

(Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik und dem Botanischen Garten,  
Hamburg.)

## Beiträge zur Kenntnis von *Hyphomicrobium vulgare* STUTZER et HARTLEB\*.

Von

WALTER MEVIUS jr.

Mit 27 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Januar 1953.)

*Hyphomicrobium vulgare* wurde verschiedentlich in Rohkulturen von Nitrifikanten gefunden; eine Übersicht der älteren Literatur gibt BOLTJES, der sich 1934 im Rahmen einer Arbeit über nitrifizierende Bakterien näher mit diesem Organismus beschäftigte, 1936 seine Untersuchungen fortsetzte und vor allem nach der morphologischen Seite hin erweiterte. Ihm fielen beim Mikroskopieren von Belebtschlamm dünne Fäden auf, die aus den Flöckchen hervorrugten, aber ungefärbt im Hellfeld nicht sichtbar waren. Sie erwiesen sich als die bekannten Anhängsel von *Hyphomicrobium*. Später fand er diesen Organismus auch in Anreicherungen von Nitrifikationsbakterien. Ebenso soll er sich aus langsam tropfenden, wenig gebrauchten Wasserhähnen gut isolieren lassen. Er nahm an, daß *Hyphomicrobium* ähnlich wie *Bac. oligocarbohilus* in der Lage sei, von den organischen Verunreinigungen der Luft zu leben. Auch HES (1937) wies in seiner Arbeit über Salpeterbakterien auf diesen Organismus hin. Endlich fand auch BÖMEKE (1939) *Hyphomicrobium* in Kulturen von Nitrifikanten. Die Abtrennung von *Nitrobacter* aus diesen Mischkulturen stieß jedoch auf die größten Schwierigkeiten. STEPHENSON (1950) erwähnt *Hyphomicrobium* als heterotrophe Verunreinigung in Kulturen autotropher Salpeterbakterien, die sich trotz mehrfachen Überimpfens auf anorganischen Medien hartnäckig hält.

Die systematische Stellung von *Hyphomicrobium* ist noch äußerst unklar. STUTZER u. HARTLEB (1898) gaben an, daß es sich von den Bakterien in morphologischer Hinsicht durch die Ausbildung von Hyphen und die Art der Vermehrung unterscheidet. Schon der Name selbst sollte eine Verwandtschaft mit den Fadenpilzen andeuten, von denen es ihrer Auffassung nach jedoch in physiologischer Hinsicht deutlich abweicht, indem es u. a. nicht auf Zucker wächst und empfindlich gegen freie Säure ist. ENLWS (1920) ordnete es als Monotyp innerhalb der Bakterien ein. HENRICI und JOHNSON (1935) stellten *Hyphomicrobium* in eine neue Ordnung gestellter Bakterien. BOLTJES (1934) betonte mit Recht, daß eine einwandfreie systematische Eingruppierung noch nicht möglich sei. Er hielt es für wahrscheinlich, daß dieser Organismus einen Übergang zwischen Bakterien und Phycomyceen darstelle. STANTER u. VAN NIEL (1941) stellten *Hyphomicrobium* zu den *Pasteuriaceae* und somit in den Anhang der *Schizomycetes*. In „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology“ (1948) findet sich *Hyphomicrobium* in Anlehnung an STANTER u. VAN NIEL als Anhang der Unterordnung der *Caulobakterien*. Diese Unterbringung ist aber nur ein Notbehelf und sagt nichts über die wirklichen verwandtschaftlichen Beziehungen aus. Auch RIPPEL-BALDES (1952) glaubte, daß die systematische Einordnung innerhalb der eigentlichen Bakterien noch verfrüht und unsicher sei.

\* Auszug aus der gleichnamigen Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg 1952.

Ausgangspunkt meiner Untersuchungen war die auffallende Tatsache, daß *Hyphomicrobium* einer der beharrlichsten Begleiter nitrifizierender Bakterien ist. Auch der von mir untersuchte Stamm fand sich als Verunreinigung in einer Nitritbildnerkultur. Das häufige gemeinsame Vorkommen zwingt zu der Frage, wie wir uns das Zusammenleben vorzustellen haben, zumal STEPHENSON (1950) betont, daß eine Trennung auch bei Verwendung reiner Chemikalien und mehrfach destillierten Wassers auf Grund der selektiven Eigenschaft der WINOGRADSKYSCHEN Nitrifikations-Nährlösung nicht möglich sei. Lebt *Hyphomicrobium* vielleicht von organischen Stoffen, die die Salpeterbakterien ausscheiden? Oder müssen wir uns das Zusammenleben so vorstellen, daß *Hyphomicrobium* ähnliche Ansprüche an das Milieu stellt wie die Nitrifikationserreger? Es wäre z. B. denkbar, daß es autotroph lebt und in der Lage ist, die freie Kohlensäure ebenso zu assimilieren wie die Nitrifikationsorganismen, wobei die dafür notwendige Energie vielleicht aus der Oxydation der eben erwähnten organischen Stoffe stammt. Es war der Zweck meiner Untersuchungen, Licht in diese Fragen zu bringen.

#### Herkunft, Isolierung und mikroskopisches Aussehen.

Zur Isolierung von *Hyphomicrobium* diente eine *Nitrosomonas*-Rohkultur, die aus einer Schlickprobe des Elbufers dicht westlich der Anlegebrücke „Alte Liebe“ in Cuxhaven gewonnen worden war. Die Reinzucht gelang nach der von ENGEL u. SKALLAU (1937) für Salpeterbakterien angegebenen Methode und anschließendem mehrfachen Umzüchten auf Hefewasser und einer auch in den folgenden Versuchen verwendeten synthetischen Nährlösung — ähnlich den Angaben von BOLTJES (1935) —:

Na-Formiat 1 g,  $\text{KNO}_3$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oder  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 g, NaCl 0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 mg, Aq. dest. 1000 cm<sup>3</sup> (ohne  $\text{HCOONa}$ -Stammlösung).

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf etwa 7,2—7,5 eingestellt. Als Kulturgefäße dienten 100 cm<sup>3</sup>-ERLENMEYER-Kolben aus Jenaer Glas, in denen die Flüssigkeit — zur genügenden Sauerstoffversorgung — nur 1 cm hoch stand. Anzuchttemperatur 30—37° C. Über den Hals der mit Watte verschlossenen Kolben wurde eine Staniolkappe gestülpt, um die Gefahr des Eindringens von Fremdorganismen sowie die der Eindunstung der Nährlösung bei der mehrere Wochen dauernden Kultur auf

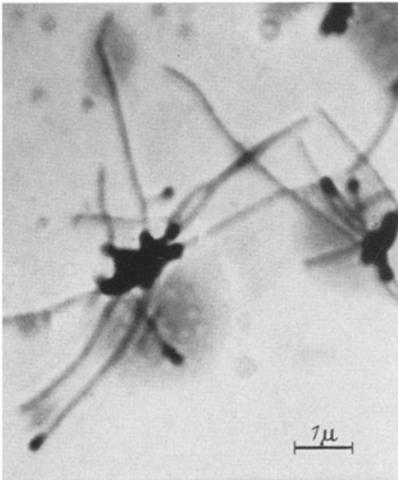


Abb. 1. *Hyphomicrobium vulgare*. Hyphen mittels Geißelfärbung nach GRAY sichtbar gemacht. Am Ende eines kurzen Seitenzweiges findet sich ein Knöpfchen.

ein Minimum herabzusetzen. Eine so lange Kulturdauer war erforderlich, da *Hyphomicrobium*, ähnlich wie die nitrifizierenden Bakterien, nur sehr langsam wächst. Als Reinheitskriterium diente neben dem lichtmikroskopischen Bild das Ausbleiben

einer Trübung von Fleischextraktbrühe und Hefewasser. Zwar erfolgte auf diesen Substraten schwache Vermehrung, die aber nicht mit der bekannter, heterotropher Organismen zu vergleichen war. Der sich nach mehreren Tagen auf der Oberfläche bildende feine, fast weiße Film bestand lediglich aus den durch Hyphen miteinander verfilzten Zellen von *Hyphomicrobium*. Notwendig erschien es aber, daß verhältnismäßig stark geimpft wurde.

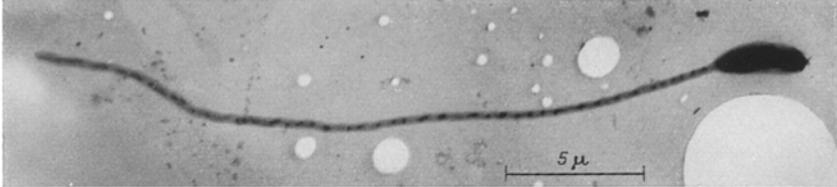


Abb. 2. *Hyphomicrobium vulgare*. Sowohl in den Zellen wie in der Hyphe zeigt sich eine Innenstruktur. Elektronenoptisch. (ENGEL u. MEVIUS jr. 1951.)

Was die Verbreitung von *Hyphomicrobium* betrifft, so wurde sein Vorkommen in folgenden Boden- und Wasserproben festgestellt: Botanischer Garten Hamburg, Komposthaufen; Wedel/Holstein, Sandboden; Elbe bei Cuxhaven; Burgsteinfurt/Westf., Waldboden; Lissabon, lehmiger Sand; Geisecke/Ruhr, sandiger Lehm; Ruhrstau bei Geisecke. Nicht gefunden wurde es lediglich in einer Ackerbodenprobe aus Schweden. Der Organismus ist also, wie auch schon von anderen Autoren betont wurde, ein sehr verbreiteter Bewohner des Bodens und Wassers.

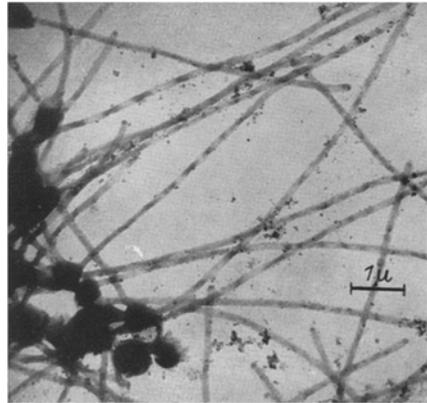


Abb. 3. *Hyphomicrobium vulgare*. Innenstruktur der Hyphen. Elektronenoptisch.

Da über das mikroskopische Bild des von mir isolierten Stammes von *Hyphomicrobium* bereits eingehend berichtet worden ist (ENGEL u. MEVIUS jr. 1951), seien hier nur kurz einige ergänzende Hinweise gegeben. Bei Anwendung von Methoden der Geißelfärbung färbten sich die Hyphen besonders gut, und ich konnte bestätigen, daß neben den normalen Hyphen auch solche mit Verzweigungen vorkommen. Gelegentlich war an den Enden der Verzweigungen ein Knöpfchen sichtbar (Abb. 1). Über den Aufbau der Hyphen ließen sich aber nach dieser Methode keine Aussagen machen. Im Elektronenmikroskop zeigten die Hyphen „auf ihrer ganzen Länge eine Gliederung in dunklere und hellere Partien in mehr oder weniger regelmäßiger Reihenfolge“ (ENGEL u. MEVIUS jr. 1951) (Abb. 2 u. 3).

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß JAKOB (1947) überraschend ähnliche Strukturen bei elektronenoptischen Aufnahmen von Lues-*Spirochäten* gefunden hat. SCHLOSSBERGER, JAKOB u. PIEKARSKI (1950) nahmen an, daß bei den Spirochäten auf der Länge der „Spiralen“ mehrere Nucleoide verteilt sind. Geradezu verblüffend ähnlich sind auch die elektronenoptischen Aufnahmen JAKOBS (1947 a) von *Leptospira canicola*. Bei einem seiner Stämme trat nach jahrelanger Kultur plötzlich eine „S-Form“ auf. Die *Leptospire* war jetzt nicht mehr geschlängelt, sondern glatt und bildete an ihrem Ende eine „Knospe“ aus. Diese Formen sehen im Elektronenmikroskop *Hyphomicrobium* in der äußeren Form sowie in ihrem inneren Aufbau täuschend ähnlich und entsprechen diesem auch in ihrer Größe, so daß der Eindruck entsteht, es könnte sich hier um eine Verunreinigung von *Leptospira canicola* mit *Hyphomicrobium* gehandelt haben.

### Fortpflanzung.

BOLTJES (1936) hat das Wachstum der sich am freien Ende der Fäden ausbildenden Knöpfchen im Dunkelfeld bei Kulturen auf sehr dünnen Agarplättchen verfolgt. Es gelang ihm merkwürdigerweise nicht, *Hyphomicrobium* unter dem Mikroskop in Nährlösung, z. B. im „hängenden Tropfen“ zur Entwicklung zu bringen. Wie später noch ausführlich berichtet werden wird, stellt Methanol ein noch geeigneteres organisches Substrat als Na-Formiat dar. Ich verfolgte daher in diesem Medium die Entwicklung von *Hyphomicrobium* und benutzte zur Beobachtung das Phasenkontrastverfahren (Firma E. Leitz).

Das Präparat befand sich auf einem Heiztisch bei 37° C. Neben der visuellen Beobachtung wurden als Beleg Serien photographischer Aufnahmen mit Hilfe des Mikroansatzes (Stutzen ½-fach) und der Leica hergestellt. Als Film bewährte sich am besten der „Micro-Film“ der Eastman-Kodak Company, Rochester, N. Y., USA, in Verbindung mit einem strengen orange Lichtfilter. Beim Phasenkontrastverfahren war die Verwendung des „hängenden Tropfens“ wegen seiner Linsenwirkung nicht günstig, da dann eine Justierung nur sehr schwer zu erreichen ist. Zählkammern eigneten sich auf Grund der relativ großen Schichtdicke des Präparates nicht. Der Phaseneffekt ist desto besser, je dünner das Objekt ist. Nach vergeblichen Versuchen, flachere Kammern herzustellen, wurden schließlich normale Objektträger und große Deckgläser verwendet, zwischen die, nach dem Sterilisieren, mit der Platinöse einige Tropfen einer 1—2 Tage alten Kultur gebracht wurden. Zur Sauerstoffversorgung der Organismen befanden sich einige Luftblasen unter dem Deckglas. Gegen Austrocknen wurde das Präparat mit Paraffin umrandet.

Es zeigte sich das in den Abb. 4—7 wiedergegebene Bild<sup>1</sup>: Am freien Ende der polar ansitzenden, meist unverzweigten Hyphe bildet sich langsam ein kleines Knöpfchen, das in etwa 10—15 Std zu einer länglichen, leicht gekrümmten Tochterzelle heranwächst, die meist etwas länger und schlanker ist als die Mutterzelle. In ihrem Inneren befindet sich, ebenso wie auch in der Mutterzelle, ein länglich-rundlicher, stärker lichtbrechender Körper (siehe auch ENGEL u. MEVIUS jr. 1951). Nach einiger Zeit beginnt die Tochterzelle plötzlich lebhaft zu zappeln, um dann fast ebenso schlagartig wieder zur Ruhe zu kommen. Dieses Spiel

<sup>1</sup> Die übrigen Originalaufnahmen können in der Dissertation eingesehen werden.

wiederholt sich noch mehrfach, bis sich die Zelle schließlich losreißt und sehr schnell, anscheinend mehr oder weniger unter Drehungen um die eigene Achse, im Zickzackkurs davonschwimmt. Nach einiger Zeit bildet sich an der gleichen Hyphe erneut ein Knöpfchen, welches wieder im Laufe von 10—15 Std zu einem Schwärmer heranwächst, der sich losreißt und fortschwimmt. Am Ende einer Hyphe werden also mehrfach

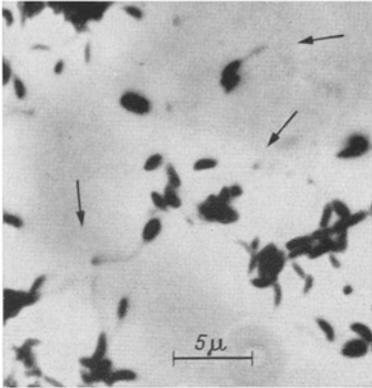


Abb. 4.

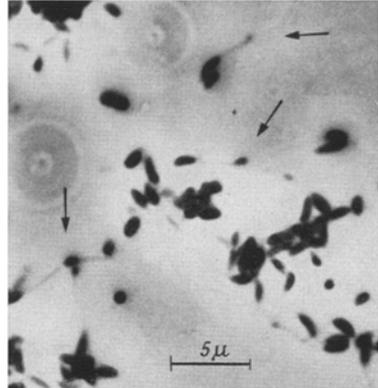


Abb. 5.

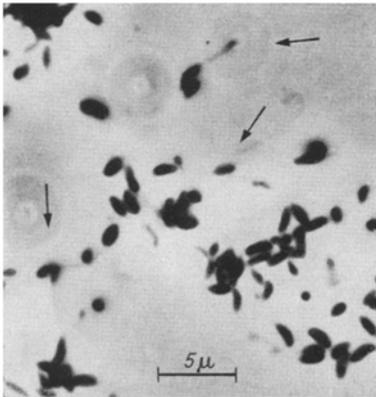


Abb. 6.

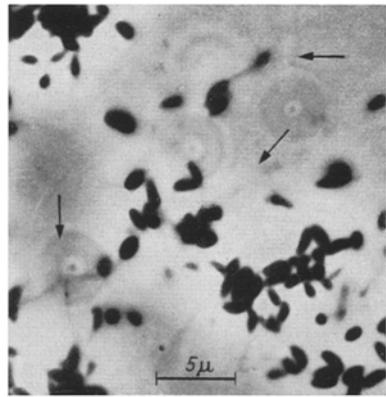


Abb. 7.

Abb. 4—7. Die Serie von Aufnahmen zeigt die Entwicklung von *Hyphomicrobium* in einer etwas älteren Kultur. Besonders schön ist das Wachstum der Tochterzellen bis zum fertigen Schwärmer bei den drei aufeinander zulaufenden Hypphen sowie den am oberen Bildrande liegenden einzelnen Zellen zu verfolgen (siehe Pfeile). An dem freien Hypphenende (Abb. 4) bildet sich zunächst ein kleines Knöpfchen (Abb. 5), welches zu einem leicht gebogenen Schwärmer heranwächst (Abb. 6), sich dann loszappelt und fortschwimmt (Abb. 7).

hintereinander — BOLTJES (1936) gibt für Agarplatten bis zu achtmal an — Schwärmer ausgebildet. Eine andere Vermehrungsart, etwa durch einfache Querteilung der Zellen, konnte ich nicht beobachten.

Damit war es, im Gegensatz zu BOLTJES (1936), gelungen, die Entwicklung der Tochterzellen an den Hyphenenden von *Hyphomicrobium* auch in flüssiger Kultur am lebenden Objekt zu beobachten. Die Geißeln der Schwärmer konnten auch mit spezifischen Geißelfärbungsmethoden nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Lediglich im Dunkelfeld konnte zeitweise an dem der Hyphe entgegengesetzten Pol der Tochterzelle ein heller Hof beobachtet werden, der von einer schnell schlagenden Geißel zu stammen schien.

Lebendaufnahmen der Schwärmer sowie ihrer Bewegungen ließen sich auf Grund der sehr schnellen Beweglichkeit nicht herstellen. Die erforderlichen Belichtungszeiten bedingten sehr starke Lichtquellen, wie sie selbst bei Gleichstrom-Bogenlampen nicht gegeben waren. Auch die von METZNER (1920) angewandte Methodik, mit Hilfe der stroboskopischen Beleuchtung die schnellen Bewegungen sichtbar zu machen, war in Verbindung mit dem Phasenkontrastverfahren nicht gangbar. Vielleicht werden Aufnahmen dieser Art möglich sein, wenn ein Elektronenblitz mit seiner sehr starken Lichtintensität auch für die Mikroskopie zur Verfügung steht.

### Physiologie.

#### *Methodisches zur BARCROFT-WARBURG-Apparatur.*

Um einen Einblick in den Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* zu bekommen, über den bisher nur recht vage Vorstellungen bestehen, die sich zudem bei den verschiedenen Autoren auch noch widersprechen, prüfte ich zunächst den Gaswechsel des Organismus in der BARCROFT-WARBURG-Apparatur (Firma B. Braun, Melsungen). Bei dem langsamen Wachstum von *Hyphomicrobium* und dem zu erwartenden Gaswechsel mußten die Versuche auf 3—10 Tage ausgedehnt werden.

Ich arbeitete mit Differentialmanometern, die nach den Angaben von BÖMEKE (1939) am unteren, umgebogenen Teil geöffnet waren und hier einen Gummischlauchverschluss mit Quetschschraube besaßen, wie er an einfachen Manometern allgemein vorhanden ist (Abb. 8). Geräte ähnlicher Bauart benutzten, wenn auch zu anderem Zweck, WARBURG u. KUBOWITZ (1928) sowie DICKENS u. GREVILLE (1933). Auf die Vorteile dieser Apparatur hat bereits BÖMEKE (1939) hingewiesen, und ich kann seine Angaben nur bestätigen. Die mir zur Verfügung stehenden Manometer besaßen einen Capillarquerschnitt von etwa 1 mm<sup>2</sup>. Eine Verringerung auf 0,2 mm<sup>2</sup> würde bei gleichem Gasumsatz eine erhebliche Vergrößerung der Ausschläge bedeutet haben. Gerade dies wäre für das Arbeiten mit *Hyphomicrobium* mit seinem relativ trägen Gaswechsel äußerst erwünscht gewesen. Leider waren empfindlichere Manometer nicht zu erhalten. Als Reaktionströge wurden Gefäße aus Jenaer Durobax-Glas der Firma B. Braun, Melsungen, Form Ia, verwendet.

Die gebildeten bzw. verschwundenen Gasmengen wurden aus den Druckdifferenzen von jeweils zwei Differentialmanometern berechnet. Dabei arbeitete ich teils mit verschiedenen Mengen Flüssigkeit, jedoch gleichen Zellmengen, also ungleichen Zellkonzentrationen, teils mit verschiedenen Mengen Flüssigkeit und verschiedenen Zellmengen, jedoch gleichen Zellkonzentrationen (GAFFRON 1929). Nach Beendigung eines jeden Versuches testete ich das Substrat durch Abimpfen auf Bouillon und Hefewasser auf Reinheit und prüfte es außerdem mikroskopisch. Ergebnisse aus Ansätzen, bei denen sich eine Verunreinigung zeigte, blieben unberücksichtigt. Den pH-Wert bestimmte ich mittels Merck-Spezial-Indicatorpapier. Er lag um

7,2. Die Temperatur des Wasserbades betrug bei den ersten Versuchen 37° C, später 30° und 25°, da sich bei höherer Temperatur infolge starken Absinkens der Raumtemperatur nachts in den Capillaren, soweit sie aus dem Wasserbad ragten, Kondenswasser ansammelte, was zu Verstopfungen und damit zu Ablesefehlern führte. Die Sterilisation der Reaktionsgefäße erfolgte in einem Becherglas mit Deckel 30 min bei 1 atü strömendem Dampf im Autoklaven, die der Glasgeräte (Pipetten, Zentrifugiergläser usw.) im Trockensterilisator 120 min bei 180° C.

Die größte Gefahr durch Fremdinfektion drohte den Kulturen während des Zentrifugierens. Um sie herabzusetzen, wurden die Zentrifugiergläser mit Deckeln (Stanniolkappen) versehen. Die Manometer selbst wurden mehrfach mit Alkohol abgewaschen, abgeflammt und außerdem von Zeit zu Zeit im Autoklaven sterilisiert, da sich gezeigt hatte, daß sich in den Schlifflen und den benachbarten Capillarstücken Pilze entwickelten (vermutlich auf dem Hahnfett und der Brodieflüssigkeit). Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen fielen noch etwa 50% aller Versuche durch Verunreinigungen aus. Als Dichtungsmittel für die Schlifflie fand anfangs *Adeps lanae*, später Silicone Verwendung.

#### *Atmungsquotient.*

In der Literatur finden sich bisher keinerlei Angaben über den Gaswechsel von *Hyphomicrobium*. Es wächst auf Ameisensäure, Essigsäure, Methanol, Glycerin und anderen relativ einfach gebauten organischen Verbindungen. Es entwickelt sich aber auch in der rein mineralischen Nährlösung nitrifizierender Bakterien und lebt an so energiearmen und ausgefallenen Standorten wie langsam tropfenden Wasserhähnen (BOLTJES 1936). Es ist aber nicht bekannt, wie die organischen Stoffe abgebaut werden, ob dazu Sauerstoff benötigt wird, bzw. wieviel Kohlensäure gebildet wird und ob daneben noch andere Gase entstehen.

Ich untersuchte zunächst, ob für den Abbau solcher Stoffe, auf denen *Hyphomicrobium* wächst (Ameisensäure, Essigsäure u. a.), Sauerstoff benötigt wird und ob das Endprodukt des Stoffwechsels CO<sub>2</sub> ist. Der Atmungsquotient mußte dann bereits gewisse Einblicke in die Art des Abbaues gewähren.

*Hyphomicrobium* wurde in 100 cm<sup>3</sup>-ERLENMEYER-Kolben auf 20 cm<sup>3</sup> der eingangs erwähnten mineralischen Stammlösung gezüchtet, der 0,1% der zu prüfenden organischen Stoffe zugesetzt war. Nach 2—4 Wochen wurde der Inhalt der Kölbchen abzentrifugiert, der Niederschlag in neuer, steriler Nährlösung (20 cm<sup>3</sup>) aufgenommen und 3 bzw. 5 cm<sup>3</sup> dieser Suspension in die Atmungströge der WARBURG-Apparatur gebracht. Diese Versuche liefen ohne Kalilauge in den dafür bestimmten Einsätzen der Reaktionsgefäße, da sich herausgestellt hatte — wie weiter unten noch näher berichtet wird —, daß bei Gegenwart von KOH kein Gaswechsel stattfindet.

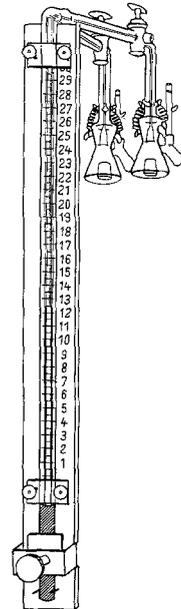


Abb. 8. Differentialmanometer mit Gummischlauchverschluss und Quetschschraube.

Bei Verwendung von Ameisensäure, Essigsäure, Glycerin, Methanol und Äthanol war stets eine Druckabnahme zu beobachten. Unter der Voraussetzung, daß *Hyphomicrobium* nicht in der Lage ist, den freien Luftstickstoff zu binden (wofür keinerlei Anhaltspunkte in der Literatur zu finden sind), konnte unter den gegebenen Umständen die Druckabnahme nur auf einer Sauerstoffaufnahme beruhen (Abb. 9—11). Die Berechnung des Sauerstoffverbrauches ergab bei Na-Formiat, Na-Acetat sowie bei Glycerin typische Wachstumskurven. Sie zeigen, daß auf den geprüften Substanzen neben der  $O_2$ -Aufnahme auch eine Vermehrung der Zellen erfolgte.

Der Nachweis der gleichzeitigen  $CO_2$ -Abgabe in der üblichen Weise durch Zusatz von  $0,5\text{ cm}^3$  Kalilauge in den hierfür bestimmten Einsatz des Reaktionsgefäßes schlug überraschenderweise fehl. Der erwartete

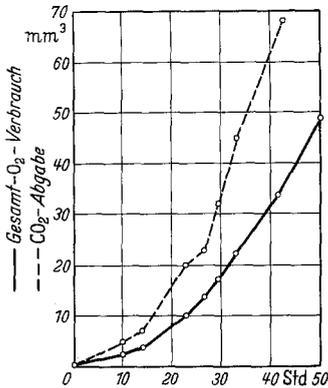


Abb. 9.

Abb. 9. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von *Hyphomicrobium*. Energiequelle: Na-Formiat;  $3\text{ cm}^3$  Zellsuspension bzw.  $3\text{ cm}^3$  Zellsuspension +  $2\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}$ ; Suspension in Stammlösung +  $0,1\%$  Na-Formiat; Temperatur  $30^\circ\text{ C}$ .

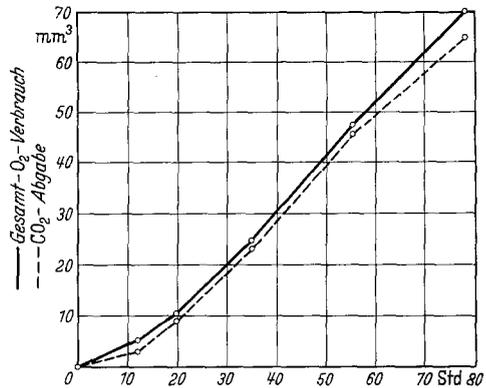


Abb. 10.

Abb. 10. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von *Hyphomicrobium*. Energiequelle: Na-Acetat,  $3$  bzw.  $5\text{ cm}^3$  Zellsuspension in Stammlösung +  $0,1\%$  Na-Acetat; Temperatur  $30^\circ\text{ C}$ .

höhere Druckabfall gegenüber den Versuchen ohne KOH blieb nicht nur aus, sondern es fand überhaupt keine oder nur eine sehr geringe Druckverminderung statt, obwohl die Versuchsdauer bis zu 12 Tagen ausgedehnt wurde (Abb. 12). Mehrfache Wiederholung dieser Versuche bewies, daß kein Irrtum vorlag. Daraus mußte also geschlossen werden, daß der Entzug der Kohlensäure durch den KOH-Zusatz das Wachstum von *Hyphomicrobium* sistierte. Auch zeigte die mikroskopische Kontrolle, daß keine Zellvermehrung stattgefunden hatte. Die Zellen waren schlecht färbbar und anscheinend mehr oder weniger geschädigt. Da der  $pH$ -Wert in den einzelnen Versuchen zwischen  $7,3$  und  $8,0$  lag, sich also von dem in den Reaktionströgen ohne KOH nicht wesentlich unterschied, konnte er nicht der Grund des Wachstumstillstandes sein. Ich werde auf diese bemerkenswerte Tatsache in einem späteren Kapitel noch zurückkommen.

In diesem Zusammenhang sei ein Brief von STUTZER an BURRI erwähnt (STUTZER u. HARTLEB 1898), in dem er mitteilt, daß nach seinen Beobachtungen das Wachstum von *Hyphomicrobium* bei CO<sub>2</sub>-Entzug unterdrückt wurde.

Obwohl es mir somit nicht gelungen war, die Abgabe von CO<sub>2</sub> durch *Hyphomicrobium* unmittelbar zu zeigen, gingen meine weiteren Überlegungen dennoch von der Voraussetzung aus, daß eine solche tatsächlich vorhanden sei. Nimmt man das an, so lassen sich die oben erwähnten Versuche über Sauerstoffaufnahme auch zur Berechnung der CO<sub>2</sub>-Abgabe verwerten (siehe GAFFRON 1929). Man kommt dann zu den in den Abb. 9, 10 und 11 eingezeichneten Kurven.

Aus den Werten für O<sub>2</sub>-Aufnahme und CO<sub>2</sub>-Abgabe lassen sich weiter die Atmungsquotienten berechnen. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, fand ich

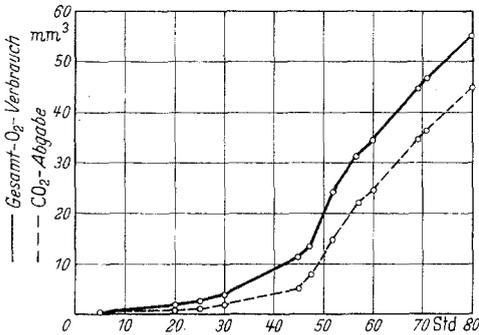


Abb. 11.

Abb. 11. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe von *Hyphomicrobium*. Energiequelle: Glycerin; 3 cm<sup>3</sup> Zellsuspension bzw. 3 cm<sup>3</sup> Zellsuspension + 2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O; Suspension in Stammlösung + 0,1% Glycerin; Temperatur 30° C.

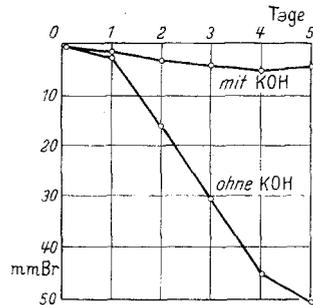


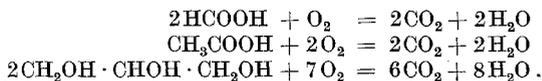
Abb. 12.

Abb. 12. Druckabnahme beim Wachstum von *Hyphomicrobium* mit bzw. ohne KOH-Zusatz. Energiequelle: Na-Formiat Kulturflüssigkeit 5 cm<sup>3</sup>; pH 7,5; Temperatur 30° C.

Tabelle 1. Atmungsquotienten von *Hyphomicrobium*.

Energiequelle	Versuchsbeginn	Atmungsquotient	
		gefundener	erwarteter
Na-Formiat . .	7. 2. 51	2,08	2,00
	21. 3. 51	1,96	
	5. 7. 51	1,89	
Na-Acetat . . .	20. 1. 51	1,02	1,00
	6. 3. 51	1,08	
	9. 3. 51	0,96	
Glycerin . . . .	13. 3. 51	0,845	0,856
	23. 3. 51	0,864	
	25. 3. 51	1,07	

für Ameisensäure den Wert von etwa 2, für Essigsäure 1 und Glycerin 0,9. Das sind Werte, die unter der Annahme zu erwarten sind, daß der Abbau der organischen Energiequellen nach folgenden Gleichungen bis zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O durchgeführt wird:



Wir dürfen aus dieser guten Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment den Schluß ziehen, daß *Hyphomicrobium* die ihm gebotenen Energiequellen tatsächlich in der genannten Weise abbaut. Diese Übereinstimmung kann kein Zufall sein, sondern muß als Beweis für das Vorhandensein einer  $\text{CO}_2$ -Abgabe angesehen werden.

Allerdings war die Übereinstimmung nicht immer so gut wie in Tab. 1, sondern in manchen, wenn auch in der Minderzahl bleibenden Versuchsansätzen traten erhebliche Abweichungen auf, für die ich einstweilen keine Erklärung habe. So wurde auf Oxalsäure in einigen Ansätzen der theoretische Wert  $\text{CO}_2/\text{O}_2 = 4$  gefunden, in anderen dagegen Werte zwischen 2 und 3. Auch Ameisensäure lieferte mitunter völlig abweichende Quotienten. Aber es darf, wie schon betont wurde, nicht übersehen werden, daß der Druck in den Reaktionsgefäßen infolge des trägen Stoffwechsels von *Hyphomicrobium* nur sehr langsam abnahm und die Apparatur für diese Versuche verhältnismäßig wenig empfindlich war. Fehlerquellen der verschiedensten Art machten sich daher äußerst störend bemerkbar.

Weiterhin konnte beobachtet werden, daß der Atmungsquotient während des Versuches nicht konstant bleibt, sondern sich, besonders gegen Ende des Versuches, langsam ändert. Offenbar geht bei Erschöpfung der Energiequelle die Substratatmung langsam in Restatmung über, der zelleigene Stoffe mit anderen Atmungsquotienten zugrunde liegen. Es ist daher für die Berechnung des Atmungsquotienten nicht gleichgültig, zu welchem Zeitpunkt man sie vornimmt. Die oben angegebenen Werte sind für den Zeitraum vom 2. bis zum 3. Versuchstag berechnet. Der erste Versuchstag zeigte meist so kleine Ausschläge an den Manometern, daß der Ablesefehler zu groß wurde und daher eine Berechnung des RQ-Wertes illusorisch war.

Weitere Versuche hatten zum Ziel, den Atmungsquotienten bei Verbindungen mit höherem Molekulargewicht zu ermitteln. Die hierfür benutzten Kohlenhydrate (Glucose, Mannose, Raffinose usw.) wurden getrennt von der Stammlösung durch fraktionierte Sterilisation im Dampftopf keimfrei gemacht, um so ein Karamelisieren und eine Verschiebung des pH-Wertes zu verhindern. Die beobachteten Druckänderungen waren aber, selbst nach mehreren Tagen, so gering, daß sie von der Veratmung von Verunreinigungen herrühren oder auf Restatmung beruhen konnten. Damit findet die Angabe von BOLTJES (1936) eine Bestätigung, wonach *Hyphomicrobium* Zucker nicht verarbeiten kann. Da wegen der geringen Manometerausschläge die der Apparatur innewohnenden Fehler sehr ins Gewicht fielen, sei auf eine bildliche Wiedergabe dieser Versuche verzichtet.

Bei den bisherigen Versuchen befand sich die organische Energiequelle von Anfang an im Bakterienansatz. Das ist insofern nicht ganz einwandfrei, als der beobachtete Gasumsatz nicht allein auf dem Abbau der von

außen gebotenen Energiequellen beruht, sondern diesem auch zelleigene organische Stoffe zugrunde liegen können. Jedenfalls blieb dabei unbekannt, wie sich die beobachtete Atmung quantitativ auf beide verteilte. Um hierüber mehr aussagen zu können, gab ich in den folgenden Versuchen die Energiequelle in den seitlichen, dafür bestimmten Ansatz der Reaktionsgefäße und kippte sie erst während des Versuches zu, nachdem die Zellen zunächst in der Hauptsache ihre Restatmung durchgeführt hatten.

Durch diese Art der Versuchsanstellung wurde zudem der Einfluß der organischen Energiequelle auf die Atmung noch augenscheinlicher. Nach dem Zentrifugieren einer 14 Tage alten Kultur wurden die Zellen in neuer, diesmal rein mineralischer, steriler Nährlösung aufgeschwemmt. Die organische Substanz befand sich als meist 1% ige Lösung in dem Seitenansatz der Reaktionsgefäße. Nach einer Versuchsdauer von 2—3 Tagen wurde sie der Zellsuspension zugekippt.

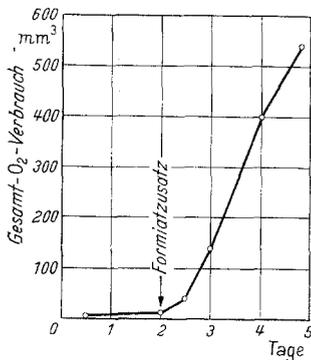


Abb. 13.

Abb. 13. Sauerstoffaufnahme von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Na-Formiat; 5 cm<sup>3</sup> Zellsuspension (Stammlösung); 1 cm<sup>3</sup> Zusatz (1% ige Na-Formiatlösung); Temperatur 30° C.

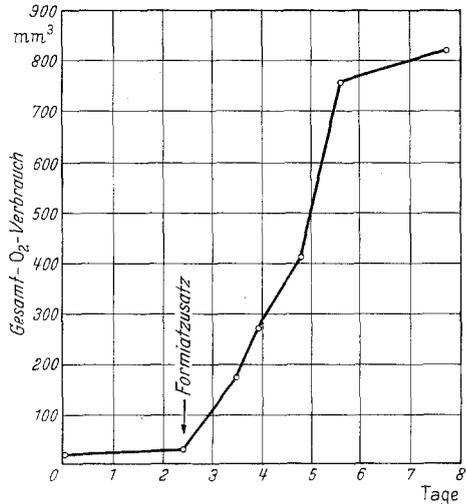


Abb. 14.

Abb. 14. Sauerstoffaufnahme von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Na-Formiat; 5 cm<sup>3</sup> Zellsuspension (Stammlösung); 1 cm<sup>3</sup> Zusatz (0,25% Na-Formiat); Temperatur 30° C.

Das Ergebnis einiger solcher Versuche ist in den Abb. 13—15 wiedergegeben. In fast allen Ansätzen erfuhr die Atmung unmittelbar nach Zukippen der organischen Substanz eine sehr beachtliche Steigerung. Diese Substratatmung war gegenüber der Restatmung so groß, daß letztere für die Berechnung des Atmungsquotienten nicht wesentlich ins Gewicht fiel. Das erkennt man besonders deutlich bei den Ansätzen mit gleichzeitiger Kontrolle. (Organische Substanz im Ansatz wurde nicht zugekippt.)

Bei den von mir benutzten Alkoholen erwies sich die obige Versuchsanstellung jedoch als nicht anwendbar. Die Manometer zeigten bereits vor Zukippen der organischen Substanz beträchtliche Druckabnahmen

(Abb. 16). Es wurde also Sauerstoff verbraucht, obwohl die Nährlösung anfangs keine Energiequelle enthielt. Die Substrat-Atmung von *Hyphomicrobium* muß also durch Überdestillieren des Alkohols aus dem seitlichen Ansatz in die Nährlösung unterhalten worden sein. Um aber festzustellen, wie *Hyphomicrobium* im Augenblick des Alkoholzusatzes reagiert, wurde der Alkohol nach getrenntem Sterilisieren von außen mittels keimfreier Pipette zur Nährlösung hinzugegeben. Wie man sieht (Abb. 17 und 18), veratmet *Hyphomicrobium* die beiden Alkohole ausgezeichnet, jedenfalls wesentlich schneller als die entsprechenden organischen Säuren. Der Atmungsquotient wurde nicht berechnet, da der Dampfdruck des Alkohols als dritte veränderliche Größe in die Formel eingeht.

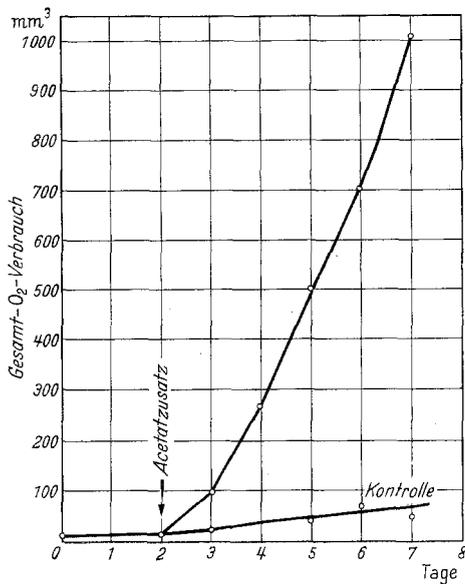


Abb. 15.

Abb. 15. Sauerstoffaufnahme von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Na-Acetat; 5 cm<sup>3</sup> Zellsuspension (Stammflösung); 1 cm<sup>3</sup> Zusatz (1% iges Na-Acetat); Temperatur 30° C.

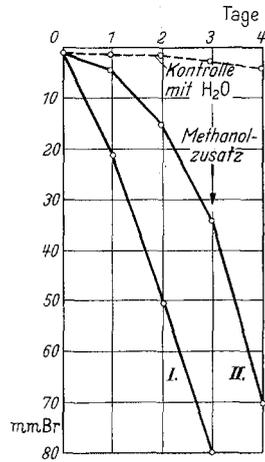


Abb. 16.

Abb. 16. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; 2% iges Methanol im Seitenansatz. Kontrolle mit H<sub>2</sub>O; I und II sind Parallelansätze. Temperatur 28° C.

Mit den beiden Alkoholen wurden auch noch folgende Versuche angestellt: Etwa 500 cm<sup>3</sup> Luft, die mit einer 1% igen Alkohollösung im Gleichgewicht standen, wurden unter Zwischenschalten eines Wattefilters durch die Reaktionsgefäße gedrückt. Somit stand *Hyphomicrobium* nach Verdrängen der gewöhnlichen Luft nur Alkoholdampf als Energiequelle zur Verfügung. Der Gaswechsel stieg, wie Abb. 19 und 20 zeigen, in den Versuchsgefäßen sehr schnell an, während sich in den Kontrollen, durch die normale Luft gedrückt war, kein Ansteigen zeigte.

In welcher Weise der Alkohol aufgenommen wird, ob durch die Kahlhaut als Dampf aus dem Gasraum oder erst als Lösung nach Übertreten in die flüssige Phase, kann nicht entschieden werden.

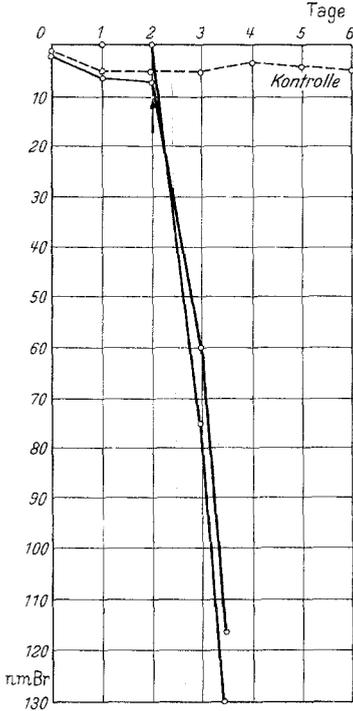


Abb. 17. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; bei (↑) Zugabe von 1 cm³ 1% Methanol mit Hilfe einer Pipette; 5 cm³ Zellsuspension; Temperatur 30° C.

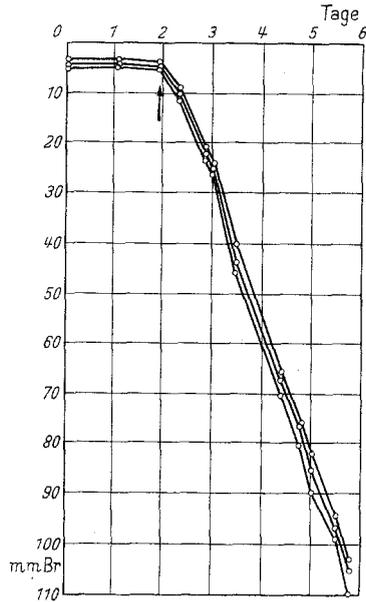


Abb. 18. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; bei (↑) Zugabe von 1 cm³ 1% Äthanol mit Hilfe einer Pipette; 5 cm³ Zellsuspension; Temperatur 30° C.

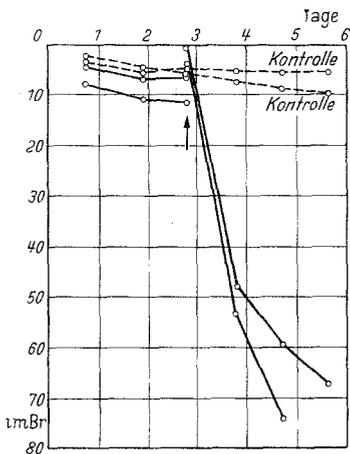


Abb. 19. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Methanol; 5 cm³ Zellsuspension in Stammlösung. Bei (↑) wurden durch den Reaktionsstrom 500 cm³ Luft geleitet, die mit einer 1% igen Methanollösung im Gleichgewicht standen, geleitet.

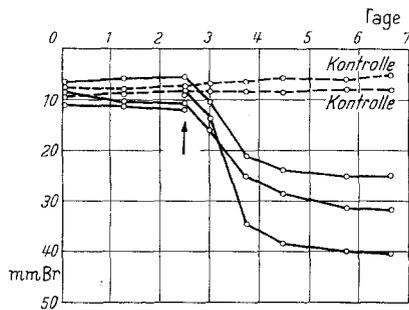


Abb. 20. Druckabnahme während der Atmung von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: Äthanol; 5 cm³ Zellsuspension in Stammlösung. Bei (↑) wurden durch den Reaktionsstrom 500 cm³ Luft geleitet, die mit einer 1% igen Äthanolösung im Gleichgewicht stand.

### *Energiequellen.*

Bei Verwendung von flüchtigen Alkoholen als Energiequelle in der WARBURG-Apparatur wurde, wie erwähnt, beobachtet, daß sie bereits als Gas verwertet werden können. Deshalb wurden auch noch andere flüchtige organische Verbindungen geprüft.

Mehrere weithalsige Kulturkolben wurden mit rein mineralischer Nährlösung in einen Exsiccator gebracht, in dem sich ein Becherglas mit der jeweils zu prüfenden Substanz in wäßriger Lösung befand oder durch den das entsprechende Gas-Luft-Gemisch geleitet war. Als Kontrolle diente ein Exsiccator, in dem sich an Stelle der Substanzlösung destilliertes Wasser befand. Nach 3—10 Tagen wurde das Wachstum mikroskopisch geschätzt. Genauere quantitative Angaben ließen sich nach dieser Methode nicht machen.

Auf dem Weg über die Gasphase können danach außer Methanol und Äthanol noch Formaldehyd und wahrscheinlich auch Methan, Chloroform, Leuchtgas und Essigsäure das Wachstum von *Hyphomicrobium* unterhalten, während Acetaldehyd, Propionsäure, Isobutylalkohol, n-Butylalkohol, Butylacetat, Benzol, Benzaldehyd und anscheinend auch Ameisensäure hierzu nicht in der Lage sind. Diese Versuche hatten aber nur orientierenden Charakter, und ihre Ergebnisse sind daher nicht endgültig.

In weiteren Versuchen prüfte ich die quantitative Ausbeute an *Hyphomicrobium* auf den flüchtigen Energiequellen, die sich als besonders geeignet für das Wachstum erwiesen hatten. Das Auszählen der Proben in einer Zählkammer war, da die Zellen mit ihren Hyphen mehr oder weniger zu einer Haut verfilzen, unmöglich. Die Bestimmung des Kohlenstoffs, wie in den weiter unten angeführten Versuchen, war für den vorliegenden Zweck zu zeitraubend und daher nicht durchführbar. Es wurde schließlich das Trockengewicht als Vergleichsmaß verwendet.

Ein 250 cm<sup>3</sup>-Becherglas mit 25 cm<sup>3</sup> der mineralischen Nährlösung stand auf einem Glasgestell in einem 1000 cm<sup>3</sup> Weckglas, dessen Schliff zur Abdichtung mit Silicone (DC 44-leicht) eingerieben und dessen Deckel mit einer Feder befestigt war. Die üblichen Gummiringe mußten ausgeschaltet werden, da ihr Verhalten gegenüber Dämpfen org. Verbindungen nicht bekannt war. Sterilisation im Autoklaven 30 min im strömenden Dampf. Ähnlich wie bei den Exsiccatorversuchen wurden 10 cm<sup>3</sup> einer wäßrigen Lösung der zu untersuchenden Substanz mittels einer sterilen Pipette auf den Boden des Weckglases gegeben und die Nährlösung mit einer Platinöse beimpft.

Bei makroskopischer Betrachtung schien sich die Kulturflüssigkeit am dritten Tag nach Beimpfen plötzlich zu trüben. Es zeigte sich aber, daß *Hyphomicrobium* in erster Linie als dichte Kahmhaut auf der Oberfläche der Nährlösung wuchs, ferner auch als Film an den Wänden der Bechergläser unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche; dies war die Ursache der „Trübung“. Die Nährlösung selbst war fast frei von Organismen. Der Inhalt eines Becherglases wurde nach 8—10 Tagen abzentrifugiert, zweimal mit dest. Wasser gewaschen und bei 60° C im Vakuumtrocken-

schränk bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tab. 2. Methanol stellt also anscheinend die günstigste Energiequelle für *Hyphomicrobium* dar. Bei den 1-C-atomigen Verbindungen dürfte die Reihenfolge des Wachstums Methanol > Formaldehyd > Ameisensäure sein. Die Trockengewichte auf  $\frac{1}{100}$  mol Methanol und  $\frac{1}{100}$  mol Formaldehyd — die allein vergleichbar sind — verhalten sich wie 1,8 : 1, also fast wie die Verbrennungswärmen. Die Ausbeute ist bei Methanol am günstigsten.

Tabelle 2. *Eignung flüchtiger Kohlenstoffverbindungen für Hyphomicrobium.*

Kulturdauer in Tagen	Energiequelle	Konz. mol	cm <sup>3</sup>	Verbrennungswärme kcal/mol	Trocken- gew. mg	Ausbeute %
7	Methanol	$\frac{1}{10}$	10	182,6	7,8	26
7	„	$\frac{1}{10}$	10	182,6	8,0	26,5
8	„	$\frac{1}{30}$	10	182,6	7,3	24,1
13	„	$\frac{1}{100}$	10	182,6	1,6	52
10	„	$\frac{1}{100}$	10	182,6	1,5	50
10	„	$\frac{1}{100}$	10	182,6	1,5	50
10	Formaldehyd	$\frac{1}{10}$	10	134,1	kein Wachstum	
8	„	$\frac{1}{100}$	10	134,1	0,8	26,5
18	„	$\frac{1}{100}$	10	134,1	0,8	26,5
10	Ameisensäure	$\frac{1}{10}$	10	69,4	0,1	3,3
10	„	$\frac{1}{10}$	10	69,4	0,08	2,7
6	Äthanol	$\frac{1}{10}$	10	372,8	0,6	1
10	„	$\frac{1}{10}$	10	372,8	0,6	1
10	„	$\frac{1}{100}$	10	372,8	0,4	6,2
10	„	$\frac{1}{100}$	10	372,8	0,5	8,7

Als nicht mehr daran zu zweifeln war, daß *Hyphomicrobium* eine ganze Anzahl einfacher organischer Stoffe unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren vermag, interessierte vor allem die Frage, wieviel Kohlenstoff in die Substanz der Zellen eingebaut wird. Dabei wurde zunächst vorausgesetzt, daß dieser zelleigene Kohlenstoff tatsächlich dem von außen gebotenen organischen Substrat entnommen wird. Wir werden weiter unten noch sehen, daß diese Voraussetzung keineswegs gesichert erscheint. Da sich Methanol als hervorragend geeignetes Substrat erwies, setzte ich die folgenden Versuche nur noch mit ihm an.

In die bereits oben erwähnten Weckgläser wurde eine bekannte Menge — meist 5 bzw. 10 cm<sup>3</sup> — einer 1%igen Methanollösung gegeben, bzw. als Kontrolle die gleiche Menge dest. Wasser. Bereits makroskopisch war nach wenigen Tagen eine deutliche Abstufung des Wachstums zwischen den Kontrollen, der einfachen und der doppelten Methanolmenge zu

erkennen. Nach einigen Tagen wurde der Kohlenstoff des Becherglasinhaltes nach der von ENGEL (1941) und BÖMEKE (1951) angegebenen Weise auf nassem Wege durch Verbrennen mit Chromschwefelsäure be-

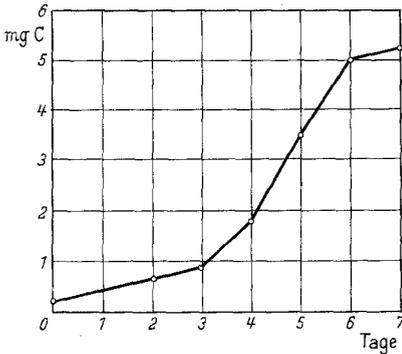


Abb. 21. Wachstum von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: 5 cm<sup>3</sup> Methanol 1%; Temperatur 37° C; pH = 7,2.

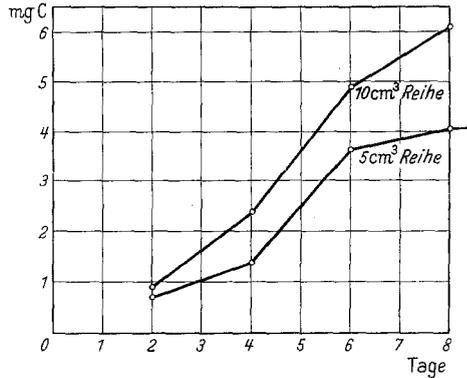


Abb. 22. Wachstum von *Hyphomicrobium*; Energiequelle: 5 bzw. 10 cm<sup>3</sup> Methanol 1%; Temperatur 37° C.

stimmt. Nach anfänglichen Mißerfolgen zeigte sich, daß vor der Kohlenstoffbestimmung die Bechergläser zunächst 1½ Std in einen Vacuum-trockenschrank bei 75° C und 0,95 kg/cm<sup>2</sup> Unterdruck gebracht werden

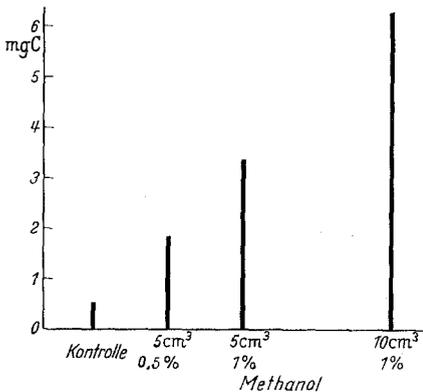


Abb. 23. In *Hyphomicrobium* eingebauter Kohlenstoff (Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen). Energiequelle: 5 bzw. 10 cm<sup>3</sup> Methanollösung; beimpft: 23. 1. 52 bzw. 23. 5. 52; C-Best.: 3. 2. 52 bzw. 31. 5. 52; Temperatur 37° C.

mußten, um etwa noch vorhandenes Methanol zu entfernen, das bei der Bestimmung die gefundenen Werte verfälschte. Die Zunahme der Kohlenstoffmenge in Abhängigkeit von der Zeit geht deutlich aus Abb. 21 hervor. Die Kurve stellt eine typische Wachstumskurve dar, deren Abklingen nach etwa 8 Tagen durch den völligen Verbrauch des Methanols bedingt ist. Etwa 30% des in Form von Methanol in die Weckgläser gegebenen Kohlenstoffs wurden in den Bechergläsern wiedergefunden. Selbst wenn man annimmt, daß die am ersten Tage gefundenen Kohlenstoffmengen auf Verunreinigungen der Nährsalze zurückzuführen sind, ändert sich an dieser Zahl praktisch nichts.

In einer weiteren Versuchsserie sollte festgestellt werden, ob durch Verdoppelung der Methanoldmenge, bei gleichbleibender Konzentration

mußten, um etwa noch vorhandenes Methanol zu entfernen, das bei der Bestimmung die gefundenen Werte verfälschte. Die Zunahme der Kohlenstoffmenge in Abhängigkeit von der Zeit geht deutlich aus Abb. 21 hervor. Die Kurve stellt eine typische Wachstumskurve dar, deren Abklingen nach etwa 8 Tagen durch den völligen Verbrauch des Methanols bedingt ist. Etwa 30% des in Form von Methanol in die Weckgläser gegebenen Kohlenstoffs wurden in den Bechergläsern wiedergefunden. Selbst wenn man annimmt, daß die am ersten Tage gefundenen Kohlenstoffmengen auf Verunreinigungen der Nährsalze zurückzuführen sind, ändert sich an dieser Zahl praktisch nichts.

derselben (Abb. 22, 23), auch ungefähr eine Verdoppelung der Kohlenstoffausbeute zu beobachten war.

Jetzt erkennt man, daß unter Berücksichtigung der Kontrollen (Ansätze ohne Methanol) die Beziehung zwischen Kohlenstoff in der gebotenen Energiequelle und Kohlenstoff in *Hyphomicrobium* ungefähr eine lineare ist. Hierdurch könnte der Eindruck erweckt werden, als ob *Hyphomicrobium* seinen Kohlenstoffbedarf allein aus dem Methanol gedeckt habe. Ob dies zutrifft, soll aber erst entschieden werden, wenn die Frage untersucht wird, welche Bedeutung die Kohlensäure im Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* spielt. Wir sahen ja bereits, daß in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> keine Sauerstoffaufnahme und daher wahrscheinlich auch kein Abbau des organischen Substrates möglich ist.

#### *Bedeutung des freien Kohlendioxyds.*

Bereits die manometrischen Versuche hatten die auffällige Tatsache ergeben, daß das Wachstum von *Hyphomicrobium* bei Entzug des freien Kohlendioxyds sistiert wird. Der Organismus braucht offenbar dieses Gas, um normal leben zu können. Um in dieser Frage ganz sicher zu gehen, setzte ich folgende Versuche an:

Am 14. 2. 51 wurden 8 ERLÉNMEYER-Kolben mit 0,1%iger Na-Formiat-Nährlösung, am 23. 2. 51 weitere 8 Kolben mit 0,1%iger Ammoniumoxalat-Nährlösung und als Wiederholung der ersten Serie am 24. 2. 51 erneut 8 Kolben mit 0,1%iger Na-Formiat-Nährlösung beschickt und mit *Hyphomicrobium* beimpft. Jeweils 4 Kolben wurden in einem Exsiccator über etwa 15%iger Kalilauge untergebracht, während die restlichen 4 Kolben jeweils als Kontrolle (ohne KOH) dienten.

Nach einem Aufenthalt von einer Woche im Brutschrank bei 37° C zeigte sich bei mikroskopischer Beobachtung in den CO<sub>2</sub>-Mangelkolben kein Wachstum, während sich *Hyphomicrobium* in den Kontrollen stets vermehrte. Der p<sub>H</sub>-Wert in den Kolben über Kalilauge schwankte zwischen 6,8 bis 7,2, während er in den Kontrollen bis 7,6 anstieg. Dieser höhere p<sub>H</sub>-Wert in den Kontrollkolben beruhte höchstwahrscheinlich auf der physiologisch alkalischen Reaktion des Na-Formiates bzw. Ammoniumoxalates. Er bestätigte gewissermaßen den mikroskopischen Befund insofern, als eine Reaktionsverschiebung auf physiologischer Grundlage nur möglich ist, wenn Wachstum, verbunden mit Abbau der organischen Säuren, stattfindet. Da in Gegenwart von Kalilauge im Exsiccator keine nennenswerte Reaktionsverschiebung stattfand, kann daraus geschlossen werden, daß hier ein Wachstum nicht möglich war. Ursache kann nur der CO<sub>2</sub>-Mangel sein.

Trotzdem sollte der Nachweis der Notwendigkeit freien Kohlendioxyds für das Wachstum von *Hyphomicrobium* auch noch auf einem anderen Wege erbracht werden.

Durch die Kulturen wurde ein ständiger, mit Hilfe von Kalilauge und Barytwasser CO<sub>2</sub>-frei gemachter Luftstrom geschickt, der bei den ersten Versuchsreihen

in der Apparatur durch Unterdruck erzeugt, später mittels eines Kompressors durch die Waschflaschen gedrückt wurde. Hierbei fallen kleinste Undichtigkeiten in der Apparatur, die selbst bei Verwendung von Vacuumschläuchen und Schliffen leicht auftreten können, nicht ins Gewicht. Der Luftstrom betrug etwa 6 l/Std. Zur besseren Luftverteilung fanden sich in den Kulturkolben sowie einem Teil der Waschflaschen Schott-Glasfritten G 1. Beimpft wurden die Versuchskolben mit 0,5 bzw. 1,0 cm<sup>3</sup> einer gut wachsenden, nicht zu alten Kultur.

In allen Fällen zeigte *Hyphomicrobium* im CO<sub>2</sub>-freien Luftstrom praktisch kein Wachstum, während es sich bei Durchleiten von CO<sub>2</sub>-haltiger Luft stark vermehrte. Das Ansteigen der p<sub>H</sub>-Werte der Kontrollen (auf 7,0—8,0) im Gegensatz zu den CO<sub>2</sub>-Mangelreihen (auf 6,8—7,8) konnte auch hier, wenngleich nicht so ausgeprägt wie in den Exsiccatorversuchen, beobachtet werden. Wurde dagegen ein schwächerer Luftstrom, etwa 0,5 l/Std, durch die Gefäße geschickt, so kam es zu mehr oder weniger starker Zellvermehrung auch im CO<sub>2</sub>-freien Luftstrom. Dies Phänomen läßt sich vielleicht so erklären, daß das von den eingepfropften Organismen aus der Ameisensäure der Nährlösung gebildete Kohlendioxyd ausreichte, um den CO<sub>2</sub>-Bedarf der Kultur zu decken. Diese Kohlensäure wurde den Zellen nicht, wie bei starker Belüftung, wieder entzogen.

Ähnliches beobachtete FARGHALY (1950) bei Leuchtbakterien. Er fand, daß *Achromobacter Fischeri* in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> weder wuchs noch leuchtete. Durch Zusatz bestimmter Aminosäuregemische konnte diese Hemmung aufgehoben werden, aber nur dann, wenn der Strom CO<sub>2</sub>-freier Luft nicht zu stark wurde.

#### CO<sub>2</sub>-Assimilation.

Die Kohlensäure spielt also irgendwie eine lebensnotwendige Rolle im Stoffwechsel von *Hyphomicrobium*. Damit sind die in den letzten Jahren sich häufenden Beobachtungen über die Notwendigkeit dieses Gases oder zumindest über die Möglichkeit seiner Verwertung durch Mikroorganismen (RABINOWITSCH 1945, RIPPEL-BALDES 1952) um eine weitere bereichert worden. Es fragt sich nun, ob die Kohlensäure unmittelbar in den Stoffwechsel eingreift oder nur durch ihre Gegenwart wirkt.

So könnte *Hyphomicrobium* einen ähnlichen Stoffwechsel wie die „echten“ autotrophen Bakterien besitzen. Die organische Substanz könnte als Energiequelle dienen, während der Kohlenstoff der Zellsubstanz durch Reduktion der atmosphärischen Kohlensäure gewonnen wird, ähnlich wie bei den methanoxydierenden Bakterien (SÖNGEN 1906), bei denen bekanntlich der klassische Begriff der Chemo-Autotrophie zuerst gesprengt wurde. Die Wärmetönung der von *Hyphomicrobium* durchgeführten Oxydationen organischer Stoffe sind so beträchtlich, daß ein Teil dieser Energie wie bei der anorganischen Chemosynthese zur Reduktion der atmosphärischen Kohlensäure dienen könnte. Als Wasserstoffdonator könnte entweder ein Teil der organischen Substanz oder, in Parallele zur Photosynthese und vermutlich auch der anorganischen Chemosynthese (z. B. bei den Salpeterbakterien), das Wasser dienen. Ferner besteht die Möglichkeit (RABINOWITSCH 1945), daß ein Teil der organischen Substanz direkt für die heterotrophe Assimilation benötigt wird, während der Rest als Energielieferant Verwendung findet. Seit langem ist

z. B. von den *Athiorhodaceen* bekannt, daß bei ihnen die Grenze zwischen Autotrophie und Heterotrophie verwischt ist. Organische Stoffe — wie Fettsäuren, Alkohole usw. — dienen als Wasserstoffdonatoren bei der Reduktion der Kohlensäure, welche zur Synthese der Körpersubstanz verwendet wird, sie werden aber selbst nicht zum Aufbau zelleigener Substanz benutzt.

Weiterhin könnte die Bindung von  $\text{CO}_2$  entsprechend der WOOD-WERKMAN-Reaktion stattfinden. WOOD u. WERKMAN (1942) fanden, daß z. B. Propionsäurebakterien in der Lage sind, aus Glycerin unter Aufnahme von  $\text{CO}_2$  (auf dem Weg über Brenztraubensäure) Bernsteinsäure zu bilden. Die Kondensation von Brenztraubensäure (einer 3-Kohlenstoffverbindung) mit  $\text{CO}_2$  zu Oxalelessigsäure, die zu einem Teil zu Bernsteinsäure reduziert wird (beides 4-Kohlenstoffverbindungen), scheint allgemein verbreitet zu sein, so z. B. bei *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Hefe* usw., aber auch bei höheren Pflanzen. Ein ähnlicher Reaktionstyp, bei dem  $\text{CO}_2$  gebunden wird, wurde von LIPMANN u. TUTTLE (1945) beschrieben. Es ist die Umkehr der oxydativen Decarboxylierung von Brenztraubensäure in Gegenwart von anorganischen Phosphorverbindungen. Schließlich fand OCHOA (1945 u. 1948) eine enzymatische Carboxylierung, bei der Triphospho-Pyridin-Nukleotid (TPN) eine wesentliche Rolle spielt und die bekannte Decarboxylierung von Isocitronensäure zu  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure umgekehrt wird.

Welcher der hier aufgezeigten Wege der Verwendung der Kohlensäure von *Hyphomicrobium* beschritten wird, bleibt einstweilen unbekannt. Es könnte zudem — wie bereits erwähnt — möglich sein, daß die Kohlensäure hier nicht direkt in den Stoffwechsel eingreift, sondern lediglich durch ihre Anwesenheit wirkt, etwa als Austausch-Anion oder zur Aufrechterhaltung des Plasmagefüges u. a. Was zunächst einmal geprüft werden mußte, war die Frage, ob der Kohlenstoff des  $\text{CO}_2$  überhaupt eingebaut wird oder nicht. Der Lösung dieses Problems kommt man näher, wenn es gelingt, den Weg des Kohlenstoffs der organischen Substanz und den des Kohlendioxyds getrennt voneinander zu verfolgen. Bekanntlich ist dies mit Hilfe von markiertem Kohlenstoff durchführbar, eine Möglichkeit, die in den kurzlebigen  $^{11}\text{C}$ , dem stabilen  $^{13}\text{C}$  und dem langlebigen  $^{14}\text{C}$  gegeben ist.

Bei Versuchen mit radioaktiven Stoffen ist zunächst die Frage zu beantworten, inwieweit eine hierbei auftretende Strahlung die physiologischen Eigenschaften der Zellen beeinflußt. Man könnte geneigt sein, Vergleiche mit UV-Licht und Röntgenstrahlen anzustellen, bei denen es bekanntlich zu Schädigungen kommt. Nach KAMEN (1948) wird aber bei solchen Einwendungen übersehen, daß die Strahlung von Isotopen im wesentlichen nicht von außen her an den Organismus herantritt. Nach ihm sind bei den in der „Tracer-Methodik“ üblichen Konzentrationen von  $^{14}\text{C}$  keine physiologischen Störungen zu erwarten. Genauere Angaben einer verträglichen Bestrahlungsdosis liegen allerdings nicht vor. Auch meine im folgenden aufgeführten Versuche zeigen, daß eine Strahlungsschädigung anscheinend nicht auftritt.

Bei diesen Versuchen arbeitete ich mit der radioaktiven Kohlenstoffisotope  $^{14}\text{C}$ .  $^{14}\text{C}$  ist ein reiner  $\beta$ -Strahler mit einer Maximalenergie von 0,156 MeV. Der Energieabfall kann, da die Versuchsdauer im Verhältnis zur Halbwertszeit von  $^{14}\text{C}$  (etwa

6300 Jahre) sehr klein ist, vernachlässigt werden.  $^{14}\text{C}$  war wegen seiner kurzen Lebensdauer nicht verwendbar, während  $^{13}\text{C}$  nicht so geeignet erschien, weil sein Auffinden nur mit Hilfe des Massenspektrographen erfolgen kann. Die radioaktiven Isotope können hingegen durch die bei ihrem Zerfall emittierte Strahlung leicht nachgewiesen werden.

Die Messung der Aktivität erfolgte mit dem GEIGER-MÜLLER-Strahlungsmeßgerät FH 44 und einem Glockenzählrohr FHZ 15 mit Glimmerfenster  $1,6 \text{ mg/cm}^2$  der Firma Frieseke u. Hoepfner, Erlangen-Bruck.

Der erste Versuch sollte die Frage klären, ob das zum Wachstum von *Hyphomicrobium* notwendige Kohlendioxyd in die Zellen eingebaut oder lediglich lose angelagert oder sonstwie durch seine Gegenwart wirksam wird. Es mußte also *Hyphomicrobium* in einer  $\text{C}^*\text{O}_2$ -haltigen Atmosphäre gezüchtet und anschließend festgestellt werden, ob sich radioaktiver Kohlenstoff in den Bakterienzellen nachweisen ließ.

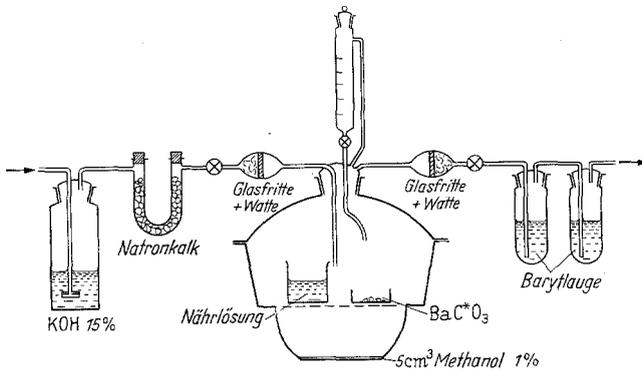


Abb. 24. Apparatur zur Züchtung von *Hyphomicrobium* in einer  $\text{C}^*\text{O}_2$ -haltigen Atmosphäre.

In einem Exsiccator von  $5500 \text{ cm}^3$  Fassungsvermögen befanden sich ein Becherglas mit  $25 \text{ cm}^3$  rein mineralischer Nährlösung sowie eine Schale mit  $25 \text{ mg}$  radioaktivem Bariumcarbonat (etwa  $0,1 \text{ mg C}$ ), aus welchem durch Zusatz von  $15 \text{ cm}^3$   $n/5$  Schwefelsäure  $\text{C}^*\text{O}_2$  freigemacht werden konnte (Abb. 24). Vor Versuchsbeginn wurde die gesamte Apparatur im Autoklaven sterilisiert und, nachdem die Nährlösung beimpft worden war, der Exsiccator mittels Durchleitens ( $\frac{1}{2}$  Std) von  $\text{CO}_2$ -freier Luft  $\text{CO}_2$ -frei gemacht. Jetzt wurden mit Hilfe der aufgesetzten Bürette  $15 \text{ cm}^3$   $1\%$ iges Methanol auf den Boden des Exsiccators gegeben und anschließend durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aus  $\text{BaC}^*\text{O}_3$  das aktive  $\text{C}^*\text{O}_2$  freigemacht. Nach 8—14 Tagen Wachstum — die gesamte Apparatur befand sich während dieser Zeit im Brutschrank bei  $37^\circ \text{C}$  — entfernte ich das aktive  $\text{C}^*\text{O}_2$  mittels Durchleitens von Luft wieder aus dem Exsiccator und fing es in Barytlaug auf. Nach Prüfung der angewachsenen Kultur auf Reinheit durch Abimpfen auf Fleischextraktbrühe und Hefewasser wurden die Bakterien bei  $5000 \text{ Umdr./min}$  abzentrifugiert und durch Aufschlänmen und erneutes Zentrifugieren einmal mit  $20 \text{ cm}^3$   $0,5\%$ iger Phosphorsäure sowie dreimal mit  $20 \text{ cm}^3$  Aqua bidest. gewaschen, auf Messingschälchen (innerer  $\varnothing$   $15 \text{ mm}$ ) gebracht und im Vakuumtrockenschrank bei  $70^\circ \text{C}$  und  $-0,95 \text{ kg/cm}^2$  Druck getrocknet. Es mußte darauf geachtet werden, daß die Bakterien möglichst gleichmäßig auf den Schälchen verteilt waren.  $2 \text{ cm}^3$  der Nährlösung bzw. der verschiedenen Fraktionen des Waschwassers wurden auf Uhrgläsern,  $\varnothing$   $70 \text{ mm}$ , im Trockenschrank eingedampft; der Rückstand wurde auf Aktivität geprüft.

Wie aus den Versuchsergebnissen hervorgeht (Tab. 3), zeigen die Bakterien, die in einer C\*O<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre gezüchtet wurden, eine recht beachtlich hohe Impulszahl, die sich auch durch wiederholtes Auswaschen mit Wasser nicht entfernen läßt. Damit ist gezeigt, daß von *Hyphomicrobium* CO<sub>2</sub> aus der Luft aufgenommen und irgendwie festgelegt wird. Die weitere Frage war jetzt, ob ein Einbau des CO<sub>2</sub> in die Zellen erfolgte oder ob es lediglich adsorptiv gebunden wird. Um dies zu klären, stellte ich Versuche an, bei denen die Aktivität der Organismen nicht insgesamt, sondern die einzelnen Bausteine von *Hyphomicrobium* getrennt auf ihre Aktivität geprüft wurden.

 Tabelle 3. Aufnahme von <sup>14</sup>C durch *Hyphomicrobium*.

Beimpft am:	Abzentrif. am:	<i>Hyphomicrobium</i>		Nährlös. (2 cm <sup>3</sup> ) Imp./min	Phosphorsäure 0,5 % (2 cm <sup>3</sup> ) Imp./min	Waschwasser (2 cm <sup>3</sup> )			Null-effekt Imp./min
		Aktivität Imp./min	Trockengew. mg			1. Imp./min	2. Imp./min	3. Imp./min	
17. 5. 52	26. 5. 52	45000	14,0	7200	—	360	170	100	35
29. 5. 52	6. 6. 52	40000	13,5	3150	1000	360	315	290	265

Die abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien wurden zur Zerstörung der Zellen zusammen mit einem Rest Wasser vorsichtig 5 oder 6 mal bei —5° C langsam eingefroren und bei +30° C wieder aufgetaut. Anschließend entfettete ich sie 3 mal hintereinander mit insgesamt 10 cm<sup>3</sup> Alkohol-Äther 3:1 bei 50° C zur Herauslösung etwa vorhandener Lipide. Die Lösung wurde im Wäageglas eingedampft und auf Aktivität geprüft. Den Bakterienrückstand unterwarf ich einer 8stündigen Hydrolyse mit 4 cm<sup>3</sup> rauchender Salzsäure bei 130° C auf dem Paraffinbad, die anschließend durch Vakuumdestillation bis zur Trockne bei 50° C und 17 mm Hg wieder entfernt werden mußte. Der nach Fleischextrakt riechende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, auf ein Uhrglas übergeführt, abgedampft und erneut in 0,5 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Um die im Alkohol-Äther-Extrakt sowie im Hydrolysat enthaltenen Stoffe voneinander zu trennen, ließ ich mehrere zweidimensionale Papierchromatogramme laufen. Als Papier fand „Schleicher und Schüll 2043b“ 40 × 40 cm Verwendung. Auf den Startpunkt brachte ich mit einer Mikropipette jeweils 0,015 cm<sup>3</sup> des Extraktes bzw. Hydrolysates auf. Das Lösungsmittel des Chromatogrammes war Butanol-Eisessig-Wasser (9:1 Vol.-Teile + Wasser bis zur Trübung, die durch einen Tropfen Eisessig wieder zum Verschwinden gebracht wird) für die eine Richtung, Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:7:6) für die andere. Die Laufzeit betrug 30 bzw. 48 Std. Es wurde absteigend bei 17° C chromatographiert. Nach dem Trocknen im Trockenschrank wurde eines der Chromatogramme mit Ninhydrin als Reagens auf Aminosäuren entwickelt. Es zeigten sich nach ½ Std bei 60° im Trockenschrank blauviolette sowie einige rötliche Flecke. Zur Orientierung war in diesem Chromatogramm 0,001 cm<sup>3</sup> l-Prolinlösung mitgelaufen, die nach dem Entwickeln einen gelben Fleck hinterließ. Da die Färbung der Aminosäuren mit Ninhydrin nur wenige Tage haltbar ist, fotografierte ich die Chromatogramme (Abb. 25)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Herrn Dr. W. WALTER danke ich für die Deutung dieses Chromatogrammes.

Das erstaunliche an dem Chromatogramm ist die stattliche Zahl von mindestens 16 verschiedenen Aminosäuren. Obwohl nur einfachste organische Energiequellen und  $\text{CO}_2$  genügen, um das Leben von *Hyphomicrobium* sicherzustellen, baut es sich ein Aminosäuregemisch auf, das in seiner Vielseitigkeit dem höher stehender Organismen in nichts nachsteht.

Ein zweites Chromatogramm wurde zur Entwicklung der Zucker mit Anilinphtalat gesprüht. Zucker konnten aber nicht nachgewiesen werden. Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen, daß Zucker in der WARBURG-Apparatur von *Hyphomicrobium* nicht ver-

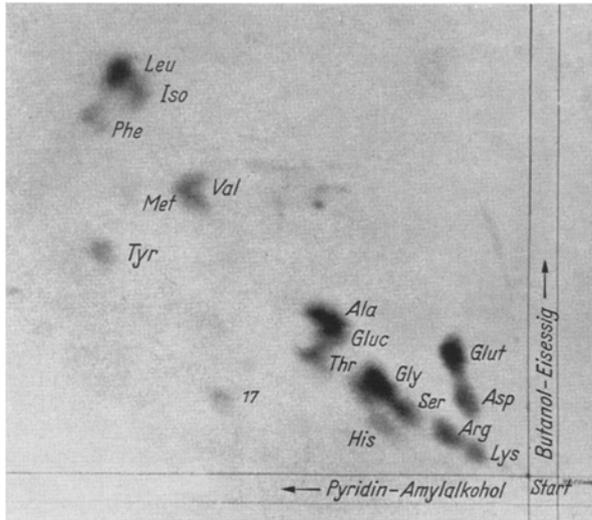


Abb. 25. Papierchromatogramm des Hydrolysates, entwickelt mit Ninhydrin.

Ala	Alanin	Lys	Lysin
Arg	Arginin	Met	Methionin
Asp	Asparaginsäure	Phe	Phenylalanin
Gluc	Glucosamin?	Ser	Serin
Glut	Glutaminsäure	Thr	Threonin
Gly	Glykokoll	Tyr	Tyrosin
Hjs	Histidin	Val	Valin
Iso	Isoleucin	Nr. 17	unbekannt
Leu	Leucin		

arbeitet wurden. Ob zwischen diesen beiden Beobachtungen allerdings ein Zusammenhang besteht — insofern, als die eine eine Bestätigung für die andere ist —, kann heute noch nicht entschieden werden.

Ein drittes Chromatogramm sollte, entsprechend den Angaben von MARKHAM u. SMITH (1949), nach dem Photoprintverfahren mit UV-Licht von  $260\text{ m}\mu$  durchstrahlt und auf Fotopapier kopiert werden. Leider trat, trotz langer Belichtungszeiten, überhaupt keine Schwärzung ein. Wahrscheinlich hängt dies mit dem Lösungsmittelgemisch zusammen, welches Pyridin enthält. Falls von diesem — oder dessen Salz mit Essigsäure — noch Reste in dem Papier sind, besteht die Möglichkeit, daß es nicht mehr UV-durchlässig ist.

Wird  $C^{14}O_2$  in den Stoffwechsel einbezogen und sein Kohlenstoff als Baustein für irgendwelche Zellbestandteile verwendet, so mußte die Prüfung der Chromatogramme auf Aktivität mit Hilfe des GEIGER-MÜLLER-Zählrohres an irgend einer Stelle, wenn nicht gar im gesamten Bereich des Chromatogrammes, positiv ausfallen, negativ dagegen, wenn  $C^{14}O_2$  kein Baumaterial ist. Die Untersuchung der aus dem Papierchromatogramm geschnittenen Flecke sowie des übriggebliebenen Papiers ergab folgendes Bild (Tab. 4).

Tabelle 4. *Einbau von  $^{14}C$  in Aminosäuren von *Hyphomicrobium*.*

	Versuch vom: 7. 7. 52	18. 7. 52
Alanin . . . . .	157	320 Imp./min
Arginin . . . . .	160	316 "
Asparaginsäure . .	150	384 "
Glukosamin? . . .	215	320 "
Glutaminsäure . .	195	430 "
Glykokoll . . . . .	92	316 "
Histidin . . . . .	94	322 "
Isoleucin . . . . .	50	120 "
Leucin . . . . .	58	121 "
Lysin . . . . .	78	180 "
Methionin . . . . .	33	30 "
Phenylalanin . . .	74	128 "
Serin . . . . .	68	100 "
Threonin . . . . .	126	305 "
Tyrosin . . . . .	129	131 "
Valin . . . . .	50	101 "
Nr. 17 . . . . .	86	75 "
Leerstellen . . . .	30	26 "
Nulleffekt . . . . .	19	26 "

Die Werte sind Mittelwerte aus mehreren Messungen.

Es sei bezüglich der Zahlen in der Tabelle noch darauf hingewiesen, daß — wie WEYGAND (1952) betont — bei der Strahlungsmeßtechnik durch direktes Auszählen keine hohen Impulszahlen erwartet werden können, da bei den energiearmen  $\beta$ -Teilchen die Selbstabsorption des Papierses sehr groß ist.

Sämtliche auf dem Chromatogramm gefundenen Aminosäuren waren aktiv, denn ihre Impulszahlen übertreffen die der Leerstellen zum Teil um ein Vielfaches. Daraus geht mit Sicherheit hervor, daß der Kohlenstoff des  $CO_2$  in die Körpersubstanz der Zellen eingebaut wurde, im vorliegenden Falle in die Bausteine des Eiweiß. Überraschend an dem Ergebnis war das Auftreten erhöhter Aktivität in sämtlichen Aminosäuren. Hieraus kann man den Schluß ziehen, daß der Kohlenstoff des  $CO_2$  den gesamten Aufbau des Zelleiweiß beherrscht, wahrscheinlich steht er am Anfang desselben.

Außerdem prüfte ich auch die bei der Aufbereitung der Bakterien gewonnenen Extrakte, Waschwasser usw. auf ihre Aktivität (Tab. 5).

Tabelle 5. Verteilung von  $^{14}C$  in *Hyphomicrobium*-Kulturen.

Versuch vom:	7. 7. 52	18. 7. 52	4. 8. 52
Nährlösung (2 cm <sup>3</sup> ) . . . . .	11 000	4470	5900 Imp./min
Waschwasser 1 (2 cm <sup>3</sup> ) . . . . .	1300	310	430 „
„ 2 (2 cm <sup>3</sup> ) . . . . .	445	240	375 „
„ 3 (2 cm <sup>3</sup> ) . . . . .	410	195	275 „
Alkohol-Äther-Extrakt . . . . .	14550	16500	11450 „
Hydrolysat . . . . .	22000	19000	21000 „
Nulleffekt . . . . .	10	26	25 „

An dem Ergebnis interessierte besonders die hohe Aktivität des Alkohol-Äther-Extraktes. Sie zeigt, daß außer den Aminosäuren auch noch andere Stoffe synthetisiert werden (Lipoide ?), in welche der Kohlenstoff des CO<sub>2</sub> eingeht.

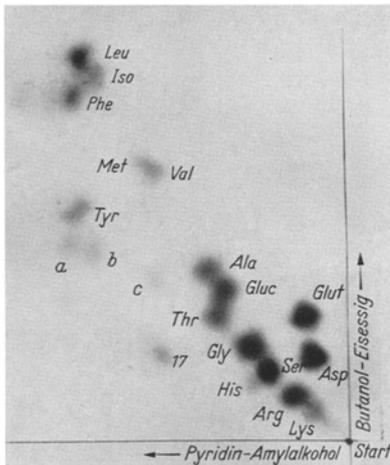


Abb. 26.

Abb. 26. Radioautogramm eines Papierchromatogrammes des Hydrolysates. Abkürzungen der Aminosäuren wie in Abb. 25. *a*, *b* und *c* Flecken unbekannter Herkunft (Purine?).

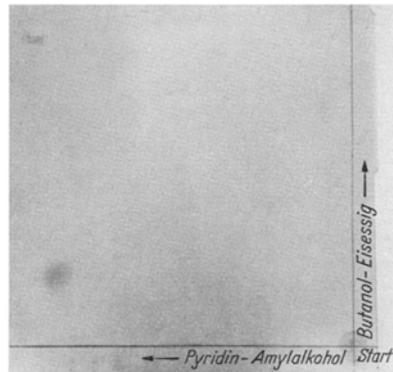


Abb. 27.

Abb. 27. Radioautogramm eines Papierchromatogrammes des Alkohol-Äther-Extraktes.

Um die Flecken höherer Aktivität des Papierchromatogrammes noch einwandfreier als mit dem Zählrohr lokalisieren zu können und um festzustellen, ob außer den Aminosäuren noch weitere Stoffe mit höherer Aktivität in den Chromatogrammen gelaufen waren, wurde ein Autoradiogramm angefertigt, ähnlich den Angaben von CALVIN u. Mitarb. (1951). Zwischen zwei Hartfaserplatten — besser eigneten sich noch Glasplatten — wurde auf das trockene Papierchromatogramm ein Agfa-Film für 10 Tage gepreßt. Er zeigte nach dem Entwickeln das gleiche Bild wie das anschließend auf Aminosäuren entwickelte Papierchromatogramm (Abb. 26).

Außer den als Aminosäuren identifizierten Flecken fanden sich jedoch noch drei Zonen (*a*, *b*, *c*) wesentlich geringerer Schwärzung, die bisher nicht gedeutet werden konnten und die vielleicht auf Purine zurückzuführen sind.

Das Radioautogramm des Papierchromatogrammes des Alkohol-Äther-Extraktes (Abb. 27) zeigte nur einen gewanderten Fleck, während sich weitere Aktivität nur auf dem Startpunkt fand. Daraus geht hervor, daß Purine und Aminosäuren mit Alkohol-Äther 3:1 nicht wesentlich aus den Zellen entfernt wurden. Welche Substanz dem gewanderten Fleck entspricht, muß dahingestellt bleiben. Lipide dürften auf dem Startpunkt erscheinen, da sie in Butanol-Eisessig bzw. Pyridin-Amylalkohol unlöslich sind.

Bei einer weiteren Versuchsreihe sollte die CO<sub>2</sub>-Aufnahme von *Hyphomicrobium* geprüft werden, nachdem dessen Vermehrungsphase abgeschlossen bzw. die Energiequelle verbraucht war. Es bestand immerhin die Möglichkeit, daß das CO<sub>2</sub> einfach durch Ionenaustausch oder auf Grund irgendeiner anderen nicht biochemischen Reaktion bzw. durch nachträgliche Umlagerung innerhalb der Körperbausteine in das Eiweißgerüst der Zellen eingedrungen war und sich dort festgesetzt hatte. In diesem Fall müßte auch nach Einstellung des Wachstums der Zellen (Verbrauch der Energiequelle) im Hydrolysat, bzw. in dessen Aminosäuren eine erhöhte Aktivität nachweisbar sein.

Eine 14 Tage alte, in einem Weckglas herangezogene Kultur wurde in den sterilisierten Exsiccator gebracht. Eine organische Energiequelle stand den Zellen nicht mehr zur Verfügung. Aus aktivem Bariumcarbonat wurde nun, wie bei den bisher beschriebenen Versuchen, C\*O<sub>2</sub> entwickelt. Nachdem dieses 8 Tage auf *Hyphomicrobium* eingewirkt hatte, zentrifugierte ich die Zellen ab und arbeitete sie wie bereits beschrieben auf. Die Prüfung auf Aktivität ergab folgendes Bild (Tab. 6 und 7).

Tabelle 6. Aufnahme von <sup>14</sup>C durch *Hyphomicrobium* nach Aufhören des Wachstums.

	Versuch vom: 14. 7. 52	19. 8. 52
Nährlösung (2 cm <sup>3</sup> ) . . .	1820	5300 Imp./min
Waschwasser 1 (2 cm <sup>3</sup> ) .	60	132 „
„ 2 (2 cm <sup>3</sup> ) .	42	147 „
„ 3 (2 cm <sup>3</sup> ) .	48	127 „
„ 4 (2 cm <sup>3</sup> ) .	35	
Alkohol-Äther-Extrakt .	95	260 „
Hydrolysat . . . . .	3210	2060 „
Nulleffekt . . . . .	30	120 „

Nach Verbrauch der Energiequelle hatte *Hyphomicrobium* keine wesentlichen Mengen CO<sub>2</sub> mehr aufgenommen. Ein gewisser Anstieg der Aktivität im Hydrolysat war allerdings vorhanden, da eine geringe Vermehrung

der Zellen auf Grund der Zerfallsprodukte toter Zellen bzw. der Verunreinigungen der Luft usw. stets stattfindet. Aber dieser Anstieg war gering im Vergleich zu dem des in Tab. 7 wiedergegebenen Versuches. Das Ergebnis war gleichzeitig aber auch ein Beweis dafür, daß bei den vorher beschriebenen Versuchen *Hyphomicrobium* tatsächlich seine Körpersubstanz, zumindest zu einem wesentlichen Anteil, aus dem CO<sub>2</sub> der Luft aufgebaut hatte und der nachgewiesene aktive Kohlenstoff keineswegs allein auf Grund nicht biologischer Umsetzungen bzw. Reaktionen angelagert war.

Tabelle 7. Aufnahme von <sup>14</sup>C durch *Hyphomicrobium* nach Aufhören des Wachstums (Aminosäuren).

Versuch vom: 14. 7. 52			
Alanin . . . . .	34 Imp./min	Methionin . . . . .	27 Imp./min
Arginin . . . . .	31 „	Phenylalanin . . . . .	25 „
Asparaginsäure . . . . .	27 „	Serin . . . . .	25 „
Glukosamin . . . . .	30 „	Threonin . . . . .	29 „
Glutaminsäure . . . . .	25 „	Tyrosin . . . . .	20 „
Glykokoll . . . . .	28 „	Valin . . . . .	18 „
Histidin . . . . .	23 „	Nr. 17 (unbekannt) . . . . .	20 „
Isoleucin . . . . .	29 „		
Leucin . . . . .	31 „	Leerstellen . . . . .	29 „
Lysin . . . . .	25 „	Nulleffekt . . . . .	27 „

#### Schlußbemerkungen.

Meine im vorstehenden geschilderten Untersuchungen haben viele Fragen offen lassen müssen. Obwohl die von *Hyphomicrobium* ausgebildeten Hyphen im Dienste der vegetativen Vermehrung stehen und gewisse Strukturen aufweisen, bleibt ihre Bedeutung unklar. Es ist nicht recht einzusehen, warum der Entwicklung eines Schwärmers die Bildung einer trägerartigen Hyphe vorausgehen soll, die sich gelegentlich auch verzweigen kann. Schwärmerbildung ist im gesamten Reich der Bakterien auch ohne Zwischenschaltung derartiger Hyphen möglich. Durch den Besitz dieser, der Zellvermehrung dienenden, hyphenartigen Gebilde entfernt sich *Hyphomicrobium* — systematisch gesehen — so sehr von den Bakterien, daß seine Zuordnung zu den *Eubacteriales* mehr als zweifelhaft erscheint. Betrachtet man dagegen die Hyphen nicht als Anhängsel, sondern als den eigentlichen Organismus, so könnte man zu einer wesentlich anderen Auffassung über die systematische Stellung von *Hyphomicrobium* kommen. Die Schwärmer könnte man als von den Hyphen gebildete bewegliche Sporen auffassen, die nach einer bestimmten Zeit zur Ruhe kommen und unter gegebenen Bedingungen mit neuen Hyphen auskeimen. Wir hätten damit einen sehr primitiven Pilz vor uns, dessen vegetative und reproduktive Phasen weitgehend reduziert und

vereinfacht sind. Es sei daran erinnert, daß schon STUTZER u. HARTLEB (1897) Fäden des von ihnen beschriebenen „*Salpeterpilzes*“ — eines Gemisches verschiedener Mikroorganismen einschließlich *Hyphomicrobium* — als Anlagen zu Mycelien auffaßten. Die Anschwellungen an ihren Enden sollten Chlamydosporen sein, die sich nach der Reife loslösen.

Auch der Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* bleibt noch in mancherlei Hinsicht problematisch. Insbesondere muß die Frage, ob die Einbeziehung der Kohlensäure in den Stoffwechsel auf chemosynthetischem Wege (autotroph) oder „heterotroph“ vor sich geht, offen bleiben. Manches spricht allerdings dafür, daß im vorliegenden Fall der erste Weg beschritten wird, so der vollständige Abbau der organischen Energiequellen bis zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  und das in allen Fällen langsame Wachstum, eine Eigenschaft, die allen chemosynthetisch arbeitenden Bakterien eigen ist.

Auf die in der Einleitung aufgeworfene Frage, warum *Hyphomicrobium* so häufig in nitrifizierenden Kulturen angetroffen wird, sei an dieser Stelle noch einmal zurückgekommen. STEPHENSON (1950) vermutet geradezu eine Art von Symbiose. Untersucht man die Lebensansprüche beider Organismen genauer, so kommt man zu dem Ergebnis, daß sie in mancherlei Hinsicht übereinstimmen oder doch ähnlich sind. Beide oxydieren energiereiche Substanzen. Bei den Salpeterbakterien sind diese anorganischer, bei *Hyphomicrobium* organischer Natur. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch *Hyphomicrobium* wie die Salpeterbakterien mit Hilfe der Oxydationsenergie autotroph lebt. Beide stellen die Oxydation ein, sobald ihnen atmosphärische Kohlensäure entzogen wird. In der Natur kommen Ammoniak bzw. flüchtige, einfach gebaute organische Stoffe, wie sie von den Salpeterbakterien bzw. *Hyphomicrobium* oxydiert werden können, häufig gemeinsam vor. Beiden sind größere Mengen höhermolekularer organischer Stoffe, insbesondere Kohlenhydrate, entweder gleichgültig oder gar schädlich. Die Ansprüche an den  $\text{pH}$ -Wert der Nährlösung und an die Sauerstoffverhältnisse sind gleich.

Dies sind, bei aller Verschiedenheit in anderen Punkten, doch wesentliche Züge, die es begreiflich machen, warum beide so häufig vergesellschaftet vorkommen. Wenn es zudem zutreffen sollte, daß die nitrifizierenden Bakterien einen Teil ihrer organischen Assimilate in das Substrat ausscheiden, so wird das häufige Zusammenleben von *Hyphomicrobium* und *Nitrifikanten* noch verständlicher. Man könnte in diesem Zusammenhang sogar gewisse Rückschlüsse auf die Natur der Stoffausscheidungen der Salpeterbakterien ziehen. Es müssen jedenfalls sehr einfache Stoffe nach Art der Ameisensäure, Essigsäure usw. sein.

Zum Schluß sei noch kurz auf die Frage eingegangen, welche Rolle *Hyphomicrobium* im Stoffkreislauf der Natur spielt. Wir haben gesehen, daß es eine ganz besondere Vorliebe für flüchtige, einfach gebaute organische Stoffe hat, wie sie

bei der Verrottung und Fäulnis von pflanzlichen und tierischen Rückständen allgemein auftreten können. *Hyphomicrobium* ist wahrscheinlich unter Berücksichtigung dieser Tatsache wesentlich an der Beseitigung derartiger Stoffe in der Natur beteiligt. Da es weitverbreitet ist und sowohl im Boden als auch im Wasser gefunden wurde, dürfte es eine beträchtliche Rolle bei der Reinigung der Luft von derartigen Stoffen spielen. Schon RULLMANN (1898) vermutete ähnliches, als er dieser „Mikrobe“ große Bedeutung für die Selbstreinigung der Flüsse zuschrieb.

### Zusammenfassung.

1. *Hyphomicrobium vulgare* St. et H. wurde aus verschiedenen Boden- und Wasserproben in Reinkultur gezüchtet; folgende Eigenschaften wurden an ihm festgestellt:

2. Sein Zellkörper und seine Hyphe besitzen Innenstrukturen, über deren Bedeutung allerdings nichts ausgesagt werden kann.

3. Mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens gelang es, die Schwärmerbildung an den Hyphen erstmalig in einem flüssigen Nährmedium zu verfolgen.

4. Aus dem in der WARBURG-Apparatur bestimmten Atmungsquotienten verschiedener organischer Substanzen (Formiat, Acetat, Glycerin) wurde geschlossen, daß *Hyphomicrobium* diese Stoffe unter  $O_2$ -Aufnahme vollständig zu  $CO_2$  und  $H_2O$  abbaut.

5. Es vermag ferner gasförmige, einfache, organische Verbindungen (Methanol, Äthanol, Formaldehyd) abzubauen, vermutlich ebenfalls bis zu  $CO_2$  und  $H_2O$ .

6. Ohne Anwesenheit von Kohlensäure findet kein Wachstum statt.

7. Mit Hilfe radioaktiven Kohlenstoffs wurde nachgewiesen, daß  $CO_2$  aus der Luft aufgenommen und der Kohlenstoff daraus in der Körpersubstanz eingebaut wird.

8. Die Natur der C-Assimilation — ob autotroph oder heterotroph — bleibt vorläufig ungeklärt. Es sind Hinweise dafür vorhanden, daß der Kohlenstoff des  $CO_2$  chemosynthetisch verarbeitet wird.

9. Auch die systematische Stellung von *Hyphomicrobium* bleibt unklar. Manches spricht dafür, daß es als primitiver Pilz aufgefaßt werden muß.

10. Die häufige Vergesellschaftung mit Nitrifikanten beruht wahrscheinlich auf weitgehend übereinstimmenden Ansprüchen beider Organismen an das Nährsubstrat.

11. Im Kreislauf der Stoffe in der Natur spielt *Hyphomicrobium* anscheinend eine wesentliche Rolle bei der Reinigung der Luft und somit auch des Bodens und Wassers von flüchtigen, einfach gebauten organischen Stoffen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. ENGEL, Hamburg, spreche ich für das stets hilfsbereite Interesse bei der Durchführung der Arbeit meinen herzlichsten Dank aus. Herrn Prof. Dr. K. HEYNS, Hamburg, und Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND, Heidelberg, danke ich für wertvolle Ratschläge. Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

**Literatur.**

- BÖMEKE, H.: Arch. f. Mikrobiol. **10**, 385 (1939); **15**, 414 (1951). — BOLTJES, K.: Proefschrift. Delft 1934; Arch. f. Mikrobiol. **7**, 188 (1936). — BREED, R. S., E. G. D. MURRAY and A. P. HITCHENS: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore 1948. — CALVIN, M., A. A. BENSON u. Mitarb.: University of California, Radiation Laboratory. Contract No W 7405-eng 48. — DICKENS, F., and G. D. GREVILLE: Biochemic. J. **27**, 213 (1933). — ENGEL, H.: Die Methoden der Fermentforschung **4**, 2706 (1941). — ENGEL, H., u. W. MEVIUS, jr.: Ber. dtsh. bot. Ges. **64**, 208 (1951). — ENGEL, H., u. W. SKALLAU: Zbl. Bakter. II, **97**, 305 (1937). — ENLOWS, E.: Hyg. Lab. Bull. Washington **121**, 1920. — FARGHALY, A. H.: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **36**, 165 (1950). — GAFFRON, H.: ABDERHALDEN, Handbuch der biol. Arbeitsmethoden Abt. XI. Berlin, Wien 1929. — HENRICI, A. T., and D. E. JOHNSON: J. Bacter. **30**, 61 (1935). — HES, J. W.: Rec. Trav. bot. néerl. **34**, 233 (1937). — JAKOB, A.: Klin. Wschr. **24/25**, 882 (1947). — Med. Klin. **42**, 22 (1947) (a). — KAMEN, M. D.: Radioactive tracers in biology. N. Y. 1948. — LIPMAN, F., and L. C. TUTTLE: J. of Biol. Chem. **158**, 505 (1945). — MARKHAM, R., and J. D. SMITH: Biochemic. J. **45**, 294 (1949). — METZNER, P.: Jb. Bot. **49**, 325 (1920). — OCHOA, S.: J. of Biol. Chem. **159**, 243 (1945); **174**, 133 (1948). — RABINOWITSCH, E. I.: Photosynthesis and related Processes I. N. Y. 1945 (1948). — RIPPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin, Göttingen, 2. Aufl. 1952. — RULLMANN, W.: Zbl. Bakter. II, **4**, 152 (1898). — SCHLOSSBERGER, H., A. JAKOB u. G. PIEKARSKI: Naturwiss. **37**, 186 (1950). — SÖHNGEN, N. L.: Zbl. Bakter. II, **15**, 513 (1906). — STANIER, R. Y., and C. B. VAN NIEL: J. Bacter. **42**, 437 (1941). — STEPHENSON, M.: Bacterial Metabolism. London 1950. — STUTZER, A., u. R. HARTLEB: Zbl. Bakter. II, **3**, 6, 54, 161, 235, 311, 351 (1897); Mitt. d. landw. Inst. d. kgl. Univ. Breslau 1898. Ref. Zbl. Bakter. II, **5**, 678 (1899). — WARBURG, O., u. F. KUBOWITZ: Biochem. Z. **203**, 95 (1928). — WERKMAN, C. H., and H. G. WOOD: Advances in Enzymol. **2**, 135 (1942). — WEYGAND, F., A. WACKER u. H. DELLWEG: Z. Naturforschg **7b**, 156 (1952).