

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der Technischen Hochschule
in Delft, Holland.)

Über *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer et Hartleb.

Von

T. Y. Kingma Boltjes.

Mit 18 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Februar 1936.)

Bei einer Untersuchung von Flöckchen Belebtschlamm im Dunkel-
feld zogen immer wieder dünne, aus diesen Flöckchen hervorragende
Fäden meine Aufmerksamkeit auf sich. Diese Fäden trugen an ihrem
Ende einen Knopf von Bakteriengröße. Es fiel mir auf, daß von diesen
Fäden im Hellfeld nichts zu sehen war. Dem gleichen merkwürdigen
Organismus begegnete ich später immer in meinen Anreicherungen von
nitrifizierenden Bakterien¹.

Ein genaues Studium der Literatur lehrte, daß dieser Organismus
wenig bekannt geworden ist, obwohl er schon 1897 von *Rullmann* entdeckt
und später von *Stutzer* und *Hartleb* ziemlich gut beschrieben worden ist.
Weiter geht aus der Literatur hervor, daß man diesem Organismus bei den
Untersuchungen über Nitrifikation häufig begegnet ist (*Rullmann*²,
Stutzer und *Hartleb*³, *Joshi*⁴, *Fred* und *Davenport*⁵, *Prouty*⁶ und *Gibbs*⁷). Aus
den Untersuchungen von *Stutzer* und *Hartleb*, wie aus der weiteren Literatur,
kann man ersehen, daß der Organismus allgemein verbreitet ist.

Hyphomicrobium hat zuerst *Rullmann* in seinen Nitrifikationsanhäu-
fungen gesehen. Weil er anfangs meinte, daß dieses Bakterium Nitri-
fierungsvermögen hatte, beschrieb er es unter den Namen „*Nitrosobacterium*
formae novae“. *Rullmann* schickte *Winogradsky* ein Präparat dieses Orga-
nismus, um dessen Urteil über die merkwürdige Wachstumsform zu ver-
nehmen. *Winogradsky* schickte *Rullmann* eine Photographie einer An-
reicherung von *Nitrosomonas*, worauf auch dieser Organismus vorkam, mit der
Mitteilung, er finde diese Wachstumsform sehr merkwürdig, könne aber
keine Erklärung dafür finden. Soweit mir bekannt, hat *Winogradsky* dem
Organismus nie weitere Aufmerksamkeit geschenkt.

¹ Die vorliegende Arbeit ist eine vornehmlich in morphologischer
Richtung weitergeführte Untersuchung, deren erste Ergebnisse mitgeteilt
sind in *T. Y. Kingma Boltjes*, Onderzoekingen over nitrificeerende Bacteriën.
Proefschrift. Delft 1934. — ² *W. Rullmann*, Centralbl. f. Bakt. II, **3**, 229,
1897; **4**, 152, 1898; **5**, 716, 1899. — ³ *A. Stutzer* u. *R. Hartleb*, ebenda II, **3**,
621, 1897; **5**, 678, 1899; Mitt. landw. Inst. Breslau **1**, 75, 197, 1899. —
⁴ *N. V. Joshi*, Memoirs of the Dep. of Agric. in India **1**, 86, 1915. —
⁵ *E. B. Fred* u. *A. Davenport*, Soil Science **11**, 389, 1921. — ⁶ *Chas. C.*
Prouty, ebenda **28**, 125, 1929. — ⁷ *W. M. Gibbs*, ebenda **8**, 427, 1919.

Stutzer und *Hartleb* meinten anfangs, daß dieser Organismus, dem sie regelmäßig in ihren *Nitrobacter*-Anreicherungen begegneten, eine besondere Form ihres „Salpeterpilzes“ sei. Auch sie hielten ihn lange Zeit für identisch mit *Nitrobacter* und hatten viel Mühe, ihn davon zu trennen. Nachdem ihnen dies gelungen war und sie Reinzuchten bekommen hatten, bemerkten sie, daß ihre Vermutung nicht richtig war. Sie untersuchten nun den Organismus, den sie *Hyphomicrobium vulgare* nannten, eingehend. Sie fanden ihn in allen untersuchten Erdproben mit Nitrifizierungsvermögen aus fast allen Teilen der Welt. Weil *Hyphomicrobium* immer in den *Nitrobacter*-Anhäufungen vorkam, hielten sie es für nicht ausgeschlossen, daß es irgendwie die Nitrifikation begünstigt. An Reinzuchten, die sie mit Hilfe von Nitritagarplatten gewonnen hatten, untersuchten sie seinen Stoffwechsel.

Auch *Joshi* sowie *Fred* und *Davenport* begegneten dem Organismus in ihren nitrifizierenden Kulturen, wie deutlich aus den von ihnen gegebenen Photographien hervorgeht. Weil sie ihn nicht als Verunreiniger ihrer Kulturen erkannt haben, hielten sie ihre nitrifizierenden Kulturen für rein. Infolgedessen meinen sie, daß ihre nitrifizierenden Bakterien auch heterotroph leben können, was jedoch bekanntlich nicht zutrifft.

Proaty fand in seinen nitrifizierenden Kulturen ebenfalls *Hyphomicrobium*, das er unter allen Verunreinigungen am schwersten von *Nitrobacter* trennen konnte.

Sehr wahrscheinlich hat auch *Gibbs* *Hyphomicrobium* in seinen nitrifizierenden Kulturen gesehen, was aus seiner Veröffentlichung allerdings nicht mit Sicherheit hervorgeht.

Daß *Hyphomicrobium* so oft in nitrifizierenden Kulturen gefunden wird, hängt, wie später erwähnt werden soll, mit den geringen Ansprüchen dieses Organismus an die Kohlenstoffnahrung zusammen. Weil es in der Kulturflüssigkeit für *Nitrobacter* genau so gut wie dieses Bakterium wächst, ist es sehr schwierig, die beiden Organismen zu trennen. Obwohl *Hyphomicrobium* schon ziemlich ausführlich von *Stutzer* und *Hartleb* untersucht wurde, waren doch noch eingehendere Untersuchungen über seinen Stoffwechsel sowie seine Morphologie erwünscht.

Die Isolierung.

Trotz der Anweisungen von *Stutzer* und *Hartleb* machte mir die Isolierung von *Hyphomicrobium* mehr Mühe als ich erwartet hatte. In den Kolonien, die ich auf Nitritagarplatten erhielt, indem ich aus einer *Nitrobacter*-Anreicherung abstrich, fand ich nie Bakterien mit Fäden. Die Ursache könnte sein, daß *Hyphomicrobium* auf diesen Platten nicht wachsen konnte, aber es ist auch möglich, daß der Organismus noch zu wenig angereichert war. Auch Anreicherungen in einem Natriumformiatmedium, wie sie *Stutzer* und *Hartleb* angeben, waren anfangs erfolglos. Schließlich gelang mir die Kultur, als ich von einer ausgetrockneten Rohkultur von *Nitrobacter* ausging. Aus diesem Kölbchen wurden die gewöhnliche *Nitrobacter*-Nährlösung und eine solche mit Zusatz von Natriumformiat beimpft. In beiden entwickelte sich der gesuchte Organismus gut. Auch später bestätigte sich, daß *Hyphomicrobium* Austrocknen gut verträgt. Aus den obenerwähnten Kulturen wurde nun auf Kieselsäureplatten abgestrichen. Auf diesen Platten fand ich flache Kolonien, die von *Hyphomicrobium* gebildet sein mußten, indem

ich unter dem Mikroskop im Dunkelfeld zahlreiche Bakterien mit den typischen Fäden sah. Die Kolonien erreichten einen Durchmesser von 0,5 bis 1 mm. Mit einem Pipettchen wurde eine Kolonie aufgesogen, in einen Tropfen steriles Wasser ausgeblasen und schließlich aufs neue auf einer Kieselsäureplatte abgestrichen, auf der sich dann derselbe Kolonientypus entwickelte. Von diesen Kolonien wurden einige in die *Nitrobacter*-Nährlösung und in Peptonwasser geimpft. Von Entwicklung war in diesen Medien mit bloßem Auge nichts zu sehen; ein beimpftes Kölbchen sah höchstens etwas trüber aus als ein unbeimpftes.

Bei mikroskopischer Untersuchung stellte sich aber heraus, daß *Hyphomicrobium* vorzüglich gewachsen war. Aus dem Kölbchen mit Peptonwasser wurde auf Peptonagar abgestrichen. In den ersten 5 Tagen war mit bloßen Augen auf diesen Platten nichts zu finden, unter dem Mikroskop sah ich

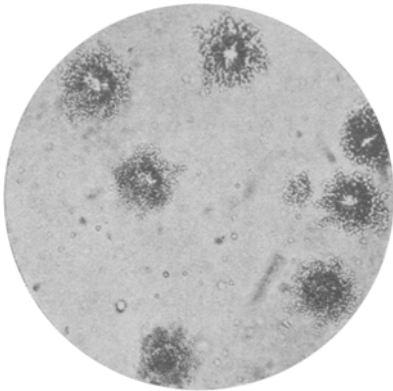


Abb. 1. *Hyphomicrobium*. Alte Kolonien auf Pepton-Agar (Vergr. 85 mal).

aber deutlich winzige Kolonien, die nach etwa 10 Tagen auch mit unbewaffneten Augen zu sehen waren. Abb. 1 zeigt ältere Kolonien auf Peptonagar. Auch von einer dieser Platten wurde eine Kolonie zerteilt und aufs neue auf Peptonagar abgestrichen. Die Platte zeigte nur einen dem der vorigen Platte gleichen Kolonientypus, so daß ich die erhaltene Kultur für rein halten durfte.

Im Gegensatz zu *Stutzer* und *Hartleb* muß ich also schließen, daß *Hyphomicrobium* in Peptonwasser und auf Peptonagar gut wächst. Es sieht so aus, als habe man früher dem p_H dieser Nährböden zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Auch aus *Nitrosomonas*-Kulturen konnte ich mit Hilfe von Nitritagarplatten *Hyphomicrobium* isolieren. Schließlich zeigten sich Tropfen von langsam tropfenden, wenig gebrauchten Wasserhähnen als ein sehr geeignetes Ausgangsmaterial. Wenn man ein Präparat von solchen Tropfen macht, findet man im Dunkelfeld fast immer die typischen Formen von *Hyphomicrobium*. Das regelmäßige Vorkommen dieses Organismus an solchen Stellen wird durch die unten zu besprechende Art des Stoffwechsels wohl einigermaßen verständlich. Will man aus diesen Tropfen *Hyphomicrobium* anreichern, so bringt man sie am besten in das Nitritmedium für *Nitrobacter*.

Bei den Untersuchungen über den Stoffwechsel in Reinkulturen von *Hyphomicrobium* hat sich, den Ergebnissen *Stutzers* und *Hartlebs* entsprechend, herausgestellt, daß dieser Organismus sehr gut auf Na-Formiat als Kohlenstoffquelle und Nitrat als Stickstoffquelle wächst. Auf diesem Nährboden kann man *Hyphomicrobium* sehr bequem erhalten.

Der Stoffwechsel.

Die Untersuchungen von *Stutzer* und *Hartleb* geben kein klares Bild über den Stoffwechsel *Hyphomicrobiums*. Vor allem ist es auffallend, daß dieser Organismus, nach *Stutzer* und *Hartleb*, sehr gut in einer sehr reinen anorganischen Nährlösung mit Nitrat als Stickstoffquelle wächst. Aus der Tatsache, daß das Wachstum darin durch Zusatz von Carbonaten sehr verbessert wurde, schließen sie, unter Vorbehalt, daß der Organismus zur Kohlensäureassimilation befähigt sei. Dies ist indessen sehr unwahrscheinlich, da es völlig unverständlich ist, woher *Hyphomicrobium* die für die Kohlensäurereduktion benötigte Energie nehmen sollte. *Stutzer* und *Hartleb* haben auch selber dieses Bedenken geäußert, und auch ihnen kommt es nicht unmöglich vor, daß das Wachstum der Anwesenheit von Spuren organischer Stoffe zu verdanken sei.

Ich konnte ebenfalls feststellen, daß der Organismus sich in Leitungswasser, dem nur 0,1 % Kaliumnitrat und 0,1 % Dinatriumphosphat zugesetzt war, also in der erwähnten anorganischen Nährlösung, gut entwickelte. Es stellte sich aber heraus, daß ein Zusatz von Natriumcarbonat, der von *Stutzer* und *Hartleb* für unentbehrlich gehalten wurde, völlig überflüssig ist. Die Kohlensäureassimilationstheorie wurde dadurch noch weniger wahrscheinlich, und man mußte schon schließen, daß das beobachtete Wachstum auf Kosten organischer Stoffe stattgefunden hatte, die entweder aus dem Leitungswasser oder aus der Luft stammten.

Der Versuch wurde deshalb in sorgfältig gereinigten Quarzkölbchen wiederholt, während für die Bereitung der Nährlösung Wasser, das in einer Quarzapparatur unter Zufügung von Permanganat und Schwefelsäure destilliert worden war, verwendet wurde. Es wurden die folgenden wiederholt umkristallisierten Salze zugefügt: 0,05 % Natriumchlorid, 0,05 % Magnesiumsulfat, 0,001 % Ferrosulfat, 0,001 % Kaliumchlorid und 0,1 % Dinatriumphosphat.

Nach 14 Tagen konnte festgestellt werden, daß *Hyphomicrobium* sich auch in dieser Nährlösung gut entwickelt hatte. Wir müssen daraus also schließen, daß der Organismus von den Spuren organischer Stoffe, die in der Luft vorhanden sind, leben kann. In dieser Hinsicht gleicht *Hyphomicrobium* dem *Bac. oligocarbophilus*, den *Beijerinck* und *van Delden* 1903 isolierten, und von dem sie zweifellos feststellten, daß er von den Spuren organischer Stoffe, die in der verunreinigten Luft bewohnter Räume vorhanden sind, wachsen kann.

Als einmal bestätigt war, daß *Hyphomicrobium* tatsächlich von Spuren organischer Stoffe wachsen kann, schien es mir von Bedeutung, der Frage nachzugehen, ob das in Lösungen mit Pepton, Rohrzucker und fettsauren Salzen beobachtete Wachstum wirklich auf Kosten dieser organischen Verbindungen stattgefunden hatte. Dazu mußten notwendig die Wachstumsversuche in völlig von organischen Stoffen befreiter Luft wiederholt werden.

Es wurden dazu wieder Quarzkölbchen und sehr reines Wasser verwendet und die in Tabelle I angegebenen Salze und organischen Ver-

bindungen zugesetzt. Die Hälfte der Kölbchen wurde in Exsikkatoren aufgestellt, durch die langsam Luft geblasen wurde, die erst eine Waschflasche mit starker Schwefel- und Chromsäure, dann eine mit 20 % Kalilauge und schließlich eine mit destilliertem Wasser durchströmte. Die letzte Flasche diente nur zur Befeuchtung der Luft, weil sonst während des dreiwöchigen Versuchs die Kölbchen zu sehr austrocknen würden. Die Röhre, durch die die Luft aus dem Exsikkator entwich, war ebenfalls durch eine Waschflasche mit Schwefel- und Chromsäure abgeschlossen, wodurch es unmöglich war, daß bei vorkommender Absperrung der Preßluft ungewaschene Luft Zutreten würde. Als Indikator für die tatsächliche Reinheit der durchgeblasenen Luft wurde in diesem Versuch *Bac. oligocarbophilus* einbezogen, den ich ohne Mühe nach dem von *Beijerinck* angegebenen Verfahren aus Gartenerde isolieren konnte. Die Kölbchen mit den verschiedenen Nährlösungen wurden wie folgt über sechs Exsikkatoren verteilt. In Exsikkator I die Kölbchen 1, 11, 13; in II 4 und 14; in III 6 und 16; in IV 10; in V 5, 7, 15; in VI 2, 3, 8, 9, 12. In allen Exsikkatoren, ausgenommen in IV, war also auch *Bac. oligocarbophilus* vorhanden.

Tabelle I. Einfluß von Reinigung der Luft auf die Entwicklung von *Hyphomicrobium vulgare* und *Bacillus oligocarbophilus*.

Medium Nr.	Stammlösung*, der zugefügt wurde:	Wachstum in nicht gereinig- ter Luft (nach 3 Wochen)	Wachstum in gereinigter Luft (nach 3 Wochen)
		<i>Hyphomicrobium vulgare.</i>	
1	—	mäßig	kein
2	0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	gut	"
3	0,1 % KNO_3	"	"
4	0,1 % Na-Formiat	sehr gut	sehr schwach
5	0,1 % Na-Formiat + 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	" "	sehr gut
6	0,1 % Na-Formiat + 0,1 % KNO_3 . .	" "	" "
7	0,1 % NH_4 -Formiat	" "	" "
8	0,1 % Na-Acetat + 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	gut	gut
9	0,1 % Rohrzucker + 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	"	kein
10	0,1 % Asparagin	mäßig	"
		<i>Bacillus oligocarbophilus:</i>	
11	—	gut	kein
12	0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	"	"
13	0,1 % KNO_3	"	"
14	0,1 % Na-Formiat	"	"
15	0,1 % NH_4 -Formiat	"	"
16	0,1 % Na-Formiat + 0,1 % KNO_3 . .	"	"

* Sehr reines Wasser + 0,1 % Na_2HPO_4 + 0,05 % NaCl + 0,05 % MgSO_4 + 0,001 % FeSO_4 + 0,001 % KCl .

Die Ergebnisse des Versuchs gibt Tabelle I. Aus der Tatsache, daß *Bac. oligocarbophilus* in keinem der Exsikkatoren gewachsen war, während er sich in an der normalen Luft gehaltenen Kölbchen gut entwickelte, geht hervor, daß die durchgeblasene Luft tatsächlich von jeder Spur organischer Stoffe gereinigt war. Wenn also *Hyphomicrobium* in den Exsikkatorkölbchen gewachsen ist, so muß dies den zugesetzten organischen Verbindungen zu verdanken sein. Wir sehen, daß

Hyphomicrobium sich auf Kosten einiger fettsaurer Salze wie Formiat und Acetat entwickeln kann, nicht aber auf Rohrzucker oder Asparagin. Daß in der stickstofffreien Nährlösung 4 in der gereinigten Luft ein schwaches Wachstum aufgetreten ist, wird wahrscheinlich durch die Spuren von Stickstoffverbindungen ermöglicht worden sein, die noch in dieser Lösung anwesend waren.

Aus den obenerwähnten Versuchen geht also hervor, daß, im Gegensatz zu *Bac. oligocarboophilus*, *Hyphomicrobium* einige einfache Kohlenstoffverbindungen anzugreifen vermag, daß dagegen Rohrzucker und Asparagin ungeeignete Kohlenstoffquellen sind, aber das Wachstum auf Kosten der organischen Verbindungen der Luft keineswegs behindern. Es ist nicht klar, weshalb *Stutzer* und *Hartleb* bei Anwesenheit von Rohrzucker kein Wachstum gefunden haben. Vielleicht ist der p_H -Wert der von ihnen verwendeten Nährlösung daran schuld gewesen, da *Hyphomicrobium* schon durch eine sehr schwache Azidität merkbar in seinem Wachstum gehemmt wird. Daß die beiden Autoren andererseits so günstige Ergebnisse in ihrer Asparaginnährlösung erhalten, muß vielleicht der geringeren Reinheit des von ihnen verwendeten Präparats zugeschrieben werden; das von mir verwendete Asparagin war sorgfältig einige Male umkristallisiert worden.

Die Entdeckung von *Bac. oligocarboophilus* durch *Beijerinck* und *van Delden* hat uns zum ersten Male mit einem für die biologische Reinigung der Luft in Frage kommenden Organismus bekannt gemacht; die oben beschriebenen Versuche lassen keinen Zweifel, daß auch *Hyphomicrobium vulgare* diese Eigenschaft zugeschrieben werden muß.

Die Morphologie.

Wie wir schon gesehen, besteht die Merkwürdigkeit dieses Organismus darin, daß er eine submikroskopische Wachstumsform hat, die

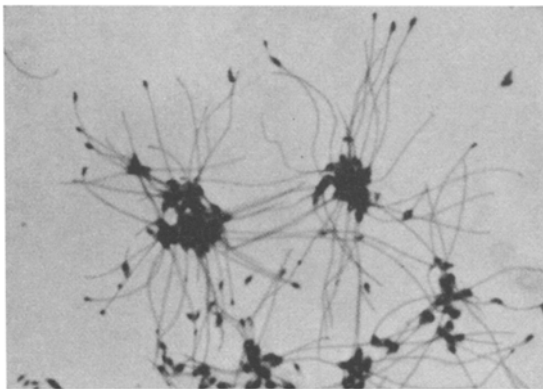


Abb. 2. *Hyphomicrobium*. Schwach gebeizt und gefärbt mit Carbofuchsin (Vergr. 1700 mal).

im Hellfeld nicht zu sehen ist. Dieser Umstand wird sicher dazu beigetragen haben, daß er so wenig bekannt geworden ist. Neben der Dunkelfeldbeleuchtung macht nur Färbung, z. B. mit Carbofuchsin, die Fäden sichtbar, besonders wenn man sie zuvor schwach mit Zettnow-Beize gebeizt hat (Abb. 2).

Wenn man *Hyphomicrobium* im Dunkelfeld besieht, so fällt es gleich auf, daß die Form sehr stark abhängt von der Art des verwendeten Kulturmediums. In Peptonwasser, in Kulturen auf festen Nährböden und in Anhäufungen von *Nitrobacter* zeigt *Hyphomicrobium* nur kurze Fäden (Abb. 3). Viel stärker ist das Wachstum in der obenerwähnten Natriumformiatnährlösung, wie man aus Abb. 4 und 5 ersieht. Die submikroskopischen Fäden wachsen hier erstaunlich lang aus und zeigen bisweilen wahre Verzweigungen.

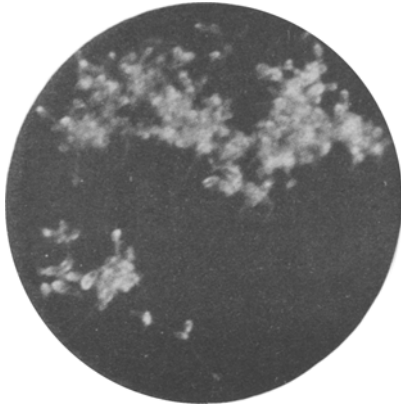


Abb. 3. *Hyphomicrobium* in Peptonwasser. Kardioid Kond.; Apochr. „X“; Komp. Ok. 20 mal (Vergr. 1400 mal).

Wie schon erwähnt, ist von diesen Fäden im Hellfeld nichts

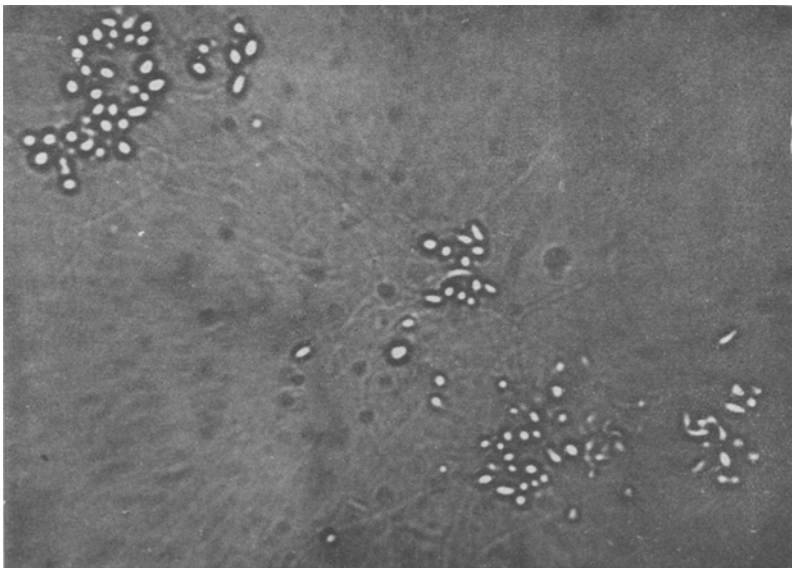


Abb. 4. *Hyphomicrobium* (unscharf eingestellt). Aplan. Kond.; Apochr. N. A. 1,4; Komp. Ok. 12 mal (Vergr. 1400 mal).

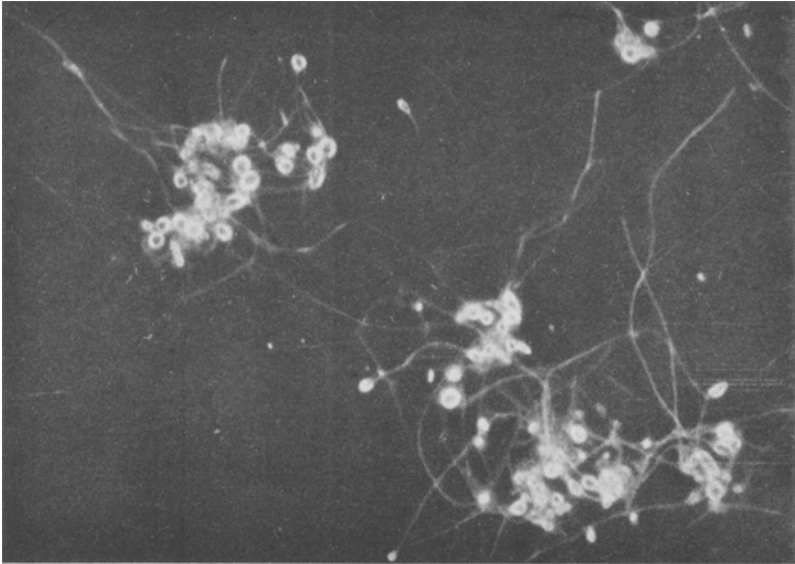


Abb. 5. *Hyphomicrobium*. Kardioid Kond.; Apochr. „X“; Komp. Ok. 20 mal (Vergr. 1400 mal).

zu sehen. Nur bei unscharfer Einstellung (Abb. 4) kann man im Hellfeld die Andeutung der Fäden erkennen. Bei direkter mikroskopischer Beobachtung kann man die Fäden noch weniger unterscheiden als auf der Aufnahme.

Was ist nun die Bedeutung dieser Fäden? Eine Antwort auf diese Frage bekommt man am leichtesten durch Vergleich von Kulturen verschiedenen Alters. Einige Tage nach der Impfung sieht man hauptsächlich sich lebhaft bewegende Zellen ohne

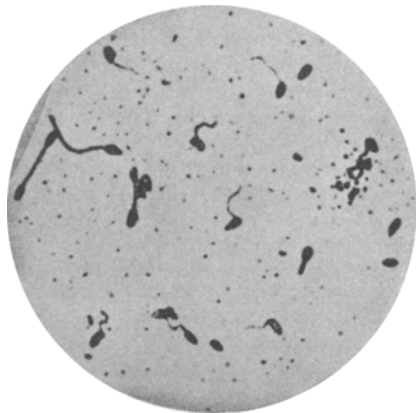


Abb. 6. *Hyphomicrobium*. Zeltnow-Geißelfärbung. (Vergr. 1700 mal.)

Fäden. Nach einiger Zeit nimmt ihre Zahl ab, und an vielen der zur Ruhe gekommenen Organismen, aber auch schon bei einigen noch beweglichen Zellen, sieht man einen kurzen Faden. Weil Faden und Zelle ein starres Ganzes bilden, dient der Faden zweifellos nicht zur Bewegung. Auf Abb. 6, wo es gelungen ist, an einzelnen Zellen die Geißel sichtbar zu machen, ist deutlich der Unterschied zwischen Geißel und Faden zu sehen. Beim Altern sieht

man in vielen Fällen auch an dem anderen Ende des Fadens eine Zelle entstehen. Die Größe der neuen Zelle schwankt von der eines kaum sichtbaren Knopfes bis zu der eines normalen, erwachsenen Exemplars. Daraus wurde geschlossen, daß hier nicht Kopulation stattfindet, wie man zuerst meinen könnte, sondern daß an dem freien Fadenende eine neue Zelle auswächst. Impft man eine Kultur in diesem Stadium über, so sieht man zuerst wieder hauptsächlich freie, bewegliche Zellen, eine Tatsache, die darauf hinweist, daß die an den Fäden sitzenden Zellen sich gelöst haben. Allerdings könnten auch noch auf andere Weise, z. B. durch normale Teilung, neue Zellen entstanden sein; falls jedoch die Zellen sich tatsächlich von dem Faden gelöst haben, wird man schließen können, daß die Fadenbildung bei der Vermehrung eine wesentliche Rolle spielt.

Stutzer und *Hartleb*, die ebenfalls versucht haben, die Entwicklung von *Hyphomicrobium* zu verfolgen, kamen im allgemeinen zu den gleichen Ergebnissen. *Henrici* und *Johnson*¹ wollen aber, allerdings nur auf Grund der vorliegenden Literatur, in den Fäden nur ein Befestigungsmittel sehen. Neue Gründe werden für diese Ansicht jedoch nicht angeführt.

Die einzige Möglichkeit, dem Zweifel ein Ende zu machen, lag in der unmittelbaren Beobachtung des Wachsens der einzelnen Zellen. Selbstverständlich ist dabei die Dunkelfeldbeleuchtung unentbehrlich.

Um bei der Isolierung der zu beobachtenden Zellen in der Feuchtkammer genügend Bewegungsfreiheit zu haben, mußte der Dunkelfeldkondensator eine Brennweite von mindestens 4 mm besitzen. Der von *Zeiss* für solche Zwecke gelieferte Präparierkondensator entspricht zwar dieser Anforderung, aber seine numerische Apertur (0,7 bis 0,8) war zu klein, als daß man mit einem Objektiv von genügendem Auflösungsvermögen ein gutes Dunkelfeld bekam. Bei einem Objektiv, dessen num. Ap. 0,4 übersteigt, bekommt man schon kein gutes Dunkelfeld mehr. Wegen des winzigen Durchmessers der *Hyphomicrobium*-Fäden verwendet man besser ein Objektiv mit etwas größerem Auflösungsvermögen. Ich dachte dann an den großen Gaskondensator² von *Zeiss* (Nr. 114 521, num. Ap. 0,96 bis 0,98), der sich tatsächlich für diesen Zweck als sehr geeignet erwies. Verwendet man diesen Kondensator zusammen mit dem Apochromat „X“ — einer Ölimmersion, ausgestattet mit Irisdiaphragma — und Kompensationsokular 20×, so kann man die *Hyphomicrobium*-Fäden sehr gut in dem hängenden Tropfen sehen. Eine 5 Amp. Wechselstrombogenlampe diente als Lichtquelle.

Von einer Suspension von *Hyphomicrobium* im Nährmedium mit Natriumformiat wurden mit Hilfe des Mikromanipulators kleine Tropfen auf ein Deckglas ausgesetzt, das dann auf eine Glaskammer gelegt wurde, in der etwas feuchtes Filtrierpapier war, damit die Tropfen

¹ A. T. *Henrici* u. *Delia E. Johnson*, J. of Bact. 30, 61, 1935. — ² Mit diesem Gaskondensator kann man auch in der Bakterienzählkammer von *Reichert* ein Dunkelfeld bekommen. Mit dem Objektiv D und Komp. Ok. 20× unterscheidet man dann die Bakterien sehr gut; auch die Verteilung ist gut sichtbar.

nicht austrockneten. Das Ganze wurde unter das Mikroskop gelegt und alles mit der Bogenlampe in einem Raum von 30° C aufgestellt. Zu meinem Bedauern kam in keinem der Tropfen auch nur ein einziges Bakterium zu Entwicklung, selbst nicht nach tagelangem Warten. Die Ursache läßt sich schwer vermuten.

Zunächst nahm ich an, daß das Wachstum infolge der starken Beleuchtung ausblieb, obwohl ich vor der Lampe eine Küvette mit Kupfersulfatlösung und eine mit Aurantiagelblösung (welches Filter alles Licht unter 5100 Å absorbiert) gestellt hatte. Um über die Schädlichkeit der Beleuchtung Auskunft zu erhalten, brachte ich auf die Deckgläser zweier feuchter Kammern ein Stückchen Formiatagar und beimpfte beide mit *Hyphomicrobium*. Die Kämmerchen wurden geschlossen und das eine wurde durch die Dunkelfeldkondensor nach jeder Stunde einige Minuten beleuchtet, während das andere nicht beleuchtet wurde. Das Wachstum war in beiden Fällen dasselbe. Es muß also aus einer anderen Ursache das Wachstum in den Tropfen unterblieben sein.

Weil das Wachstum auf Agar sehr gut ist, versuchte ich, auf die Deckgläser so dünne Agarschichten zu legen, daß ich durch die Schicht hindurch *Hyphomicrobium* mit der Ölimmersion beobachten konnte. Dies war ziemlich leicht: Das Deckglas wurde in eine *Petri*-Schale schräg hingelegt, die Oberfläche zwecks Sterilisation flambiert und das ganze so über ein kochendes Wasserbad gesetzt, daß es gleichmäßig erhitzt wurde. Dann wurden auf das Deckglas einige Tropfen des möglichst heißen Formiatagars aufgetragen. Das überflüssige Agar wurde später mit einem *Gillette*-Messer weggeschnitten. Zur Beseitigung der bei der Dunkelfeldbeleuchtung wegen ihrer starken Lichtausstrahlungen störenden mikroskopischen Agarkörnchen wurde das Formiatagar vorher mit Eiweiß geklärt. Um dem Austrocknen der dünnen Agarschicht während des Versuchs vorzubeugen, wurden ringsum, und teilweise auch über die Schicht, Formiatagarstreifen gelegt. Auf die in der Mitte frei gebliebene dünne Schicht wurde ein Tröpfchen der flüssigen Kultur aufgetragen und mit dem Platindraht ausgestrichen. Dann wurde das Kämmerchen geschlossen. Ein solches Kämmerchen besteht aus einer kupfernen Leiste von 40 × 50 mm, 0,3 mm hoch mit *De Khotinsky*-Zement auf Glas gekittet. Das Kämmerchen muß so groß sein, weil der Durchmesser des aus dem Dunkelfeldkondensor tretenden Lichtkegels ziemlich groß ist. Das Mikroskop wurde in einem kleinen Erwärmungsschrank von *Zeiss* aufgestellt, der es ermöglicht, das Objekt bei der gewünschten Temperatur, in diesem Falle 28° C, zu halten, ohne daß die visuelle Beobachtung gehindert wird. Die Beleuchtung geschah mittels einer 5 Amp. Gleichstrombogenlampe.

Alle 2 Stunden wurde eine Aufnahme des Präparats gemacht mit dem photographischen Okular „Phoku“ von *Zeiss* auf Wellington-Ortho-Process-Platten. Obwohl diese zu Reproduktionszwecken viel verwendeten Platten wenig empfindlich sind, stellte sich heraus, daß sie für das von mir verwendete gelbgrüne Licht viel empfindlicher sind als ultrarapides und panchromatisches Material. Die Beleuchtungsdauer war 3 Minuten, die Vergrößerung auf dem Negativ 300 ×. Zur näheren Untersuchung der Aufnahmen wurden 5 × vergrößerte Positive gemacht.

Die erste Aufnahme geschah ungefähr 1 Stunde nach der Bestimmung, die zweite etwa 14 Stunden später. Die hier wiedergegebene

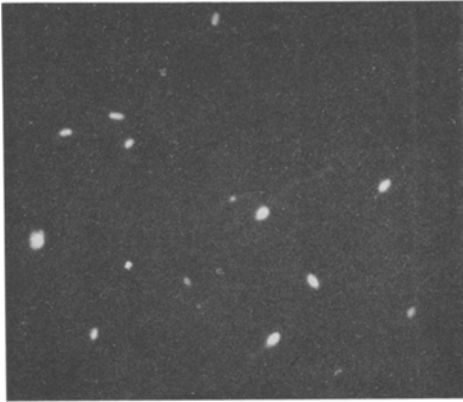


Abb. 7.

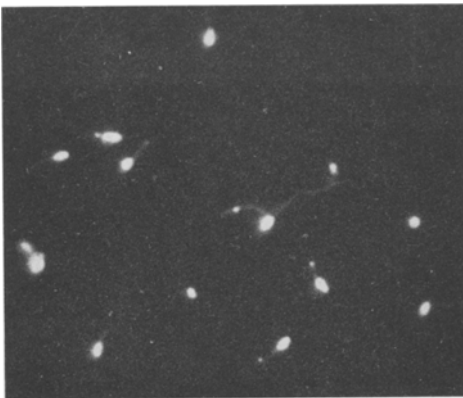


Abb. 8.

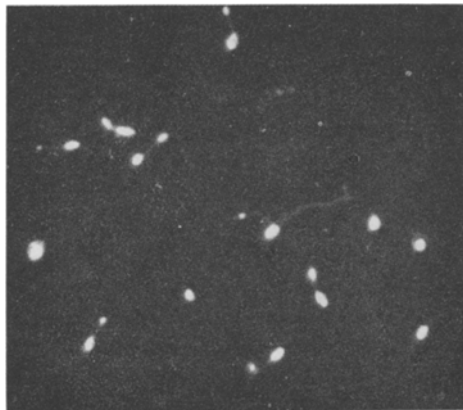


Abb. 9.

Bilderreihe (Abb. 7 bis 11, Vergrößerung 1000 mal) stellt den Anfang einer Reihe von 24 Aufnahmen dar. Sie bildet keine völlig zusammenhängende Reihe, da zwecks Raumersparnis die meisten Aufnahmen weggelassen sind. Zwischen Abb. 8 und 9 und zwischen Abb. 9 und 10 liegen jedesmal 4 Stunden. In der Mitte der Bilder liegt eine Zelle mit zwei Fäden, eine Besonderheit, die aber die Orientierung im Bilde erleichtert. In Abb. 7 liegen nur zwei Zellen mit Fäden. Auf dem nächsten, 14 Stunden später aufgenommenen Bilde (Abb. 8) sieht man schon deutlich, daß Wachstum stattgefunden hat. Es sind nicht nur die Zellen gewachsen, sondern auch ihre Konturen sind schärfer geworden. In vielen Fällen sieht man, daß sich am Pol, dem Faden gegenüber, ein stark lichtbrechender Punkt befindet. Auf Abb. 2 sieht man in manchen Zellen, daß dieser am Pol liegende Punkt sich stärker gefärbt hat als der übrige Teil der Zelle. Man bekommt den Eindruck, als habe sich das Protoplasma an einem Pol zusammengezogen. Auf Abb. 9 sieht man deutlich, daß die Tochterzellen erheblich gewachsen sind. Am bemer-

kenswertesten ist aber, daß die Tochterzelle des rechten Fadens der doppelgestielten Zelle verschwunden ist. Auf Abb. 10 ist an ihrer Stelle eine neue Tochterzelle gewachsen.

Im ganzen sah ich an diesem rechten Faden acht neue Zellen entstehen im Laufe von 40 Stunden.

Diese Wachstumsercheinungen verfolgte ich bei 27 Zellen, und bei allen wurde nach dem Verschwinden einer Tochterzelle wieder eine neue Zelle gebildet. Durchschnittlich lagen zwischen der Abtrennung zweier junger Zellen 5 bis 6 Stunden. Ich habe die Trennung mehrmals beobachten können. Durch heftiges Zucken, Schwenken und Wirbeln mit dem freien Ende versucht die Zelle sich loszureißen. Oft dauert der Kampf länger als 1 Stunde, und die Zelle macht öfters eine Pause, um dann mit erneuten Kräften wieder anzufangen. Hat sie sich einmal gelöst, so schwimmt sie schnell davon. Die jungen Zellen kommen nach einiger Zeit zur Ruhe; dann fängt die eben geschilderte Entwicklung aufs neue an. Aus der Tat-

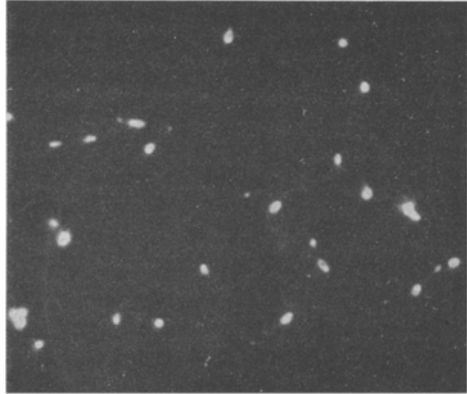


Abb. 10.

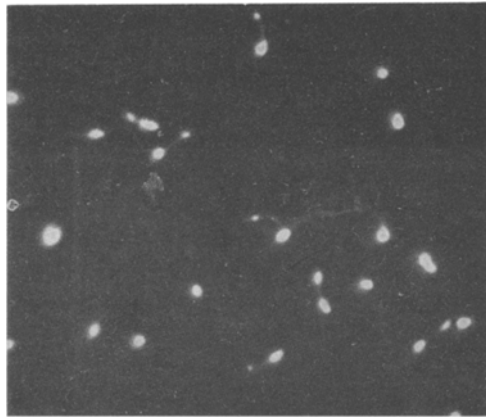


Abb. 11.

sache, daß die Tochterzelle sich so lebhaft bewegt, können wir schließen, daß die Geißel sich am freien Pol befinden muß. Schließlich war das Gesichtsfeld so von dem Organismus erfüllt, daß ich den Versuch beenden mußte. Daher konnte ich leider nicht feststellen, wie oft der Vorgang der Tochterzellenbildung sich wiederholen kann. Ich untersuchte die Bilder sehr sorgfältig, folgte der Entwicklung jeder Zelle und sah, daß sie immer auf die geschilderte Weise vor sich ging.

Besonders achtete ich darauf, ob ich vielleicht einen Fall von normaler Vermehrung durch Querteilung auffinden konnte. *Stutzer*

und *Hartleb* glaubten nämlich, daß *Hyphomicrobium* sich auch noch durch normale Teilung vermehre, was aber aus den Abbildungen, aus denen sie dies schließen, keineswegs überzeugend hervorgeht. Anfangs schien mir die normale Teilung nicht ausgeschlossen zu sein, weil nur so erklärlich schien, weshalb junge Kulturen vorwiegend fadenlose bewegliche Zellen enthalten. Dies wird jedoch genügend erklärt durch die Tatsache, daß jede Mutterzelle eine Reihe von Tochterzellen erzeugt.

Obgleich es mir fast sicher schien, daß bei *Hyphomicrobium* keine normale Querteilung stattfindet, stellte ich doch zur Sicherheit einen

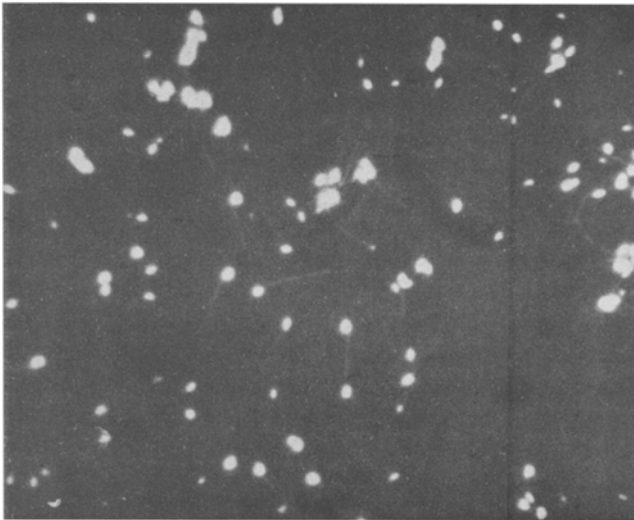


Abb. 12.

neuen Wachstumsversuch an, der jedoch mißlang, weil das Agar soviel Wasser auspreßte, daß das Präparat verschwamm. Als der dritte Versuch aus demselben Grunde zu mißlingen drohte, versuchte ich ihn zu retten, indem ich mit Filtrierpapier das überflüssige Wasser wegnahm, was tatsächlich Erfolg hatte. Die Entwicklung dieses Präparats wurde während 36 Stunden verfolgt und in einer Reihe von 14 Bildern festgelegt, von denen hier einige wiedergegeben sind.

Wenn man die ersten Bilder beobachtet (Abb. 12 und 13, Vergr. 1000 mal), findet man ganz die oben beschriebene Entwicklung wieder. Genau wie im vorigen Versuch sieht man an den noch ungestielten Zellen einen Faden entstehen, woran dann eine neue Zelle wächst. Anstatt fortzuschwimmen bleibt hier aber die neue Zelle liegen und wird breiter. In vielen Fällen sieht es so aus, als teile sich die Zelle in der Länge. Nach einiger Zeit wächst an der verbreiterten Basis ein zweiter Faden dem ersten parallel. Am Ende des neuen Fadens entsteht wieder eine neue Zelle, man verfolgte

z. B. Zelle Nr. 1¹. Dieses abweichende Benehmen hat seinen Grund darin, daß die Platte so trocken war, daß es den jungen Zellen unmöglich war fortzuschwimmen. Daß die Bewegungslosigkeit eines Teiles der Zellen wirklich in Trockenheit seine Ursache hatte, ersah ich daraus, daß es an anderen Stellen des Präparats lebhaft schwimmende Zellen gab. Gelangen diese Zellen zu nahe an die Ränder der Wassertropfen, so konnten sie nicht weiter kommen und mußten zurück. Auf den Photographien kamen auch einige nasse Stellen vor, und man sah, daß da jede neue Zelle fortschwamm, genau wie im vorigen Präparat.

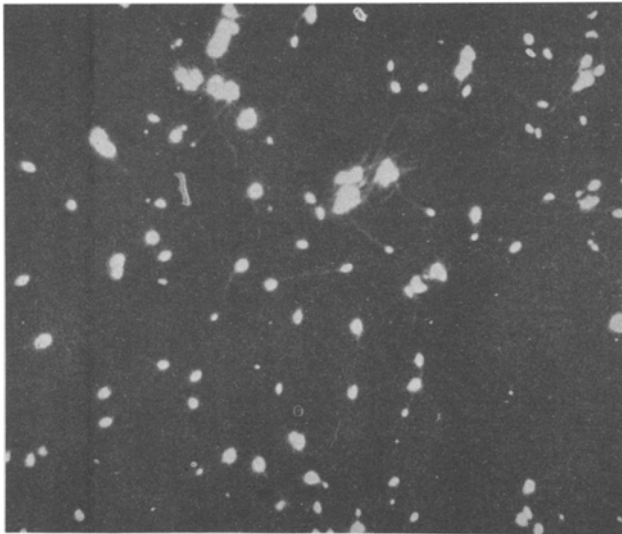


Abb. 13.

Aus der Tatsache, daß die Tochterzellen nur dort neue Fäden bilden, wo sie am Mutterfaden festsitzen, dürfen wir schließen, daß sie das nur an dem Pol der Geißel gegenüber vermögen. Mitten auf Abb. 6 liegt eine Zelle, wo man den Anfang der Fadenbildung schon spürt, und auch hier vollzieht sich dies am geißelfreien Pol. Es entstehen auf diese Weise sehr komplizierte Gebilde, die scheinbar ein Ganzes darstellen. Es stellte sich bei näherer Betrachtung aber heraus, daß dies eine optische Täuschung ist². Wenn man nämlich mit Hilfe des Mikro-

¹ Die Nummern der Zellen sind in Abb. 15 markiert. — ² Es ist ein Nachteil der Dunkelfeldbeleuchtung, daß sie oft ein falsches Bild gibt. Hat man z. B. in einem Präparat von stäbchenförmigen Bakterien zwei Individuen, die gekreuzt liegen, oder liegt das Ende des einen Bakteriums der Seite der anderen an, so ist oft an der Stelle der Berührung die Zellwand gar nicht mehr zu sehen oder nur sehr schwach, und es macht den Eindruck, als liege hier wahre Verzweigung vor.

manipulators mit einem sehr feinen Glasdraht das Gebilde berührt, so fällt es beim leichtesten Anstoß in mehrere normale, oft noch bewegliche Zellen auseinander.

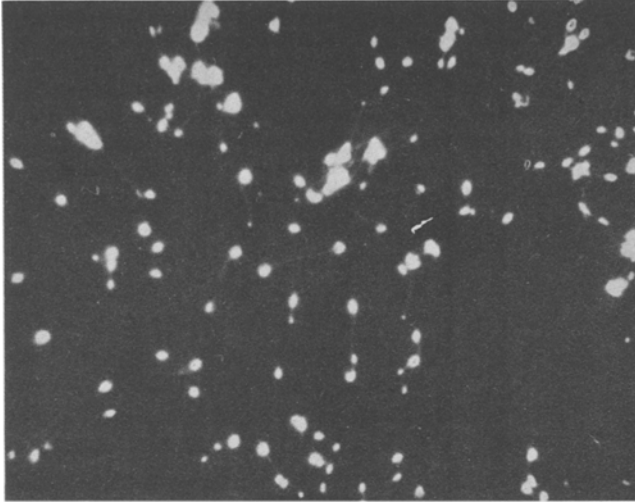


Abb. 14.

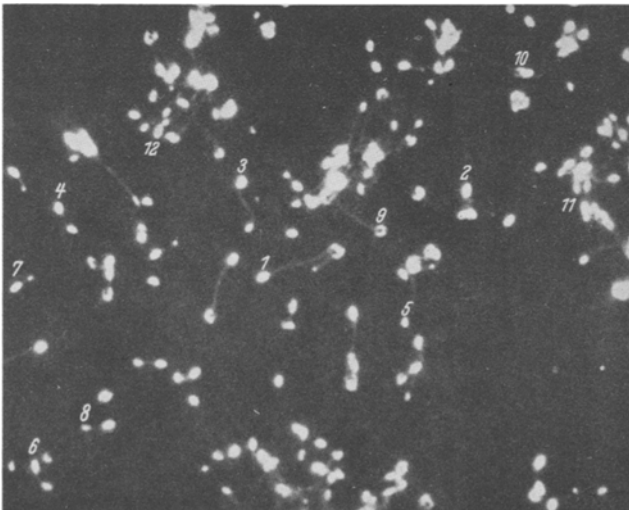


Abb. 15.

Es fragt sich nun, was eigentlich bei der Entwicklung auf den trockenen Stellen vor sich geht. Bei näherer Beobachtung meiner Bilder fielen mir einige Zellen auf, bei denen ich keine Verbreiterung feststellen konnte. Bei diesen sah ich neben der Zelle (oft im Anfang

sehr undeutlich) einen kleinen Punkt, der allmählich zu einer normalen Zelle auswuchs. Vgl. Abb. 14, Nr. 2, Abb. 16, Nr. 3, 4, 5 und 6, Abb. 17, Nr. 7 und 8.

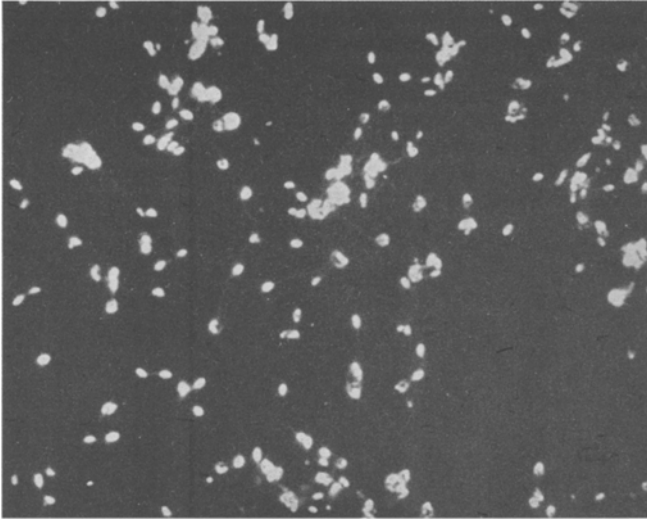


Abb. 16.

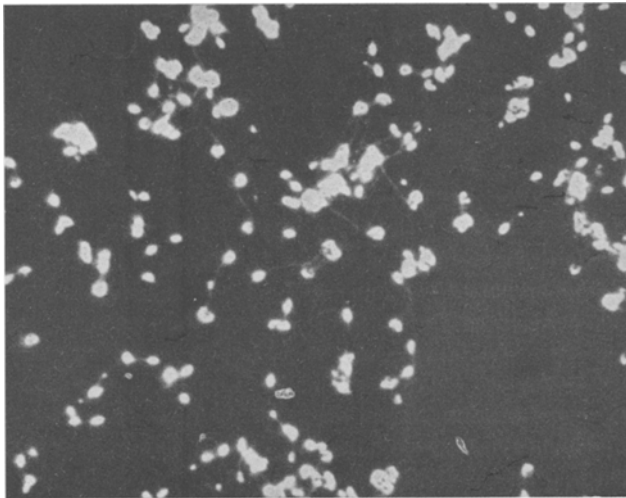


Abb. 17.

Auch in anderen Präparaten habe ich diese Vermehrungsweise deutlich beobachten können. Bei Nr. 2 sieht man später, wie zwischen zwei Zellen noch eine dritte gebildet wird. Man könnte sagen, daß hier Vermehrung durch Sproßbildung stattfindet. Es kommt mir sehr wahr-

scheinlich vor, daß bei den Zellen, die sich scheinbar verbreitern, dasselbe vorgeht. Der Sproß ist dann unsichtbar geblieben, weil er an der Unterseite der Mutterzelle entstanden ist. Die neue Zelle wird auch erwachsen nicht völlig sichtbar, und so sieht es aus, als habe die Mutterzelle sich verbreitert. In einzelnen Fällen (Abb. 15, Nr. 9), wo die verbreiterte Zelle mehr oder weniger deutlich aus zwei Zellen besteht, scheint es manchmal, als habe eine Teilung nach der Längsachse stattgefunden. Auf Grund der vorhergehenden Ausführungen kommt mir dies sehr unwahrscheinlich vor.

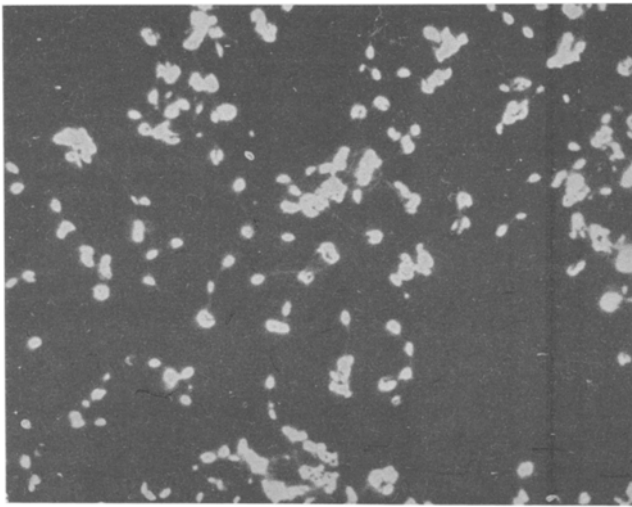


Abb. 18.

Weitere Untersuchung der Photographien gab keine neuen Gesichtspunkte mehr. Irgendwelche Belege für normale Teilung waren nicht aufzufinden, so daß man mit ziemlich großer Bestimmtheit sagen kann, daß bei *Hyphomicrobium* diese Vermehrungsweise nicht vorkommt. Wohl begegnete ich noch einzelnen, von den oben erwähnten abweichenden Fällen. So fand ich ein Exemplar, das sich, obgleich es keinen Faden hatte, doch verdoppelte. Danach wuchs an beiden Polen ein Faden aus, an dem später Tochterzellen entstanden. Auch war der Fall zu beobachten, daß zwischen Mutter- und Tochterzelle am gleichen Faden eine zweite Tochterzelle wuchs. Diese liegt dann immer der ersten Tochterzelle sehr nahe. Siehe Abb. 14, Nr. 10, Abb. 13, Nr. 11 und Abb. 12, Nr. 12.

Schließlich versuchte ich noch, inwiefern abgeschnittene Fäden und abgeschnittene junge Zellen lebensfähig waren. Es gelang mir aber nicht, auf der dünnen Agarschicht einen Faden zu durchschneiden. Die Fäden waren so zähe, daß ich sie in den Agar hineindrückte, ohne sie

zerschneiden zu können. Wohl gelang mir dies auf Glas, aber dann waren die Kulturverhältnisse so ungünstig, daß ich keinen Erfolg hatte.

Es erhebt sich jetzt die Frage, welche Stellung *Hyphomicrobium* im System der Mikroorganismen einnimmt. Seinen Größenverhältnissen nach würde man sicher geneigt sein, es zu den Bakterien zu rechnen. Weil aber keine Vermehrung durch Querteilung vorkommt, müssen wir schließen, daß es nicht zu den Bakterien gehört. Das fadenförmige Wachstum, obwohl submikroskopisch, erinnert an dasjenige der *Actinomyceten*. Die Tatsache aber, daß die jungen Zellen beweglich sind, läßt eine Einreihung bei diesen nicht zu. Schließlich erinnert die Form in Kulturen, in denen die Fäden sehr üppig gewachsen sind, sogar an das Mycelium der Eumyceten. Die Bildungsweise der neuen Zellen ist jedoch so von derjenigen der Zoosporen der niedrigsten *Phycomyceten* verschieden, daß auch die Einreihung bei dieser Pilzgruppe nicht erlaubt ist.

Es ist daher vorläufig nicht möglich, den Organismus in dem bestehenden System unterzubringen. Es scheint nicht unmöglich, daß es sich, wenn einmal noch andere mit *Hyphomicrobium* verwandte Organismen gefunden werden, ergeben könnte, daß diese Gruppe einen Übergang zwischen *Bakterien* und *Phycomyceten* darstellt.

Zusammenfassung.

Hyphomicrobium vulgare ist aus den Tropfen langsam tropfender, wenig gebrauchter Wasserhähne zu isolieren auf Natriumformiat-Agar mit Nitrat als N-Quelle; gegebenenfalls kann es in einer Nährlösung für Nitritbildner angereichert werden.

Der Organismus kann organische Verunreinigungen der Luft als Kohlenstoffquelle ausnutzen. Er wächst gut mit Formiaten und Acetaten, während Zucker und Asparagin nicht verwertet werden, aber die Verwertung der übrigen C-Quellen auch nicht hemmen.

Hyphomicrobium besitzt eine polare Geißel. Am entgegengesetzten Ende sprossen Fäden, die nur in Dunkelfeldbeleuchtung sichtbar sind, und an denen wieder Zellen entstehen, die sich loslösen. Teilung der Zellen fehlt; dagegen findet auf trockenerem Substrat anscheinend eine Art Sprossung statt. Eine systematische Einreihung des Organismus ist zur Zeit nicht möglich.