

Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien

NORBERT PFENNIG und KLAUS DIETER LIPPERT

Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

Eingegangen am 12. September 1966

Die phototrophen roten und grünen Schwefelbakterien galten bis vor einigen Jahren im Unterschied zu den Nicht-Schwefelpurpurbakterien (*Athiorhodaceae*) als auxoautotrophe Mikroorganismen (GÆST u. KAMEN, 1960; THIMANN, 1964; VAN NIEL, 1963; KONDRATIEVA, 1965). Die bis dahin in Reinkultur untersuchten Stämme waren mit mineralischen Nährlösungen ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren isoliert und kultiviert worden (VAN NIEL, 1931; LARSEN, 1952; HURLBERT u. LASCELLES, 1963; MECHSNER, 1957; SADLER u. STANIER, 1960). Anreicherungskulturen weiterer Arten, die schon durch die Beschreibungen von EHRENBURG (1838), PERTY (1852), COHN (1875) und WINOGRADSKY (1888) bekannt geworden waren, gelangen in Standzylindern über einem Gemisch aus frischem Klärschlamm, Erde und Calciumsulfat (PFENNIG u. SCHLEGEL, 1960; SCHLEGEL u. PFENNIG, 1961); Reinkulturen der sich entwickelnden Arten *Chromatium okenii*, *Chr. weissii*, *Chr. warmingii* und *Thiospirillum jenense* erwiesen sich in vollsynthetischer Nährlösung bedürftig für Vit. B₁₂ (PFENNIG, 1961). Die Vit. B₁₂-haltige Nährlösung wurde in den folgenden Jahren für die Anreicherungs- und Reinkultur weiterer Stämme und Arten roter und grüner Schwefelbakterien aus den verschiedensten Gewässern in Kalifornien, Norwegen und Deutschland angewendet (PFENNIG, 1965). Von insgesamt 19 Isolaten der Gattung *Chlorobium* erwiesen sich 10 als Vit. B₁₂-bedürftig. Schon die qualitativen Tests zeigten, daß das Vit. B₁₂-Bedürfnis aller untersuchten grünen Schwefelbakterienstämme etwa gleich aber deutlich größer als das der roten Schwefelbakterien ist.

Unter den *Athiorhodaceae* entdeckten SCHER, SCHER u. HUTNER (1963) erstmals bei *Rhodospseudomonas palustris* Abhängigkeit des Wachstums von Vit. B₁₂, wenn sie diesen Organismus bei erhöhten Temperaturen (40—45° C) kultivierten.

Die im folgenden beschriebenen Versuche hatten zum Ziele festzustellen, in welchem Konzentrationsbereich die roten und grünen Schwefel-

bakterien auf Vit. B₁₂ ansprechen. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Faktoren Vit. B₁₂ ersetzen können.

Material und Methoden

Alle roten und grünen Schwefelbakterien wurden in der von PFENNIG (1965) beschriebenen Nährlösung bei pH 6,8 mit 0,075 g Na₂S · 9 H₂O und 0,04 g Ammoniumacetat (an Stelle von 0,033 g NH₄Cl) sowie 2 µg Vit. B₁₂ je 100 ml Medium gezüchtet. Die bei PFENNIG (1965) angegebene Schwermetall-Lösung wurde durch folgende verbesserte Schwermetall-Lösung ersetzt: Dest. Wasser 1000 ml; Titriplex III 500 mg; FeSO₄ · 7 H₂O 200 mg; ZnSO₄ · 7 H₂O 10 mg; MnCl₂ · 4 H₂O 3 mg; H₃BO₃ 30 mg; CoCl₂ · 6 H₂O 20 mg; CuCl₂ · 2 H₂O 1 mg; NiCl₂ · 6 H₂O 2 mg; Na₂MoO₄ · 2 H₂O 3 mg. Anwendung: 10 ml dieser Lösung je Liter Kulturmedium. Für die quantitativen Vit. B₁₂-Teste wurden dem mit bidestilliertem Wasser angesetzten, zunächst Vit. B₁₂-freien Medium steigende Mengen steriltrierter Cyanocobalamin (Merck)-Lösung zugesetzt: Endkonzentrationen für die roten Schwefelbakterien in µg Vit. B₁₂ je ml Medium: 0; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 1,0; Endkonzentrationen für die grünen Schwefelbakterien 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 µg Vit. B₁₂ je ml Medium.

Das Impfmateriale für die Testreihen (50 ml Schraubverschlußflaschen, 2 bis 3 Parallelen) wurde über 1—3 Passagen in Vit. B₁₂-freiem Medium vorkultiviert; bei den *Chlorobium*-Stämmen war das Wachstum bereits in der ersten Vit. B₁₂-freien Subkultur begrenzt; demgegenüber wurde bei den *Chromatium*-Stämmen, je nachdem, wann die Wachstumsbegrenzung infolge Vit. B₁₂-Mangels einsetzte, aus der 2. oder 3. Passage mit je 0,5 ml geimpft. Alle Flaschen wurden bei 20° C und 700 Lux Lichtintensität bebrütet. Die Auswertung erfolgte, wenn die am stärksten gewachsenen Flaschen 1—2 Tage schwefelfrei gestanden hatten. Bei den höchsten Vit. B₁₂-Konzentrationen war dann nicht Vit. B₁₂ wachstumsbegrenzender Faktor, sondern die in der Nährlösung gebotene Sulfidkonzentration. Alle Vit. B₁₂-begrenzten Kulturen enthielten mehr oder weniger noch nicht photooxydierten elementaren Schwefel; deshalb schieden Trübungsmessungen und Trockensubstanz- oder Proteinbestimmungen, die alle durch elementaren Schwefel gestört werden, für die routinemäßige quantitative Auswertung der Versuche aus. Wegen der Instabilität der Bacteriochlorophylle in organischen Lösungsmitteln wurde als Maß für die Vit. B₁₂-Wirkung die colorimetrische Phäophytinbestimmung gewählt.

Bei den grünen Schwefelbakterien wurde wie folgt verfahren: 10 ml jeder Kultur (oder 20 ml bei sehr schwach gewachsenen Kulturen) wurden bei 16000 × g 20 min abzentrifugiert und der Satz nach Dekantieren in 1 ml dest. Wasser suspendiert. Durch Zugabe von 9 ml Methanol mit 0,1 molar Citronensäure wurde das Chlorophyll aus den Zellen extrahiert und sofort in Phäophytin umgewandelt (JENSEN et al., 1964). Zur vollständigen Extraktion wurden die Röhrchen 30 min bei +4° C gehalten. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde der Phäophytin-gehalt des klaren, olivgrünen Methanolextraktes im Zeiss-Spektralphotometer beim langwelligen Absorptionsmaximum des Phäophytins (Bacteriophäophytin $c = 667,5$ nm, Bacteriophäophytin $d = 662,5$ nm; Chlorophyllnomenklatur nach JENSEN et al., 1964) bestimmt. Da sich Bacteriochlorophyll a der roten Schwefelbakterien in Methanol mit 0,1 molar Citronensäure nicht zu Phäophytin umwandeln läßt, wurde bei diesen Organismen nach THIELE (1966) wie folgt verfahren: 10 ml jeder Kultur wurden bei 12000 × g 10 min abzentrifugiert, der Satz in 0,5 ml dest. Wasser homogen suspendiert und dann 4,5 ml Methanol mit 0,03 m Orthophosphorsäure zugesetzt. Nach 30 min Extraktionsdauer bei +4° C wurde der klare Extrakt vom Unlöslichen abzentrifugiert und der Phäophytin-gehalt bei 765 nm im Zeiss-Spektralphotometer bestimmt.

Trockensubstanzbestimmung

Zur Bestimmung der Trockensubstanz von *Chlorobium*-Zellen wurden jeweils 100–500 ml Zellsuspension abzentrifugiert (16000 × g; 20 min), die Zellen wurden zweimal mit dest. Wasser gewaschen und bei 85° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Da nicht vollständig ausgewachsene Chlorobienkulturen stets elementaren Schwefel enthalten, wurde das auf diese Weise erhaltene Trockengewicht in bezug auf den elementaren Schwefel korrigiert.

Schwefelbestimmung

Die oben erhaltene Trockensubstanz diente als Ausgangsmaterial zur Bestimmung des elementaren Schwefels. 50–60 mg TS wurden nach WURZSCHMITT u. ZIMMERMANN (1950) durch Verbrennung mit Na₂O₂ und Äthylenglykol als Zündsubstanz in der Wurzschnitt-Bombe aufgeschlossen. Die alkalische Schmelze wurde in verdünnter Salzsäure gelöst und das Sulfat gravimetrisch nach MÜLLER (1954) bestimmt. Nach Ansäuern auf pH 1–2 wurde in der Siedehitze mit 0,1 m Bariumchloridlösung gefällt, über Nacht stehengelassen, anschließend auf Tiegelfritten abfiltriert, gewaschen und 10 min bei 500–600° C im Muffelofen geglüht. Die Tiegelfritten wurden dann im Exsiccator über Silicagel abgekühlt und gewogen.

Spektrophotometrische Messungen

Die Absorptionsspektren von *Chlorobium*-Zellen wurden an gewaschenen Zellsuspensionen im Zeiss-Spektralphotometer nach der Opalglas-Methode von SHIBATA et al. (1954) gemessen.

Die Vit. B₁₂-Faktoren III (= 5-Hydroxy-benzimidazol-cobalamin), IV (= Adenin-cobalamin) und B (= nucleotidfreies Cobalamin) für die qualitativen Tests wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. F. WAGNER, Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Hochschule Stuttgart, zur Verfügung gestellt.

Alle verwendeten Organismen stammen aus der eigenen Kulturensammlung. Für die quantitativen Bestimmungen wurden folgende *Chromatium*- und *Chlorobium*-Stämme verwendet: *Chromatium weissei*, Stamm 6211; *Chromatium warmingii*, Stämme 1113, 6512 und 1311; *Chlorobium thiosulfatophilum*, Stamm 1930; *Chlorobium limicola*, Stämme 1830, 1230 und 6132.

Ergebnisse und Diskussion

1. Vit. B₁₂-Konzentrationen und Chlorophyllgehalte der Kulturen

Typische Meßergebnisse für je zwei Vit. B₁₂-bedürftige rote und grüne Schwefelbakterienstämme zeigen Abb. 1 und 2. Die Extinktionswerte der langwelligen Absorptionsmaxima der im sauren Methanolextrakt gewonnenen Phäophytine sind gegen die Vit. B₁₂-Konzentrationen aufgetragen. Bei *Chromatium weissei*, Stamm 6211 und *Chr. warmingii*, Stamm 6512, liegt der mit den Vit. B₁₂-Konzentrationen linear ansteigende Phäophytinertrag im Bereich bis 0,1 mµg Vit. B₁₂ je ml. Oberhalb von 0,1 mµg Vit. B₁₂ wird Sulfid begrenzender Faktor. Vergleicht man damit die Messungen an *Chlorobium thiosulfatophilum*, Stamm 1930 und *Chl. limicola*, Stamm 1830, so fällt auf, daß die entsprechenden Ertragssteigerungen bei den grünen Schwefelbakterien im Konzentrationsbereich bis 1,5 mµg Vit. B₁₂ je ml NL liegen, also um eine Zehnerpotenz höher. Diese eindeutige Differenz trifft für alle 10 bisher isolierten Vit. B₁₂-bedürftigen

Stämme roter Schwefelbakterien gegenüber allen 10 bisher isolierten Vit. B₁₂-bedürftigen *Chlorobium*-Stämmen zu, wie sich schon qualitativ aus den Verarmungsexperimenten erkennen läßt: Nach Überimpfung von 0,5 ml einer gut gewachsenen Kultur in 50 ml Vit. B₁₂-freie Nährlösung

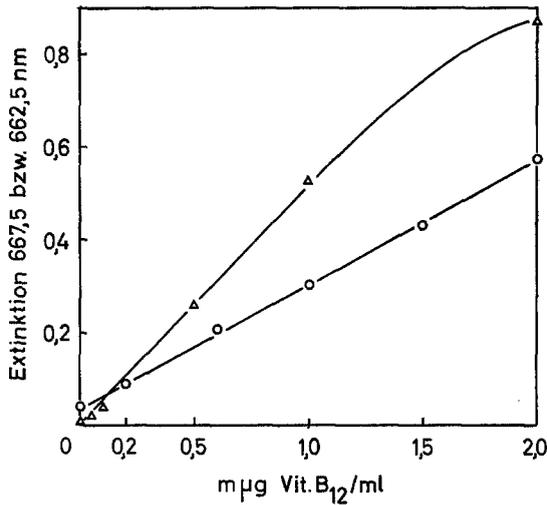


Abb. 1. Abhängigkeit des Chlorophyllgehaltes zweier *Chlorobium*-Kulturen von der Vit. B₁₂-Konzentration. Der Chlorophyllgehalt der Zellen wurde nach Umwandlung des Chlorophylls in Phäophytin bestimmt. Δ—Δ *Chl. limicola* 1830; Extinktion im langwelligen Absorptionsmaximum bei 667,5 nm (Bacteriophäophytin c). ○—○ *Chl. thiosulfatophilum* 1930; Extinktion im langwelligen Absorptionsmaximum bei 662,5 nm (Bacteriophäophytin d)

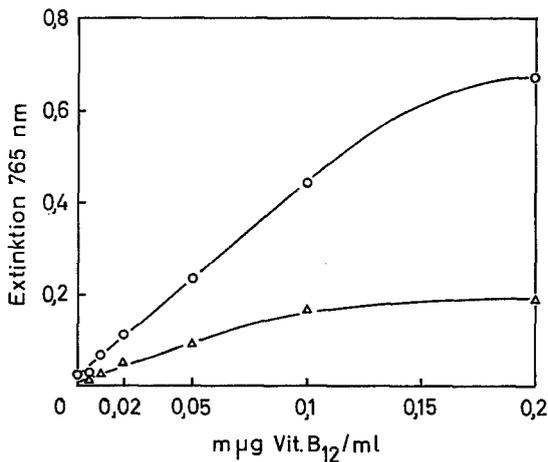


Abb. 2. Abhängigkeit des Chlorophyllgehaltes zweier *Chromatium*-Kulturen von der Vit. B₁₂-Konzentration. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes nach Umwandlung des Chlorophylls in Phäophytin. ○—○ *Chr. warmingii*; Δ—Δ *Chr. weissii*. Messung der Extinktion im langwelligen Absorptionsmaximum von Bacteriophäophytin a bei 765 nm

tritt nur bei den Chlorobien Wachstumsbegrenzung durch Vit. B₁₂-Mangel ein; bei allen *Thiorhodaceae*-Stämmen bedarf es dazu 1—2 weiterer Passagen im Vit. B₁₂-freien Medium.

2. Vit. B₁₂-Konzentrationen und Trockensubstanzbildung

Um den Vit. B₁₂-Bedarf auch mit der Zellsubstanzbildung in Beziehung setzen zu können, wurden an Kulturen von *Chl. limicola* 1830, die bei verschiedenen Vit. B₁₂-Konzentrationen gewachsen waren, parallel Trockensubstanz- und Phäophytinbestimmungen vorgenommen. Hierbei zeigte es sich, daß der Ertrag der Trockensubstanz bei Vit. B₁₂-Konzentrationen oberhalb von 0,15 µg/ml NL nicht mehr proportional zum Phäophytinertrag ansteigt, sondern schon bei 1 µg Vit. B₁₂/ml den Sättigungswert erreicht (Abb.3). Die Hälfte der unter diesen Kulturbedingungen maximal erreichbaren Trockensubstanz wird schon bei 0,15 µg Vit. B₁₂/ml gebildet, während für die halbmaximale Chlorophyllbildung 1,1 µg Vit. B₁₂/ml, also mehr als die siebenfache Vit. B₁₂-Konzentration benötigt wird.

Im Bereich der linearen Abhängigkeit des Wachstums von der Vit. B₁₂-Konzentration ermöglichen 0,1 µg Vit. B₁₂ die Bildung von 70 µg Zellsubstanz. Zur Bildung von 1 g Zellsubstanz würden daher bei diesem *Chlorobium*-Stamm 1,4 µg Vit. B₁₂ benötigt werden.

Dieser Wert von 1,4 µg Vit. B₁₂/g Zellsubstanz liegt etwas unter den von USPENSKAYA u. KONDRATIEVA (1962) ermittelten Vit. B₁₂-Gehalten der Zellsubstanz auxoautotropher roter und grüner Schwefelbakterien: *Chromatium minutissimum* enthielt photoautotroph gezüchtet 8,5—9 µg Vit. B₁₂ je g Trockensubstanz, photoorganotroph gezüchtet aber nur 2 µg Vit. B₁₂ je g. Entsprechende Werte erhielten die Autoren bei *Chloropseudomonas ethylicum* (8,3—8,5 µg Vit. B₁₂/g photoautotroph, 3 µg Vit. B₁₂/g photoorganotroph). Das nur photoautotroph wachsende *Chlorobium thiosulfatophilum* enthielt mit *Chromatium* und *Chloropseudomonas* übereinstimmende Vit. B₁₂-Mengen: 8 µg Vit. B₁₂/g Trockensubstanz. Es haben sich also hier keine Unterschiede in den Vit. B₁₂-Gehalten auxoautotropher roter und grüner Schwefelbakterien gezeigt. Wir hätten auf Grund unserer Befunde Unterschiede erwartet, da die Vit. B₁₂-bedürftigen Stämme der grünen Bakterien zur Ausbildung des normalen Pigmentgehaltes wesentlich höhere Vit. B₁₂-Konzentrationen benötigen als die roten Schwefelbakterien.

Die verhältnismäßig hohe Trockensubstanzbildung von *Chl. limicola* 1830 bei 0,15 µg Vit. B₁₂/ml NL läßt sich dadurch verstehen, daß die Organismen bei Vit. B₁₂-Begrenzung gewachsen sind und daher einen niedrigeren Vit. B₁₂-Gehalt aufweisen werden als vergleichbare auxoautotrophe Organismen.

Für die Chrysomonade *Monochrysis lutheri* fand DROOP (1961), daß (im Bereich von 0,1—100 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂/ml) 1 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂ das Wachstum von $0,55 \cdot 10^6$ Zellen ermöglicht. Da jede Zelle ein Volumen von 200 μm^3 besitzt, d. h. bei einem spez. Gewicht von wenig über 1 also 200 $\mu\mu\text{g}$ wiegt, ermöglicht 1 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂ die Bildung von $1,1 \cdot 10^{11}$ $\mu\mu\text{g}$ Frischgewicht oder (bei 80% Wassergehalt) 22 mg Trockensubstanz. Das ist etwa 30mal mehr Trockensubstanz als bei der gleichen Vit. B₁₂-Menge durch *Chlorobium limicola* 1830 gebildet werden kann.

3. Mangelerscheinungen an Vit. B₁₂-begrenzten Kulturen

Das auffälligste Zeichen des Vit. B₁₂-Mangels bei den meisten *Chlorobium*-Kulturen ist die Verfärbung der Zellmasse von grasgrün nach grüngelb bis goldgelb. Diese Farbänderung beruht auf dem niedrigeren Chlorophyllgehalt der bei geringen Vit. B₁₂-Konzentrationen gezogenen

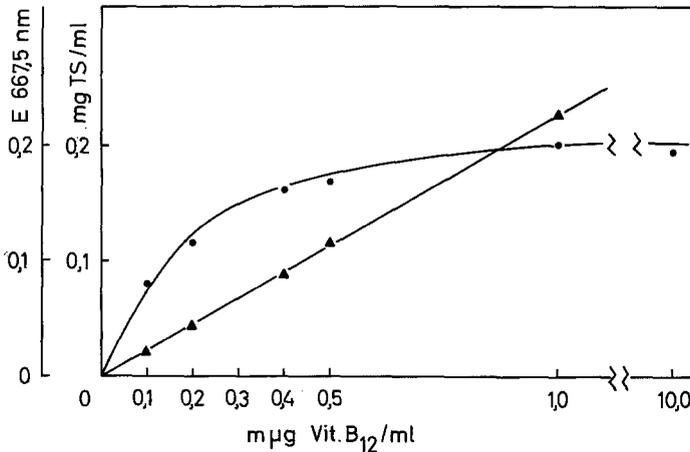


Abb. 3. Trockensubstanz- und Chlorophyllbildung durch *Chl. limicola* 1830 in Abhängigkeit von der Vit. B₁₂-Konzentration. ●—● Trockensubstanz; ▲—▲ Phäophytin

Zellen, wie aus Abb. 3 hervorgeht: Das Verhältnis Phäophytin/Trockensubstanz steigt oberhalb von 0,15 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂/ml an, bis die für maximale Chlorophyllbildung erforderliche Vit. B₁₂-Konzentration (10 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂/ml) erreicht ist. Zellen, die bei 0,1 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂/ml gewachsen sind, weisen ein für grüne Schwefelbakterien ungewöhnliches Absorptionsspektrum auf (Abb. 4): Die Chlorophyllgipfel bei 750 und 460 nm sind nur sehr schwach ausgeprägt. Demgegenüber entspricht das Spektrum von Zellen, die bei 10 $\mu\mu\text{g}$ Vit. B₁₂/ml NL kultiviert sind, demjenigen auxoautotropher Chlorobien.

Chromatium-Kulturen, deren Eigenfarbe schon von Natur aus durch die enthaltenen Carotine bedingt ist, ändern ihre Färbung praktisch

nicht, jedoch sind die Einzelzellen mit Speicherstoffen angefüllt (Abb.5), die sich durch Braunfärbung mit Kaliumjodid-Jod als Polysaccharide erweisen. Die Untersuchungen von FOGG (1959), FORD u. GOULDEN (1959) und anderen Autoren haben erkennen lassen, daß sich Vit. B₁₂-Mangel bei Algen wie Stickstoffmangel auswirkt und zur Ablagerung N-freier

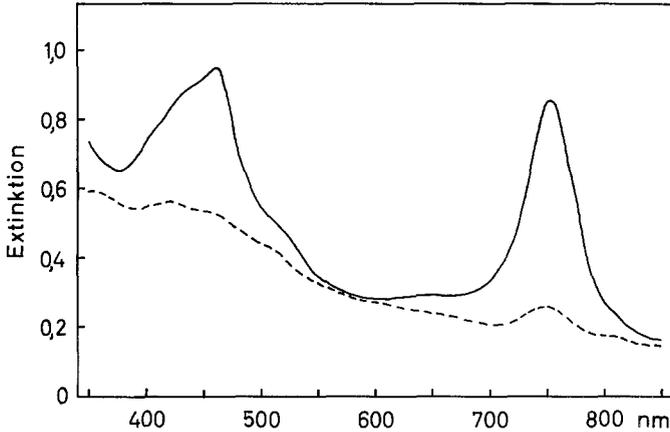


Abb. 4. Absorptionsspektren gewaschener Zellen von *Chl. limicola* 1830 nach Anzucht bei verschiedenen Vit. B₁₂-Konzentrationen. Die Zellsuspensionen wurden auf etwa gleiche Extinktion bei 600 nm eingestellt. — Anzucht bei 10 µg Vit. B₁₂/ml NL; - - - Anzucht bei 0,1 µg/Vit. B₁₂/ml NL. Diese Suspension enthielt elementaren Schwefel in einer Menge von 2% der Trockensubstanz

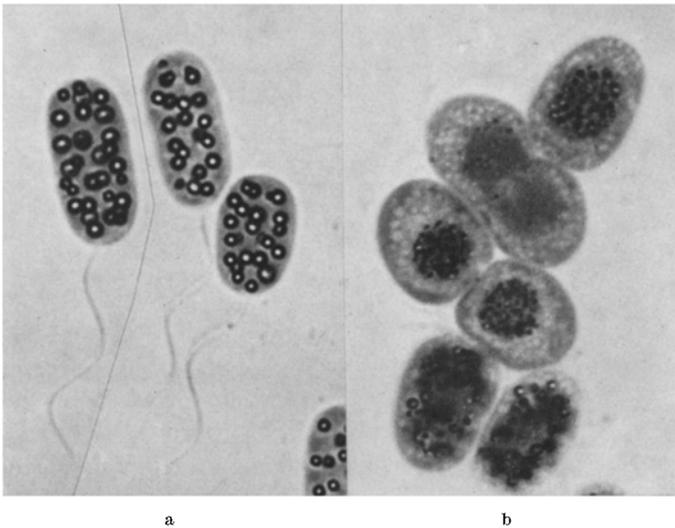


Abb.5 a und b. *Chromatium okenii*, Stamm 1111, Hellfeld-Lebendaufnahmen, Vergr. 1820mal. a Normale Zellen, welche in Gegenwart von 20 µg Vit. B₁₂ je Milliliter Medium gewachsen sind; b Vit. B₁₂-Mangelzellen, welche in der zweiten Passage in Vit. B₁₂-freiem Medium gewachsen sind. Die Zellen sind meist unbeweglich; ihre Schwefeltröpfchen sind im Inneren konzentriert, während die peripheren Bereiche der Zellen mit Polysaccharidgranula vollgestopft sind (weiße Pünktchen)

Speicherstoffe (z. B. Fett) führt. Die speicherstoffbildenden *Thiorhodaceae* (vgl. SCHLEGEL, 1962; KRAN u. Mitarb., 1963) verhalten sich hier entsprechend den grünen Algen.

4. Die Verwertung anderer Vit. B₁₂-Faktoren

Um die Spezifität des Vit. B₁₂-Bedürfnisses der roten und grünen Schwefelbakterien zu testen, wurde zunächst die Kobalt-Konzentration im Medium von 0,2 µg CoCl₂ auf 4 µg/ml NL erhöht, jedoch führte diese Maßnahme bei keinem Stamm zur Aufhebung des Vit. B₁₂-Bedürfnisses. Anders als bei *E. coli*-Mutanten und *Leptothrix* (MÜLDER, 1963) ließ sich das Vit. B₁₂-Bedürfnis aller *Chlorobium*-Stämme auch nicht durch Methionin befriedigen. Es trat sogar im Bereich von 10–50 µg Methionin/ml Medium eine mehr oder weniger starke Wachstumshemmung bei allen Stämmen auf. Außer Cyanocobalamin (= 5,6-Dimethyl-benzimidazolcobalamin) haben wir bei einigen Stämmen noch die Vit. B₁₂-Faktoren III, IV und B qualitativ getestet (Tabelle).

Tabelle

Organismen	Cyanocobalamin 20 µg/ml	Faktor III 20 µg/ml	Faktor IV 20 µg/ml	Faktor B 20 µg/ml
<i>Chr. warmingii</i>				
Stamm 6511	+	+	+	+
<i>Chr. weissei</i>				
Stamm 6211	+	+	±	±
<i>Chl. limicola</i>				
Stamm 1830	+	+	—	—
<i>Chl. thiosulfatophilum</i>				
Stamm 1930	+	+	±	+
<i>Chl. limicola</i>				
Stamm 6132	+	+	—	—
<i>Chl. limicola</i>				
Stamm 1230	+	+	+	+

+ Wachstum gut; ± Wachstum schwach; — kein Wachstum.

Während die beiden *Thiorhodaceae*-Stämme mit allen geprüften Faktoren zu wachsen vermögen, traten bei den vier *Chlorobium*-Stämmen deutliche Unterschiede in der Verwertung der Faktoren IV und B auf: zwei der Stämme (1830 und 6132) verwerten nur Cobalamine, die substituiertes Benzimidazol als Nucleotid enthalten. Ein Stamm (1230) wächst mit allen Faktoren gleich gut, während Stamm 1930 das Adenin-substituierte Cobalamin schlechter verwertet als das nucleotidfreie.

5. Vit. B₁₂-Bedürfnis und Bedingungen am natürlichen Standort

Alle bisher isolierten Stämme von *Chromatium okenii* (3), *Chr. weissei* (3), *Chr. warmingii* (3), *Thiospirillum jenense* (2) und etwa die Hälfte

aller isolierten *Chlorobium*-Stämme erwiesen sich als Vit. B₁₂-bedürftig. Es erscheint deshalb berechtigt anzunehmen, daß es sich in allen diesen Fällen nicht um die zufällige oder selektive Isolierung vereinzelter Mangelmutanten handelt, sondern daß auch große natürlich vorkommende Populationen dieser Organismen Vit. B₁₂-bedürftig sind. So ließen z. B. Anreicherungskulturen mit und ohne Vit. B₁₂-Zusatz erkennen, daß die dichte, das Wasser weinrot färbende Population von *Chromatium okenii* und *Chr. weissii* des Abwasserteiches einer Brauerei in Zeulenroda/Thür. nur aus Vit. B₁₂-bedürftigen Zellen besteht: selbst mit großen Mengen Impfmateriale trat im Gegensatz zu der Vit. B₁₂-haltigen Nährlösung in der Vit. B₁₂-freien keine Vermehrung dieser Organismen ein. Experimentelle Bestätigungen liegen auch in Untersuchungen an meromiktischen Seen Norwegens vor. In Zusammenarbeit mit ORMEROD u. HOLTAN (1967, in Vorbereitung) wurde z. B. gefunden, daß die grün gefärbte anaerobe Wasserschicht des Polden-Sees in 7 m Tiefe ausschließlich Vit. B₁₂-bedürftige *Chlorobacteriaceae* enthalten muß: neben $2,5 \cdot 10^6$ koloniebildenden Zellen je Milliliter Seewasser in Vit. B₁₂-haltigen Agar-Schüttelkulturen konnte nicht eine Kolonie Vit. B₁₂-autotropher Zellen in Vit. B₁₂-freien Agar-Schüttelkulturen nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang sind auch die Befunde von DROOP u. Mitarb. (1959) interessant, nach denen etwa 70% der einzelligen marinen Algen Vit. B₁₂-bedürftig sind.

Der Vit. B₁₂-Gehalt eines von ROBBINS u. Mitarb. (1950) untersuchten Teichwassers lag das ganze Jahr über zwischen 0,1 und 1,0 µg Vit. B₁₂/ml. Es sind dies Konzentrationen, die selbst den anspruchsvollen grünen Schwefelbakterien eine normale Entwicklung ermöglichen. Im Schlamm des Teiches fanden die Autoren Bakterien und Actinomyceten, die Vit. B₁₂ synthetisieren und ausscheiden. Die Untersuchungen von BERNHAUER u. FRIEDRICH (1954) über den Gehalt an Vit. B₁₂-Faktoren im Schlamm aus anaeroben Faulräumen haben gezeigt, welche beachtlichen Mengen an Vit. B₁₂-Faktoren im anaeroben Faulschlamm gebildet werden (0,1–2,0 mg Vit. B₁₂-Faktoren je Liter Faulschlamm). Als Hauptkomponenten wiesen die Autoren nach: 5,6-Dimethyl-benzimidazol-cobalamin, 5-Hydroxy-benzimidazol-cobalamin (FRIEDRICH u. BERNHAUER, 1956) und nucleotidfreies Cobalamin. Die anaerobe Mikroflora, welche im Schlamm natürlicher Gewässer die Lebensbedingungen für phototrophe Schwefelbakterien bildet, ist derjenigen der Faulräume ähnlich; hier wie dort treten CO₂, H₂S, CH₄ und H₂ als Gärgase auf. Durch die Tätigkeit dieser anaeroben Mikroflora werden wohl die größten in der Natur vorkommenden Vit. B₁₂-Mengen gebildet. Da in dieser ökologischen Nische Vit. B₁₂-autotrophe Schwefelbakterien kaum einen Selektionsvorteil besitzen, ist es durchaus verständlich, daß viele phototrophe Schwefelbakterien Vit. B₁₂-bedürftig sind.

Zusammenfassung

1. 10 von 19 *Chlorobium*-Stämmen, die mit einer Vit. B₁₂-haltigen Nährlösung aus verschiedenen Gewässern in Kalifornien, Norwegen und Deutschland isoliert waren, erwiesen sich als Vit. B₁₂-bedürftig.

2. Bei Vit. B₁₂-bedürftigen *Chlorobium*- und *Chromatium*-Stämmen wurde der Chlorophyllgehalt der Kulturen in Abhängigkeit von der Vit. B₁₂-Konzentration quantitativ bestimmt. Zur Bildung vergleichbarer Erträge benötigten alle untersuchten *Chlorobium*-Stämme gegenüber den *Chromatium*-Stämmen etwa zehnmahl höhere Vit. B₁₂-Konzentrationen.

3. Der Vergleich der Trockensubstanz- und Chlorophyllmengen einer *Chlorobium*-Kultur in Abhängigkeit von der Vit. B₁₂-Konzentration zeigt, daß der Chlorophyllgehalt der Zellen sehr stark erniedrigt ist, wenn Vit. B₁₂ wachstumsbegrenzender Faktor ist.

4. Die unter Vit. B₁₂-Begrenzung bei Chlorobien und Chromatien auftretenden Mangelerscheinungen sind beschrieben.

5. Vit. B₁₂ läßt sich weder durch erhöhte Co⁺⁺-Konzentrationen noch durch Methionin ersetzen. Die getesteten *Chromatium*-Stämme verwerten alle geprüften Vit. B₁₂-Faktoren (III, IV und B), während zwei der untersuchten vier *Chlorobium*-Stämme nur Cobalamine nutzen können, die substituiertes Benzimidazol als Nucleotid enthalten.

6. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Bedingungen an natürlichen Standorten diskutiert.

Summary

1. 10 out of 19 *Chlorobium*-strains, which were isolated with a vit. B₁₂-containing culture medium from different ponds and lakes in California, Norway, and Germany, proved to be vit. B₁₂-dependent.

2. The chlorophyll content of vit. B₁₂-dependent *Chlorobium*- and *Chromatium*-strains was determined in correlation to the vit. B₁₂-concentration of the medium. All *Chlorobium*-strains tested required for comparable yields about ten times higher vit. B₁₂-concentrations than the *Chromatium*-strains.

3. The comparison of dry weight and chlorophyll content of a *Chlorobium* culture in correlation to the vit. B₁₂ concentration of the medium shows, that the chlorophyll content of the cells is strongly reduced in the presence of growth-limiting vit. B₁₂-concentrations.

4. The deficiency characteristics of *Chlorobium*- and *Chromatium*-strains under conditions of vit. B₁₂-limitation are described.

5. Vit. B₁₂ could not be replaced neither by increased Co⁺⁺-concentrations nor by the addition of methionin. The *Chromatium*-strains were able to utilize all vit. B₁₂-factors tested (III, IV and B), while two of the four *Chlorobium*-strains studied grow only in the presence of substituted benzimidazole containing cobalamines.

6. The results are discussed in view of the conditions in natural habitats.

Den Mitarbeitern des Norwegischen Instituts für Wasserforschung, Blindern/ Oslo, danken wir für ihre großzügige Hilfe bei den Probeentnahmen aus norwegischen Seen.

Fräulein ROSEMARIE RIPPKA danken wir für sorgfältige Assistenz. Die Untersuchungen wurden ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- BERNHAEUER, K., u. W. FRIEDRICH: Über die Vitamine der B₁₂-Gruppe. *Angew. Chem.* **66**, 776—780 (1954).
- COHN, F.: Untersuchungen über Bakterien II. *Beitr. Biol. Pflanzen* **1**, 141—207 (1875).
- DROOP, M. R.: Vitamin B₁₂ and marine ecology: The response of *Monochrysis lutheri*. *J. mar. biol. Ass. U. K.* **41**, 69—76 (1961).
- J. J. A. McLAUGHLIN, J. J. PINTER, and L. PROVASOLI: Specificity of some protophytes toward vitamin B₁₂-like compounds, pp. 916—918. *Int. Oceanogr. Congr. New York 1959*.
- EHRENBERG, CHR. G.: Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen. Leipzig: L. Voss 1838.
- FOGG, G. E.: Nitrogen nutrition and metabolic patterns in algae. *Symp. Soc. exp. Biol.* **13**, 106—125 (1959).
- FORD, J. E., and J. D. S. GOULDEN: The influence of vitamin B₁₂ on growth rate and cell composition of the flagellate *Ochromonas*. *J. gen. Microbiol.* **20**, 267—276 (1959).
- FRIEDRICH, W., u. K. BERNHAEUER: Vitamin B₁₂-Faktor III, 5. Mitt. Die Stellung des phenolischen Hydroxyls im Nucleotid-Anteil. *Angew. Chem.* **68**, 439 (1956).
- GEST, H., and M. D. KAMEN: The photosynthetic bacteria. *Handb. Pflanzenphysiol.*, Bd. 5, 2. Teil, S. 568—612. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1960.
- HURLBERT, R. E., and J. LASCELLES: Ribulose diphosphate carboxylase in *Thiorhodaceae*. *J. gen. Microbiol.* **33**, 445—458 (1963).
- JENSEN, A., O. ASMUNDRUD, and K. E. EIMHJELLEN: Chlorophylls of photosynthetic bacteria. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **88**, 466—479 (1964).
- KONDRATIEVA, E. N.: Photosynthetic Bacteria, Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem 1965.
- KRAN, G., F. W. SCHLOTE u. H. G. SCHLEGEL: Cytologische Untersuchungen an *Chromatium okenii* Perty. *Naturwissenschaften* **50**, 728—730 (1963).
- LARSEN, H.: On the culture and general physiology of the green sulfur bacteria. *J. Bact.* **64**, 187—196 (1952).
- MECHSNER, K.: Physiologische und morphologische Untersuchungen an Chlorobakterien. *Arch. Mikrobiol.* **26**, 32—51 (1957).
- MÜLLER, G. O.: Praktikum der quantitativen chemischen Analyse, S. 332. Leipzig: S. Hirzel 1954.
- MULDER, E. G., and W. L. VAN VEEN: Investigations on the *Shaeoetilus-Leptothrix* group. *Antonie v. Leeuwenhoek* **29**, 121—153 (1963).
- VAN NIEL, C. B.: On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **3**, 1—112 (1931).
- A brief survey of the photosynthetic bacteria. In: *Bacterial Photosynthesis*, pp. 459—467. Yellow Springs, Ohio: Antioch Press 1963.
- PERTY, M.: Zur Kenntnis kleinster Lebensformen. Bern 1852.

- PFENNIG, N.: Eine vollsynthetische Nährlösung zur selektiven Anreicherung einiger Schwefelpurpurbakterien. *Naturwissenschaften* **48**, 136 (1961).
- Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. Suppl.* **1**, 179—189, 503—504 (1965).
- , u. H. G. SCHLEGEL: Anreicherungskulturen von Schwefelpurpurbakterien. *Generalversammlungsheft. Ber. dtsh. bot. Ges.* **73** (1960).
- ROBBINS, J., A. HERREY, and M. E. STEBBINS: Studies on *Euglena* and vitamin B₁₂. *Science* **112**, 455 (1950).
- SADLER, W. R., and R. Y. STANIER: The function of acetate in photosynthesis by green bacteria. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **46**, 1328—1334 (1960).
- SCHER, S., B. SCHER, and S. H. HUTNER: Notes on the natural history of *Rhodospseudomonas palustris*. In: *Symp. Mar. Microbiol.*, pp. 580—587. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1963.
- SCHLEGEL, H. G.: Die Speicherstoffe von *Chromatium okenii*. *Arch. Mikrobiol.* **42**, 110—116 (1962).
- , u. N. PFENNIG: Die Anreicherungskultur einiger Schwefelpurpurbakterien. *Arch. Mikrobiol.* **38**, 1—39 (1961).
- SHIBATA, K., A. A. BENSON, and M. CALVIN: The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **15**, 461 (1954).
- THIELE, H. H.: Dissertation Göttingen (1966).
- THIMANN, K. V.: *Das Leben der Bakterien*. Jena: VEB G. Fischer 1964.
- USPENSKAYA, V. E., and E. N. KONDRATIEVA: The relation of photoautotrophic bacteria to vitamins and vitamin synthesis by these organisms. *Mikrobiologiya* **31**, 396—401 (1962).
- WINOGRADSKY, S. N.: *Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien*. Leipzig: A. Felix 1888.
- WURZSCHMITT, B., u. W. ZIMMERMANN: Die Metallbombe als Hilfsmittel in der Elementaranalyse. *Fortschr. chem. Forsch.* **1**, 485 (1950).

Prof. Dr. N. PFENNIG
Institut für Mikrobiologie
der Universität
34 Göttingen, Goßlerstr. 16