

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

Demonstration von Mikroorganismen der Rhizosphäre vermittels der Aufwuchsplattenmethode nach Chododny.

Von

Nicolae Hulpoi (Bukarest).

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Oktober 1936.)

Gelegentlich umfangreicher Untersuchungen an verschiedenen Böden vermittels der *Chododnyschen*¹ Aufwuchsplattenmethode sollte eine Beobachtung von *A. Rippel*² nachgeprüft werden, wonach man unmittelbar an den Wurzelhaaren höherer Pflanzen Bakterienauflagerungen beobachten kann. Ich möchte aber zunächst über einige allgemeine Erfahrungen mit der Methode berichten.

Die Verwendung von Phenolerythrosin und von „fast acid blue R“ nach *Romell*³ (di-paraäthoxyphenylrhodanaminsulfosaures Natrium, I. G. Farben, 0,05 % in wässriger Lösung + 4 % Phenol) ergab für Erythrosin eine bessere Färbung von Stäbchen, Actinomyceten und Pilzen, für den blauen Farbstoff von Kokken.

Die Versuche wurden teils im Laboratorium, teils im Freiland angestellt, und zwar:

1. In Glasgefäßen mit zweimal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je eine halbe Stunde bei $2\frac{1}{2}$ Atm. sterilisiertem Ackerboden und bei steriler Aufbewahrung, teils unbepflanzt, teils besät mit sterilisierten Samen von Senf bzw. Erbsen. Es handelte sich um 17 cm hohe und 16 cm weite Glasstutzen mit übergreifendem Deckel. Die Bodenoberfläche und der Raum zwischen Stutzen und Deckel waren mit sterilisierter Watte abgedichtet. In die Mitte des Stutzens ragte ein zweimal gebogenes Glasrohr, das mit einem Glasröhrchen verschlossen war. Durch das Rohr wurde steriles Gießwasser zugeleitet und ab und zu auch Luft abgesaugt, die somit beim Einströmen in das Kulturgefäß die Wattefilter passieren mußte.

2. In Tontöpfen mit natürlichem Ackerboden, teilweise mit Kompost, Huminal und acht verschiedenen Mineraldüngungen (Stickstoff, Kalium, Phosphorsäure), teils unbepflanzt, teils mit Hafer bzw. Lupine besät.

3. Im Freiland auf dem Dauerdüngungsversuchsfeld (*E*-Feld) des Institutes für Pflanzenbau, Göttingen, mit verschiedenen Früchten und Düngungen.

4. In großen Zementkästen des Pflanzenbauinstitutes, Göttingen, auf fünf anderen Böden verschiedener Typen.

¹ *N. Chododny*, diese Zeitschr. 1, 620, 1930. Eine leider nur russisch geschriebene Zusammenfassung mit weiteren Verbesserungsvorschlägen gibt *N. Chododny* in: *Microbiology* (russ.) 4, 153, 1935. — ² *A. Rippel*, *Der Forschungsdienst* 1, 28, 1936. — ³ *L. G. Romell*, *Stain Technology* 9, 141, 1934.

Es wurden in vier- bis zwölfmaliger Wiederholung Deckgläser eingebracht, die durch Wasseradhäsion in der Mitte eines Objektträgers festgehalten wurden. Der obere Rand des senkrecht eingegrabenen Objektträgers schnitt mit der Bodenoberfläche ab; es wurde darauf geachtet, daß die Pflanzenwurzeln sich an das Deckglas anlegen konnten. Die Deckgläser, die allein zur Untersuchung kamen, wurden in den Gefäßen 30 bis 60, im Freiland 22 bis 29 Tage belassen.

Die Ergebnisse waren recht befriedigend, soweit die Auffindung von Mikroorganismen überhaupt in Frage kommt, weniger befriedigend indessen in Hinsicht auf *klare* Unterschiede in den verschiedenen Böden. Was ich an einigermaßen Sicherem fand, sei hier ganz kurz wiedergegeben. Es sei zuvor erwähnt, daß ich auch die jüngst mit etwas anderer Methodik von *Cholodny*¹ beobachtete radiäre Anordnung von Bakterien fand.

In allen sterilen Gefäßen (unbehandelt und mit sterilen Samen bepflanzt) traten Kolonien von kleinen Kokken auf, wie sie auch *R. Meyer*² bei gleicher Behandlung von Boden auffand. Sie waren so häufig und regelmäßig vorhanden, daß ich kaum an eine Luftinfektion oder Infektion durch das Gießwasser glaube, sondern es für möglich halte, daß es Formen sind, die aus irgendeinem Grunde der Sterilisation entgehen. Irgendeine Lagerung zu den Wurzelhaaren war nicht zu erkennen.

In den Gefäßen mit natürlichem Boden, teilweise mit Hafer bzw. Lupine bepflanzt, überwogen Stäbchen; in den mit Kalium und Phosphorsäure gedüngten traten *Azotobakter*-ähnliche Kokken auf. Bei Zugabe von Kompost und Huminal scheinen meist Actinomyceten zusammen mit Pilzen zu überwiegen.

In den Feldversuchen (*E*-Feld) waren die Präparate ärmer an Mikroorganismen im Vergleich zu den Gefäßversuchen, was zum größten Teil sicherlich an den im Gefäßversuch günstigeren Wasser- und Wärmebedingungen liegt. Actinomyceten mit langen und kurzen Fäden traten hier auf. Unterschiede zwischen den verschieden gedüngten Dauerparzellen waren zwar teilweise festzustellen; ich wage jedoch nicht zu entscheiden, ob es sich um wirklich faßbare bzw. tatsächlich ursächlich bedingte Unterschiede handelt.

Bei den fünf übrigen Bodentypen überwogen in den an organischen Stoffen reichen Böden (Leinetalboden) Stäbchen, Actinomyceten und Pilze. Recht arm war die Mikroflora armer Böden (Heidesand aus der Lüneburger Heide); nur Kokken traten hier stärker in Erscheinung.

Es scheint mir, daß die Aufwuchsplattenmethode erst dann weitere Erkenntnisse bringen wird, wenn sie in verschiedener Richtung verbessert ist. Durch das Entfernen der Bodenpartikelchen und die Spülung der Präparate werden zweifellos Pilz- und Actinomycetenfäden

¹ *N. Cholodny*, diese Zeitschr. 7, 286, 1936 (S. 292). — ² *R. Meyer*, ebenda 6, 461, 1935.

zerstört und entfernt, ebenso Bakterien. Bei diesen wird es auch sehr darauf ankommen, daß sie wahrscheinlich nicht alle das gleiche Haftvermögen am Glas besitzen, und daß auch die Berührungsfläche an dem Glas sehr verschieden sein wird. So könnten vielleicht gerade charakteristische Mikroorganismen entfernt sein. Durch Verbesserung der Eingrabeteknik und der Entfernung der Bodenpartikelchen, der Farbe- (Verwendung weiterer Farbstoffe) und auch der Mikroskopieretechnik, verbunden mit Abimpfverfahren (vgl. *Demeter*¹), werden sich jedoch sicherlich weitere Fortschritte erzielen lassen.

Das eigentliche Ziel der Untersuchung war die Frage, ob man eine Rhizosphäre in der Verteilung der Mikroorganismen erkennen könne. In der Tat ergaben sich einige charakteristische Bilder.

Abb. 1 zeigt Wurzelhaare von Hafer aus Gefäßversuchen mit natürlichem Ackerboden. Man erkennt deutlich längsgerichtete Stäbchen unmittelbar am Wurzelhaar gelegen.

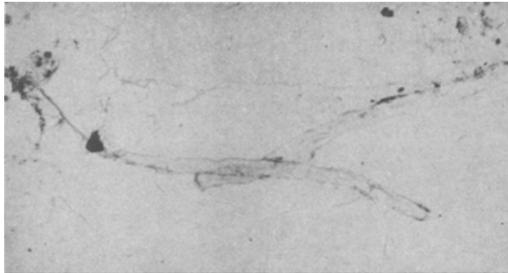


Abb. 1. Stäbchen an Wurzelhaaren von Hafer. Vergr. 240.

Noch aufschlußreicher ist Abb. 2, ebenfalls ein Wurzelhaar vom Hafer. Außer Ansammlungen kleiner Stäbchen in der Nähe des Wurzelhaares erkennt man deutlich einige eng ihm anliegende dicke Stäbchen, die an vier Stellen einen richtigen Mantel um das Wurzelhaar bilden. Dieser Mantel ist allerdings wohl nur halbseitig, auf der dem Glas abgewandten Seite ausgebildet; die Glasseite dürfte frei sein. Abb. 3

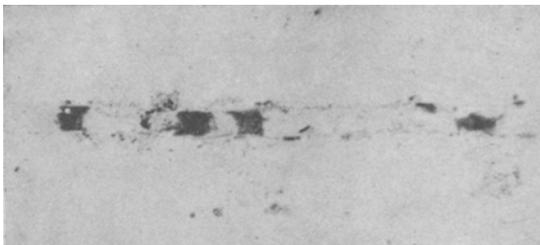


Abb. 2. Einzelstäbchen und Mäntel von Stäbchen am Wurzelhaar von Hafer. Vergr. 480.

¹ K. J. Demeter, Centralbl. f. Bakt. II, 88, 384, 1933.

zeigt starke Ansammlungen von Bakterien unmittelbar am und in nächster Nähe des Wurzelhaares bei Lupine. In diesem Falle dürfte es sich um Knöllchenbakterien handeln; das mikroskopische Bild spricht jedenfalls nicht dagegen.

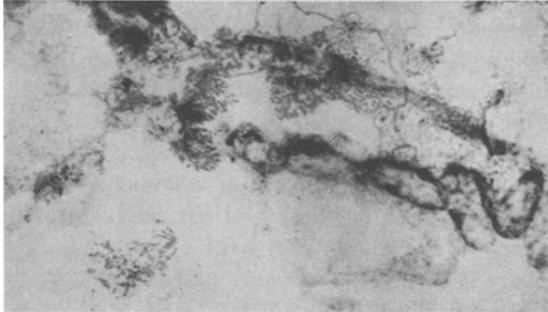


Abb. 3. Bakteriensammlungen um Wurzelhaare der Lupine (Knöllchenbakterien?). Vergr. 310.

Abb. 4 und 5 zeigen endlich gewaltige Ansammlungen von Stäbchen unmittelbar an den Wurzelhaaren und in ihrer nächsten Nähe bei Hafer, die besonders in Abb. 4 sehr schöne Lagerung unmittelbar am

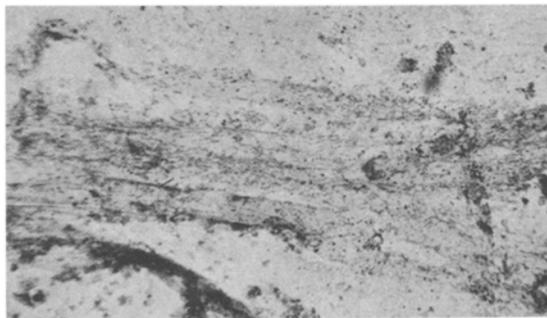
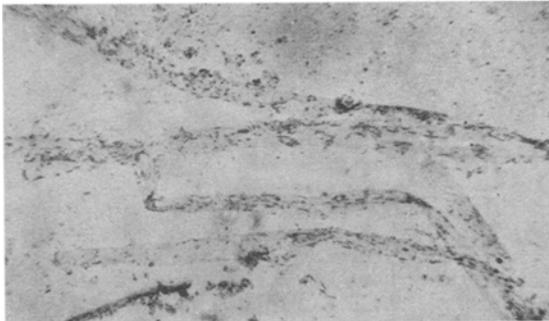


Abb. 4 und 5. Bakterienansammlungen um Wurzelhaare von Hafer (Cellulosezersetzer?). Vergr. 280.

Wurzelhaar zeigen. Während es sich bei den Abb. 1 bis 3 anscheinend um Bakterien handelt, die an dem gesunden Wurzelhaar liegen, scheint hier die Möglichkeit zu bestehen, daß, teilweise wenigstens, cellulosezeretzende Bakterien vorliegen, die von den Membranen des absterbenden Wurzelhaares leben. Es besteht jedenfalls starke Ähnlichkeit mit dem anaeroben Cellulosezer-setzer.

Die geschilderten Versuche sind in keiner Weise abschließend; sie sollen nur demonstrieren, daß man anscheinend mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode von *Cholodny* auch in der Frage der Rhizosphäre weitere Einblicke erhalten kann. Es müssen natürlich Züchtungs- usw. Verfahren parallel gehen, wobei sich auch erst herausstellen dürfte, was zufällig ist, und was als zum normalen Bestand der Rhizosphäre gehörig betrachtet werden muß.

Zusammenfassung.

Mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode nach *Cholodny* läßt sich eine starke Mikroorganismenanhäufung in der Rhizosphäre der Pflanzen nachweisen. Teilweise handelt es sich um richtige Bakterienmäntel, die das Wurzelhaar umgeben. Unter Ergänzung durch Züchtungs- usw. Verfahren dürfte die Methode in dieser Richtung aussichtsreiche Möglichkeiten bieten.

Im übrigen gab die Methode auf verschieden gedüngten Böden wenig faßbare Einblicke; doch dürfte auch hier eine Verbesserung der Methodik weiter führen. Die Mikroorganismenzahl ist in Freilandversuchen geringer als in Gefäßversuchen. In reichen Böden ist sie größer als in armen Böden; in jenen herrschten Stäbchen, Actinomy-ceten und Pilze vor, in diesen (Heidesand) waren fast nur Kokken zu beobachten.