



# **Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* Ehbg : mit besonderer Berücksichtigung der Atmungsprozesse bei den Vertretern dieser Gattung**

<https://hdl.handle.net/1874/322560>

49 μ. 192, 1936

# Beiträge zur Kenntniss der Gattung *Spirillum* Ehb. g.

Mit besonderer Berücksichtigung  
der Atmungsprozesse bei den Vertretern  
dieser Gattung

G. GIESBERGER

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.







# Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* EhbG

Mit besonderer Berücksichtigung  
der Atmungsprozesse bei den Vertretern  
dieser Gattung

Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* EhbG  
Mit besonderer Berücksichtigung der Atmungsprozesse bei den  
Vertretern dieser Gattung

GEORGE D. SPROER

Ph.D. Thesis, University of Michigan, 1934

THE UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

UNIVERSITY OF MICHIGAN  
LIBRARY  
ANN ARBOR, MICH.



*Diss. Utrecht 1936*

# Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* Ehb. g.

Mit besonderer Berücksichtigung  
der Atmungsprozesse bei den Vertretern  
dieser Gattung

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING  
VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN  
DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE  
RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP  
GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFI-  
CUS DR. W. E. RINGER, HOOGLEERAAR  
IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE,  
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT  
DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDEN-  
KINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-  
EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN  
OP MAANDAG 30 NOVEMBER 1936, DES  
NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR

GEORGE GIESBERGER

GEBOREN TE DJOKJAKARTA

DRUK NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP W. D. MEINEMA — DELFT

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.







# INHALT.

EINLEITUNG . . . . .	11
KAPITEL I.	
<i>Die Abgrenzung der Gattung Spirillum Ehb. . . . .</i>	13
KAPITEL II.	
<i>Historischer Rückblick . . . . .</i>	15
KAPITEL III.	
<i>Anhäufung, Isolierung und Züchtung verschiedener Spirillen</i>	28
§ 1. Einleitung . . . . .	28
§ 2. Anhäufung von in Oberflächenwasser vorkommenden Spirillen . . . . .	29
§ 3. Isolierung und Züchtung der aus dem Oberflächenwasser angehäuften Spirillen . . . . .	32
§ 4. Anhäufung von in Jauche vorkommenden Spirillen . . . . .	37
§ 5. Isolierung und Züchtung der „Mist-Spirillen“ . . . . .	39
KAPITEL IV.	
<i>Einteilung und Identifizierung der isolierten Stämme . . . . .</i>	44
§ 1. Einleitende Bemerkungen . . . . .	44
§ 2. Allgemeine Bemerkungen bezüglich der Feststellung der morphologischen Eigenschaften . . . . .	47
§ 3. Morphologische Eigenschaften der isolierten Stämme . . . . .	46
§ 4. Die Grundzüge des Stoffwechsels der isolierten Stämme . . . . .	48
§ 5. Verwendbarkeit verschiedener einfacher Verbindungen als einziger Kohlenstoffquelle . . . . .	51
§ 6. Die Identifizierung der isolierten Stämme . . . . .	55
KAPITEL V.	
<i>Systematische Übersicht der Gattung Spirillum Ehb. . . . .</i>	59
§ 1. Die Merkmale der Gattung <i>Spirillum Ehb.</i> . . . .	59
§ 2. Die in der Gattung <i>Spirillum</i> zu unterscheidenden Arten . . . . .	61
KAPITEL VI.	
<i>Die Atmungsprozesse bei den Vertretern der Gattung Spirillum Ehb. . . . .</i>	69
§ 1. Einleitende Bemerkungen . . . . .	69
§ 2. Methodisches . . . . .	70
§ 3. Verwendbarkeit verschiedener organischer Verbindungen als Atmungssubstrat für die isolierten <i>Spirillum</i> -Arten . . . . .	72
§ 4. Die Atmungsintensität einiger <i>Spirillum</i> -Arten . . . . .	75
§ 5. Der Einfluss der H-Ionenkonzentration auf die Atmungsprozesse der Spirillen . . . . .	76
§ 6. Der bei der Veratmung einiger Kohlenstoffverbindungen beobachtete Gaswechsel . . . . .	79

KAPITEL VII.

*Atmungsversuche unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Assimilationsvorgänge.* . . . . . 82

§ 1. Einführende Bemerkungen zu den angestellten Versuchen . . . . . 82

§ 2. Allgemeine Bemerkungen zur Ausführung der Versuche und zur Verwertung der Ergebnisse . . . . . 86

§ 3. Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum serpens* (Müller) Winter . . . . . 92

§ 4. Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum Itersonii* nov. spec. . . . . 102

§ 5. Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum tenue* (Müller) Ehrenberg . . . . . 107

§ 6. Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum undula* (Müller) Ehrenberg. . . . . 111

§ 7. Einige weitere Beobachtungen über den Assimilationsvorgang. . . . . 115

KAPITEL VIII.

*Die Untrennbarkeit von Atmungs- und Assimilationsvorgänge* . . . . . 118

ZUSAMMENFASSUNG. . . . . 127

LITERATUR. . . . . 132

## VOORWOORD.

Evenmin als een mensch reeds tijdens zijn jeugd de goede en voor zijn later leven zoo belangrijke zorgen, welke hem in de ouderlijke omgeving ten deel vielen, op de juiste waarde zal kunnen schatten, is het voor een promovendus mogelijk, bij het beëindigen van zijn studie, al hetgeen de Universiteit hem schonk in zijn volle beteekenis te overzien. Wanneer ik hier gaarne de gelegenheid aangrijp om mijn dank te betuigen aan allen, welke tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen, doe ik dit dan ook in de overtuiging, dat deze gevoelens van dankbaarheid zich in de komende jaren nog aanmerkelijk zullen verdiepen.

In het bijzonder denk ik daarbij aan U, Hooggeleerde KLUYVER. De twee jaren, gedurende welke ik onder Uw geestdriftige en zoo stimuleerende leiding dit proefschrift heb mogen bewerken, zijn de gelukkigste van mijn studietijd geweest. Hoezeer ik U daarbij ook dankbaar ben voor de groote steun en belangstelling mij gedurende dien tijd betoond, zoo is voor mijn later leven het feit, dat ik dank zij U een indruk heb kunnen krijgen van de ongekende mogelijkheden en vreugden, welke voor de microbioloog zijn weggelegd, toch van nog grootere beteekenis. Ik acht het een groot voorrecht daarbij juist van U voorlichting te hebben mogen ontvangen.

Dat ik met het vorderen der jaren steeds grooter vreugde in de door mij gekozen studie ben gaan scheppen, dank ik wel in de eerste plaats aan de voortreffelijke opleiding, welke de Utrechtsche Universiteit den student in de biologie biedt. U, Hooggeleeraren en Lectoren in de faculteit der Wis- en Natuurkunde, welke tot mijn opleiding hebben bijgedragen, ben ik dan ook ten zeerste daarvoor verplicht.

In het bijzonder zal wijlen mijn leermeester WENT als een schoon voorbeeld van nauwgezette plichtsbetrachting in mijn herinnering blijven voortleven.

Hooggeleerde KONINGSBERGER, Hooggeachte Promotor, ofschoon de bewerking van dit proefschrift buiten U om is geschied, hebt Gij U bereid verklaard als mijn promotor op te treden. Het is mij een behoefte U daarvoor grooten dank te brengen. Door Uw krachtdadige medewerking mocht het mij gelukken met deze studie tijdig gereed te komen, waarvoor ik U in hooge mate erkentelijk ben.

Zeergeleerde KINGMA BOLTJES, ik prijs mij zeer gelukkig, dat U zoo vriendelijk zijt geweest een deel van de plaatsruimte in Uw laboratorium-aan mij af te staan. Daardoor was ik toch indirect in de gelegenheid in ruime mate van Uw ervaring op microbiologisch gebied te profiteeren. Met groote dankbaarheid denk ik terug aan de vele malen, dat U mij met raad en daad hebt willen bijstaan.

Ook U, Zeergeleerde ROELOFSEN en HOOPERHEIDE, en U, Waarde PERQUIN, dank ik voor de mij betoonde hulp.

It is with much pleasure that I look back on the time spent with you, Dr. H. ALBERT BARKER. I am greatly indebted for the help and advice received on various occasions. I shall always remember with gratefulness and respect our intercourse during your stay in Delft.

Ook U, Zeergeleerde Meuffrouw ERXLEBEN, ben ik ten zeerste erkentelijk voor de mij betoonde hulp.

Van groote en blijvende waarde is voor mij de vriendschap, die ik tijdens mijn studietijd van velen heb mogen ontvangen. Zonder anderen te kort te doen, wil ik hier in het bijzonder U, beste MAYER en THOMAS, daarvoor hartelijk danken. Voor Uw hulp gedurende de laatste afgelopen maanden ben ik U ten zeerste erkentelijk.

Tenslotte mag niet onvermeld blijven de groote medewerking, welke ik bij de tot standkoming van mijn dissertatie van het geheele personeel van het Laboratorium voor Microbiologie te Delft heb ondervonden. Ik dank hen allen daarvoor zeer. Ook aan U, Geachte A. DE BOUTER, voel ik mij zeer verplicht voor de keurige verzorging van de in dit proefschrift opgenomen grafieken.

## EINLEITUNG.

„Trotz vielfach angestellter Bemühungen hat sich bisher unter den Spaltpilzen die Gattung *Spirillum* am wenigsten zugänglich für ein genaueres Studium, vor allem in biologischer Hinsicht gezeigt.“

E. VON ESMARCH, Centr. f. Bakt., 1, 225, 1887.

In der an Verschiedenheit der Formen so äusserst reichen Welt der Mikroorganismen verdienen die durch Schönheit der Gestalt und Zierlichkeit ausgezeichneten Vertreter der Bakteriengattung *Spirillum* sicher einen Ehrenplatz. Es ist deshalb nicht erstaunlich, dass diese nicht selten vorkommenden Organismen bereits von ANTHONIE VAN LEEUWENHOEK und seinen unmittelbaren geistigen Nachfolgern, wie MÜLLER und EHRENBURG, vermeldet und abgebildet worden sind. Wenn demnach die Zahl der Mikrobiologen, die sich zu einem eingehenderen Studium der Spirillen hingezogen fühlten, erwartungsgemäss nicht klein gewesen ist, so stehen unsere heutigen geringen Kenntnisse dieser Bakteriengruppe in schroffem Gegensatz hierzu, sodass man nach Orientierung in der Literatur unwillkürlich an die oben angeführten Zeilen denken muss, die VON ESMARCH vor nun schon beinahe einem halben Jahrhundert niedergeschrieben hat.

Aus dem Grunde habe ich mir zum Ziel gesetzt, die auf diesem Gebiete bestehenden Lücken einigermassen auszufüllen. Es hat sich jedoch bald gezeigt, dass diese Aufgabe so umfangreich war, dass nur ein bescheidener Fortschritt erzielt werden konnte.

Der mehr oder weniger chaotische Zustand unserer Kenntnis der *Spirillum*-Arten hat nämlich zur Folge gehabt, dass die Ausarbeitung geeigneter Isolierungsmethoden und die hieran anschliessende systematische Untersuchung der erhaltenen Reinkulturen so viel Arbeit und Zeit beanspruchte, dass mit der Erforschung der physiologischen Charakteristik dieser Organismengruppe nur ein erster Anfang gemacht werden konnte. Das in der bakteriologischen Literatur seit Jahrzehnten sich fortschleppende Geheimnis der „Spirillenlinie“ suggerierte, dass die Eigenart dieser Bakteriengruppe sich in erster Instanz in den speziellen Bedürfnissen ihres Atmungsvorganges äussern würde. Daher wurde

diesem Prozesse ein eingehenderes Studium gewidmet. Hierbei stiess ich jedoch auf einige Phänomene, welche, wie sich später zeigte, keineswegs nur für die Spirillen charakteristisch sind. Gerade die Allgemeinheit der betreffenden Probleme verführte dazu, etwas tiefer auf diese Erscheinungen einzugehen und die hierbei erhaltenen Ergebnisse rechtfertigen dieses Vorgehen vielleicht.

Allerdings ist hierdurch die Aufklärung der Spirillen-Charakteristik bis auf Weiteres verschoben worden.

## KAPITEL I.

### DIE ABGRENZUNG DER GATTUNG *SPIRILLUM* EHBG.

Bevor ich zur Besprechung der Literatur übergehe, ist es notwendig die Umgrenzung der Gattung *Spirillum* einer näheren Betrachtung zu unterziehen. Im allgemeinen ist es in der bakteriologischen Literatur üblich, alle Bakterien, deren Zellen durch eine Spiralforn gekennzeichnet sind, als „Spirillen“ zu benennen. Doch es würde falsch sein, alle Bakterienarten, bei denen man gelegentlich einmal die „Spirillen“-Form beobachtet, in eine einzelne systematische Gruppe zusammenzufassen.

An erster Stelle scheint es geboten, die auf oben angegebene Weise umgrenzte Gruppe in zwei morphologisch verschiedene Abteilungen zu trennen. In der üblichen Systematik kommt dies hierin zum Ausdruck, dass man die Familie der *Spirillaceae* in die Gattungen *Vibrio* Müller und *Spirillum* Ehb. zerlegt.

Wenn man nun im Zusammenhang hiermit BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (4th Ed., 1934) zu Rate zieht, findet man als charakteristische Unterscheidungsmerkmale zwischen den Gattungen *Vibrio* und *Spirillum*, dass die Vertreter der ersten Gruppe in der Form kurzer, gekrümmter, einzelner oder zu einer Spirale vereinigt Zellen vorkommen, die Gattung *Spirillum* dagegen Zellen aufweist, die aus verschiedenen Windungen oder Teilen einer Windung bestehen.

Die Tatsache, dass in der Diagnose der Gattung *Vibrio* auch die für die Gattung *Spirillum* charakteristische Spiralforn angeführt worden ist, gibt natürlich Anlass zu Schwierigkeiten. Dies hat dazu geführt, dass eine typische *Vibrio*-Art, wie der Erreger der Cholera, gelegentlich unter dem Gattungsnamen *Spirillum* vermeldet worden ist. Andererseits sind auch mehrmals unverkennbare *Spirillum*-Arten als Vibrionen beschrieben worden.

Aus den Untersuchungen von VAN RIEMSDIJK (1929) geht nun aber mit genügender Deutlichkeit hervor, dass zwar das Vorkommen von spiralförmigen Zellen bei einer typischen Vibrione, wie *Vibrio cholerae*, durchaus nicht selten ist, dass man es jedoch in diesen Fällen mit Zellen zu tun hat, die sich unter ungünstigen Bedingungen befinden. Normalerweise besitzen die betreffenden Zellen stets die Kommaform. Zu einem

ähnlichen Schluss kam BAARS (1930) bezüglich *Vibrio desulfuricans*.

Man muss daher den Unterschied zwischen der Gattung *Spirillum* und der Gattung *Vibrio* darin suchen, dass die Zellen bei der Gattung *Spirillum*, wenn man sie unter möglichst natürlichen Bedingungen betrachtet, überwiegend spiralförmige Gestalt besitzen, während sie dagegen bei der Gattung *Vibrio* durch die Kommaform gekennzeichnet sind und eine Spiralförmigkeit nur sporadisch unter ungünstigen Verhältnissen auftritt.

Während nun die Bakterien, die durch eine vorherrschend spiralförmige Zellform gekennzeichnet sind, in *morphologischer* Hinsicht ein hinreichend begrenztes und homogenes Ganzes bilden, zerfallen sie dagegen auf Grund ihrer *physiologischen* Eigenschaften noch in einzelne scharf getrennte Gruppen. Immer mehr neigt man dazu, diese Gruppen als gesonderte Gattungen aufzufassen.

So hat man neben der Gattung *Spirillum* EhbG, die sich durch eine heterotrophe, obligat aerobe Lebensweise auszeichnet, die Gattung *Rhodospirillum* bzw. die Gattung *Thiospirillum* eingeführt, die auf Grund ihres Stoffwechsels zu der Gruppe der *Athiorhodaceae* bzw. der *Thiorhodaceae* zu rechnen sind. Unter *Athiorhodaceae* oder Purpurbakterien verstehe ich mit VAN NIEL und MULLER (1931) diejenigen *Rhodobacterales*, die fakultativ anaerob, obligat heterotroph und unter anaeroben Bedingungen obligat photosynthetisch tätig sind, während zu den *Thiorhodaceae* oder Purpurschwefelbakterien diejenigen *Rhodobacterales* gehören, die obligat anaerob sind und sich durch eine photosynthetische autotrophe Lebensweise auszeichnen. Die von VISLOUCH eingeführte Gattung *Thiospira*, deren Vertreter anorganische Schwefelverbindungen oxydieren (Leukothiobakterien), umfasst ebenfalls spirillenartige Formen und mit Rücksicht hierauf ist denn auch kürzlich für diese Gattung der Name *Sulfospirillum* vorgeschlagen worden (KLUYVER und VAN NIEL 1936).

In dieser Arbeit werde ich mich auf die nach obigen Gesichtspunkten umgrenzte Gattung *Spirillum* EhbG beschränken. Ich hoffe später noch zurückzukommen auf gelegentlich von mir gemachte Beobachtungen bezüglich *Rhodospirillum rubrum* und anderer spirillenförmigen Vertreter der *Rhodobacterales*.

## KAPITEL II.

### HISTORISCHER RÜCKBLICK.

„... ende ongelooflijk veel seer kleinje diertgens, die ik heden morgens niet en conde bekennen, wat figuer dat die hadden, *sag ik nu seer claer dat aeltgens of wormtgens waren, Leggende overhoop door malcanderen en beweegden, als of wij met ons bloote oog aenschouden een gansche tobbe, met seer kleinje aeltgens* \*), en scheen het gansche water door de menigvuldige diertgens als te leven, *Dit was voor mijn onder alle de wonderheden, die ik inde natuer heb ontdekt, het alderverwonderentste* \*), en ik moet seggen, datter voor mij, tot nog toe geen grooter vermaek in mijn oog is geweest, als deze gesigten, van soo veel duijssenden, van levende schepsels, in een kleijn droppeltge water te sien, door malcanderen bewegen, ijder bijzonder schepsels, sijn bijzonder bewegingh hebbende ...”

ANTHONIE VAN LEEUWENHOEK, 18ter Brief an die Royal Society (9 October 1676).

Es ist durchaus begreiflich, dass die Entdeckung äusserst kleiner Organismen in wässerigen Infusionen verschiedener Stoffe, welche sich wie kleine „Älchen“ sehr schnell hin und her bewegen und womit unzweifelhaft Spirillen gemeint sind, einen überwältigenden Eindruck auf ANTHONIE VAN LEEUWENHOEK gemacht hat. Doch ist seinen diesbezüglichen Beobachtungen, die in seinen Briefen an die Royal Society verschiedentlich vermeldet sind, verhältnismässig wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Ogleich es also feststeht, dass schon VAN LEEUWENHOEK Spirillen beobachtet hat, ist es noch unsicher, ob er diese Organismen auch abgebildet hat.

Man findet in fast allen Handbüchern, in denen der historischen Entwicklung der Mikrobiologie ein Kapitel gewidmet wird, Reproduktionen der ersten Zeichnungen, die VAN LEEUWENHOEK von Bakterien anfertigte. Eine dieser Abbildungen, Bakterien aus der Mundhöhle des Menschen, stellt einen spiralförmigen Organismus dar und wird denn

---

\*) Kursivierung von mir.

auch meistens als die erste Abbildung eines *Spirillum* angesehen. Im Gegensatz hierzu hat CLIFFORD DOBELL (1932) in seinem bewundernswerten, VAN LEEUWENHOEK gewidmeten Buche eine andere Meinung. Nach ihm hätte VAN LEEUWENHOEK *Spirochaete buccalis* abgebildet. Wie aus einer brieflichen Mitteilung an Prof. KLUYVER hervorgeht, gründet DOBELL diese Ansicht namentlich auf die Tatsache, dass er in all den Jahren, während derer er sich mit der Untersuchung der in der Mundhöhle lebenden Bakterien beschäftigte, darunter niemals ein *Spirillum* angetroffen hat. Hierzu möchte ich jedoch bemerken, dass wenn auch Spirillen nicht zu der üblichen Bakterienflora der Mundhöhle gerechnet werden dürfen, es nicht ausgeschlossen scheint, dass VAN LEEUWENHOEK doch Spirillen aus der Mundhöhle gesehen hat. Er vermeldet nämlich ausdrücklich, dass er diesen Organismus nur einmal gesehen hat und zwar beim Untersuchen des Zahnschleims eines Mannes, von dem er auf so charakteristische Weise sagt, dass ihm jeder Begriff der Hygiene vollkommen fremd war. Falls VAN LEEUWENHOEK hier mit *Spirochaete buccalis* zu tun gehabt hätte, würde es verwunderlich sein, dass er diesen Organismus dann nicht mehrere Male beobachtet hätte, da dieser ständig in der Mundhöhle angetroffen wird. Auch die Abmessungen sprechen meines Erachtens gegen die Identität mit *Spirochaete buccalis*, da die Zeichnung im Hinblick auf andere abgebildete Bakterien eine zu dicke Zelle wiedergibt. Selbst habe ich wiederholt menschlichen Speichel und Zahnschleim untersucht. Obschon fast stets die Abwesenheit von Spirillen konstatiert wurde, habe ich diese in einem Fall ohne Zweifel beobachtet, wobei eine Verwechslung mit *Spirochaete buccalis* oder mit *Selenomonas sputigenum* ausgeschlossen war.

VAN LEEUWENHOEK'S Beobachtungen führten dazu, dass zahlreiche Forscher sich mit der Untersuchung der in Infusionen vorkommenden Organismen beschäftigten. In dieser Hinsicht will ich u.a. erwähnen MÜLLER, der verschiedene *Spirillum*-Arten unter dem Gattungsnamen *Vibrio* in seinem 1786 erschienenen Werke „Animalcula Infusoria fluvialia et marina etc.“ beschrieb. Im Jahre 1838 führte EHRENBERG in seinem berühmten Buche „Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen“ für die bereits bekannten und für noch einige andere von ihm beschriebenen Arten den Gattungsnamen *Spirillum* ein.

Der Umstand, dass zu dieser Gattung Formen gehören, die zu den grössten unter den Bakterien gezählt werden müssen, hat die mikroskopische Untersuchung dieser Organismen selbstverständlich in hohem Masse gefördert. Noch bevor LOEFFLERS Methoden für Geisselfärbung

bekannt waren, hatte COHN (1872) bereits bei *Spirillum volutans* einen Bewegungsapparat beobachtet, den er als eine lange polare Geißel abbildet. Auch die Bakteriologen, die mit Hilfe verschiedener Farbstoffe einen Einblick in die innere Struktur der Bakterienzelle zu erzielen hofften, wählten gern Spirillen als Versuchsobjekt. Als Folge hiervon kann man die Entdeckung eines Reservestoffs bei *Spirillum volutans* durch ARTHUR MEYER betrachten. Diese Substanz, der er den Namen Volutin gab (vergl. hierfür die zusammenfassende Darstellung bei MEYER, 1912), gehört nach neueren Untersuchungen vermutlich zu der Gruppe der Nukleine und hat u.a. die Eigenschaft, nach Färbung mit Methylenblau diesen Farbstoff bei Behandlung mit einprozentiger Schwefelsäurelösung nur sehr langsam wieder abzugeben.

Während man bisher seine Zuflucht zu Material aus Rohkulturen nehmen musste, war es zu erwarten, dass man, seitdem man dank LISTERS Verdünnungs- und KOCHS Plattenmethode mit dem Prinzip der Reinkulturen vertraut geworden war, danach strebte, zu Reinkulturen von Spirillen zu gelangen.

VON ESMARCH (1887) muss die Ehre zuerkannt werden, als erster, wenn auch auf mehr oder weniger zufällige Weise, eine Reinkultur eines *Spirillum*s erhalten zu haben. Er isolierte diesen Organismus, indem er ein wenig der rot gefärbten Reste einer an Septicaemia gestorbenen Maus, die er mit Leitungswasser bedeckt in einem Glasbecher längere Zeit hatte stehen lassen, in Röhren mit geschmolzener Bouillongelatine suspendierte. Neben Kolonien anderer Bakterien wurden nach einiger Zeit Kolonien bemerkbar, die durch die Anwesenheit eines roten Farbstoffes auffielen und sich bei mikroskopischer Untersuchung als kurze Spirillen erwiesen. VON ESMARCH gab diesem Organismus den Namen *Spirillum rubrum*. Merkwürdigerweise war die Pigmentbildung bei Züchtung unter anaeroben Bedingungen sehr intensiv, wurde jedoch unter aeroben Umständen stark zurückgedrängt. Es muss hierzu bemerkt werden, dass *Spirillum rubrum* auf Grund seiner physiologischen Eigenschaften jetzt zu der Gruppe der *Athiorhodaceae* gerechnet und der Gattung *Rhodospirillum* zugeteilt wird.

Kurz hierauf gelang es BEIJERINCK eine *Spirillum*-Art in engerem Sinne zu isolieren. Im Jahre 1893 erschien sein bekannter Artikel über die „Atmungsfiguren der beweglichen Bakterien“, in dem er beiläufig vermeldet, im Besitz einer Reinkultur von *Spirillum tenue* zu sein, welcher Organismus in jungem Zustand zur Erzielung von Atmungsfiguren sehr geeignet ist. Unter Atmungsfiguren versteht BEIJERINCK das Ergebnis der Verteilung

von Mikroorganismen, die sich unter dem Einfluss der Sauerstoffspannung und der übrigen Nährstoffe auf ein gewisses Niveau einstellen. Diese Erscheinung kann dabei auf zweierlei Weise beobachtet werden, nämlich in mikroskopischen Präparaten und in Flüssigkeitskulturen, wobei man im letzteren Fall meistens von Bakterienniveaus spricht.

BEIJERINCK unterscheidet nun hierbei, je nach der stärkeren oder schwächeren Empfindlichkeit dem Sauerstoff gegenüber, drei Haupttypen, denen er die Namen aerober, Spirillen- und anaerober Typ gibt. Hiermit charakterisiert er die Eigenschaft der fraglichen Organismen, sich an Stellen mit der höchsten, bzw. mittelmässigen oder geringsten Sauerstoffspannung anzuhäufen.

Wenn man eine Suspension von *Spirillum tenue* unter ein Deckglas bringt, häufen sich die Spirillen in jenem Abstand vom Rande des Deckglases oder einer in dem Präparat befindlichen Luftblase an, wo die Sauerstoffspannung einen für sie passenden Wert hat. Sie sind also auf eine geringere Sauerstoffspannung abgestimmt als der aerobe Typ und zeigen noch aktive Bewegung in Gegenwart so geringer Spuren Sauerstoff, bei denen die Formen des aeroben Typs bewegungslos geworden sind.

Zwei Jahre später erscheint die bekannte Untersuchung von KUTSCHER (1895a) über die Vibrio- und Spirillenflora in flüssigem Mist, eine Veröffentlichung, der noch immer in der Hauptsache die Angaben entnommen werden, die über die Gattung *Spirillum* in den bakteriologischen Handbüchern zu finden sind. KUTSCHER ging aus von flüssigem Mist, dem er jeweils Pepton zufügte; dabei traten nacheinander verschiedene *Spirillum*-Arten in den Vordergrund.

Nachdem nun auf diese Weise eine gute Anhäufung erzielt worden war, bereitete er in Röhren mit geschmolzenem Bouillonagar verschiedene Verdünnungen der Anhäufungsflüssigkeit, die sodann in Petrischalen ausgegossen wurden. Nach einigen Tagen wurden nun die Platten auf die Anwesenheit von Spirillenkolonien untersucht, wobei das Auffinden der wenigen, gewöhnlich nicht sehr charakteristisch wachsenden Kolonien keine einfache Aufgabe war. Dies umso mehr da die Zahl der sich entwickelnden Kolonien in keinem Verhältnis zur Zahl der suspendierten Zellen stand. Auf diese Weise gelang es ihm jedoch vier Spirillenarten, unter denen angeblich fast alle bekannten, in Reinkultur zu bringen. Die weitere Züchtung brachte jedoch noch Schwierigkeiten mit sich, da die üblichen flüssigen Medien, wie Peptonwasser oder Bouillon, sogar sterilisierter, flüssiger Mist, keine geeigneten Nährmedien für diese

Mikroorganismen bildeten. Schliesslich ergab eine dem Fleischextrakt hinzugefügte kleine Menge wässrigen Agarextrakts das erwünschte Resultat. Abgesehen davon, dass in dieser Untersuchung das Vorkommen verästelter Zellen festgestellt und die Frage, ob Spirillen zur Sporenbildung imstande sind, negativ beantwortet wurde, eröffnet sie keine neuen Gesichtspunkte. Ohne in irgend einer Hinsicht die grossen Verdienste KUTSCHERS in Abrede stellen zu wollen, ist es m. E. zu bedauern, dass er sich mit nur wenigen oberflächlichen Angaben bezüglich der Wachstumsweise und Kolonienform der von ihm isolierten Arten begnügt hat. Hierdurch ist eine Identifizierung mit später erhaltenen Stämmen fast unmöglich geworden.

Im selben Jahre veröffentlichte KUTSCHER (1895b) noch einen kurzen Artikel, da er von ZETNOW auf das Vorkommen einer grösseren Varietät neben einer kleineren der Art *Spirillum undula* aufmerksam gemacht worden war. Es gelang ihm auf die bereits beschriebene Weise, neben der schon von ihm isolierten *Spirillum undula* var. *minus* jetzt auch die Varietät *majus* in Reinkultur zu erhalten.

Ungefähr zu gleicher Zeit veröffentlichte BEIJERINCK (1895) seine Untersuchung über die Ursache der in der Natur so allgemein auftretenden, vollkommenen Reduktion von Sulfaten zu Schwefelwasserstoff. Aus diesem Studium ging hervor, dass ein obligat anaerober Organismus für diesen Prozess verantwortlich ist. Dieser Organismus erhielt den Namen *Spirillum desulfuricans*. Weil man hier, gemäss den späteren Untersuchungen, mit einer *Vibrio*-Art zu tun hat, werde ich nicht weiter auf dieses Bakterium eingehen. Wichtiger im Rahmen dieser Übersicht ist jedoch das Auftreten von *Spirillum tenue* in den Rohkulturen von *Vibrio desulfuricans*. Zur Erzielung einer Anhäufung von *Vibrio desulfuricans* benutzte BEIJERINCK Stöpselflaschen, die er ganz mit einem flüssigen Medium, das neben Sulfat, Salzen und einer geeigneten Stickstoffquelle, Malat oder Laktat enthielt, füllte und weiterhin mit ein wenig Schlamm impfte. Bei ähnlichen Versuchen unter semi-aeroben Bedingungen trat *Spirillum tenue* stark hervor, und es gelang BEIJERINCK sogar 3 Varietäten dieser Art zu isolieren. Er fand, dass *Spirillum tenue* auf gewöhnlichen Nährböden zwar langsam jedoch ohne besondere Schwierigkeit wuchs. Notwendig ist eine sehr schwach alkalische Reaktion und die Anwesenheit von neutralen Salzen organischer Säuren, während Pepton einen günstigen Einfluss hat. Die Ergebnisse BEIJERINCKs sind besonders darum merkwürdig weil KUTSCHER erwähnt, dass er mit der Züchtung eines von ihm ebenfalls für *Spirillum tenue* gehaltenen Organismus die grössten Schwierigkeiten hatte.

Die Anwesenheit von *Spirillum tenue* war sehr förderlich für das Wachstum der *Vibrio desulfuricans*, da das aerobe *Spirillum* die obligat anaerobe *Vibrio* gegen den Sauerstoff schützt. Von diesem Umstand wusste BEIJERINCK zur Erzielung einer Reinkultur der *Vibrio* Gebrauch zu machen, indem er in Röhren mit geschmolzenem Agar neben der Rohkultur der *Vibrio* auch eine Reinkultur von *Spirillum tenue* impfte. Nachdem durch Schütteln eine homogene Verteilung der Zellen erzielt und der Agar durch Abkühlen fest geworden war, sorgten weiterhin die sich zu Kolonien entwickelnden Spirillen für eine dauerend so niedrige Sauerstoffspannung in dem unteren Teile der Agarsäule, dass dort die Bedingungen für eine Entwicklung der *Vibrio desulfuricans* erfüllt wurden. Hierbei zeigte sich nun die merkwürdige Erscheinung, dass bei einer übrigens gleichmässigen Verteilung der Spirillen in dem Agar doch nur in einem gewissen Abstand von der Oberfläche sich Kolonien entwickelten und allein dort eine bedeutende Grösse erreichten. Scheinbar entstehen die Kolonien in dem Agar an einer Stelle, mit bestimmter und zwar sehr geringer Sauerstoffspannung, woraus die Folgerung gezogen werden muss, dass sowohl die Beweglichkeit als auch das Wachstum bei Spirillen eine optimale Intensität erreichen bei einer tieferen Sauerstoffspannung als die in der Luft vorherrschende. Inzwischen hat BEIJERINCK (1898) einige Jahre später in einer Veröffentlichung über die Beziehung obligat anaerober Bakterien zum freien Sauerstoff eine andere Erklärung für die soeben beschriebene Erscheinung gegeben. Es zeigte sich nämlich, dass *Spirillum tenue* bezüglich seiner Wachstumsbedingungen zu den aerophilen Organismen gezählt werden muss und im Anfang ausschliesslich an der Oberfläche wächst. Durch das starke Wachstum sollen sich an der Oberfläche die Nährstoffe schnell erschöpfen, sodass als Folge der langsamen Diffusion der Nährstoffe aus den tieferen Agarschichten eine bestimmte Stelle unterhalb der Oberfläche unter der gemeinschaftlichen Wirkung von Nahrung und Sauerstoff die günstigsten Bedingungen für das Wachstum bietet. Man hat hier, wie BEIJERINCK es ausdrückt, mit dem bemerkenswerten Fall zu tun, dass ein Organismus bezüglich seines Wachstums aerophil, jedoch hinsichtlich seiner Beweglichkeit mikro-aerophil ist. Offenbar meint BEIJERINCK mit der zweiten Hälfte dieser Aussage, dass infolge der Beweglichkeit von *Spirillum tenue* ans Licht tritt, dass dieser Organismus, was seinen Stoffwechsel anbelangt, niedrigere Sauerstoffspannungen bevorzugt.

In einer kurz hierauf erschienenen Arbeit berichtet BONHOFF (1896) über die erfolgreiche, jedoch mühsame Isolierung von *Spirillum tenue*

aus Flusswasser nach einer offenbar inzidentellen vorhergehenden Anhäufung in Peptonwasser. Daneben erhielt er auch eine Reinkultur von *Vibrio rugula* Cohn, die später von MIGULA mit Recht ebenfalls zur Gattung *Spirillum* gezählt worden ist. Dagegen versuchte BONHOFF vergebens auf die übliche Weise *Spirillum undula* aus Heu- oder Gersteninfusen zu isolieren. Wohl wurden einmal unter sehr speziellen Bedingungen einige Kolonien erhalten, die Weiterzucht gelang jedoch nicht.

Im Laufe der folgenden Jahre erschienen eine Anzahl Abhandlungen, in denen unter Benutzung der KUTSCHERSchen Reinkulturen über die Bearbeitung von Fragen mehr zytologischer Art berichtet wird. Besonders ZETTNOW (1896, 1897) widmete der inneren Struktur der grossen Spirillen verschiedene Untersuchungen. Dabei war es ihm aufgefallen, dass *Spirillum undula* in dem von KUTSCHER empfohlenen Fleischwasseragar wohl gut wuchs, jedoch nur in geringem Masse die Gekörntheit und Beweglichkeit zeigte, die es in der Rohkultur besitzt. Die Einfachheit, mit der in derartigen Rohkulturen Nitrate und Ammoniumverbindungen nachzuweisen waren, veranlasste ihn, KUTSCHERS Medium Ammoniumsulfat und Nitrat zuzufügen. Der auf diese Weise bereitete „Spirillenagar“ soll nach ihm ein vorzüglich geeignetes Medium für alle von KUTSCHER isolierten Stämme sein.

Von der Hand SWELLENGREBELS (1907, 1909) erschienen später zwei Veröffentlichungen über die vergleichende Zytologie der Spirillen und Spirochaeten.

Man könnte geneigt sein aus dem Erfolge der KUTSCHERSchen Versuche zu schliessen, dass die Frage der Kultur von Spirillenarten von ihm endgültig gelöst sei. Dass dies nicht zutrifft, ging jedoch bald hierauf aus der Arbeit von VOGT (1899) hervor, welcher über das Misslingen seiner Versuche, mit KUTSCHERS Methode *Spirillum volutans* zu isolieren, berichtete. Es gelang ihm nicht, eine Spirillenkolonie zu erhalten, obgleich er sowohl KUTSCHERS Anweisungen gewissenhaft befolgte, als auch mehrere Abänderungen der Methodik prüfte. Da er während seiner Versuche unter dem Rückgang seines Ausgangsmaterials zu leiden hatte, bemühte er sich zunächst, ein flüssiges Medium zu finden, in dem die Rohkulturen nach Belieben in guter Beschaffenheit gehalten werden konnten. Nach vielen vergeblichen Versuchen lieferte ein Medium aus Erbsenextrakt, dem 1% Pepton, 1% NaCl und 1—2% Ammoniumcarbonat zugefügt wurde, das gewünschte Resultat, was der starken Salzkonzentration wegen eigentlich ziemlich überraschend ist.

Es mangelte ihm jedoch die Gelegenheit, diesen Befund weiterhin zur Isolierung von *Spirillum volutans* auszunutzen.

In einer von VAN ITERSON (1902) veröffentlichten Untersuchung über den von ihm zum ersten Mal nachgewiesenen Zelluloseabbau durch aerobe Mikroorganismen, werden auch beiläufig einige Beobachtungen bezüglich des Auftretens von Spirillen in seinen Kulturen vermeldet. Zuerst wurde von ihm der Zelluloseabbau gepaart mit Denitrifikation in Stöpselflaschen untersucht, die mit einem Medium gefüllt waren, das neben etwas Phosphat, 2% Filtrierpapier und 0,25%  $\text{KNO}_3$  enthielt. Bei Impfung mit etwas Schlamm trat nun eine sehr starke Denitrifikation ein. Diese ging gepaart mit einem Angreifen der Zellulosefasern, die von einer schleimartigen Bakterienmasse umhüllt wurden, unter der sich auch Vibrionen und Spirillen befanden. Strich er aus einer derartigen Kultur auf Peptonagar- oder auf Leitungswasseragarplatten ab, die neben Phosphat, Na-Laktat und  $\text{KNO}_3$  enthielten, dann erhielt er neben Kolonien von *Bacterium Stutzeri* und einer unbeweglichen denitrifizierenden Bakterienart in einigen Fällen auch Kolonien eines kleinen, schwach denitrifizierenden *Spirillums*.

Auch unter aeroben Bedingungen ging der Zelluloseabbau gepaart mit einer Anhäufung von Spirillen, welche jedoch die Zellulose selbst nicht angriffen. Mehrere Arten traten u.a. auf in Erlenmeyern, welche eine dünne Schicht Leitungswasser mit 2% Filtrierpapier, 2% Kreide, etwas Phosphat nebst 0,1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bzw.  $\text{KNO}_3$  oder Pepton enthielten und mit einigen ccm Grabenwasser geimpft wurden. Ging VAN ITERSON anstelle von Schlamm von Gartenerde aus, so kam er zu einem ähnlichen Resultat, obgleich die Zahl der verschiedenen Arten viel beschränkter war. In der Regel herrschte nun ein kurzes, dickes *Spirillum* mit stark gekörnten Zellen vor, das er in Reinkultur brachte. Wie sich unten noch herausstellen wird, ist es jedoch fraglich, ob dieser Organismus tatsächlich zu den Spirillen gerechnet werden darf. Eine sehr gute Spirillenanhäufung konnte VAN ITERSON ebenfalls erzielen, indem er etwas Grabenschlamm in Leitungswasser mit 2% Ca-Laktat, 0,05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 0,05% Pepton impfte. Angaben über die Reinkultur dieser Organismen fehlen jedoch.

ELLIS (1903) hat bei einer Untersuchung über die Gruppe der *Coccaceae* und *Spirillaceae*, bei der er über KUTSCHERS Stamm von *Spirillum volutans* verfügte, einige Beobachtungen gemacht über die Entwicklung des letztgenannten Organismus in verschiedenen Nährmedien. Von den geprüften Nährflüssigkeiten erwies gewöhnliche Nährbouillon sich am geeignetsten. Auf eine weitere Beschreibung seiner Untersuchungen über die Struktur

der Zelle, über die Ontogenesis der Geisseln und über die bei der Zellteilung auftretenden Erscheinungen werde ich hier verzichten.

Etwas tiefer soll jedoch auf eine Veröffentlichung von VAHLE (1910) eingegangen werden, der verschiedene Bakteriengruppen, unter denen auch Spirillen, einer vergleichenden Untersuchung unterzog. Abgesehen von dem Studium über die Pigmentbildung bei *Spirillum rubrum*, hat diese Veröffentlichung insofern Wert, als VAHLE versucht hat, den Einfluss verschiedener Sauerstoffspannungen auf das Wachstum von *Spirillum rubrum* und *Spirillum volutans* zu ergründen. Dazu machte er mit der Platinnadel auf Agar einen Impfstrich und kultivierte unter verschiedenen Sauerstoffspannungen. An Hand der Dicke bzw. Breite der entstandenen Kultur versuchte er dann die optimale Sauerstoffspannung zu bestimmen. Sowohl für *Spirillum rubrum* als auch für *Spirillum volutans* kam er auf diese Weise zu der Folgerung, dass die optimale Sauerstoffspannung ungefähr der Luft gleich sei; m. E. ist diese Schlussfolgerung auf Grund der befolgten Methodik nicht erlaubt, da doch je nachdem die Kolonien durch Wachstum grösser werden, auch die Bedingungen, unter denen die verschiedenen Zellen verkehren, sehr auseinander gehen können. Die an der Oberfläche der Kolonie gelegenen Zellen sind z.B. der vollen Sauerstoffspannung ausgesetzt und verkehren bezüglich der Erlangung von Nährstoffen in einer viel ungünstigeren Lage als die unten in der Kolonie gelegenen Zellen. Ausserdem befinden letztere sich durch den Sauerstoffverbrauch bei der Atmung unter anaeroberen Bedingungen. Eine für die Zelle eventuell zu hohe Sauerstoffspannung wird also ihren schädlichen Einfluss hauptsächlich auf die sich an der Aussenseite der Kolonie befindenden Zellen geltend machen können, dagegen für die tiefer gelegenen günstigere Wachstumsbedingungen schaffen. Die auf Grund dieser Methode erzielten Ergebnisse würden also vielleicht ein vollkommen abweichendes Bild formen von demjenigen, das sich ergeben würde, falls alle Zellen unter gleichmässigen Umständen verkehrten.

Merkwürdigerweise wird dann in den folgenden fünfzehn Jahren nichts mehr über die saprophytischen Spirillen publiziert.

1925 kommt BEIJERINCK zurück auf einen Organismus, den er schon 1901 während seiner Untersuchungen über die oligonitrophilen Mikroben beobachtete und der nach VAN ITERSON identisch ist mit der von diesem Untersucher aus den aeroben Anhäufungen mit Zellulose isolierten Art. Dieser Organismus tritt unter gewissen nicht näher bekannten Bedingungen in Anhäufungskulturen von *Azotobacter chroococcum* auf, falls Ca-Malat oder Ca-Laktat als organisches Substrat benutzt werden. Auch in seiner

1922 erschienenen Abhandlung über *Azotobacter chroococcum* erwähnt BEIJERINCK den Organismus beiläufig, und verbindet daran dann den Namen von *Azotobacter spirillum*.

BEIJERINCK stellt sich nun zum Ziel zu entscheiden inwieweit auch dieser Organismus zur Stickstoffbindung imstande ist.

Es gelang ihm ohne allzuviel Mühe eine Reinkultur herzustellen. Es zeigte sich, dass im allgemeinen die Form der Zelle nicht ausgesprochen spiralförmig ist, oft sogar hauptsächlich stabförmig. Kulturen auf verdünntem Bouillonagar besitzen jedoch eine spiralförmige Zellform. Letztere Tatsache zusammen mit der Überlegung, dass die Einfachheit, womit die Kultur in Lösungen von organischen Salzen erfolgt ebenfalls ein „Spirillenmerkmal“ ist, führen BEIJERINCK dazu den Organismus jetzt zu der Gattung *Spirillum* zu rechnen. Da häufig sehr viel Fett in der Form von Kügelchen vorhanden ist, schlägt er den Namen *Spirillum lipoferum* vor.

BEIJERINCK berichtet weiter, dass sein früherer Mitarbeiter MINKMAN in partiellen Reinkulturen, in denen jedoch *Azotobacter* oder *Clostridium* abwesend waren, eine deutliche Stickstoffzunahme festgestellt hatte. Andererseits zeigte sich, dass wirkliche Reinkulturen sich in flüssigen Medien nur dann entwickeln, wenn eine gute Stickstoffquelle, wie Pepton, anwesend ist. BEIJERINCK äussert sich denn auch bezüglich des Stickstoffbindungsvermögens seines Organismus mit starkem Vorbehalt.

Die späteren Untersuchungen von SCHRÖDER (1932) haben unzweideutig ergeben, dass *Spirillum lipoferum* unter keiner der von ihr untersuchten Bedingungen zur Stickstoffbindung imstande ist. Zum Wachstum war die Anwesenheit von Pepton oder einer  $\text{NH}_4$ -Verbindung wesentlich, woneben als Kohlenstoffquelle mehrere Salze organischer Säuren, aber auch eine grosse Anzahl verschiedener Zuckerarten fungieren konnten.

Es ist zu betonen, dass auch SCHRÖDER ausdrücklich erwähnt, dass es in keinem der Fälle zur Ausbildung ausgesprochener Spirillengestalt kam. Bestenfalls liessen sich halbe Windungen erkennen; das mikroskopische Bild zeigte in den meisten Kulturen nur mehr oder weniger lange und dicke Stäbchen. Es ist klar, dass diese Angaben, nebst der wenig eindeutigen Beschreibung BEIJERINCKS, es sehr zweifelhaft machen, ob dieser Organismus tatsächlich zu der Gattung *Spirillum* gerechnet werden darf.

Während die Veröffentlichung von SCHRÖDER, abweichend von der chronologischen Reihenfolge, direkt nach der Arbeit von BEIJERINCK vermeldet worden ist, soll nunmehr erwähnt werden, dass es DIMITROFF im Jahre 1926 gelang, aus Schlamm ein *Spirillum* zu isolieren, dem er den

Namen *Spirillum virginianum* gab. Dieses *Spirillum* weicht nach DIMITROFF in der Hauptsache wegen einer negativen Gram-Färbung von den anderen bisher beschriebenen Arten ab. Er beschränkte sich vornehmlich auf eine zytologische Untersuchung dieses Organismus, auf die ich nicht eingehen werde.

Schliesslich hat DEN DOOREN DE JONG (1926) in seine sehr ausführliche Untersuchung über die Mikroorganismen, welche den Mineralisationsprozess der organischen Stoffe in Boden und Wasser bewirken, einen aus Kanalwasser isolierten Stamm von *Spirillum tenue*, einbezogen. Hierbei untersuchte er, inwieweit Wachstum auftrat beim Abstreichen auf einem Agarmedium, welchem ausser einigen anorganischen Salzen und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als Stickstoffquelle verschiedene organische Verbindungen zugefügt wurden. Gutes Wachstum wurde erzielt mit den Salzen von Bernstein-, Zitronen-, Äpfel-, Fumar- und Brenztraubensäure, mit Aethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl- und Isobutylalkohol und mit den Zuckern Glukose, Galaktose, Lävulose, Mannose, Arabinose, Xylose und Rhamnose.

Vollständigkeitshalber möchte ich jetzt noch ganz kurz etwas bemerken über einige, hauptsächlich in der medizinischen Literatur als Spirillen beschriebene Organismen, welche ich bisher absichtlich ausser Betracht gelassen habe.

Es handelt sich hierbei nämlich meistens um ältere Untersuchungen über Organismen, welche nur ein einziges Mal beobachtet wurden und nicht in Reinkultur gebracht werden konnten. Ausserdem ist es für einige dieser „Spirillen“ wohl sicher, dass sie gar nicht zur Gattung *Spirillum* gehören, sondern als *Vibrio*-Arten zu betrachten sind. Kennzeichnend für die Verwirrung, welche in vielen dieser Abhandlungen herrscht, ist die Tatsache, dass manchmal ein Organismus in derselben Publikation einmal als *Vibrio*, ein andermal wieder als *Spirillum* vermeldet wird.

So gehört z.B. das *Spirillum fetus* Smith, welches oft als Erreger von Rinderabortus betrachtet wird, zur Gattung *Vibrio*, ebenso wie *Spirillum terrigenum* (Günther) Migula, und *Spirillum parvum* von Esmarch. *Spirillum sputigenum* Mühlens soll dagegen auf Grund der einseitig lateralen Anheftung der Geisseln zur Gattung *Selenomonas* gerechnet werden. Inwieweit das von KITASATO (1889) beschriebene und isolierte *Spirillum concentricum* wirklich eine neue Art ist oder identisch ist mit einer schon vorher beschriebenen Art kann auf Grund der Beschreibung

nicht entschieden werden. Jedenfalls liegen keine Angaben darüber vor, dass diese Art jemals wieder zurückgefunden ist.

Etwas grössere Aufmerksamkeit verdient jedoch das *Spirillum minus* Carter, der Verursacher der Rattenbisskrankheit. Dieser Organismus, der öfters im Blut der Ratte vorkommt, kann im Falle eines Bisses eine ziemlich gefährliche Blutkrankheit beim Menschen verursachen. Speziell in Japan und China ist die Krankheit nicht selten, sie wurde aber auch mehrmals in Europa wahrgenommen. Obgleich zahlreiche Forscher sich mit *Spirillum minus* beschäftigt haben, sind bis jetzt fast nur die pathologischen und serologischen Eigenschaften studiert worden. Der Organismus hat sich nämlich noch nicht ausserhalb des Tierkörpers kultivieren lassen. (Für Einzelheiten und Literaturangaben verweise ich auf Ruys (1925, 1929)). Das gelegentlich im Magen mehrerer Säugetiere beobachtete *Spirillum stomachi* (Salomon) Lehmann et Neumann, und das in älteren Veröffentlichungen einige Male erwähnte *Spirillum hachiazae* Kowalski sind nicht genügend charakterisiert worden um eine Wiedererkennung zu erlauben.

Schliesslich sei hier noch das von SARDJITO (1932, 1933) aus dem Blut von einem an Pericarditis erkrankten Patienten isolierte *Spirillum cardiopyrogenes* erwähnt, welches sich, wenn auch schwierig, in Blutmedien kultivieren liess.

Wenn wir jetzt schliesslich die Lage übersehen, die sich beim Anfang meiner Untersuchung darbot, bekommen wir den Eindruck, dass fast alles was über die Gattung *Spirillum* in der Literatur zu finden ist, sich bezieht auf beiläufig gemachte, mehr oder weniger locker von einander stehende Beobachtungen, welche sich übrigens noch in verschiedenen Punkten widersprechen.

Im grossen und ganzen beschränken unsere Kenntnisse der saprophytischen *Spirillum*-Arten sich auf nur wenige Tatsachen. An erster Stelle ist es klar, dass diese Organismen in Oberflächenwasser weit verbreitet sind, während sie auch im Mist vieler Säugetiere offenbar häufig vorhanden sind. Weiter stimmen zahlreiche Angaben darin überein, dass Anhäufungen mehrerer Arten leicht erhalten werden, wenn man Oberflächenwasser entweder benutzt zur Herstellung pflanzlicher Infusen, oder impft in synthetische Nährmedien, in welchen Salze verschiedener organischer Säuren die einzige Kohlenstoffquelle bilden.

Hierzu muss aber festgestellt werden, dass von den genannten „Wasserspirillen“ nur eine einzige Art — *Spirillum tenue* — reinkultiviert und

etwas näher studiert worden ist. Was die „Mistspirillen“ anbelangt, sind nur die erfolgreichen Züchtungsversuche von KUTSCHER hervorzuheben, die sich aber bei späteren Versuchen nicht reproduzierbar zeigten.

Hierzu kommt noch, dass es allen Anschein hat, dass trotz Identität der verwendeten Artnamen, die von KUTSCHER aus Mist isolierten Stämme in ihren Eigenschaften erheblich von denjenigen der in obenerwähnten Anhäufungsmedien auftretenden „Wasserspirillen“ abweichen.

Während man um 1900, dank den Untersuchungen von KUTSCHER, BONHOFF und BEIJERINCK, noch einigermaßen von einer Blütezeit in der Literatur der Spirillen sprechen darf, ist seit etwa 1910 ein so starker Rückgang eingetreten, dass dieser nicht mehr als zufällig betrachtet werden kann. Es will mir vorkommen, dass die Ursache davon zu suchen sei in dem Umstand, dass die Reinzüchtung von Spirillen noch immer eine ungenügend gelöste Aufgabe ist. Kennzeichnend für die unbefriedigende Lage ist wohl in genügendem Masse die Tatsache, dass eine vor wenigen Jahren angestellte Rundfrage an die bekanntesten bakteriologischen Laboratorien der Welt, Reinkulturen von *Spirillum*-Arten zur Verfügung zu stellen, einen fast negativen Erfolg hatte.

Es braucht daher auch nicht zu wundern, dass wir betreffs der physiologischen Eigenschaften der verschiedenen *Spirillum*-Arten noch grösstenteils im Dunkeln tappen.

Alles in allem schien es mir eine dankbare Aufgabe zu versuchen unsere Kenntnisse der betreffenden Organismen einigermaßen zu erweitern und zu ordnen.

## KAPITEL III.

### ANHÄUFUNG, ISOLIERUNG UND ZÜCHTUNG VERSCHIEDENER SPIRILLEN.

#### § 1. EINLEITUNG.

Auf Grund des Vorhergehenden wird es ohne weiteres klar sein, dass es für ein besseres Verständnis der verschiedenen noch ausstehenden Fragen wesentlich war, die anzustellenden Untersuchungen auf ein grösseres Material auszudehnen.

Da zu Beginn meiner Untersuchung ausser zwei Stämmen von *Spirillum tenue* aus der Sammlung des Laboratoriums für Mikrobiologie zu Delft, und einem Stamme von *Spirillum virginianum* aus der „American Type Culture Collection“ in Chicago, soweit mir bekannt, nirgends Reinkulturen von Spirillen zur Verfügung standen, war mein Bestreben selbstverständlich darauf gerichtet, eine möglichst grosse Anzahl Stämme verschiedener Herkunft zu isolieren.

Hierzu musste man an erster Stelle versuchen, mittels der in der Literatur erwähnten Anhäufungen verschiedener Art eine möglichst reiche Spirillenflora in Rohkultur zu erhalten. Zu diesem Zwecke kamen vor allem Anhäufungen aus Oberflächenwasser und aus Jauche in Betracht. Selbstverständlich sollte sich eine Isolierung der verschiedenen in den einzelnen Anhäufungen eventuell vorkommenden *Spirillum*-Arten hieran anschliessen.

Mit Rücksicht auf die Schwierigkeiten, auf die andere Forscher bei der Isolierung von Spirillen gestossen sind, war es dabei unumgänglich, der Ausarbeitung geeigneter Isolierungsmethoden besondere Aufmerksamkeit zu widmen.

Erfahrungen, die im Laboratorium für Mikrobiologie zu Delft gemacht waren und die durch eigene Beobachtungen bestätigt wurden, wiesen darauf hin, dass die Isolierung von Spirillen aus Oberflächenwasser, wenn auch nicht leicht, doch wesentlich geringere Schwierigkeiten bot als die der in den Anhäufungen mit Mist erhaltenen Spirillen (in der Folge kurz „Mist-Spirillen“ genannt). Ich entschloss mich daher meine Aufmerksamkeit in erster Linie der erstgenannten Kategorie von Spirillen zu

schenken, und zwar in der Hoffnung, dass die hierbei gesammelten Erfahrungen mir später zur Erlangung von Reinkulturen der „Mist-Spirillen“ dienlich sein würden.

## § 2. ANHÄUFUNG VON IN OBERFLÄCHENWASSER VORKOMMENDEN SPIRILLEN.

Bei der Anhäufung von Spirillen aus Oberflächenwasser verfuhr ich in zweierlei Weise. Einerseits machte ich Gebrauch von dem von VAN ITERSON bzw. von BEIJERINCK angegebenen synthetischen Medium, andererseits wurde mit dem Oberflächenwasser ein Heu-Infus dargestellt.

Ogleich die genannten Forscher schon die Weise Spirillen mittels synthetischer Medien anzuhäufen beschrieben haben, ist ihre Beschreibung so kurz, dass es mir erwünscht erscheint, etwas ausführlicher auf die Methodik einzugehen. Dies um so mehr, da hierbei noch einige nicht unwichtige Ergebnisse mitzuteilen sind.

Vorläufige Versuche führten zu der folgenden Arbeitsweise, welche fast ständig ein befriedigendes Resultat ergab. In Erlenmeyern von 300 ccm wurden zu 200 ccm Oberflächenwasser 2% Ca-Malat resp. Ca-Laktat, 0,1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 0,05%  $\text{MgSO}_4$  zugefügt und es wurde für eine ungefähr neutrale Reaktion gesorgt. Es ist darauf zu achten, dass bei Züchtung bei 30° C die Reaktion des Mediums sich nach Verlauf von ca. 24 Stunden infolge der Bildung von tertiärem Ca-Phosphat und des dadurch bedingten Freiwerdens von Äpfel- oder Milchsäure nach der sauren Seite verschoben hat. Es wurde deshalb stets das pH aufs neue durch Hinzufügung von Lauge auf ca. 7.3 gebracht. Im Zusammenhang hiermit muss ausdrücklich vermeldet werden, dass absichtlich nicht von den Na-Salzen der genannten Säuren ausgegangen wurde, welche eine derartige Erscheinung nicht hervorrufen. Der Gebrauch von Ca-Salzen hat nämlich den Vorteil, dass sich an der Oberfläche der Kultur eine ziemlich dicke Haut von  $\text{CaCO}_3$ -Kristallen bildet. Diese Haut hemmt den Zutritt des Sauerstoffs und fördert die Entwicklung der mikro-aerophilen Spirillen, wobei übrigens die unter den gewählten Bedingungen relativ geringe Oberfläche der Flüssigkeitsschicht ebenfalls mitwirkt. Bezüglich der grösseren oder geringeren Eignung von Malat oder Laktat als Kohlenstoffquelle möchte ich keine Entscheidung fällen. Im allgemeinen zeigten beide gleich gute Ergebnisse; da jedoch manchmal mit der einen Verbindung ein besseres Resultat erzielt wurde als mit der anderen, wurde stets eine Anhäufung sowohl mit Malat als auch mit Laktat angestellt.

Was das benutzte Oberflächenwasser anbelangt muss noch mitgeteilt

werden, dass dies in allen Fällen entweder einem stark verschmutzten Stadtgraben oder einem weniger verunreinigten Kanal entnommen wurde. Es zeigte sich, dass mit beiden Wassermustern gute Ergebnisse erhalten wurden, doch es muss ausdrücklich bemerkt werden, dass in den Anhäufungen mit dem stärker verschmutzten Grabenwasser bisweilen ein Spirillentypus auftrat, welcher in den mit dem Kanalwasser erhaltenen Anhäufungen nicht beobachtet wurde.

In einer derartigen Anhäufungskultur findet nun während der ersten 2 bis 3 Tage eine starke Entwicklung von überwiegend zur Gattung *Pseudomonas* gehörenden Bakterien statt. Vom dritten Tage an treten die Spirillen immer mehr in den Vordergrund, um nach Ablauf einer gewissen Zeit (meistens nach ungefähr einer Woche) ihre optimale Entwicklung zu erreichen und schliesslich, je mehr das Medium an Nährstoffen ärmer wird, wieder zahlenmässig abzunehmen. Immerhin darf hierbei nicht ausser Acht gelassen werden, dass auch im Optimalzustande der Prozentsatz der „verunreinigenden“ Bakterien keineswegs gering war.

Bezüglich der beschriebenen Anhäufung soll weiter noch bemerkt werden, dass das Resultat noch besser ist, wenn nicht bei 30° C sondern bei 40° C kultiviert wird. In diesem Falle ist die Entwicklung der Spirillen nämlich so viel rascher, dass schon nach etwa 24 Stunden eine befriedigende Rohkultur erhalten wird. Durch die verhältnismässig hohe Temperatur werden die bei 30° C noch in grosser Anzahl anwesenden *Pseudomonas*-Arten schon erheblich in ihrer Entwicklung gehemmt, sodass die Anhäufung zugleich relativ „reiner“ ist. Die Optimumtemperatur der Spirillen liegt offenbar viel höher als diejenige der *Pseudomonas*-Arten. Höher als 40° C kann man aber nicht gehen, da bei 45° C hauptsächlich nur noch sporenbildende Bakterienarten auftreten.

Auch niedriger als 30° C soll man vorzugsweise nicht kultivieren. Bei 20° C tritt nämlich fast keine Entwicklung von Spirillen auf, während die Flüssigkeit sich grün färbt infolge des von *Pseudomonas putida* bzw. *Pseudomonas fluorescens* produzierten Farbstoffes.

Es muss nun hervorgehoben werden, dass die mikroskopische Prüfung der erwähnten Anhäufungen zum Ergebnis führte, dass fast immer drei verschiedene Typen von Spirillen vorhanden waren. Dazu kam noch in einzelnen Fällen (Anhäufungen mit Grabenwasser) der oben schon vermeldete seltene Typus. Diese Typen unterschieden sich auf Grund ihrer Zelldimensionen, sowie auch auf Grund der mehr oder weniger ausgesprochenen Spiralforn.

Schliesslich ist es wichtig hervorzuheben, dass die Benutzung von

Oberflächenwasser wesentlich ist für den Erfolg der beschriebenen Anhäufungsversuche. Ich habe nämlich öfters ähnliche Versuche angestellt, wobei Leitungswasser anstatt Oberflächenwasser verwendet wurde. Indessen blieb unter diesen Bedingungen jegliche Entwicklung von Spirillen aus. Dieses Ergebnis ist auch darum bemerkenswert, weil BEIJERINCK in einer 1894 erschienenen Notiz ausdrücklich angibt, dass er aus dem damaligen Delfter Leitungswasser mit Leichtigkeit Spirillen anhäufen konnte. Die Tatsache, dass das jetzige Leitungswasser (filtriertes Flusswasser) zur Zeit chloriert wird, mag für diesen Unterschied verantwortlich sein <sup>1)</sup>.

Im Anschluss an diese Beobachtungen sei noch mitgeteilt, dass es mir ebenfalls nicht gelang Spirillen in dem Leitungswassermedium anzuhäufen, wenn ausserdem wechselnde Mengen Gartenerde (1 bis 10 Gramm) als Impfmateriel zugesetzt wurden.

Es macht daher den Eindruck, dass die in der erwähnten Weise erhaltenen Spirillen nur in Oberflächenwasser regelmässig vorkommen.

Wie schon erwähnt, wurden neben den genannten Anhäufungen auch solche angestellt, in denen das Oberflächenwasser zur Darstellung eines Heu-Infuses diente.

Hierzu wurde je eine Handvoll Heu fest in Bechergläser von etwa 1 Liter gepresst und diese, nachdem sie mit Graben- oder Kanalwasser angefüllt worden waren, bei 30° C stehen gelassen. Die allmählich aus dem Heu in das Wasser hineindiffundierenden organischen Substanzen veranlassen nun die Entwicklung einer reichlichen Bakterienflora, wobei vor allem im Anfang mehrere *Spirillum*-Arten in den Vordergrund treten. Nach einigen Tagen werden diese allerdings wieder grösstenteils verdrängt von sporenbildenden Bakterien. Es ist wichtig in diesem Zusammenhang zu bemerken, dass die Spirillen wirklich aus dem benutzten Wasser und nicht aus dem Heu herrühren. Wenn nämlich das Wasser vorher einen Augenblick gekocht wurde, entwickelten sich keine Spirillen mehr in dem Infus. Auch wenn statt Oberflächenwasser Leitungswasser benutzt wurde, blieb wiederum jede Entwicklung aus.

Im allgemeinen lässt sich zu den mittels Heu-Infus erhaltenen Anhäufungen bemerken, dass diese niemals so selektiv verlaufen, wie diejenigen in den besprochenen synthetischen Medien. Es geschieht sogar nicht

---

<sup>1)</sup> Allerdings darf in diesem Zusammenhang ebenfalls nicht ausser Betracht gelassen werden, dass das von BEIJERINCK benutzte Wasser anderer Herkunft war (Dünenwasser).

selten, dass die Entwicklung der Spirillen fast völlig von den sporenbildenden Bakterien unterdrückt wird. Da es sich bald zeigte, dass die aus den Heu-Infusen isolierten Spirillen identisch waren mit denjenigen aus den synthetischen Medien habe ich die letztere Methode später immer bevorzugt.

### § 3. ISOLIERUNG UND ZÜCHTUNG DER AUS DEM OBERFLÄCHENWASSER ANGEHÄUFTEN SPIRILLEN.

Bei meinen Versuchen, die in den beschriebenen Anhäufungen anwesenden Spirillen zu isolieren, neigte ich anfänglich dazu, die Ursache der schwierigen Reinkultur dieser Organismen in dem Umstand zu suchen, dass Spirillen offenbar auf eine niedrigere Sauerstoffspannung als die in der Luft vorherrschende, abgestimmt sind. Um diesem Umstande einigermaßen Rechnung zu tragen, befolgte ich die Methode von KUTSCHER, indem ich eine kleine Menge der Anhäufungskultur in geschmolzenem und bis auf 40° C abgekühltem Agar, der dieselben Nährstoffe wie die Rohkulturen enthielt, suspendierte und diese danach in Petrischalen aussoss.

Es kam jetzt nur darauf an festzustellen, ob sich auch Kolonien von Spirillen befanden zwischen den in einem derartigen Agarboden sich entwickelnden Bakterien. Dies war eine ziemlich zeitraubende Beschäftigung, da jede Kolonie mit der Platinnadel durchstochen und weiterhin mikroskopiert werden musste. Ein sehr hoher Prozentsatz wurde durch Kolonien „verunreinigender“ Bakterien gebildet, aber schliesslich traf ich einige Spirillenkolonien an. Diese gehörten jedoch offenbar alle dem kleinsten in der Anhäufung anwesenden Spirillentypus zu. Nun bildet überdies der Umstand, dass die Spiralform der Spirillen auf einem festen Nährboden meistens nicht so ausgesprochen ist wie in einem flüssigen Medium, einen erschwerenden Faktor für die Erkennung. Eine Reinkultur wurde weiterhin dadurch erzielt, dass einige Male aufs neue ein wenig von der Kolonie in Agar suspendiert wurde. Sehr bald ergab es sich jedoch, dass die Furcht, das Wachstum könne beim Abstreichen an der Oberfläche des Agars infolge der Einwirkung der vollen Sauerstoffspannung der Luft ausbleiben, unbegründet war. Nach einigen Tagen entwickelten sich auf dem Agar ganz gute Kolonien, wobei ausserdem bald zu Tage trat, dass das Wachstum auf Peptonagar beträchtlich besser und schneller vor sich ging. Auf Grund dieser Feststellung wurde künftig direkt aus den Rohkulturen auf Peptonagar abgestrichen. Es ist hierbie empfehlenswert, ein Blättchen Filtrierpapier mit etwas Glycerin in den

Deckel der umgekehrten Petrischale zu legen, um zu verhindern, dass sich „verunreinigende“, bewegliche Bakterien zu stark über die Platte ausbreiten. Dadurch, dass die Kolonien der betreffenden Spirillen unter dem Mikroskop eine ziemlich charakteristische Faltung aufweisen, war das Erkennen der Kolonien wesentlich vereinfacht worden.

Bei diesen Versuchen trat die merkwürdige, bereits von KUTSCHER für die „Mistspirillen“ vermeldete Tatsache, dass die Anzahl der entwickelten Kolonien der Spirillen in gar keinem Verhältnis stand zu dem Masse, in welchem diese Spirillen in der Anhäufungsflora vertreten waren, deutlich zutage.

Es ergab sich daher die Frage, welchem Umstand es zugeschrieben werden muss, dass scheinbar eine ziemlich grosse Anzahl Zellen nicht zur Vermehrung übergeht. Es war mir nun schon aufgefallen, dass, während die meisten Kolonien der „verunreinigenden“ Bakterien bereits nach 24 Stunden bei 30° C auf Peptonagar eine ansehnliche Grösse erreicht hatten, niemals etwas von Spirillenkolonien zu entdecken war. Erst nach 48 Stunden hatten sich mit dem blossen Auge sichtbare Kolonien entwickelt, sodass die Spirillen an Wachstumsgeschwindigkeit wesentlich hinter den anderen Bakterien zurückblieben. Es scheint daher durchaus möglich, dass zahlreiche Spirillen, die zufällig dicht in der Nähe von Kolonien der „verunreinigenden“ Bakterien gelegen sind, in ihrer Entwicklung gehemmt werden. Dies könnte entweder von einer starken Konkurrenz um die Nährstoffe aus dem Agarboden oder von eventuell gebildeten schädlichen Stoffwechselprodukten verursacht werden.

Um diese Annahme näher zu prüfen, beschloss ich, die Agarplatten möglichst bald nach dem Abstreichen auf die Anwesenheit von Spirillenkolonien zu untersuchen. Dazu wurden nach ungefähr 24 Stunden kleine Scheiben aus der Agarplatte geschnitten und unmittelbar mikroskopiert. Durch das Ausschneiden und Herausheben der kleinen Agarscheiben werden nämlich die hierauf befindlichen Kolonien etwas verschoben, sodass eine ausreichende Anzahl Zellen freigelegt und eine mikroskopische Identifizierung mit dem Objektiv D von ZEISS sehr gut ermöglicht wird.

In der Tat stellte sich nun die oben beschriebene Vermutung als richtig heraus; während neben den ziemlich grossen Kolonien der anderen Bakterien sehr viele, mit dem blossen Auge jedoch nicht sichtbare, Spirillenkolonien anwesend waren, kamen scheinbar nur diejenigen Kolonien ordentlich zur Entwicklung, die zufällig nicht in der Nähe „verunreinigender“ Kolonien gelegen waren. Um nun möglichst zu vermeiden, dass die Kolonien dicht neben einander liegen, wurde deshalb in der Folge eine kleine Menge aus der Anhäufungskultur auf die Platte

gebracht und dieser Tropfen mit der Platinnadel möglichst gut über die ganze Oberfläche ausgestrichen. Nach 24 Stunden wurden darauf kleine Scheiben aus der Agarplatte geschnitten.

Die mikroskopische Prüfung dieser Agarscheiben führte weiter zu der erfreulichen Feststellung, dass unter den zahlreichen auf den Platten vorhandenen kleinen Spirillenkolonien mehrere nicht zu dem bis jetzt allein beobachteten kleinen Spirillentypus gehörten. Es liessen sich bei dieser Untersuchungsweise auf Grund der Zelldimensionen leicht drei verschiedene Spirillentypen unterscheiden.

Jetzt wurden die Kolonien mit Hilfe des Mikromanipulators in sterile Mikropipetten aufgesogen und wieder auf eine andere Peptonagarplatte ausgeblasen. Auf diese Weise war ich imstande, bereits nach einer Überimpfung zu Kulturen der drei erwähnten Spirillentypen zu gelangen, welche sich bei der weiteren Prüfung als rein erwiesen.

Es ist grösstenteils dieser Methode zu verdanken, dass die Erzielung von Reinkulturen von Spirillen aus Oberflächenwasser im allgemeinen weiterhin nicht mehr viel Mühe verursachte. Es darf jedoch nicht verschwiegen werden, dass aus noch ungeklärten Gründen bisweilen ein negatives Ergebnis erzielt wurde. So wurde z.B. in einem bestimmten Fall beobachtet, dass das grösste aus Kanalwasser angehäuften *Spirillum* beim Abstreichen aus der Rohkultur sich auf Peptonagar nicht vermehrte, dagegen wohl auf einem Agarboden, der neben Pepton Na-Laktat enthielt. Doch zeigte es sich, dass für den rein kultivierten Stamm Peptonagar ein sehr geeignetes Nährmedium war. Dies beweist also wohl, dass geringfügige, nicht näher bekannte Umstände das Wachstum positiv oder negativ beeinflussen können.

Es muss der obigen Beschreibung nun noch zugefügt werden, dass ein vierter Spirillentypus, über den im Vorhergehenden schon berichtet worden ist und der nur gelegentlich in mit Grabenwasser angestellten Laktat-Anhäufungen auftrat, mir noch spezielle Schwierigkeiten bereitete.

Die Entwicklung auf gewöhnlichem Peptonagar war immer nur äusserst ärmlich und Zusatz von Ca-Laktat zu diesem Nährboden brachte hierin keine wesentliche Verbesserung. Die mit einem auf Peptonagar schlecht wachsenden Stamme vorgenommenen, im nächsten Kapitel zu beschreibenden, Züchtungsversuche ergaben nun Anweisungen, dass im Gegensatz zu anderen organischen Salzen Pyruvate ein besonders geeignetes Substrat für diesen Organismus bildeten. Auf Grund dieser Beobachtung habe ich bei späteren Isolierungsversuchen und auch bei der Weiterzüchtung immer Peptonagar, dem 0.5—1% Na-Pyruvat zugesetzt war, benutzt.

Tatsächlich wurde hierdurch die Isolierung und auch die Kultur der Stämme des betreffenden Typus wesentlich erleichtert.

Es scheint nicht ausgeschlossen, dass der spezifische günstige Effekt des Pyruvats seiner reduzierenden Fähigkeit zugeschrieben werden muss. In diesem Zusammenhang weise ich auf die Untersuchungen BERTHELOTS (1924) hin, welcher zeigte, dass sehr verschiedenartige anaerobe Organismen auch bei Luftzutritt gut wachsen, wenn den Medien passende Mengen Brenztraubensäure zugefügt werden.

Schlieslich darf nicht unerwähnt bleiben, dass einmal in einer Laktat-Anhäufung mit Grabenwasser ein sehr grosses *Spirillum* — wahrscheinlich *Spirillum volutans* Ehb. — auftrat, dessen Reinzüchtung mir jedoch leider nicht gelungen ist.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode wurde nun eine grosse Anzahl Reinkulturen erhalten.

Hierunter folgt eine Übersicht der Herkunft der verschiedenen Stämme.

Nummer des Stammes	Isoliert aus:
1	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 14. Januar 1935.
2	} Heu-Infus in Kanalwasser vom 8. März 1935.
3	
4	
5	} Heu-Infus in Kanalwasser vom 20. März 1935.
6	
7	
8	Heu-Infus in Kanalwasser vom 2. April 1935.
9	} Heu-Infus in Kanalwasser vom 1. Mai 1935.
10	
11	} Ca-Laktat-Anhäufung mit Grabenwasser vom 2. Oktober 1935.
12	
13	} Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 7. Juni 1935.
14	
15	
16	} Ca-Laktat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 15. Juni 1935.
17	

<i>Nummer des Stammes</i>	<i>Isoliert aus:</i>
18 } 19 }	Ca-Laktat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 18. Juni 1935.
20 } 21 }	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 24. Juni 1935.
22	Ca-Laktat-Anhäufung mit Grabenwasser vom 24. Juni 1935.
23	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 26. Juni 1935.
24 } 25 <sup>1)</sup> } 26 }	Ca-Malat-Anhäufung mit Grabenwasser vom 28. Juni 1935.
27 } 28 } 30 } 32 }	Ca-Laktat-Anhäufung mit Grabenwasser vom 1. Juli 1935.
33	Ca-Laktat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 14. August 1935.
34 } 35 } 36 }	Heu-Infus in Kanalwasser vom 20. März 1935.
37 } 38 }	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 7. Juni 1935.
39 } 40 }	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 24. Juni 1935.
41	Ca-Laktat-Anhäufung mit Grabenwasser vom 17. September 1935.
42 } 43 }	Ca-Laktat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 27. Juni 1935.
45 } 46 }	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 2. Juli 1935.
48 } 49 }	Ca-Malat-Anhäufung mit Kanalwasser vom 15. August 1935.

<sup>1)</sup> Im Laufe der Untersuchung eingegangen.

Alle Stämme wurden als Strichkulturen auf Schrägagar aufbewahrt. Für die meisten erwies gewöhnlicher Peptonagar sich als ein vollauf geeigneter Nährboden. Dagegen gehörten die Stämme 11, 12, 22 und 27 zu demjenigen Typus, für welchen die Zufügung von Pyruvat wesentlich war. Weiter gab es nun jedoch eine Anzahl Stämme, und zwar die Nummern 2, 3, 30, 32, 33 und 43, welche offenbar bei Kultur auf Peptonagar bereits nach kurzer Dauer ihre Lebensfähigkeit einbüssten. Es zeigte sich nun, dass diese Stämme auf Peptonagar, dem 1% des Calciumsalzes einer organischen Säure, wie z.B. Milchsäure, zugesetzt worden war, sich viel besser erhalten liessen.

Es sei noch bemerkt, dass alle Medien sorgfältig auf  $\text{pH} = 7.0$  gebracht wurden. Nach Impfung wurden die Kulturen während 1—2 Tagen bei  $30^{\circ}\text{C}$  kultiviert und dann im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Alle 3—4 Monate wurden die Kulturen übergeimpft, nur für die Pyruvat-Stämme erwies es sich als notwendig, diese Zeit kürzer (d.h. 2 Monate) zu wählen.

#### § 4. ANHÄUFUNG VON IN JAUCHE VORKOMMENDEN SPIRILLEN.

Meine ersten Bemühungen mit Spirillen im allgemeinen stammen von einer mikroskopischen Untersuchung der in flüssigem Pferdemit (Jauche) vorkommenden Mikroorganismen. Die Beobachtung der in dieser Flüssigkeit in grosser Zahl anwesenden, stark beweglichen, grossen Spirillen brachte mich dazu die Isolierung dieser Organismen zu versuchen.

All meine Anstrengungen schlugen damals aber vollkommen fehl. Da die Spirillen in der Rohkultur nach Verlauf von einigen Tagen zahlenmässig stark zurückgingen, um schliesslich vollkommen zu verschwinden, und da weiter solche schönen natürlichen Anhäufungen nicht regelmässig zu bekommen waren, versuchte ich die Rohkultur längere Zeit zu erhalten.

Es zeigte sich nun, dass das von VOGT angegebene Erbsenextrakt-medium für diesen Zweck geeignet war. Jedenfalls entwickelten sich darin die Spirillen anfangs ganz gut, obwohl sogleich erwähnt werden muss, dass immer die verunreinigenden Bakterien in hohem Grade vorherrschten.

Während einiger Monate gelang es auf diese Weise die Rohkultur fortzuzüchten, indem jedesmal, wenn die Zahl der Spirillen zurückging, in Kulturröhren mit frischem Nährmedium übergeimpft wurde. Plötzlich änderte sich aber die Lage, weil bei Überimpfung die grossen Spirillen sich schlecht, schliesslich sogar überhaupt nicht mehr entwickelten.

Zur Prüfung der Frage, inwieweit vielleicht die hohe, kaum als natürlich

zu betrachtende Salzkonzentration in dem Medium verantwortlich für den auffallenden Rückgang der Anhäufung wäre, wurden Erbsenextraktmedien mit abnehmenden Salzkonzentrationen bereitet, und diese geimpft mit einer Öse einer Kultur, in der noch grosse Spirillen anwesend waren. Diese Versuche hatten aber ebenfalls ein völlig unbefriedigendes Ergebnis. In keinem einzigen Falle kam es zu einer guten Entwicklung von Spirillen.

Inzwischen hatte ich aber gefunden, dass es möglich war mit ziemlicher Regelmässigkeit Anhäufungen von „Mist-Spirillen“ im Laboratorium zu erhalten.

Hierzu brachte ich in Bechergläser eine Menge Pferde- oder Schweinemist, und fügte dann soviel Leitungswasser hinzu, dass der Mist von einer gehörigen Flüssigkeitsschicht (etwa 10 cm) überdeckt war. Alsdann wurden die mit einem Uhrglas bedeckten Bechergläser bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die allmählich ins Wasser diffundierenden Substanzen ermöglichten jetzt die Entwicklung verschiedenartiger Mikroorganismen. Unter gewissen Umständen trat nun auch eine befriedigende Anhäufung von Spirillen auf, wobei in der Regel eine grosse *Spirillum*-Art vorherrschend war.

Allerdings konnten in einzelnen Fällen auf Grund der Zelldimensionen noch einige andere Spirillentypen beobachtet werden. Darunter eine sehr kleine und eine sehr lange, dünne, überaus schön gewundene Art.

Im allgemeinen habe ich das zugefügte Leitungswasser nicht sterilisiert. Für das Ergebnis der Anhäufung war es völlig gleichgültig, ob sterilisiertes oder nicht sterilisiertes Wasser benutzt wurde.

Notwendig zum Gelingen der Anhäufung ist jedoch, dass man nicht von frischem Stallmist ausgeht, sondern von solchem, der bereits während einiger Zeit in Kontakt mit dem Boden gewesen ist. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Spirillen nicht aus dem Mist *an sich* herrühren. Möglicherweise entstammen sie dem Stallboden, in dem sie sich infolge der fortwährenden Zufuhr tierischer Abfallstoffe entwickelt haben können, sodass man also gleichsam von einer Anhäufung im Grossen sprechen könnte.

Eine nähere Anweisung für die Behauptung, dass die Spirillen nicht in dem Mist *an sich* vorkommen, ist durch die Tatsache gegeben, dass bei weitem nicht jeder Stallmist zur Anhäufung von Spirillen geeignet ist. Dies liess sich vielleicht so deuten, dass sich infolge gewisser, nicht näher bekannter Umstände im Boden mancher Ställe keine Spirillen befinden.

Es muss im allgemeinen zugegeben werden, dass der Frage nach der

Herkunft der sogenannten „Mist-Spirillen“ — einfachheitshalber werde ich diesen Namen auch im folgenden beibehalten — noch viel Rätselhaftes anhaftet. Ich habe keine Gelegenheit mehr gehabt diese Frage gründlich zu bearbeiten; ich will nur noch erwähnen, dass ich gelegentlich auch einmal eine gute Entwicklung grösserer Spirillen erzielte, nachdem ich ein wenig Pferdejauche, in dem mikroskopisch Spirillen nachzuweisen waren, in die synthetische Laktat- und Malatmedien geimpft hatte. Der vorläufige Eindruck war, dass das aus diesen Anhäufungen isolierte *Spirillum* nicht identisch war mit denjenigen, welche in den gewöhnlichen Mistanhäufungen auftreten.

#### § 5. ISOLIERUNG UND ZÜCHTUNG DER „MIST-SPIRILLEN“.

Wie schon gesagt, waren anfangs all meine Bemühungen um die in flüssigem Mist angehäuften Spirillen zu isolieren, erfolglos. Beim Abstreichen auf oder beim Suspendieren in Peptonagar bzw. in den von ZETNOW empfohlenen „Spirillenagar“, entwickelten sich jedenfalls, wie sorgfältig die Agarplatten auch untersucht wurden, keine mit blossem Auge sichtbaren Kolonien von Spirillen.

Die ausserordentlich grosse Geschwindigkeit, mit der sich die grossen Spirillen in der Erbsenextrakt-Rohkultur fortbewegten, brachte mich nun auf die Idee, diese Eigenschaft zur Isolierung dieser Organismen zu benutzen. Wenn sich nämlich die Spirillen über einen grösseren Abstand in derselben Richtung fortbewegen, liess sich erwarten, dass die vordersten schliesslich, hinsichtlich der sich langsamer fortbewegenden, „verunreinigenden“ Bakterien, einen Vorsprung erhalten würden. Durch eine mechanische Trennung, sollte es dann möglich sein, eine Anzahl Spirillen zu isolieren.

Dieser Gedankengang führte zur folgenden Arbeitsweise. Eine grosse Anzahl Mikropipetten mit einem Durchschnitt von ca. 1 mm (sogenannte PASTEUR-Pipetten) wurden mit zugeschmolzener Spitze sterilisiert. Nachdem die Spitze abgebrochen und etwas steriler Erbsenextrakt in die Pipette gesogen war, wurde diese nun ganz kurz in die Anhäufungskultur getaucht und daraufhin sofort wieder über eine Mikroflamme zugeschmolzen. Dabei musste allerdings grosse Vorsicht betrachtet werden, damit die sich im Ende der Pipette befindenden Organismen nicht getötet wurden. Die in der Pipette befindlichen, beweglichen Bakterien, unter denen die Spirillen, fingen nun u.a. aus Sauerstoffmangel an, sich in der Richtung nach dem offenen Ende der Pipette zu bewegen, wobei es sehr gut möglich war, den sehr grossen Spirillen unter dem Mikroskop

mit Objektiv A oder B von ZEISS zu folgen. Meistens schwammen die Spirillen allein, aber wenn sehr viele Spirillen in der Pipette vorhanden waren, kam es wohl auch zur Bildung einer sogenannten Spirillenie, die sich, im Masse wie der Sauerstoff verbraucht wurde, fortbewegte. Trotzdem diese Vorwärtsbewegung mit einer ziemlich grossen Geschwindigkeit vor sich ging, war diese doch zu gering, um einen Vorsprung vor den anderen beweglichen Bakterien zu erzielen, sodass ausschliesslich auf die isoliert schwimmenden Spirillen geachtet wurde. Diese bewegten sich, trotzdem die Richtung sich ab und zu änderte, durchschnittlich über einen Abstand von 2 bis 3 cm pro Stunde nach dem offenen Ende der Pipette. Weiterhin wurde dann, wenn die Aussicht günstig war, dass sich zwischen den vorderen Spirillen und den vordersten „verunreinigenden“ Bakterien ein ausreichender Abstand befand, dicht hinter der Stelle, auf der sich die vorderen Spirillen befanden, vorsichtig mit dem Glasmesser eine kleine Schramme in die Pipette gemacht. Danach wurde die Pipette aussen mittels Formol sterilisiert und in sterilem Wasser wieder gut abgewaschen, um schliesslich bei der Schramme durchgebrochen zu werden. Nun konnte je nach Wunsch der Inhalt der Pipette mit den Spirillen in irgendein flüssiges Medium ausgeblasen werden, oder die Pipette konnte wieder zugeschmolzen werden, wobei dann unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte, inwieweit die Spirillen sich in der Pipette vermehrten.

Die Resultate bildeten jedoch eine arge Enttäuschung. Es war zwar möglich, auf diese Weise eine Anzahl Spirillen zu isolieren. Jedenfalls konnte keine Entwicklung anderer Organismen festgestellt werden, ebensowenig aber vermehrten sich die Spirillen. So habe ich in einem bestimmten Fall in einer Pipette eine Woche lang ungefähr 50 Spirillen in beweglichem Zustand wahrnehmen können, wonach sie jedoch allmählich abstarben, ohne sich vermehrt zu haben.

Ohne Zweifel birgt das Misslingen dieser Arbeitsweise etwas Rätselhaftes. Ich kann noch hinzufügen, dass Frl. J. DE ZEEUW diese Methode weiter ausgearbeitet hat (nicht veröffentlicht). U.a. wurden in Hinsicht auf die Möglichkeit, dass die „verunreinigenden“ Bakterien dadurch eine wesentliche Rolle spielen, dass sie das Oxydoreduktionspotential in einer passenden Weise erniedrigen, dem Erbsenextrakt Stoffe, denen diese Eigenschaft zukommt, wie Thiomilchsäure und Cystein, in verschiedenen Konzentrationen zugefügt.

Ebenfalls wurde geprüft, inwieweit vielleicht die Nährstoffe in dem Erbsenextrakt bis zu einem gewissen Grad durch andere Bakterien abge-

baut sein müssen, bevor sie von den Spirillen assimiliert werden können. Zu diesem Zwecke machte Frl. DE ZEEUW an Stelle des sterilen Erbsenextraktes Gebrauch von einer mittels Filtrieren durch ein Bakterienfilter sterilisierten Rohkultur. All ihre Bemühungen führten jedoch nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Dies alles, zusammen mit dem schon erwähnten Rückgang der Spirillenkultur, veranlasste mich auf eine weitere Fortsetzung dieser Versuche zu verzichten.

Da ich inzwischen vertraut geworden war mit der Weise, in welcher sich die „Wasserspirillen“ aus ihren Anhäufungen isolieren liessen, beschloss ich nun zu versuchen, diese Methode auch auf die doch augenscheinlich in mancher Hinsicht hiermit übereinstimmenden „Mist-Spirillen“ anzuwenden.

Hierbei ging ich nicht mehr von der Anhäufungskultur in Erbsenextrakt aus, sondern von einer der, im vorigen Paragraphen beschriebenen, „natürlichen“ Anhäufungen.

Hieraus wurde nun ganz auf dieselbe Weise, wie im § 3 angegeben ist, auf Peptonagar abgestrichen und nach einer etwa 24 Stunden langen Züchtung bei 30° C kleine Scheiben aus dem Agar unter dem Mikroskop untersucht. Neben den zahlreichen und grossen Kolonien der anderen Bakterien traf ich nun tatsächlich Kolonien der gesuchten Spirillen an. Diese waren jedoch noch viel kleiner als die der „Wasserspirillen“ und bestanden aus nicht mehr als 20 bis 50 Zellen. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde danach auf Peptonagar übergeimpft. Nach einer ungefähr 48 Stunden langen Züchtung bei 30° C hatten die Kolonien eine ausreichende Grösse erreicht, um weiterhin mit der Platinnadel behandelt zu werden.

Es muss bemerkt werden, dass allerdings bei dieser Isolierungsmethode negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen sind. Der Prozentsatz der Fälle, bei denen die Isolierung nicht gelingt, weil die Spirillen sich aus nicht näher bekannten Gründen nicht vermehren, ist sogar nicht gering. Dies, zusammen mit der Tatsache, dass das Wachstum von „Mist-Spirillen“ auf gewöhnlichem Peptonagar oder auf dem s.g. „Spirillenagar“ sogar in Reinkultur sehr ärmlich ist, muss wohl verantwortlich sein für die Schwierigkeiten, welche andere Forscher bei Isolierungsversuchen dieser Organismen gehabt haben.

Jedenfalls wurden in der oben beschriebenen Weise eine Anzahl Reinkulturen erhalten. Sogar eine oberflächliche Untersuchung genügte jedoch um festzustellen, dass alle diese Kulturen dem gleichen morphologischen Typus zugehörten.

Die gelegentlich einmal beobachteten kleinen bzw. schlanken Formen wurden niemals in Kultur erhalten.

Es muss ausdrücklich betont werden, dass meine Untersuchung der „Mist-Spirillen“ keineswegs erschöpfend ist und dies um so mehr, weil die oben beschriebenen Isolierungen zu spät gelungen sind, um mit Rücksicht auf das übrige Arbeitsprogramm noch ein eingehendes Studium der erhaltenen Stämme zu erlauben.

Hierunter folgt eine Übersicht der Herkunft der isolierten Stämme.

<i>Nummer des Stammes</i>	<i>Isoliert aus:</i>
*29	} Anhäufung mit Pferdemist vom 17. Juni 1935.
31	
44	} Anhäufung mit Schweinemist vom 18. September 1935.
47	
50	} Anhäufung mit Pferdemist vom 20. Oktober 1935.
51	
52	Anhäufung mit Pferdemist vom 28. Oktober 1935.
53	} Anhäufung mit Schweinemist vom 10. November 1935.
54	
55	Anhäufung mit Schweinemist vom 16. November 1935.
56	} Anhäufung mit Pferdemist vom 18. November 1935.
57	
58	
*59	
60	} Anhäufung mit Pferdemist vom 24. November 1935.
61	
*62	
63	} Anhäufung mit Pferdemist vom 28. November 1935.
*64	

Inzwischen sind die mit \* angedeuteten Stämme schon wieder im Laufe der Untersuchung eingegangen, was wohl damit zusammenhängt, dass ein vollauf befriedigendes Nährmedium für die „Mist-Spirillen“ noch nicht gefunden werden konnte.

Wie schon gesagt, bildet gewöhnlicher Peptonagar für die „Mist-Spirillen“ einen wenig geeigneten Nährboden. Auch der Zusatz von Pyruvat oder Salzen anderer organischer Säuren hatte in diesem Fall keinen Erfolg. Der von ZETTNOW empfohlene Spirillenagar bot keine besseren Wachstumsbedingungen als Peptonagar, ebensowenig Hefe-Extraktagar, auf dem einige aus Oberflächenwasser isolierten Spirillen doch ganz gut wuchsen.

Schliesslich wurde auf Grund der Erwägung, dass in einer guten Anhäufungskultur die für Spirillen notwendigen Nährstoffe vorhanden sein müssen, ein Nährboden dadurch bereitet, dass dem Filtrat einer derartigen Rohkultur 2% Agar zugefügt wurde. Auf einem derartigen Nährboden (pH etwa 7.5) war das Wachstum relativ gut. Alle Stämme wurden seitdem als Strichkultur auf in dieser Weise vorbereitetem Schrägagar im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Immerhin darf mit der Überimpfung nicht zu lange gewartet werden, da die Kulturen auf diesem Agar bereits nach kurzer Dauer in ihrer Lebensfähigkeit stark zurückgehen. Trotz aller getroffenen Massnahmen ist es denn auch einige Male vorgekommen, dass eine Kultur schon vor der Überimpfung eingegangen war.

## KAPITEL IV.

### EINTEILUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER ISOLIERTEN STÄMME.

#### § 1. EINLEITENDE BEMERKUNGEN.

Nachdem, wie im vorigen Kapitel beschrieben, etwa 60 *Spirillum*-Stämme isoliert worden waren, kam es darauf an festzustellen, wieviel verschiedene Arten in dem zusammengebrachten Material unterschieden werden müssten.

Es ist einleuchtend, dass die Beantwortung dieser Frage bedingt wird durch die Ansichten bezüglich der Merkmale, welche für die Artbegrenzung als ausschlaggebend betrachtet werden müssen. Im Anschluss an die von KLUYVER und VAN NIEL (1936) in ihrer rezenten Abhandlungen veröffentlichten Auffassungen schien es mir angebracht, derart vorzugehen, dass an erster Stelle untersucht wurde, ob die isolierten Stämme gut feststellende Unterschiede in morphologischer Hinsicht aufwiesen. Bevor die auf diese Weise erhaltenen morphologischen Gruppen als bestimmte Arten charakterisiert wurden, sollte jedoch geprüft werden, inwieweit die Vertreter der genannten Gruppen auch in physiologischer Hinsicht übereinstimmten. Falls sich nämlich dabei „genügend wichtige“<sup>1)</sup> Unterschiede ergäben, wäre eine weitere Trennung der einzelnen morphologischen Gruppen in gesonderte Arten durchaus erwünscht.

#### § 2. ALLGEMEINE BEMERKUNGEN BEZÜGLICH DER FESTSTELLUNG DER MORPHOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN.

Bevor ein Bakteriologe zur Beschreibung der Form eines gegebenen Bakteriums übergeht, hat er sich zu vergegenwärtigen, dass die Bakterienzelle nicht als ein statischer, sondern als ein mehr oder weniger dynamischer Komplex aufzufassen ist. Je nachdem die äusseren Verhältnisse sich abändern, mag dieser Komplex darauf mit einer Änderung der Zellform reagieren. Man findet zahlreiche Beispiele in der Literatur erwähnt, wobei Abänderung in der Zusammensetzung eines Nährmediums ebenfalls zu einer Änderung der Zellform führt. Es besteht Grund zur

<sup>1)</sup> Vergleich hierfür die Aussage BENECKES, erwähnt in der oben zitierten Abhandlung von Kl. u. v. N. auf S. 372.

Annahme, die von HENRICI (1928) so überzeugend belegten Änderungen der Zellform in Abhängigkeit von dem Alter einer Bakterienkultur an erster Stelle zurückzuführen auf die chemischen Änderungen, welche sich im Nährmedium im Verlaufe der Entwicklung der Bakterien vollziehen.

Als Beispiel wie auch bei Spirillen nur wenig erforderlich ist, um die Zellform vollkommen abzuändern, möge hier das von mir beobachtete auffallende Benehmen vom Stamm 34 erwähnt werden. Dieser Organismus besitzt in Peptonwasser lange, schwach gewundene Zellen, aber reagiert auf das Zufügen von Ca-Laktat — man muss dabei sorgen, dass das Nährmedium neutral reagiert — mit der Bildung von zierlichen, stark spiralförmigen Zellen.

Für einen Vergleich von Bakterien in morphologischer Hinsicht ist es also durchaus notwendig möglichst vergleichbares Material zu benutzen, d.h. Individuen, die im gleichen Nährmedium gewachsen und von etwa gleichem Alter sind.

Dabei scheint es mit Rücksicht auf die von HENRICI erhaltenen Ergebnisse erwünscht, die Feststellung der Zellform in Kulturen vorzunehmen, welche in aktiver Vermehrung begriffen sind, d.h. in denen das Wachstum sich in der sogenannten logarithmischen Phase befindet. Denn wie HENRICI gezeigt hat, ist die Konstanz der Form unter diesen Bedingungen am meisten verbürgt.

Im allgemeinen empfiehlt es sich daher von Flüssigkeitskulturen Gebrauch zu machen. In der Literatur findet man ausserdem oft erwähnt, dass Spirillen, die auf einem festen Nährboden gezüchtet sind, bei weitem nicht die zierliche Spiralform der Flüssigkeitskulturen besitzen.

Auch die Variation der Zellform, welche in einer im übrigen uniformen Kultur auftritt, ist ein Punkt, dem man Aufmerksamkeit schenken soll. Zumal bei Spirillen kann nämlich die Spiralform bei der einen Zelle viel stärker ausgesprochen sein als bei der anderen. Nicht selten trifft man vollkommen stabförmige, jedoch übrigens gut bewegliche Zellen an. Im allgemeinen aber waren 80—90% der Zellen der aus Wasser isolierten Stämme ganz gleichförmig, sodass eine zuverlässige Basis für eine Beschreibung der Zellform anwesend war. Weniger günstig war jedoch der Zustand bei den „Mist-Spirillen“. Hier ist die Variation in der Zellform oft dermassen gross, dass es schwierig ist bestimmte Angaben darüber zu machen. Es kommt noch hinzu, dass einige der in Reinkultur gebrachten Stämme von „Mist-Spirillen“ bereits nach kürzerer Zeit ihre spiralförmige Gestalt verlieren, eine Erscheinung, die auch von KUTSCHER, ZETNOW und anderen schon beobachtet worden ist.

### § 3. MORPHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER ISOLIERTEN STÄMME.

#### a. Die aus Kanal- bzw. Grabenwasser isolierten Stämme.

Die nähere Untersuchung, gemäss den im vorhergehenden Paragraphen angegebenen Prinzipien, lieferte nun eine volle Bestätigung der schon früher ausgesprochenen Ansicht, dass die isolierten Stämme sich in vier morphologisch verschiedene Gruppen einteilen liessen.

*Gruppe I.* Hierzu gehören die Stämme 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 48 und 49.

In Peptonwasser geimpft nach 24 Stunden bei 30° C stark bewegliche, ziemlich schwach gewundene Zellen (Abb. 1). Zelldicke 0,8—1  $\mu$ . Länge einer Windung (von Wellenkamm bis Wellenkamm) gemessen () 8—9  $\mu$ . Breite einer Windung () 1,5—1,8  $\mu$ .

Beweglich mittels polarer Geisselbündel (Abb. 2). Volutin tritt als Reservestoff auf (Abb. 3). Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend.

Auf Peptonagar reichlich wachsend, Kolonien rahmfarbig, typisch gewellt (Abb. 4). Gelatin langsam verflüssigend. Auf Kartoffel hell orange gelber Wuchs.

*Gruppe II.* Hierzu gehören die Stämme 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25 und 26.

Das kleinste aus Wasser isolierte *Spirillum*.

In Peptonwasser nach 24 Stunden bei 30° C stark bewegliche Zellen mit meistens 1/2 bis 1 1/2 Windung (Abb. 5). Zelldicke 0,5  $\mu$ . Länge einer Windung 3—3,5  $\mu$ , Breite einer Windung 1—1,5  $\mu$ . Beweglich mittels polarer Geisselbündel. Als Reservestoff ist Volutin ein einziges Mal in der Form sehr kleiner Kügelchen sichtbar. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar reichlich wachsend. Kolonien weiss, bei Älterwerden braunschwarz verfärbend, leicht gefältelt (Abb. 6). Gelatine nicht verflüssigend. Auf Kartoffel braun-orangerfarbener Wuchs.

*Gruppe III.* Hierzu gehören nebst den Stämmen 2, 3, 30, 32, 33 und 43 auch zwei in der Sammlung des Laboratoriums für Mikrobiologie zu Delft unter dem Namen *Spirillum tenue* eingeschriebene Stämme.

In Peptonwasser nach 24 Stunden bei 30° C gut bewegliche, zierlich gewundene Zellen mit meistens 1—2 Windungen (Abb. 7). Zelldicke 0,7  $\mu$ , Länge einer Windung 4,5—5  $\mu$ , Breite einer Windung 1,5—1,8  $\mu$ .

Beweglich mittels polarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar



Abb. 1.

*Spirillum serpens* (Müller) Winter.  
Stamm 34. Während 24 Stunden in Pepton-  
wasser bei 30° C. kultiviert. Schwach gefärbt  
mit Methylenblau.  
(Vergr. 700).



Abb. 2.

*Spirillum serpens*.  
Stamm 34. Geisselfärbung nach ZETTNOW.  
(Vergr. 1500).



Abb. 3.

*Spirillum serpens*.  
Stamm 34. Volutin.  
(Vergr. 1500).

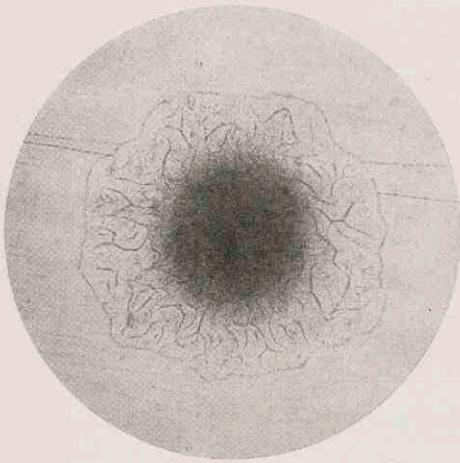


Abb. 4.

*Spirillum serpens.*

Stamm 34. Kolonie auf Peptonagar nach  
24 stündiger Züchtung bei 30° C.  
(Vergr. 30).



Abb. 5.

*Spirillum Itersonii* nov. spec.

Stamm 7. Während 24 Stunden in Pepton-  
wasser bei 30° C. kultiviert. Schwach gefärbt  
mit Methyleneblau.  
(Vergr. 700).

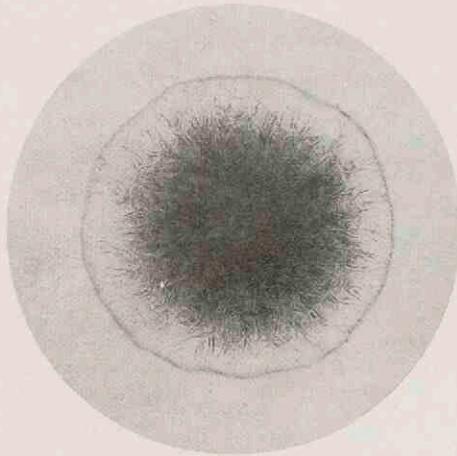


Abb. 6.

*Spirillum Itersonii.*

Stamm 7. Kolonie auf Peptonagar nach  
24 stündiger Züchtung bei 30° C.  
(Vergr. 30).

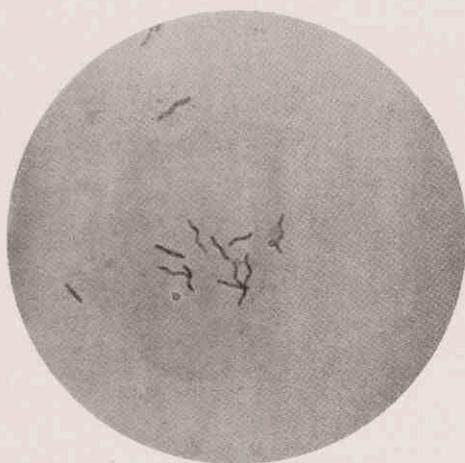


Abb. 7.

*Spirillum tenue* (Müller) Ehrenberg.  
Stamm E III 2.2.2. der Sammlung des Laboratoriums für Mikrobiologie zu Delft. Während 24 Stunden in Peptonwasser bei 30° C. kultiviert. Schwach gefärbt mit Methylenblau.  
(Vergr. 700).

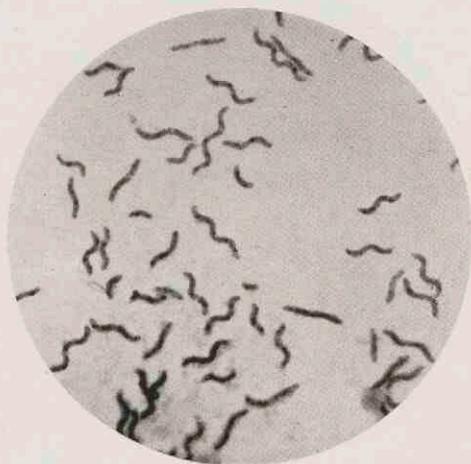


Abb. 8.

*Spirillum undula* (Müller) Ehrenberg.  
Stamm 11. Während 24 Stunden in Peptonwasser bei 30° C. kultiviert. Schwach gefärbt mit Methylenblau.  
(Vergr. 700).

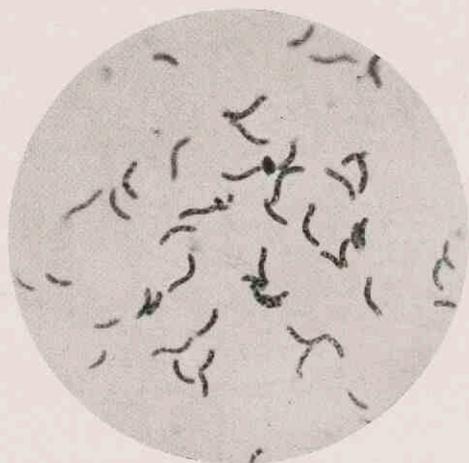


Abb. 9.  
*Spirillum Kutscheri* Migula.  
Stamm 57. Kultiviert in Peptonwasser. Schwach  
gefärbt mit Methylenblau.  
(Vergr. 700).



Abb. 10.  
*Spirillum Kutscheri* Migula.  
Stamm 50. Dunkelfeld-Aufnahme von leben-  
den Zellen.  
(Vergr. 900).

mässig wachsend. Kolonien weiss, glatt. Gelatine nicht verflüssigend. Auf Kartoffel hell-brauner Wuchs.

*Gruppe IV.* Hierzu gehören die Stämme 11, 12, 22 und 27.

In Peptonwasser nach 24 Stunden bei 30° C ausserordentlich bewegliche, schöne breit-spiralförmig gewundene Zellen (Abb. 8). Zelldicke 0,9  $\mu$ . Länge einer Windung 6  $\mu$ . Breite einer Windung 3  $\mu$ .

Beweglich mittels polarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar ärmlich wachsend. Kolonien grau-weiss, glatt. Gelatine sehr langsam verflüssigend. Auf Kartoffel grau-brauner Wuchs.

b. *Die aus den Mistanhäufungen isolierten Stämme.*

Bei der Beschreibung dieser Organismen habe ich, wie schon erwähnt, grosse Schwierigkeiten wegen der auftretenden Variabilität der Zellform erfahren. Anfänglich schien es mir unmöglich, genauere Angaben über die Morphologie dieser Spirillen zu machen. Eine mehrmals wiederholte Untersuchung lehrte jedoch, dass, wenn ich mich auf die Betrachtung der am häufigsten vertretenen Zellform beschränkte, die Schwankungen sich zwischen verhältnismässig engen Grenzen bewegten, sodass eine zuverlässige Basis für die Beschreibung vorhanden war. Da es sich ausserdem herausstellte, dass die Grenzwerte für alle Stämme ungefähr die gleichen waren, war es nicht möglich, bei diesen Organismen mehrere morphologische Gruppen zu unterscheiden. Wie jedoch aus der unten folgenden Beschreibung der wichtigsten morphologischen Eigenschaften hervorgeht, weicht die Gruppe der „Mist-Spirillen“ deutlich ab von den vier schon beschriebenen Gruppen der Wasserspirillen.

*Gruppe V.* Hierzu gehören die Stämme 29, 31, 44, 47, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 und 63.

In Peptonwasser gut bewegliche, schön gewundene Zellen (Abb. 9 und 10). Zelldicke 1,5  $\mu$ . Länge einer Windung 10,5—12,5  $\mu$ . Breite einer Windung 3—4,5  $\mu$ .

Es muss hierzu jedoch bemerkt werden, dass alle diese Beobachtungen kurz nach der Isolierung der Organismen gemacht sind. Es zeigte sich nämlich, dass bei den „Mist-Spirillen“ die Neigung besteht, allmählich ihre Spiralform zu verlieren. Diese Erscheinung kann so weit gehen, dass fast nur noch stabförmige Zellen angetroffen werden. Zurzeit trifft dies z.B. zu für die Stämme 44, 47, 51 und 58.

Beweglich mittels polarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend.

Auf Peptonagar ärmlich wachsend. Die Kolonie zeigte eine gekörnte Struktur. Gelatine langsam verflüssigend. Auf Kartoffeln nur sehr beschränktes Wachstum.

#### § 4. DIE GRUNDZÜGE DES STOFFWECHSELS DER ISOLIERTEN STÄMME.

##### *Die Dissimilationsvorgänge.*

Aus den mitgeteilten Anhäufungsversuchen geht ohne weiteres hervor, dass die isolierten Stämme zu den chemo-heterotrophen Organismen gehören. Weiter stellte sich alsbald heraus, dass alle Stämme charakterisiert waren durch ihren obligat oxydativen Stoffwechsel. Zahlreiche Versuche lehrten, dass mit Vernachlässigung einer unten näher zu erörternden Ausnahme, der Sauerstoff ein unbedingt notwendiger Faktor zur Entwicklung der untersuchten Spirillen ist. Impfte ich nämlich die Stämme in Stöpselflaschen, welche völlig gefüllt waren mit einem Nährmedium, das unter aeroben Bedingungen gutes Wachstum ermöglichte, wie z.B. Peptonwasser, so konnte auch nach längerer Zeit keinerlei Vermehrung der Organismen festgestellt werden.

Ausdrücklich sei bemerkt, dass diese Sachlage sich nicht änderte, wenn die geimpften Stöpselflaschen nicht im Dunkeln, sondern im Lichtschranke nach VAN NIEL aufgestellt wurden. Es ist dies deshalb wichtig, weil dieses negative Ergebnis einen ausschlaggebenden Unterschied bedeutet zu dem Verhalten der Vertreter der Gattung *Rhodospirillum*. Hat doch VAN NIEL schon im Jahre 1925 die grundlegende Beobachtung gemacht, dass letztgenannte Organismen — und im allgemeinen die *Athiorhodaceae* — sich in einem gegebenen einfachen Medium vermehren können, wenn entweder Sauerstoff oder Licht zutreten kann. Fehlen dagegen beide Faktoren, dann ist kein Wachstum möglich. Von der Richtigkeit dieser Beobachtung konnte ich mich bei der Untersuchung einiger Stämme von *Rhodospirillum rubrum* ebenfalls überzeugen.

Da Stämme letztgenannter Bakterienart bei Kultur unter aeroben Bedingungen häufig fast gar keine oder doch nur sehr geringe Pigmentbildung aufweisen, empfiehlt es sich zweifellos, bei Isolierung neuer *Spirillum*-Stämme dieselben auf die obenangegebene Weise auf ihre eventuelle Zugehörigkeit zur Gattung *Rhodospirillum* zu untersuchen.

Wie oben schon angedeutet, gab es in Bezug auf den obligat aeroben Charakter der Spirillen eine Ausnahme. In Hinblick auf die schon erwähnte Beobachtung VAN ITERSONS, dass in Denitrifikationsanhäufungen,

worin Zellulose als Kohlenstoffquelle benutzt wurde, bisweilen auch Spirillen auftraten, war es wünschenswert, die isolierten Stämme ebenfalls auf ihr Denitrifikationsvermögen zu prüfen. Tatsächlich konnte nun festgestellt werden, dass ein Teil der Stämme sich in einem Medium, das neben 1% Pepton 1%  $\text{KNO}_3$  enthielt, auch unter anaeroben Bedingungen — d.h. in einer völlig gefüllten Stöpselflasche — gut entwickelte. Mit Hilfe des GRIESS-ROMYNSchen Reagenzes liessen sich dann leicht reichliche Quantitäten Nitrit in der Nährflüssigkeit nachweisen. Nur ausnahmsweise wurde beobachtet, dass die Denitrifikation sogar bis zur Bildung von gasförmigem Stickstoff weiterschritt. Eine nähere Betrachtung der zur Denitrifikation befähigten Stämme führte nun zu dem auffallenden Ergebnis, dass *alle* in der morphologischen Gruppe II untergebrachte Stämme Denitrifikationsvermögen aufwiesen. Dagegen fehlte diese Eigenschaft bei allen Vertretern der sonstigen Gruppen.

#### *Die Assimilationsbedürfnisse.*

Die Anhäufungsversuche der Mehrzahl der Stämme lassen keinen Zweifel, dass sie imstande sind, den für ihr Wachstum benötigten Kohlenstoff einfachen organischen Salzen zu entnehmen. Ich konnte nun leicht feststellen, dass dies auch für die aus Heu-Infus und aus Jauche isolierten Stämme zutraf.

Jedoch stellte es sich bald heraus, dass die verschiedenen geprüften Salze untereinander keineswegs gleichwertig sind; im Gegenteil zeigte es sich, dass gerade in dieser Hinsicht bedeutende Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen vorlagen. Da es angebracht schien, dieses Merkmal für die Differenzierung der Stämme zu benutzen, werde ich hierauf im nächsten Paragraphen näher eingehen.

Bei der Isolierung ist schon festgestellt worden, dass alle in Reinkultur gebrachten Spirillen fähig sind, ihren Stickstoffbedarf mit Hilfe einer Stickstoff in komplexer Form enthaltenden Substanz, wie Pepton, zu decken. In welchem Masse sind nun aber diese in Pepton befindlichen komplexen, stickstoffhaltigen Stoffe ersetzbar durch einfache Verbindungen? Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine neue Reihe von Wachstumsversuchen angestellt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Stämme geimpft in Kulturröhren, die folgendes Standardmedium enthielten: destilliertes Wasser; 0,05%  $\text{MgSO}_4$ ; 0,05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und als Kohlenstoffquelle eine assimilierbare Kohlenstoffverbindung wie Ca-Laktat. Diesem Medium wurde als Stickstoffquelle jetzt noch 0,1% von einer der folgenden Verbindungen zugefügt: Asparagin,

Harnstoff,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KNO}_2$ . Zur Kontrolle wurde daneben einer Versuchsreihe gar kein Stickstoff zugefügt.

Es stellte sich nun heraus, dass Asparagin und  $\text{NH}_4$ -Verbindungen für alle aus Kanalwasser isolierten Stämme eine gleich gute Stickstoffquelle wie Pepton bilden, dagegen Harnstoff, Nitrat und Nitrit ganz unbrauchbar sind. Es geht hieraus also u.a. hervor, dass die Zufügung von  $\text{KNO}_3$  bei dem gemäss ZETNOW bereiteten „Spirillenagar“ vollständig überflüssig ist.

Es muss ausdrücklich bemerkt werden, dass die Untauglichkeit der Nitrate zum Aufbau von Zellmaterial sogar für die obenerwähnten denitrifizierenden Stämme gilt. Ich untersuchte nämlich, inwieweit bei Impfung dieser Stämme in ein Medium folgender Zusammensetzung: destilliertes Wasser, 0,05%  $\text{MgSO}_4$ , 0,05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1%  $\text{KNO}_3$  und 1% Ca-Laktat, unter anaeroben Bedingungen Entwicklung eintrat. Das Ergebnis war jedoch ganz negativ. Auffallenderweise änderte dies sich völlig, wenn ich die Versuche wiederholte, nachdem ich dem Medium auch noch 0,1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zugefügt hatte. Unter diesen Bedingungen trat gutes Wachstum ein, wobei ebenfalls eine Denitrifikation unter Bildung gasförmigen Stickstoffes beobachtet wurde. Offenbar müssen wir aus diesen Versuchen schliessen, dass für diese Organismen Nitrate wohl brauchbar sind zur Oxydation des Dissimilationssubstrates, während zum Aufbau des Zelleiweisses jedoch der Ammonstickstoff unbedingt erforderlich scheint. Immerhin ist diese Sachlage sehr merkwürdig, da, soweit mir bekannt, ein derartiges Verhalten denitrifizierender Bakterien bis jetzt nicht beschrieben worden ist.

Schliesslich sei noch bemerkt, dass auch die „Mist-Spirillen“ sich als fähig erwiesen, ihren Stickstoffbedarf aus  $\text{NH}_4$ -Verbindungen zu decken.

#### *pH-Empfindlichkeit.*

Mehrere Versuche, welche bezüglich des Einflusses der Azidität auf das Wachstum angestellt wurden, lehrten, dass im allgemeinen die Entwicklung der Spirillen an eine neutrale bis schwach alkalische Reaktion gebunden ist. Für die aus Wasser isolierten Stämme liegt das optimale pH bei etwa 7,4; die „Mist-Spirillen“ dagegen sind etwas mehr alkalischen Verhältnissen angepasst. Das optimale pH variierte hierbei zwischen 7,5 und 8,0.

Beim Gebrauch von Phosphat und Ca-Salze organischer Säuren enthaltenden Medien soll man stets darauf achten, dass während der Sterilisation eine Verschiebung des pH nach der sauren Seite dadurch stattfindet, dass durch Bildung und Präzipitation des tertiären Ca-Phospha-

tes ein Teil der organischen Säuren frei wird. (Vergl.: GROENEWEGE, 1921). Eine Kontrolle und etwaige Regulierung durch Zufügen von etwas Alkali soll deshalb immer geschehen.

Andererseits darf nicht ausser Betracht gelassen werden, dass in derartigen Medien der Abbau der Säuren durch den Organismus zu einer erhöhten Alkalität führt, sodass man gut daran tut, mit einem verhältnismässig niedrigen pH (z.B. 7,0) anzufangen.

#### *Temperatur-Abhängigkeit.*

Es ergab sich, dass die optimale Temperatur für das Wachstum aller untersuchten Spirillen in der Nähe von 35° C liegt. Alle Wachstumsversuche fanden jedoch bequemlichkeitshalber bei 30° C statt, weil ein auf diese Temperatur eingestellter grösserer Thermostatenraum zur Verfügung stand.

#### § 5. VERWENDBARKEIT VERSCHIEDENER EINFACHER VERBINDUNGEN ALS EINZIGER KOHLENSTOFFQUELLE.

Wie schon im vorigen Paragraphen bemerkt wurde, stellte es sich bei der vorläufigen Untersuchung verschiedener Verbindungen um als einzige Kohlenstoffquelle für die Spirillen zu fungieren, bald heraus, dass in dieser Hinsicht beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen existierten. Dies veranlasste mich, diesen Punkt etwas gründlicher zu untersuchen.

Ich benutzte hierbei die folgende Methode. Einem Nährmedium, das zusammengesetzt war aus destilliertem Wasser, 0,05%  $MgSO_4$ , 0,05%  $K_2HPO_4$  und 0,1%  $NH_4Cl$ , wurde 0,2—1% der zu untersuchenden Verbindungen zugefügt. Es wurden hierzu die reinsten käuflich erhältlichen Präparate (meistens von Merck oder Kahlbaum) verwendet. Die auf diese Weise erhaltenen Medien wurden dann in Kulturröhren sterilisiert. Die Reaktion des Mediums wurde immer nach der Sterilisation kontrolliert und wenn nötig korrigiert. Hierauf wurde eine Reihe dieser Medien mit einer kleinen Menge Zellen einer Reinkultur geimpft. Jede Reihe umfasste auch immer ein Kontroll-Rohr, das dasselbe Standardmedium, jedoch ohne Kohlenstoffverbindung enthielt.

Nach Aufbewahren in einem Brutschranke während einer Woche bei 30° C wurde untersucht, inwieweit in den einzelnen Röhrchen Wachstum eingetreten war. Dies liess sich immer leicht feststellen, weil eine einigermaßen erhebliche Vermehrung sich durch eine deutliche Trübung des Mediums verriet. Daneben wurde durch eine mikroskopische Prüfung festgestellt, ob in einem Röhrchen mit getrübtetem Medium die Zellen sich

tatsächlich in gutem Zustande, d.h. in aktiver Bewegung, befänden. Die charakteristische Zellform der Spirillen erlaubte ausserdem mit Sicherheit festzustellen, dass keine zufälligen Infektionen stattgefunden hatten.

Vorläufige, auf diese Weise angestellte Wachstumsversuche lehrten nun, dass im Gegensatz zu den meisten organischen Säuren nahezu alle Kohlenhydrate nicht geeignet waren, um als einzige Kohlenstoffquelle für das Wachstum der untersuchten Stämme zu dienen. Obgleich dieses Verhalten im allgemeinen in Übereinstimmung zu sein schien mit der schon von einigen früheren Untersuchern geäusserten Vermutung, dass die Spirillen, was ihr Kohlenstoffbedürfnis anbelangt, auf die Verarbeitung organischer Säuren angewiesen sind, so war dieses Ergebnis für die zwei zu der morphologischen Gruppe III gehörenden Stämme von *Spirillum tenue* eine sehr bemerkenswerte Tatsache. Hat doch DEN DOOREN DE JONG aus seinen Versuchen über die Mineralisation organischer Verbindungen — wobei er einen der obengenannten *Spirillum tenue*-Stämme einbezog — geschlossen, dass dieser Organismus fähig ist, eine grosse Anzahl verschiedener Kohlenhydrate zum Aufbau seines Zellmaterials zu verwenden!

Die Ergebnisse DEN DOOREN DE JONGS standen also im schroffen Gegensatz zu den von mir erzielten. Es war mir anfänglich nicht möglich, eine befriedigende Erklärung für diese merkwürdige Tatsache zu finden, um so mehr als wiederholte Versuche dasselbe negative Resultat ergaben. Die folgende bei den Wachstumsversuchen gemachte Beobachtung führte jedoch schliesslich zu der Lösung des Rätsels.

Es war mir nämlich aufgefallen, wie sehr es für die Wachstumsversuche, bei denen organische Säuren als Kohlenstoffquelle fungierten, ausschlaggebend war, die Ca-Salze und nicht z.B. die Na-Salze dieser Säuren zu verwenden. Während bei Benutzung des Ca-Salzes einer assimilierbaren organischen Säure immer ein positives Ergebnis erzielt wurde, trat bei Verwendung des entsprechenden Na-Salzes gar kein oder nur sehr beschränktes Wachstum ein. Diese Tatsache traf für alle assimilierbaren Säuren zu und war so auffallend, dass zweifellos eine fördernde Wirkung des Calciums auf das Wachstum angenommen werden konnte.

Wie muss man sich jedoch diese fördernde Wirkung des Calciums denken? Es sind hierbei mehrere Erklärungsweisen möglich. Einerseits ist es denkbar, dass es sich um ein absolutes Bedürfnis der Spirillen an diesem Element handelt. Gegen diese Annahme spricht aber, dass zur Deckung eines solchen Bedürfnisses wohl sehr kleine Quantitäten genügen würden, welche zweifellos unter den Bedingungen meiner Wachstumsversuche als Verunreinigungen im Medium anwesend waren.

Es gibt jedoch auch eine andere Möglichkeit, nämlich, dass das Calcium für die im Medium auftretenden Ionengleichgewichte von Bedeutung ist, wobei besonders an den, speziell in den letzten Jahren bei verschiedenen Zellarten zutage getretenen Antagonismus zwischen den Elementen Calcium und Magnesium gedacht werden muss. Von RIPPEL und STOESS (1932) ist eine Übersicht über die Bedeutung dieses Antagonismus für die Entwicklung von Mikroorganismen gegeben worden. Neuerdings ist auch noch von KINGMA BOLTJES (1934) ganz eindeutig die fördernde Wirkung des Calciums auf die Nitrifikation bei Anwesenheit von Magnesiumkarbonat im Medium nachgewiesen worden. Es fällt in diesem Zusammenhang auf, dass DEN DOOREN DE JONG für seine — allerdings mit Leitungswasser hergestellten — Nährböden einen speziellen Zusatz von Magnesiumverbindungen unterlässt.

Unabhängig davon ob die fördernde Wirkung des Calciums auf das Wachstum tatsächlich dem Antagonismus zwischen den Elementen Calcium und Magnesium zuzuschreiben ist, liess sich auf Grund des Vorhergehenden erwarten, dass auch mit Kohlenhydraten Wachstum auftreten würde, falls man dem obengenannten Medium noch 0,05%  $\text{CaCl}_2$  zusetzen würde.

Die auf diese Weise angestellten Wachstumsversuche führten nun für eine Anzahl Stämme, unter welchen auch *Spirillum tenue*, zu dem Ergebnis, dass jetzt tatsächlich mehrere Kohlenhydrate als Wachstumssubstrat geeignet waren. Es muss allerdings bemerkt werden, dass im allgemeinen das Wachstum in diesen Medien beträchtlich geringer war als in den Medien, welche eine assimilierbare organische Säure als Kohlenstoffquelle enthielten. Auch traten in den kohlenhydrathaltigen Medien öfters zahlreiche abnorme Zellformen auf.

Es erübrigt sich hier, die mit den einzelnen Stämmen erhaltenen Resultate ausführlich wiederzugeben. Die Untersuchung führte zu dem sehr bemerkenswerten Ergebnis, dass die aus Wasser isolierten Stämme sich auf Grund ihres Verhaltens den verschiedenen Substraten gegenüber in vier Gruppen aufteilen liessen, und zwar ergab es sich, dass diese vier Gruppen sich genau mit den in § 3 aufgestellten morphologischen Gruppen deckten. Diese hundertprozentige Korrelation zwischen den morphologischen und den physiologischen Eigenschaften ist zweifellos sehr beachtenswert.

Unter diesen Umständen kann ich mich darauf beschränken, das Ergebnis der zahlreichen Wachstumsversuche in untenstehender Tabelle 1 kurz zusammenzufassen.

TABELLE I.

Fähigkeit verschiedener Verbindungen, als einzige Kohlenstoffquelle zu dienen.

Verbindung	Stämme der morphologischen Gruppe I	Stämme der morphologischen Gruppe II	Stämme der morphologischen Gruppe III	Stämme der morphologischen Gruppe IV
<i>Gesättigte Fettsäuren</i>				
Ameisensäure	—	—	—	—
Essigsäure	+	+	+	(+)
Propionsäure	—	(+)	(+)	—
n. Buttersäure	+	+	+	—
<i>Andere Säuren</i>				
Oxalsäure	—	—	—	—
Bernsteinsäure	+	+	+	(+)
Fumarsäure		+		
Malonsäure		—		
d-Milchsäure	+	+	+	(+)
Zitronensäure	—	+	+	—
dl-Äpfelsäure	+	+	+	(+)
d-Weinsäure	—	—	—	—
Brenztraubensäure	+	+	+	+
<i>Kohlenhydrate</i>				
Xylose	—	(+)	(+)	—
Arabinose	—	(+)	(+)	—
Glukose	—	+	+	—
Lävulose	—	+	+	—
Mannose	—	(+)	(+)	—
Galaktose	—	(+)	(+)	—
Maltose	—	(+)	(+)	—
Laktose	—	(+)	(+)	—
Saccharose	—	(+)	(+)	—
<i>Alkohole</i>				
Methylalkohol	—	—	—	—
Aethylalkohol	—	+	—	+
n. Propylalkohol	—	+	—	(+)
n. Butylalkohol	—	+	—	(+)
Glycerin	—	+	(+)	—
Aethylenglykol	—	—	—	—
Mannit	—	—	—	—

+ = Wachstum

(+) = schwaches Wachstum

— = kein Wachstum

Wenn wir die Tabelle näher betrachten, fällt wohl in erster Linie auf, wie sehr die untersuchten Spirillen für ihr Wachstum auf die Verarbeitung verschiedenartiger organischer Säuren eingerichtet sind. Neben Essigsäure sind auch Milch-, Äpfel-, Bernstein- und Brenztraubensäure für alle Stämme ohne Ausnahme sehr geeignete Wachstumssubstrate. Von bestimmten Gruppen werden ausserdem noch Propionsäure, Buttersäure, Fumarsäure und Zitronensäure verarbeitet.

Daneben sind nur die Gruppen II und III imstande, eine Anzahl Kohlenhydrate und Glycerin als Wachstumssubstrat zu verwenden, während auch Aethyl-, Propyl- und Butylalkohol von den Gruppen II und IV verbraucht werden. Es zeigt sich also bei einem Vergleich, dass die Gruppen in ihrem Vermögen organische Verbindungen als Wachstumssubstrat zu benutzen Unterschiede aufweisen. So kann die Gruppe II sehr verschiedenartige organische Verbindungen angreifen, während andererseits die Gruppe I sich ganz und gar auf die organischen Säuren beschränkt.

Nur ganz im kurzen möchte ich schliesslich noch etwas mitteilen über die Eigenschaften der „Mist-Spirillen“. Im allgemeinen zeigte es sich, dass diese Stämme in den obengenannten einfachen synthetischen Medien nicht wuchsen. Ein einziges Mal habe ich jedoch positives Wachstum beobachtet in Standardmedium mit 1% Na-Pyruvat, und auch mit Na-Malat wurde einmal eine Vermehrung erhalten. Jedoch waren diese Versuche schlecht reproduzierbar.

#### § 6. DIE IDENTIFIZIERUNG DER ISOLIERTEN STÄMME.

Nachdem in den vorigen Paragraphen die wichtigsten morphologischen und physiologischen Eigenschaften der isolierten Stämme beschrieben worden sind, können wir jetzt die Arten charakterisieren, welche auf Grund der festgestellten Eigenschaften unterschieden werden sollen.

Es ist dies eine leichte Aufgabe, weil wir schon gesehen haben, dass alle aus Wasser isolierten Stämme sich auf Grund ihrer morphologischen Merkmale mit hinreichender Sicherheit in vier Gruppen zerlegen lassen, wobei sich dann ausserdem ergeben hat, dass diese Einteilung streng korreliert mit den beobachteten physiologischen Unterschieden.

Mit Hinblick hierauf ist es bis auf weiteres völlig gerechtfertigt, diese verschiedenen Gruppen als gesonderte Arten zu betrachten, und es fragt sich daher nur, inwieweit diese Arten mit bestimmten früher beschriebenen zu identifizieren sind.

Die Beantwortung der letzteren Frage ist mit erheblichen Schwierigkeiten verknüpft.

Einerseits hat die vollständige Vernachlässigung der physiologischen Eigenschaften durch die älteren Autoren dazu geführt, dass häufig verschiedene, in morphologischer Hinsicht einander einigermaßen ähnliche Organismen zu ein und derselben Art gerechnet wurden, obgleich jetzt auf Grund der oekologischen Verhältnisse wohl mit Sicherheit gesagt werden kann, dass hier physiologisch sehr verschiedene Organismen vorlagen. Als Beispiel möge hier erwähnt werden, dass der von KUTSCHER (1895a) unter dem Namen *Spirillum volutans* beschriebene und aus Mist isolierte Organismus zweifellos — wie schon von MIGULA (1897—1900) bemerkt worden ist — gänzlich von der ursprünglich von EHRENBURG in Pflanzeninfusen beobachteten und von ihm zuerst als *Spirillum volutans* beschriebenen Art abweicht.

Andererseits sind die an Hand der Rohkulturen oder in einzelnen Fällen mit Hilfe von Reinkulturen gegebenen Beschreibungen im allgemeinen so mangelhaft, dass es nahezu unmöglich ist, auf Grund davon zu einer Identifizierung zu gelangen.

Obgleich es daher meines Erachtens ausgeschlossen ist, dass man jemals die ursprünglichen von EHRENBURG und von COHN beschriebenen Arten mit voller Gewissheit erkennen wird, schien es mir dennoch empfehlenswert, eine neue Systematik der Gattung *Spirillum* in möglichst engem Anschluss an die Ergebnisse früherer Untersucher durchzuführen und wo dies nur möglich schien, die alten allgemein angewandten Artnamen beizubehalten.

Nach diesen Gesichtspunkten lässt sich zu den verschiedenen Gruppen von aus Wasser isolierten Spirillen folgendes bemerken:

*Gruppe I.* Die im § 3 mitgeteilten morphologischen Eigenschaften der zu dieser Gruppe gehörenden Stämme veranlassen dazu, diese Organismen mit *Spirillum serpens* (Cohn) Migula zu identifizieren. Die von COHN gegebene Abbildung dieses Organismus zeigt sehr charakteristisch die gleichen, schwach gewundenen Zellen. Die COHNSche Diagnose dieser Art soll dann jetzt in der Weise erweitert werden, dass die in Tabelle I für Gruppe I angegebenen physiologischen Eigenschaften darin aufgenommen werden.

*Gruppe II.* Dieses, wie im § 3 angegeben, sehr kleine *Spirillum* lässt sich nach seinen morphologischen Eigenschaften mit keiner der früher beschriebenen Arten identifizieren. Dagegen sind die Stämme sehr scharf charakterisiert durch das im § 4 besprochene Denitrifikationsvermögen.

Da das Vorkommen eines derartigen Vermögens bei *Spirillum*-Arten zuerst von VAN ITERSON (1902) entdeckt worden ist und die betreffenden Stämme auch in sonstiger Hinsicht gut mit dem von VAN ITERSON isolierten aber nicht benannten Organismus übereinstimmen, möchte ich für diese Art den Namen *Spirillum Itersonii* vorschlagen.

*Gruppe III.* Die im § 3 mitgeteilten morphologischen Eigenschaften stimmen in befriedigender Weise überein mit denjenigen von *Spirillum tenue* Ehrenberg, wie diese von COHN näher angegeben sind. Es scheint daher erlaubt, die Vertreter dieser Gruppe zu dieser Art zu rechnen. Auch die zwei in der Sammlung des Laboratoriums für Mikrobiologie zu Delft schon früher als *Spirillum tenue* charakterisierten Stämme gehören zu dieser Gruppe. Die Diagnose von *Spirillum tenue* soll dann durch die in Tabelle I für die Gruppe III gegebenen physiologischen Eigenschaften erweitert werden.

*Gruppe IV.* Dieses schöne, breit-spiralförmig gewundene *Spirillum* zeigt auf Grund seiner im § 3 näher mitgeteilten morphologischen Eigenschaften eine befriedigende Übereinstimmung mit *Spirillum undula* (Müller) Ehrenberg, wie diese Art näher von COHN charakterisiert worden ist. Da sowohl die von EHRENBURG als von COHN studierten Organismen aus mit Oberflächenwasser hergestellten vegetabilischen Infusen stammten, spricht nichts gegen eine Identifizierung der von mir zu dieser Gruppe gerechneten Stämme mit der genannten Art. Die Diagnose dieser Art soll dann wieder durch die in Tabelle I für die Gruppe IV gegebenen physiologischen Eigenschaften erweitert werden.

Was schliesslich die aus den Mistanhäufungen isolierten Spirillen anbelangt, so kann ich darüber auf Grund des schon erwähnten vorläufigen Charakters meiner Beobachtungen nur mit grosser Vorsicht urteilen. Immerhin lässt sich dazu folgendes bemerken.

Die bei der Isolierung der „Mist-Stämme“ gemachten Erfahrungen lassen keinen Zweifel, dass die in Mistanhäufungen auftretenden Spirillen in physiologischer Hinsicht beträchtlich von den obenerwähnten Arten abweichen. Dagegen sind sie wahrscheinlich identisch mit den von KUTSCHER aus ähnlichen Anhäufungen isolierten Stämmen. KUTSCHER selber ist nun geneigt, seine Stämme mit verschiedenen früher von EHRENBURG und COHN beschriebenen Arten, worunter *Spirillum undula* und *Spirillum tenue*, zu identifizieren. Auf Grund der vorhandenen physiologischen Eigenschaften scheint mir dies nicht zulässig: die Nahrungsbedürfnisse der „Mist-Spirillen“ sind doch wesentlich abweichend von denjenigen der oben näher präzisierten Arten. Wie schon bemerkt

wurde, gelten diese Überlegungen ebenfalls für das von KUTSCHER berichtete, vermeintliche Vorkommen von *Spirillum volutans* in den von ihm hergestellten Mistanhäufungen. Jedenfalls ist *Spirillum volutans* von EHRENBURG auf Grund seiner grossen Dimensionen mit genügender Schärfe charakterisiert worden, um mit Sicherheit sagen zu können, dass die von mir aus Mist isolierten Stämme nicht mit *Spirillum volutans* identifiziert werden dürfen.

Solange nicht festgestellt ist, dass auch unter den von mir isolierten „Mist-Spirillen“ Stämme vorkommen, welche genügende Unterschiede aufweisen um eine Artdifferenzierung zu rechtfertigen, ist es angebracht, diese Spirillen zu einer einzigen Art zusammenzufassen.

Auf Grund der Übereinstimmung der Zelldimensionen mit denjenigen eines von KUTSCHER aus Jauche isolierten Stammes, für welchen MIGULA schon den Namen *Spirillum Kutscheri* vorgeschlagen hat, scheint mir dieser Name auch für die von mir isolierten „Mist-Spirillen“ geeignet.

## KAPITEL V.

### SYSTEMATISCHE ÜBERSICHT DER GATTUNG *SPIRILLUM* EHBG.

#### § 1. DIE MERKMALE DER GATTUNG *SPIRILLUM* EHBG.

Hier möchte ich zuerst eine kurze Übersicht geben über die wichtigsten Merkmale der Gattung *Spirillum*. Die im vorigen Kapitel wiedergegebene Untersuchung der zahlreichen isolierten Spirillenstämmen hat gelehrt, dass diese in mehreren Punkten übereinstimmen. Sie bestehen alle aus spiralförmig gewundenen starren Zellen, welche mittels polarer Geißelbündel beweglich sind.

Für diese, sowie für alle weiteren, unten zu besprechenden Merkmale erhebt sich nun die Frage, inwieweit sie auch bei allen sonstigen Arten der Gattung angetroffen werden. Was die polaren Geißelbündel anbelangt, so ist mir beim Studium der einschlägigen Literatur nur eine gegenteilige Angabe bekannt geworden. DIMITROFF (1926) gibt nämlich an, dass das von ihm isolierte *Spirillum virginianum* nur eine polare Geißel an jedem Zellende besitze. Ich war jedoch in der Lage, die Richtigkeit dieser Angabe an einen von der „American Type Culture Collection“ zu Chicago freundlichst zur Verfügung gestellten, von DIMITROFF selbst herrührenden Stamm nachzuprüfen. Es zeigte sich nun, dass auch dieser Organismus, welcher inzwischen zwar ganz stabförmig geworden war, im Besitze deutlicher bipolarer Geißelbündel war. Es sei hierzu bemerkt, dass ich immer die von MANEVAL (1929) empfohlene Beizmethode benutzte, der eine Färbung mit Silbernitrat-Diethylamin nach ZETNOW folgte. Es scheint daher wohl sicher, dass DIMITROFFS Angabe auf eine ungenügende Methodik zurückzuführen ist.

Ein weiterer Punkt, in dem alle untersuchten Spirillenstämmen übereinstimmen, war das negative Ergebnis der Färbung nach GRAM. Es ist nun in hohem Grade merkwürdig, dass bezüglich der Gram-Färbbarkeit der *Spirillum*-Arten fast gar keine Angaben in der Literatur vorliegen. Wenn man davon absieht, dass LEHMANN und NEUMANN (1927) in der Diagnose der Familie der *Spirillaceae* beiläufig die Gram-Negativität erwähnen (und im Gegensatz hierzu angeben, dass *Spirillum (Rhodospirillum) rubrum* Gram-positiv ist!) findet man nur eine einzige Aussage über

diesen Punkt, nämlich in BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology (4th Ed. 1934). Überraschenderweise ist dort für alle *Spirillum*-Arten ausdrücklich vermeldet, dass sie Gram-positiv seien. Welcher Quelle diese Angaben in dem genannten Kompilationswerke entnommen sind, lässt sich nicht entscheiden. Die bei den verschiedenen Arten angegebene Literatur habe ich vergeblich darauf nachgeprüft.

Bis auf weiteres bin ich daher geneigt, den BERGEYSchen Angaben bezüglich der Gram-Färbbarkeit allen Wert abzusprechen und dies um so mehr, als BERGEY auch *Spirillum virginianum* als Gram-positiv kennzeichnet, während doch DIMITROFF das Gegenteil ausdrücklich angibt. Doch ist DIMITROFFS Abhandlung die einzige von BERGEY für *Spirillum virginianum* angegebene Literaturquelle.

Beiläufig sei noch erwähnt, dass ich auch *Rhodospirillum rubrum* Gram-negativ befunden habe; zu demselben Ergebnis kam laut schriftlicher Mitteilung auch Herr Professor KAPSENBERG zu Groningen.

Es ist wohl fast überflüssig hier mitzuteilen, dass all meine Angaben über die Gram-Färbung sich auf Beobachtungen stützen, welche ständig an anderen Gram-positiven und Gram-negativen Organismen kontrolliert wurden. Ich bin deshalb geneigt, die Gram-Negativität als ein allgemeines Merkmal der Vertreter der Gattung *Spirillum* zu betrachten.

Alle untersuchten Stämme waren weiter charakterisiert durch die Unfähigkeit zur Sporenbildung. Ein einziges Mal wurde bei oberflächlicher Betrachtung wohl der Anschein des Gegenteils erweckt; eine nähere Prüfung gab mir jedoch die Überzeugung, dass es sich in diesen Fällen immer um verendete oder krankhafte Zellen handelte, wobei das Protoplasma sich zu etwas stärker lichtbrechenden Körperchen abgerundet hatte.

Es scheint mir, dass die hier und da in der Literatur vorkommenden Angaben über Sporenbildung bei *Spirillum*-Arten ebenfalls mit grosser Reserve betrachtet werden müssen. Es bleibt allerdings möglich, dass sporenbildende Spirillen existieren; falls dies zutreffen würde, würde es sich jedoch m.E. empfehlen, solche in einer gesonderten Gattung (*Sporospirillum*!) unterzubringen.

Schliesslich ist hier noch zu erwähnen, dass mit der einzigen Ausnahme von *Spirillum virginianum* alle von mir untersuchten Spirillen-Stämme unter günstigen Nahrungsbedingungen Volutin enthielten, wie mit Hilfe der von ARTHUR MEYER (1901) angegebenen Färbungsmethode mit Methylenblau leicht nachgewiesen werden konnte. Das Vorkommen dieses Reservestoffes ist also keineswegs, wie vielfach angenommen wird, auf *Spirillum volutans* beschränkt.

Auf Grund des Vorhergehenden scheint es angebracht, die Gattungsdiagnose folgenderweise zu formulieren:

*Diagnose der Gattung Spirillum Ehrenberg:*

„Spiralförmig gewundene, starre Zellen, welche beweglich sind mittels bipolarer Geisselbündel. Das Vermögen zur Endosporenbildung fehlt. Gram-negativ. Katalase positiv. Chemo-heterotroph; oxydieren verschiedene organische Substanzen, vorzugsweise Salze organischer Säuren. Im allgemeinen tritt Volutin als Reservestoff auf“.

§ 3. DIE IN DER GATTUNG *SPIRILLUM* EHBG ZU UNTERSCHIEDENDEN ARTEN.

Bevor ich zu einer Besprechung der Arten, welche sich m.E. in der Gattung *Spirillum* zurzeit mit genügender Schärfe unterscheiden lassen, übergehe, mögen hier noch einige allgemeine Bemerkungen gemacht werden.

In der Systematik der Bakterien lassen sich zweierlei Tendenzen unterscheiden. Es gibt mehrere Forscher, deren Bestreben darauf gerichtet ist, die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen in der Weise zu betonen, dass sie schon auf Grund geringfügiger Unterschiede zur Aufstellung neuer Arten übergehen. Häufig wird dabei übersehen, dass die beobachteten Abweichungen mehr oder weniger von abnormalen, meistens schwer reproduzierbaren Umständen bedingt werden. Eine spätere Unterscheidung der aufgestellten Arten wird dadurch nicht selten völlig unmöglich. Charakteristische Beispiele hierfür findet man in BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology, worin eine grosse Zahl der angeführten Arten nicht wiederzuerkennen ist.

Demgegenüber möchte ich mich denjenigen Forschern anschliessen, welche die Anzahl der in einer scharf begrenzten Gattung zu unterscheidenden Arten auf ein Minimum zu beschränken wünschen, aber dabei die Arttrennung so formulieren, dass eine Nachprüfung durch spätere Untersucher immer gut durchzuführen ist. Es muss zugegeben werden, dass bei einem derartigen Vorgehen zweifellos Stämme in eine Art zusammengefasst werden können, bei denen sich später wesentliche Unterschiede ergeben. Falls jedoch ein tieferes Studium dieser Organismen zu einer derartigen Einsicht führt, wird man immer noch in der Lage sein, eine Trennung der Art in zwei oder mehr neue Arten durchzuführen.

Die folgenden Ausführungen sind in diesem Sinne abgefasst worden, und zwar in Übereinstimmung mit der Aussage VAN NIELS (1929 S. 74):

„Jedenfalls würde ein eingehendes Studium dieser Objekte die Arbeiten

der Biologen mehr lohnen, als es jene planlosen Studien tun, die nur ermüdende Listen neuer Genera und Spezies bringen, deren Bedeutung mehr als fraglich ist, und die in den allermeisten Fällen nichts weiter besagen, als dass wieder einmal Organismen konstatiert wurden, welche augenscheinlich mit keinem der schon vorher beschriebenen genau identifiziert werden konnten."

In der rezentesten, mir bekannten, zusammenfassenden systematischen Übersicht der Gattung *Spirillum*, welche in der neuesten Auflage von BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (4th Ed., 1934) zu finden ist, werden die folgenden Arten unterschieden:

1. *Spirillum undula* (Müller) Ehrenberg.
2. *Spirillum rubrum* von Esmarch.
3. *Spirillum volutans* Ehrenberg.
4. *Spirillum virginianum* Dimitroff.
5. *Spirillum serpens* (Müller) Winter.

Es kann nicht genügend betont werden, dass diese Zusammenfassung sehr unvollständig und in hohem Grade unzuverlässig ist. Es ist nicht zu rechtfertigen, dass häufig in der Literatur vermeldete Arten wie z.B. *Spirillum tenue* Ehrenberg und *Spirillum minus* Carter (der Erreger der Rattenbisskrankheit) völlig unerwähnt bleiben. Was die angeführten Arten anbelangt, muss man in Betracht ziehen, dass die Beschreibung von *Spirillum undula*, *Spirillum volutans* und *Spirillum serpens* offenbar grösstenteils den Angaben KUTSCHERS entnommen ist, obwohl merkwürdigerweise die Abhandlung dieses Autors nicht genannt wird. Da nun schon MIGULA (1897—1900) hervorgehoben hat, dass KUTSCHER mit Unrecht ein von ihm aus Jauche isoliertes *Spirillum* mit *Spirillum volutans* identifiziert hat, und die Identifizierung auch für die von KUTSCHER als *Spirillum undula* und *Spirillum serpens* angedeuteten Arten höchst unsicher ist, ist es ohne weiteres klar, dass die BERGEY'schen Artdiagnosen völlig unannehmlich sind.

Es kommt noch hinzu, dass *Spirillum rubrum* von der Liste gestrichen werden soll, weil es sich hierbei um ein *Rhodospirillum* (*Athiorhodaceae*) handelt, eine Ansicht, mit der BERGEY et al. übrigens ganz einverstanden sind, da sie weiter in ihrem Buche auch ein *Rhodospirillum rubrum* (Syn.: *Spirillum rubrum* Esmarch!) anführen.

Angesichts der Tatsache, dass die BERGEYSche Übersicht völlig unbrauchbar ist, scheint es mir erwünscht, hier eine Zusammenstellung von allen *Spirillum*-Arten zu geben, welche ich ausser den von mir selbst

isolierten, im vorigen Kapitel beschriebenen Arten in der Literatur angetroffen habe. Der grössere Teil dieser Angaben ist den älteren Zusammenfassungen von MIGULA und von LEHMANN und NEUMANN (1927) entnommen.

- Spirillum terrigenum* (Günther) Migula.
- Spirillum coprophilum* Migula.
- Spirillum subtilissimum* Migula.
- Spirillum mobile* Migula.
- Spirillum rugula* Migula.
- Spirillum giganteum* Migula.
- Spirillum volutans* EhbG.
- Spirillum concentricum* Kitasato.
- Spirillum amyliiferum* van Tieghem.
- Spirillum sporiferum* Migula.
- Spirillum endoparagogenicum* Sorokin.
- Spirillum sputigenum* Miller.
- Spirillum minus* Carter.
- Spirillum fetes* Smith.
- Spirillum tenerrinum* Lehm. et Neum.
- Spirillum stomachi* (Salomon) Lehm. et Neum.
- Spirillum lipoferum* Beijerinck.
- Spirillum hachaizae* Kowalski.
- Spirillum parvum* von Esmarch.
- Spirillum virginianum* Dimitroff.
- Spirillum cardiopyrogenes* Sardjito.

Wie ich schon in der Literaturübersicht erörtert habe, ist es nun für eine Anzahl der oben angeführten Arten sicher, dass sie keineswegs zur Gattung *Spirillum* gehören. So gilt für *Spirillum terrigenum* (Günther) Migula, *Spirillum coprophilum* Migula und *Spirillum mobile* Migula, dass MIGULA sie in seinem „System der Bakterien“ ohne jegliche Begründung in die Gattung *Spirillum* einteilt, obgleich diese Organismen von ihren Entdeckern (GÜNTHER bzw. KUTSCHER) immer als *Vibrio* angedeutet worden sind. Aus den von MIGULA selbst gegebenen Beschreibungen und Abbildungen geht die Richtigkeit der ursprünglichen Auffassung deutlich hervor. Zu demselben Schluss kommt man nach dem Studium der Literatur betreffs *Spirillum parvum* von Esmarch (Vergl. ZETTNOW, 1916) und *Spirillum fetes* Smith (Vergl. SMITH 1921).

Weiter soll *Spirillum sputigenum* auf Grund der einseitig lateralen Anheftung der Geisseln zur Gattung *Selenomonas* gerechnet werden (Vergl. hierzu DOBELL, 1932).

Für *Spirillum amyliferum* van Tieghem, *Spirillum sporiferum* Migula und *Spirillum endoparagogenicum* Sorokin (Vergl. hierzu MIGULA 1897—1900) findet man angegeben, dass sie imstande sind, Sporen zu bilden. Es scheint, wie schon gesagt, angebracht, diese Angaben vorläufig mit grosser Reserve zu betrachten. Es handelt sich hierbei nämlich um inzidentell gemachte Beobachtungen, welche einer näheren Bestätigung bedürfen. Da die Beschreibung dieser Arten im allgemeinen sehr mangelhaft ist, können sie bis auf weiteres nicht anerkannt werden. Falls das Vorhandensein des Sporenbildungsvermögens bestätigt würde, empfiehlt es sich ausserdem, für diese Arten die neue Gattung *Sporospirillum* einzuführen.

Wie schon aus der Besprechung der Arbeit von SCHRÖDER (1932) hervorgegangen, ist es zum mindesten sehr zweifelhaft, ob *Spirillum lipoferum* Beijerinck zur Gattung *Spirillum* gehört. Ich habe diese Frage durch eine Untersuchung einiger Stämme von *Spirillum lipoferum*, welche nach den Angaben BEIJERINCKS aus Gartenerde und aus Kanalwasser isoliert wurden, ebenfalls noch näher untersucht. Es zeigte sich nun, dass diese Organismen tatsächlich fast immer als stabförmige oder schwach gebogene Zellen vorkommen. Nur ausnahmsweise beobachtete ich Zellen mit einigen Windungen. Immerhin wurde zuweilen durch die eigentümlich schlängelnde, hin und her zuckende Bewegung der Organismen, besonders wenn sie in Medien gewachsen waren, welche neben Pepton Ca-Laktat oder Ca-Malat enthielten, der Eindruck erweckt, dass man es mit Spirillen zu tun hatte. Eine mikroskopische Untersuchung der fixierten und gefärbten Präparate lehrte aber, dass es sich immer um kurze gebogene Zellen handelte und nur dadurch der Anschein gewundener Zellen geweckt wurde, dass die jungen Zellen sich bei der Zellteilung noch nicht voneinander gelöst hatten. Es zeigte sich weiter, dass *Spirillum lipoferum* auch nur eine polare Geissel hat, was ebenfalls einen Unterschied zu den eigentlichen *Spirillum*-Arten bedeutet.

Es wird also deutlich sein, dass *Spirillum lipoferum* nicht der Gattung *Spirillum* zugehört. Zu demselben Schluss kam auch BERGEY in seinem häufig zitierten Buche „Manual of Determinative Bacteriology“. Selbstverständlich ist es jedoch völlig unzulässig, diesen Organismus in der Gattung *Chromatium* unterzubringen, wie es BERGEY getan hat. Es besteht doch ein ungeheuer grosser Unterschied zwischen dem genannten farblosen, chemo-heterotrophen Organismus und den purpurnen photoautotrophen Chromatien!

Obwohl die Kommaform von *Spirillum lipoferum* nicht immer so

deutlich ausgeprägt ist, scheint es mir dennoch angebracht, diesen Organismus in die Gattung *Vibrio* einzuordnen.

Was die weiteren angeführten *Spirillum*-Arten anbelangt, so besteht keine Veranlassung, ihre Spirillennatur anzuzweifeln. Immerhin lässt sich zu diesen Arten folgendes bemerken.

Das von KITASATO (1889) nur einmal beobachtete und isolierte *Spirillum concentricum* Kitasato ist von diesem Autor nicht genügend charakterisiert worden, um eine Unterscheidung von *Spirillum tenue* zu ermöglichen und wird daher als gesonderte Art hinfällig.

*Spirillum tenerrimum* Lehmann et Neumann ist unbedingt nur ein Synonym für *Spirillum subtilissimum* Migula. Die Beschreibung dieses nur von KUTSCHER beiläufig studierten Organismus ist ebenfalls zu unvollständig, um eine Wiedererkennung zu erlauben. Genau dasselbe gilt für *Spirillum giganteum* Migula. Beide letztgenannten Arten sind ebenfalls aus der Literatur zu streichen.

Was *Spirillum rugula* (Müller) Migula anbelangt, so ist eine Identifizierung mit einer der anderen *Spirillum*-Arten nicht mit Sicherheit durchzuführen. Jedoch bekommt man den Eindruck, dass die späteren Autoren COHN, KOCH und BONHOFF nicht immer denselben Organismus mit diesem Namen bezeichnet haben. Diese Art soll daher m.E. als *species dubia* betrachtet werden.

Dagegen ist die Beschreibung von *Spirillum volutans* EhbG genügend vollständig, um einerseits eine Abgrenzung von den von mir beschriebenen Arten durchführen zu können und andererseits eine Wiedererkennung zu erlauben. Diese Art soll daher zweifellos beibehalten werden. *Spirillum volutans* scheint, wie auch schon von MIGULA erwähnt wurde, ziemlich selten zu sein. Wie schon erwähnt, habe ich diesen Organismus, tatsächlich einen Riesen unter den Spirillen, nur einmal in einer Calaktat-Anhäufung mit Grabenwasser beobachtet. Die Reinkultur gelang mir aber nicht.

Was *Spirillum virginianum* Dimitroff betrifft, so könnte man geneigt sein, diese Art auf Grund ihrer morphologischen Eigenschaften mit *Spirillum tenue* EhbG zu identifizieren. Die von mir vorgenommene Untersuchung der Nahrungsbedürfnisse des aus Chicago erhaltenen, in letzter Instanz von DIMITROFF selbst herrührenden Stammes hat mir jedoch die Überzeugung gegeben, dass beide Arten wesentlich verschieden sind. Es zeigte sich nämlich, dass *Spirillum virginianum* was die Wachstumssubstrate anbelangt sehr wählerisch ist. Von den zahlreichen untersuchten Verbindungen waren nur Laktate und Zitate geeignet. Es

kommt noch hinzu, dass diese Art, im Gegensatz zu *Spirillum tenue*, die Gelatine stark verflüssigt. Auch *Spirillum virginianum* soll daher als gesonderte Art beibehalten werden.

Dasselbe gilt für die in späteren Jahren von den medizinischen Bakteriologen ausführlich studierte Art *Spirillum minus* Carter. Schon das Merkmal der merkwürdig gedrungenen Zellform dieser Art genügt, um eine Identifizierung mit den anderen besprochenen Arten völlig auszuschliessen. In diesem Zusammenhang ist auch hervorzuheben, dass diese Art bis jetzt nur im Säugetierkörper beobachtet worden ist, während alle Kulturversuche fehlgeschlagen sind (Vergl. Ruys, 1925).

Auch das von SARDJITO (1932, 1933) aus dem Blut von einem an Pericarditis erkrankten Patienten isolierte *Spirillum cardiopyrogenes* soll als eine gesonderte Art beibehalten werden, obgleich die von diesem Autor gegebene Beschreibung dieses Organismus ziemlich unvollständig ist.

Hinsichtlich der nun noch übrig bleibenden Arten *Spirillum hachizae* Kowalski und *Spirillum stomachi* (Salomon) Lehm. et Neum. möchte ich einfach auf meine dieszüglichen Bemerkungen im Kapitel II hinweisen.

Auf Grund des Vorhergehenden möchte ich daher schliessen, dass bis auf weiteres in der Gattung *Spirillum* Ehb. die folgenden Arten zu unterscheiden sind, deren teilweise noch zu vervollständigende Diagnosen hier kurz angeführt werden.

#### *Spirillum undula* (Müller) Ehrenberg.

In Peptonwasser ausserordentlich bewegliche, schöne, breit-spiralförmig gewundene Zellen. Zelldicke  $0,9 \mu$ . Länge einer Windung  $6 \mu$ . Breite einer Windung  $3 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar ärmlich wachsend. Kolonien grau-weiss, glatt. Gelatine sehr langsam verflüssigend. Auf Kartoffel grau-brauner Wuchs. Als Wachstums-substrat sind Brenztraubensäure und Aethylalkohol gut, Essigsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Äpfelsäure, n-Propylalkohol und n-Butylalkohol weniger gut geeignet. Ausser komplexen organischen Stickstoffverbindungen sind auch  $\text{NH}_4$ -Verbindungen als Stickstoffquelle brauchbar.

#### *Spirillum serpens* (Müller) Winter.

In Peptonwasser stark bewegliche, ziemlich schwach gewundene Zellen. Zelldicke  $0,8-1 \mu$ . Länge einer Windung  $8-9 \mu$ . Breite einer Windung  $1,5-1,8 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar reichlich wachsend. Kolonien rahmfarbig, typisch gewellt. Gelatine langsam verflüssigend. Auf Kartoffel hell orange-gelber Wuchs. Als Wachstumssubstrat sind nur Essigsäure, n.Buttersäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Äpfelsäure und Brenztraubensäure geeignet. Ausser komplexen organischen Stickstoffverbindungen sind auch  $\text{NH}_4$ -Verbindungen als Stickstoffquelle brauchbar.

*Spirillum volutans* Ehrenberg.

Stark bewegliche, schön gewundene Zellen. Zelldicke  $1.5 \mu$ . Länge einer Windung  $13-15 \mu$ . Breite einer Windung  $4-5 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Nicht sporenbildend.

*Spirillum tenue* (Müller) Ehrenberg.

In Peptonwasser gut bewegliche, zierlich gewundene Zellen. Zelldicke  $0,7 \mu$ . Länge einer Windung  $4,5-5 \mu$ . Breite einer Windung  $1,5-1,8 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geisselbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar mässig wachsend. Kolonien weiss, glatt. Gelatine nicht verflüssigend. Auf Kartoffel hell-brauner Wuchs. Als Wachstumssubstrat sind Essigsäure, Propionsäure, n.Buttersäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Äpfelsäure, Brenztraubensäure, Glukose und Lävulose gut, mehrere andere Kohlenhydrate und Glycerin weniger gut geeignet. Ausser komplexen organischen Stickstoffverbindungen sind auch  $\text{NH}_4$ -Verbindungen als Stickstoffquelle brauchbar.

*Spirillum minus* Carter.

Stark bewegliche, sehr gedrungene Zellen. Zelldicke  $1 \mu$ . Länge einer Windung  $1 \mu$ . Breite einer Windung  $0,5 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geisselbündel. Gram-negativ. Nicht sporenbildend. Im Blute der Ratte vorkommend, auch gut übertragbar auf Mäuse. Pathogen für den Menschen. Bisher nicht ausserhalb des Tierkörpers kultiviert.

*Spirillum Kutscheri* Migula.

Gut bewegliche, schön gewundene Zellen. Zelldicke  $1,5 \mu$ . Länge einer Windung  $10,5-12,5 \mu$ . Breite einer Windung  $3-4,5 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geißelbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar ärmlich wachsend. Die Kolonien zeigen eine gekörnte Struktur. Gelatine langsam verflüssigend. Auf Kartoffeln nur sehr beschränktes Wachstum. Als Wachstumssubstrat ist nur Äpfelsäure und Brenztraubensäure mässig geeignet. Ausser komplexen organischen Stickstoffverbindungen sind auch  $\text{NH}_4$ -Verbindungen als Stickstoffquelle brauchbar.

*Spirillum virginianum* Dimitroff.

Bewegliche, spiralg gewundene Zellen. Zelldicke  $0.6-0.9 \mu$ . Länge einer Windung  $4-5.6 \mu$ . Breite einer Windung  $1-2 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geißelbündel. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar reichlich wachsend. Gelatine verflüssigend. Als Wachstumssubstrat sind nur Milch- und Zitronensäure geeignet. Ausser komplexen organischen Stickstoffverbindungen sind auch  $\text{NH}_4$ -Verbindungen als Stickstoffquelle brauchbar.

*Spirillum cardiopyrogenes* Sardjito.

Bewegliche, gewundene Zellen. Zelldicke  $\pm 0,5 \mu$ . Länge einer Windung  $\pm 2 \mu$ . Wahrscheinlich pathogen für den Menschen. Übertragbar auf Mehrschweinchen und dann in der Peritonealflüssigkeit nachweisbar. Ist in Caviaserum-Hämoglobin-Bouillonagar zu züchten.

*Spirillum Itersonii* nov. spec.

In Peptonwasser stark bewegliche, spiralg gewundene Zellen. Zelldicke  $0.5 \mu$ . Länge einer Windung  $3-3.5 \mu$ . Breite einer Windung  $1-1.3 \mu$ .

Beweglich mittels bipolarer Geißelbündel. Volutin tritt als Reservestoff auf. Gram-negativ. Katalase positiv. Nicht sporenbildend. Auf Peptonagar reichlich wachsend. Kolonien weiss, beim Älterwerden braun-schwarz verfärbend, leicht gefältelt. Gelatine nicht verflüssigend. Auf Kartoffel braun-orangefarbener Wuchs. Als Wachstumssubstrat sind Essigsäure, Propionsäure, n. Buttersäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Brenztraubensäure, Glukose, Lävulose, Aethylalkohol, n. Propylalkohol, n. Butylalkohol und Glycerin gut, mehrere der nicht genannten Kohlenhydrate weniger gut geeignet. Ausser komplexen organischen Stickstoffverbindungen sind auch  $\text{NH}_4$ -Verbindungen als Stickstoffquelle brauchbar. In Gegenwart von Nitraten anaerobes Wachstum, aber nur wenn daneben komplexe organische Stickstoffverbindungen oder  $\text{NH}_4$ -Verbindungen vorhanden sind.

## KAPITEL VI.

### DIE ATMUNGSPROZESSE BEI DEN VERTRETERN DER GATTUNG *SPIRILLUM* EHBG.

#### § 1. EINLEITENDE BEMERKUNGEN.

Wenn man sich fragt, welche Merkmale die Spirillen am deutlichsten charakterisieren, so fällt neben der starken Beweglichkeit und der zierlichen Form, die häufig sich schon bei oberflächlicher Betrachtung manifestierende Tatsache auf, dass diese Organismen offenbar niedrigeren Sauerstoffspannungen angepasst sind. Es bleibt immer merkwürdig zu beobachten, wie die Spirillen in den Präparaten und in den Kulturen bestrebt sind, sich an denjenigen Stellen anzuhäufen, an denen die Sauerstoffspannung einen Wert hat, welcher beträchtlich geringer ist als derjenige der Luft („Spirillenlinie“). Dieses Verhalten ist um so auffallender als aus den im Kapitel IV beschriebenen Versuchen deutlich hervorgegangen ist, dass der Sauerstoff einen für die Entwicklung der meisten Spirillen geradezu unentbehrlichen Faktor darstellt.

Immerhin wird es deutlich sein, dass zwischen der oben angedeuteten Mikro-Aerophilie der Spirillen und den sauerstoffverbrauchenden Prozessen dieser Organismen enge Beziehungen bestehen müssen. Wenn man beobachtet, dass Spirillen in ihrer Bewegung von Unterschieden in der Sauerstoffspannung dirigiert werden, dann wird man nicht umhin können zu schliessen, dass verschiedenartige Sauerstoffspannungen — oder verschiedenartige Oxydationszustände des Milieus — die Stoffwechselforgänge dieser Organismen auf verschiedene Weise beeinflussen. Eine derartige Voraussetzung wird nun wesentlich gestützt durch die Ergebnisse der rezenten Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen den Stoffwechselforgängen lebender Zellen und dem im Medium dieser Zellen auftretenden Oxydoreduktionspotential. Es hat sich hierbei nicht nur gezeigt, dass diese mit Hilfe von Edelmetallelektroden feststellbaren Potentialsprünge von der Natur der obwaltenden Stoffwechselforgänge bedingt werden, sondern auch dass unter Umständen reversible Oxydoreduktionssysteme, welche im Medium vorhanden sind, die Natur der Stoffwechselforgänge bestimmen. (Vergl. hierfür HOOPERHEIDE, 1935).

Es scheint nun tatsächlich nicht ausgeschlossen, dass in Medien von Spirillen vielfach autoxydable reversible Oxydoreduktionssysteme vorhanden sein können, welche die Wirkung der verschiedenen Sauerstoffspannungen indirekt vermitteln.

Das Vorhergehende dürfte genügen, um die grosse Bedeutung eines tieferen Studiums der Atmungsprozesse der Spirillen zu beleuchten. Es schien mir daher eine wichtige Aufgabe, die diesbezüglichen Fragen näher zu untersuchen. Doch möge sofort bemerkt werden, dass meine Versuche keineswegs zu einer Lösung des anfangs gestellten Problems geführt haben. Es stellte sich nämlich bald heraus, dass bei der Untersuchung der Atmungsvorgänge verschiedener *Spirillum*-Arten zahlreiche unerwartete Erscheinungen auftraten, deren Aufklärung als in erster Linie wichtig betrachtet werden musste. Hierdurch erhielt die angestellte Untersuchung eine derartige Ausdehnung, dass die Lösung der weiteren Fragen späteren Forschungen überlassen werden musste.

## § 2. METHODISCHES.

Zur Bestimmung des bei den Atmungsprozessen der Spirillen aufgenommenen Sauerstoffs bzw. der hierbei gebildeten Kohlensäure habe ich Gebrauch gemacht von der direkten manometrischen Methode nach WARBURG. Falls nur die Sauerstoffaufnahme festgestellt werden sollte, wurde für jede zu untersuchende Substanz ein Manometer benutzt, wobei die Druckabnahme bei Anwesenheit von 0,2 ccm 5% KOH, welches die Kohlensäure absorbiert, abgelesen wurde.

Wenn zu gleicher Zeit auch die gebildete Kohlensäure bestimmt werden sollte, mussten für jeden Versuch drei Manometer benützt werden. In jedes Manometergefäss wurde die gleiche Menge einer Suspension der zu untersuchenden Zellen in eine Pufferlösung gebracht; ausserdem wurde in je eines der zwei an jedem WARBURG-Gefäss angebrachten Seitengefässe eine gleiche Menge einer wässrigen Lösung des Atmungssubstrates pipettiert.

Ein Manometer diente wiederum zur Feststellung der Sauerstoffaufnahme, wobei die Kohlensäure mittels Alkali absorbiert wurde. Ein anderes Manometer enthielt im zweiten Seitengefäss, anstatt Alkali, 0,2 ccm 2 n HCl. Die bei diesem Manometer beobachtete Druckänderung ist also die Resultante der Sauerstoffaufnahme und der Kohlensäureabgabe. Da jedoch ein erheblicher Teil der Kohlensäure als Bikarbonat im gepufferten Zellmedium gebunden wird, wurde am Ende des Versuches alle gebundene Kohlensäure mittels der im Seitengefäss vorhandenen Salzsäure aus

der Lösung vertrieben. Das dritte Manometer diente zur Feststellung der zu Beginn des Versuches bereits in der Flüssigkeit eventuell vorhandenen Kohlensäure; auch hier wurde die Bikarbonat-Kohlensäure durch Zufügen von Salzsäure vertrieben. Für weitere Einzelheiten betreffs der Methodik, der anzuwendenden Formeln u.s.w. möge verwiesen werden nach den Monographien von KREBS (1929) und von DIXON (1930).

In jeder Versuchsreihe wurden, einschliesslich des als Thermobarometer dienenden Manometers, 6 Manometer gleichzeitig benutzt. Für jedes WARBURG-Gefäss, das einen Durchschnittsinhalt von 20—30 ccm und zwei Seitengefässe hatte, wurde 2 bis 3 ccm Zellsuspension verwendet. In eines der Seitengefässe wurde 0,2—0,4 ccm einer 0,1 molaren Lösung der zu untersuchenden Kohlenstoffverbindung und in das andere Seitengefäss 0,2 ccm 5% KOH bzw. 2 n HCl pipettiert. Für die Dosierung des Substrates wurden kalibrierte, in 0,01 ccm eingeteilte Pipetten benutzt. Die Temperatur des Wasserbades war während eines Versuches innerhalb 0,02° C konstant und war bei allen Versuchen etwa 30° C. Eine Beschreibung des Wasserbades ist in der Doktorarbeit von ROELOFSEN (Utrecht, 1935) zu finden.

Das Bakterienmaterial für die Zellsuspensionen wurde folgendermassen erhalten. Ungefähr 24 Stunden vor Beginn eines Versuches impfte ich den erstarrten, in sterile Petrischalen ausgegossenen, Nähragar (für *Spirillum serpens* und *Spirillum Itersonii*: Peptonagar; für *Spirillum undula*: Peptonagar mit 5% Na-Pyruvat; für *Spirillum tenue*: Peptonagar mit 0,5% Ca-Laktat) mit einigen ccm einer Kultur in Peptonwasser und züchtete bei 30° C. Zur Benutzung für die Zellsuspensionen wurden die Bakterien mit einer kleinen Menge Leitungswasser von dem Agar abgespült, sorgfältig abzentrifugiert und darauf in einer Phosphat-Pufferlösung (nach SÖRENSEN; pH etwa 7.4) suspendiert. Das beste Ergebnis, was die Atmungsintensität betrifft, ergaben die Kulturen, welche etwa 24 Stunden alt waren. Nahezu sämtliche Zellen in den aus derartigen Kulturen hergestellten Suspensionen befanden sich in vorzüglichem Zustand, und lieferten wegen ihrer starken Beweglichkeit immer wieder einen eindrucksvollen Anblick. Immer wurde durch eine mikroskopische Untersuchung geprüft, ob auf den Platten während des Wachstums keine Infektion eingetreten war. Diese Kontrolle genügte, da eine etwaige Infektion wegen der typischen Zellform der Spirillen sofort wahrnehmbar war. Falls dies zutraf, wurde die Platte selbstverständlich nicht benutzt.

Bei allen weiter unten zu beschreibenden quantitativen Versuchen habe ich immer einen der folgenden Stämme verwendet: für *Spirillum*

*serpens*: Stamm 34; für *Spirillum undula*: Stamm 11; für *Spirillum Itersonii*: Stamm 7; für *Spirillum tenue*: einen in der Sammlung des Laboratoriums für Mikrobiologie zu Delft unter E III 2.2.2. eingetragenen Stamm.

### § 3. VERWENDBARKEIT VERSCHIEDENER ORGANISCHER VERBINDUNGEN ALS ATMUNGSSUBSTRAT FÜR DIE ISOLIERTEN *SPIRILLUM*-ARTEN.

Zur Prüfung, inwieweit bestimmte organische Verbindungen von den betreffenden *Spirillum*-Arten veratmet werden können, wurde die Sauerstoffaufnahme einer Zellsuspension vor und nach Zufügung einer bestimmten Kohlenstoffverbindung auf die angegebene Weise gemessen. Dabei ging ich folgendermassen vor:

Nachdem während etwa 20 Minuten geschüttelt worden war, um einen vollkommenen Temperatenausgleich zwischen den Gefässen und dem Wasserbade zu erzielen, wurde der Manometerstand abgelesen und darauf die im Seitengefäss vorhandene Lösung des Atmungssubstrates durch Umkipfung zur Zellsuspension zugefügt. Dabei wurde immer durch wiederholt hin- und herneigen des Apparates für eine vollkommen homogene Mischung der beiden Flüssigkeiten gesorgt. Im Kontroll-Apparat wurde immer die gleiche Menge destilliertes Wasser zugefügt.

Nach Verlauf von einiger Zeit, meistens nach 1—2 Stunden, wurde nun aufs neue der Manometerstand abgelesen, und aus dem festgestellten Druckunterschied mittels Multiplikation mit der Gefäss-Konstante die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs in cmm berechnet. Eine im Vergleich zu der Kontrolle deutlich gestiegene Sauerstoffaufnahme habe ich als ein Kennzeichen betrachtet, dass die Kohlenstoffverbindung vom Organismus angegriffen wird. In diesem Zusammenhang sei bemerkt, dass zur Kontrolle angestellte Versuche, bei denen in allen Gefässen gleich viel Zellsuspension anwesend war und die gleiche Menge einer oxydierbaren Verbindung hinzugefügt wurde, bis auf 1% mit einander übereinstimmende Resultate ergaben.

In der Tabelle II sind die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Bei Betrachtung dieser Tabelle fällt an erster Stelle auf, dass nahezu alle gesättigten Fettsäuren, sowohl mit gerader als mit verzweigter Kohlenstoffkette, von den untersuchten *Spirillum*-Arten veratmet werden. Daneben werden auch Bernstein-, Fumar-, Milch-, Äpfel- und Brenztraubensäure von allen Spirillen verarbeitet.

TABELLE II.

Verwendbarkeit verschiedener Verbindungen als Atmungssubstrat für einige *Spirillum*-Arten.

Verbindung	<i>Spirillum serpens</i>	<i>Spirillum Itersonii</i>	<i>Spirillum tenue</i>	<i>Spirillum undula</i>
<i>Fettsäuren</i>				
Ameisensäure	—	(+)	(+)	—
Essigsäure	+	+	+	+
Propionsäure	+	+	+	(+)
n. Buttersäure	+	+	+	+
iso-Buttersäure	(+)	(+)	(+)	(+)
n. Valeriansäure	+	+	+	(+)
iso-Valeriansäure	+	+	+	(+)
n. Capronsäure	+	+	+	+
n. Caprylsäure	+	+	+	+
n. Caprinsäure	+	—	—	+
Laurinsäure	—	—	—	—
<i>Andere Säuren</i>				
Oxalsäure	—	—	—	—
Bernsteinsäure	+	+	+	(+)
Fumarsäure	(+)	(+)	(+)	(+)
Malonsäure	—	—	—	—
d-Milchsäure	+	+	+	(+)
Zitronensäure	—	(+)	(+)	—
dl-Äpfelsäure	(+)	(+)	(+)	(+)
d-Weinsäure	—	—	—	—
Brenztraubensäure	+	+	+	+
Glycolsäure	—	—	—	—
Glyoxylsäure	—	—	—	—
<i>Kohlenhydrate</i>				
Xylose	—	—	—	—
Arabinose	—	—	—	—
Glukose	—	(+)	—	—
Lävulose	—	(+)	(+)	—
Mannose	—	—	—	—
Galaktose	—	—	—	—
Maltose	—	—	(+)	—
Laktose	—	—	—	—
Saccharose	—	—	—	—
<i>Alkohole</i>				
Methylalkohol	—	—	—	—
Aethylalkohol	—	(+)	—	+
n. Propylalkohol	—	(+)	—	(+)
n. Butylalkohol	—	(+)	—	(+)
Glycerin	—	(+)	—	—
Aethylenglykol	—	—	—	—
Acetaldehyd	+	+	+	(+)

+ = starke Atmungssteigerung.

(+) = schwache „

— = keine „

Aus einem Vergleich der Tabellen I und II geht hervor, dass im allgemeinen das Vermögen zur Benutzung einer gewissen Verbindung als Wachstumssubstrat korreliert mit dem Vermögen zur Veratmung dieser Verbindung. Nur machen viele der untersuchten Kohlenhydrate hierbei eine Ausnahme, indem bei Zusatz dieser Verbindungen an Zellsuspensionen von *Spirillum Itersonii* bezw. von *Spirillum tenue* — wenigstens während der Versuchsdauer — keine erhöhte Atmung festgestellt werden konnte. Es muss jedoch daran erinnert werden, dass diese Verbindungen auch als Wachstumssubstrat nicht sehr geeignet waren.

Umgekehrt schliesst auch offenbar das Vermögen zur Oxydation einer Substanz nicht immer das Vermögen ein, diese Substanz als einzige Kohlenstoffquelle für das Wachstum zu benutzen.

Es zeigt sich nämlich, dass Ameisensäure von *Spirillum tenue* und *Spirillum Itersonii* unverkennbar, sei es auch langsam, veratmet wird, während doch alle Wachstumsversuche, bei denen Formiate als einzige Kohlenstoffquelle anwesend waren, fehl geschlagen waren. Es hängt dies wohl damit zusammen, dass der Aufbau der Zellsubstanz aus einer derartigen Verbindung mit erheblich grösseren Schwierigkeiten verknüpft ist als bei Substraten, welche bei Oxydation reaktionsfähige Zwischenprodukte, wie Ketosäuren und Aldehyde, ergeben. Zwar zeigen die bei andern Organismen wie bei den autotrophen Bakterien gesammelten Erfahrungen, dass eine derartige Synthese sogar aus Kohlensäure möglich ist, doch ist es nicht erstaunlich, dass andersartige Zellen diese Aufgabe nicht zu erfüllen vermögen.

Weitere Ausnahmen sind, dass *Spirillum serpens* und *Spirillum undula* Propionsäure und letztgenannte Art auch Buttersäure veratmen, während doch Wachstumsversuche mit Salzen dieser Säuren ein negatives Ergebnis geliefert hatten. Obgleich ich darüber noch keine Versuche angestellt habe, scheint es mir möglich, hierfür die Tatsache verantwortlich zu machen, dass bei den Atmungsversuchen geringere Konzentrationen dieser Substrate angewendet worden sind. Ich erinnere in diesem Zusammenhang an die Versuche von BÖESEKEN und WATERMAN (1912) aus denen deutlich hervorgeht, dass gewisse Substanzen, welche in höherer Konzentration auf bestimmte Schimmelpilze giftig und wachstumshemmend wirken, bei niedrigerer Konzentration mühelos assimiliert werden.

Schliesslich sei noch erwähnt, dass ich ebenfalls einige Beobachtungen über die Verwendbarkeit verschiedener Verbindungen als Oxydationssubstrat für *Spirillum Kutscheri* gemacht habe. Da ich kein völlig befriedigendes Nährmedium für diesen Organismus habe finden können und es

also schwierig war, genügend Material für die Zellsuspensionen zu bekommen, habe ich mich bloss auf wenige Versuche beschränken müssen. Aus diesen Versuchen, welche mit Stamm 50 (kultiviert auf Schweinejaucheagar mit 0,5% Na-Pyruvat) angestellt wurden, ergab sich, dass Essig-, Propion-, Butter-, Bernstein-, Äpfel- und Brenztraubensäure oxydiert wurden, dagegen nicht Zitronensäure, Weinsäure, Glukose, Lävulose und Laktose. Überraschenderweise wurde auch Milchsäure nicht angegriffen, was im Vergleich zu den anderen *Spirillum*-Arten einen auffallenden Unterschied bedeutet.

Jedenfalls weisen diese wenn auch noch etwas vorläufigen Ergebnisse darauf hin, dass *Spirillum Kutscheri* zur Veratmung organischer Verbindungen hauptsächlich auf dieselben Kohlenstoffverbindungen angewiesen ist, welche von den anderen *Spirillum*-Arten oxydiert werden.

#### § 4. DIE ATMUNGSINTENSITÄT EINIGER *SPIRILLUM*-ARTEN.

Obleich die für die Zellsuspensionen verwendeten Bakterien sich nahezu alle im Optimalzustande befanden und ausserordentlich beweglich waren, ist die Atmungsintensität der aus Oberflächenwasser isolierten *Spirillum*-Arten — ausgedrückt in cmm pro Stunde und pro mg Trockensubstanz aufgenommenen Sauerstoff ( $Q_{O_2}$ ) — sehr gering im Vergleich zu derjenigen vieler anderer Bakterien-Arten wie z.B. *Azotobacter vinelandii* (LINEWEAVER 1933;  $Q_{O_2} = 1000-4000$ ). Die Atmungsintensität ist für jede Art stark abhängig vom Substrate; eine Substanz wird viel rascher oxydiert als die andere. Die hier verzeichneten Werte beziehen sich auf das am schnellsten oxydierte Substrat und auf die Periode, während der die Sauerstoffaufnahme nahezu konstant war.

*Spirillum serpens* (Acetat):  $Q_{O_2} \pm 200$ .

*Spirillum tenue* (Laktat):  $Q_{O_2} \pm 70$ .

*Spirillum Itersonii* (Succinat):  $Q_{O_2} \pm 170$ .

*Spirillum undula* (Butyrat):  $Q_{O_2} \pm 120$ .

Hinsichtlich *Spirillum Itersonii*, *Spirillum tenue* und *Spirillum undula* kann bemerkt werden, dass die organischen Säuren durchschnittlich viel rascher oxydiert werden als Lävulose, Glycerin und die Alkohole. In Fig. 1 ist dies deutlich für die Oxydation von Lävulose, Glycerin und Na-Pyruvat durch *Spirillum Itersonii* zu ersehen. Der bald eintretende starke Rückgang der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Na-Pyruvat muss, wie sich später ergeben wird, dem raschen Verschwinden dieser Substanz aus dem Nährmedium zugeschrieben werden.

Abgesehen von Propionsäure, nimmt im allgemeinen die Geschwindigkeit, mit der die Fettsäuren veratmet werden, ab mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette; dabei werden die iso-Säuren langsamer oxydiert als die entsprechenden Säuren mit einer geraden Kohlenstoffkette. Doch

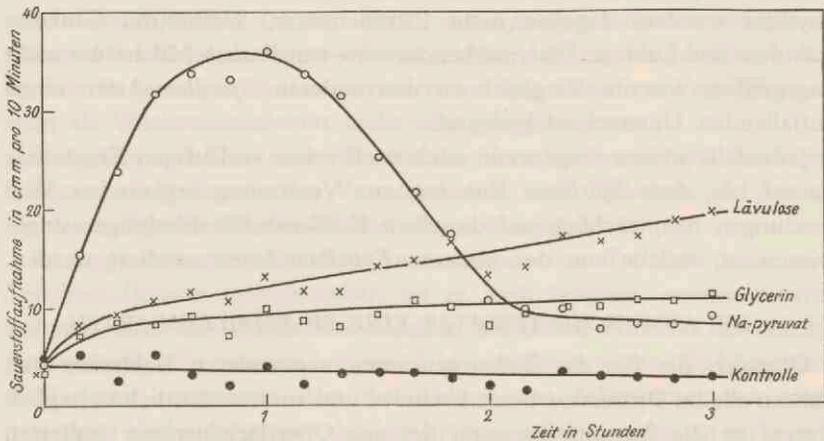


Fig. 1.

Die Veratmung von Lävulose, Glycerin und Na-Pyruvat durch *Spirillum Itersonii*. Von jeder Substanz wurde 0,1 ccm einer 0,1 molaren Lösung zugefügt. Die Sauerstoffaufnahme ist angegeben in cmm pro 10 Minuten.

gibt es hierbei Ausnahmen, so werden z.B. Capron-, Capryl- und Caprinsäure ziemlich schnell von *Spirillum undula* angegriffen, Valeriansäure jedoch sehr langsam. Es ist überhaupt bemerkenswert, in welchem Masse sich die Spirillen in Bezug auf die Geschwindigkeit unterscheiden, mit der die verschiedenen Säuren veratmet werden. Während Bernstein- und Milchsäure von *Spirillum serpens*, *Spirillum tenue* und *Spirillum Itersonii* schnell veratmet werden, oxydiert *Spirillum undula* diese Verbindungen nur äusserst langsam. Es ist zurzeit nicht möglich, für diese eigentümlichen Verhältnisse eine Erklärung zu geben.

#### § 5. DER EINFLUSS DER H-IONENKONZENTRATION AUF DIE ATMUNGSPROZESSE DER SPIRILLEN.

Bei der Untersuchung des Einflusses der H-Ionenkonzentration auf die Atmungsprozesse der Spirillen habe ich mich auf Versuche, bei denen eine organische Säure als Atmungssubstrat fungierte, beschränken müssen.

Die Oxydation von Glycerin, Lävulose und von den Alkoholen ist nämlich, wie schon erwähnt, im allgemeinen so langsam, dass diese Verbindungen für derartige Versuche nicht gut brauchbar sind.

Mit dem Arbeiten mit organischen Säuren ist jedoch immer der Nachteil verbunden, dass die Säureradikale teilweise in Karbonate umgewandelt werden, was zu einer erhöhten Alkalität des Mediums führt. Es stellte sich nämlich bald heraus, dass, trotzdem eine Pufferlösung (Konzentration der Phosphatmischung etwa 1%) benutzt wurde, die Reaktion des Mediums während eines Versuches gewöhnlich  $\pm 0,2$ — $0,4$  pH-Einheiten nach der alkalischen Seite hin verschoben war. Eine Pufferlösung mit noch stärkerer Phosphatkonzentration liess sich nicht anwenden, da sich die Zellen sonst unter allzu unphysiologischen Bedingungen befunden hätten.

Obgleich es also nicht möglich war, den Verlauf der Atmung bei verschiedenen konstant bleibenden H-Ionenkonzentrationen zu verfolgen, habe ich doch für *Spirillum serpens* den Einfluss des pH auf die Atmung folgendermassen festgestellt.

Fünf Röhren, die je 5 ccm einer Zellsuspension in destilliertem Wasser enthielten, wurden mit  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in solchen Mengen versetzt, dass die Phosphatkonzentration etwa 1% betrug und gemäss SÖRENSEN in den verschiedenen Röhren ein pH erwartet werden konnte von: 7.0; 7.4; 7.7; 7.9; 8.5. Von jedem Rohr wurde 1.8 ccm in ein WARBURG-Gefäss übergebracht, während im restlichen Teile der Suspension das pH mit Hilfe der Glaselektrode (für eine Beschreibung des verwendeten Apparates vgl. die Doktorarbeit von ELEMA, Delft 1932) bestimmt wurde. Während etwa 2 Stunden wurde darauf die Sauerstoffaufnahme der 5 Suspensionen beobachtet, nachdem zu jedem Gefäss der Zellsuspension 0.2 ccm einer 0.1 molaren Na-Butyratlösung zugefügt war. Sodann wurden die Zellsuspensionen schnell aus den Gefässen herausgeholt und wurde aufs neue das pH festgestellt, sodass von jeder Zellsuspension das pH am Anfang und am Ende des Versuches bekannt war.

In Fig. 2 ist der Verlauf der Atmung in den verschiedenen Gefässen wiedergegeben. Es ist deutlich, dass die Atmung der Zellsuspension mit einem Anfangs-pH 7.0 namentlich im Beginne wesentlich zurückbleibt hinter der der Zellsuspensionen, deren pH anfangs 7.4 resp. 7.7 resp. 7.9 ist. Im Masse das pH jedoch in erstgenannter Suspension nach der alkalischen Seite verschoben wird infolge des bei der Oxydation des Substrats gebildeten Alkalis, nimmt die Atmung zu. Doch bleibt sie immer noch geringer als die optimale Atmung, welche zwischen pH 7.4

und 8.0 erreicht wird. Im letztgenannten Gebiete hat eine Änderung des pH nahezu keinen Einfluss auf die Atmung; sobald das pH aber über etwa 8.0 hinaussteigt, tritt allmählich ein Rückgang der Atmung ein. Bei pH 8.5 ist die Atmung verglichen mit der optimalen recht

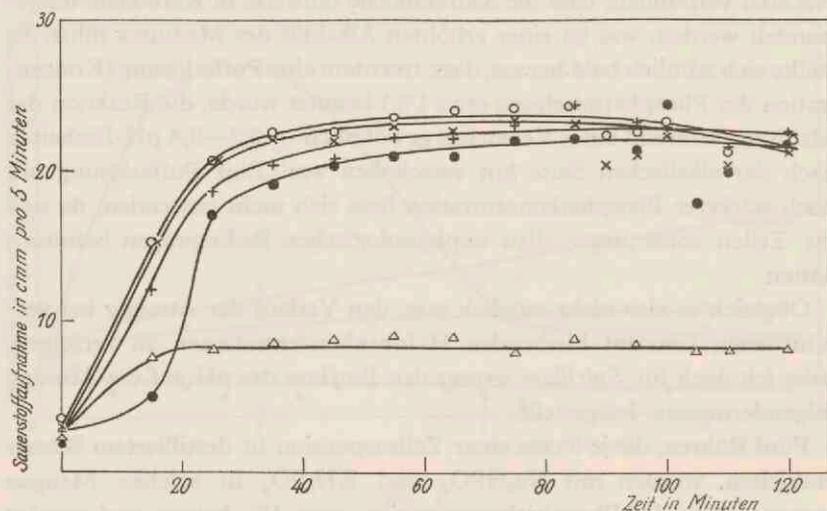


Fig. 2.

Der Einfluss des pH auf die Veratmung von Na-Butyrat durch *Spirillum serpens*. Jedes Gefäß enthielt 0,2 ccm einer 0,1 molaren Lösung. Die Sauerstoffaufnahme ist angegeben in cmm pro 5 Minuten. Die Kurven beziehen sich auf die nachfolgenden pH-Gebiete und -Änderungen während des Versuches:

7.0 → 7.2 (●); 7.4 → 7.7 (+); 7.7 → 8.0 (○);  
7.9 → 8.2 (×); 8.5 → 8.6 (△).

beträchtlich abgeschwächt. Die Gesamtmenge des aufgenommenen Sauerstoffs betrug für die einzelnen Gefäße:

pH = 7.0—7.2 : 450 cmm;  
pH = 7.4—7.7 : 507 cmm;  
pH = 7.7—8.0 : 526 cmm;  
pH = 7.9—8.2 : 507 cmm;  
pH = 8.5—8.6 : 199 cmm.

Eine Kurve, welche die Abhängigkeit der Atmungsintensität vom pH wiedergeben würde, würde daher einen sehr flachen Gipfel zwischen pH 7.4 und 8.0 aufweisen.

Ein ähnlicher Einfluss des pH liess sich auch bei der Atmung der drei anderen isolierten *Spirillum*-Arten feststellen.

§ 6. DER BEI DER VERATMUNG EINIGER KOHLENSTOFFVERBINDUNGEN BEOBACHTETE GASWECHSEL.

Da aus dem Verhältnis der aufgenommenen Sauerstoffmenge und der gebildeten Kohlensäuremenge häufig wichtige Folgerungen hinsichtlich des Verlaufs der Oxydation einer gewissen Kohlenstoffverbindung gemacht werden können, habe ich für die Oxydation einer Anzahl Verbindungen — hauptsächlich organischer Säuren — durch die aus Oberflächenwasser isolierten Spirillen den respiratorischen Quotienten  $\left(\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}\right)$  bestimmt.

Für jede Verbindung wurde der Durchschnittswert aus einer Anzahl Versuche berechnet, wobei allerdings bemerkt werden muss, dass zwischen den Werten der einzelnen Versuche nur geringe Unterschiede auftraten. In der Tabelle III sind, neben den theoretisch, für vollkommene Oxydation bis zu Kohlensäure und Wasser berechneten Quotienten, die auf diese Weise erhaltenen respiratorischen Quotienten angegeben worden.

TABELLE III.

Die respiratorischen Quotienten bei der Veratmung verschiedener Kohlenstoffverbindungen durch einige *Spirillum*-Arten.

Substrat	Theoretisch	<i>Spirillum serpens</i>	<i>Spirillum Itersonii</i>	<i>Spirillum tenue</i>	<i>Spirillum undula</i>
Essigsäure	1.00	1.05	1.07	1.07	1.04
Propionsäure	0.86	0.84	0.79	0.82	—
n. Buttersäure	0.80	0.69	0.66	0.73	0.63
n. Capronsäure	0.75	—	—	—	0.63
n. Caprylsäure	0.73	—	—	—	0.59
Milchsäure	1.00	0.99	1.01	1.05	—
Bernsteinsäure	1.14	1.15	1.29	1.25	—
Aethylalkohol	0.67	—	—	—	0.55

Wenn wir die Tabelle etwas näher betrachten, fällt sofort folgendes auf. Während die respiratorischen Quotienten für einige Verbindungen, wie Essig-, Propion- und Milchsäure alle leidlich gut übereinstimmen mit den theoretischen Werten, gibt es auch Verbindungen, für welche die beobachteten Werte beträchtlich von den theoretischen abweichen. Dies trifft z. B. zu für die Oxydation von Buttersäure durch alle vier *Spirillum*-Arten und

für die Oxydation von Capronsäure, Caprylsäure und Aethylalkohol durch *Spirillum undula*. Besonders merkwürdig ist das Verhalten der Spirillen hinsichtlich Bernsteinsäure. Während nämlich aus dem respiratorischen Quotienten geschlossen werden könnte, dass *Spirillum serpens* diese Verbindung vollkommen bis zu Kohlensäure und Wasser oxydiert, ist es ohne weiteres klar, dass die Oxydation von Bernsteinsäure durch *Spirillum Itersonii* bezw. *Spirillum tenue* ganz anders verläuft.

Es fragt sich nun, welche Bedeutung man den von den theoretischen Werten abweichenden respiratorischen Quotienten beilegen muss. Es ist einleuchtend, dass diese Abweichungen hierauf zurückgeführt werden müssen, dass es sich bei den betreffenden Atmungsprozessen um unvollständige Oxydationen handelt. Sobald der gefundene respiratorische Quotient niedriger ist als der theoretische Wert, muss im Stoffwechsel neben Kohlensäure ein Produkt gebildet sein, dass in Bezug auf das Atmungssubstrat ebenfalls oxydiert ist. Wenn andererseits der gefundene respiratorische Quotient höher ist als der theoretische Wert, bedeutet dies, dass neben Kohlensäure im Stoffwechsel ein in Bezug auf das Atmungssubstrat reduziertes Produkt gebildet worden ist. (Vergl. hierzu auch TAMIYA 1935).

Bei diesen unvollständigen Brutto-Oxydationen kann man nun an verschiedene Ursachen denken. Es kann nämlich sein, dass alle Moleküle des Substrats derselben Umwandlung unterliegen, welche zu einem unvollkommenen Oxydationsprodukt führt. Dieses Produkt könnte nun entweder in der Zelle aufgespeichert werden, oder es könnte von der Zelle in das Medium ausgeschieden werden. Für diesen letzten Fall haben wir ein klassisches Beispiel in dem Atmungsvorgang der Essigbakterien.

Es ist jedoch ebenfalls denkbar, dass die Oxydation nur in dieser Hinsicht unvollständig ist, dass zwar ein Teil des Atmungssubstrats vollständig oxydiert wird zu Kohlensäure und Wasser, dass jedoch der weitere Teil des Substrats wesentlich anderen Umwandlungen unterliegt und zwar solchen bei denen unvollkommene Oxydationsprodukte gebildet werden. Auch hier lassen sich wieder zwei Möglichkeiten unterscheiden, nämlich dass diese Produkte in der Zelle abgelagert werden oder dass sie ins Medium abgeschieden werden.

Wir müssen hieraus schliessen, dass bei den betreffenden Atmungsversuchen entweder eine Ausscheidung von andern Dissimilationsprodukten als Kohlensäure stattgefunden hat, oder dass in den Zellen, sogar bei diesen Versuchen auf kurze Dauer und bei Abwesenheit geeigneter Wachstumsbedingungen (Medien ohne assimilierbaren Stickstoff!), auch in

quantitativer Hinsicht wichtige assimilatorische Vorgänge aufgetreten sind. Das letztere würde also bedeuten, dass der Versuch zum Studium des isolierten Atmungsvorganges fehlgeschlagen ist.

Für eine eingehendere Analyse dieser Fragen schien es angebracht, die Oxydationsprozesse zu verfolgen unter Bedingungen, welche eine genaue Feststellung der bei der Oxydation einer bestimmten Quantität des Atmungssubstrats aufgenommenen Sauerstoffmenge bzw. gebildeten Kohlensäuremenge ermöglichen. Über die diesbezüglichen Versuche wird im folgenden Kapitel berichtet werden.

## KAPITEL VII.

### ATMUNGSVERSUCHE UNTER GLEICHZEITIGER BERÜCKSICHTIGUNG DER ASSIMILATIONSVORGÄNGE.

#### § 1. EINFÜHRENDE BEMERKUNGEN ZU DEN ANGESTELLTEN VERSUCHEN.

Wie am Schlusse des vorigen Kapitels bemerkt worden ist, kam es darauf an die Tatsache, dass die experimentell erhaltenen respiratorischen Quotienten in vielen Fällen nicht in Übereinstimmung waren mit denjenigen, welche sich auf Grund der Annahme vollständiger Oxydation der betreffenden Substrate erwarten liessen, eingehender zu untersuchen.

Ich habe in diesem Zusammenhang schon erörtert, dass die erwähnte Sachlage ihre Erklärung darin finden könnte, dass in den angestellten Versuchen neben dem Atmungsvorgange auch assimilatorische Prozesse aufgetreten sein konnten. *A priori* schien diese Möglichkeit wahrscheinlicher als diejenige, welche die Ausscheidung unvollständig oxydierter Dissimilationsprodukte in das Medium annimmt. Bezüglich der Bildung derartiger Produkte im Stoffwechsel der Spirillen sind nämlich weder von früheren Autoren noch von mir jemals Anhaltspunkte gefunden worden.

Es fragt sich also, inwieweit die Annahme des gleichzeitigen Ablaufs assimilatorischer Prozesse auf Schwierigkeiten stösst. Hierzu ist nun folgendes zu bemerken. Die Tatsache, dass bei der *Züchtung* oxydierender Mikroorganismen in einem nur eine einzige organische Verbindung als Kohlenstoffquelle enthaltenden Nährmedium, ein Teil dieses Substrats bei dem Atmungsvorgang verbraucht wird und ein anderer Teil in der Form neugebildeten Zellmaterials zurückgefunden wird, ist von altersher bekannt, und es sind denn auch äusserst zahlreiche Abhandlungen publiziert worden, in welchen das Verhältnis zwischen dem veratmeten und dem assimilierten Substrate in Abhängigkeit von verschiedenen äusseren Faktoren studiert worden ist. (PFEFFER: Ökonomischer Koeffizient!).

Ist es nun jedoch erlaubt anzunehmen, dass derartiges auch bei den von mir angestellten Atmungsversuchen stattgefunden hat? Zur Beantwortung dieser Frage muss hervorgehoben werden, dass die Bedingungen, unter denen meine Versuche vor sich gingen, wesentlich verschieden sind von denjenigen, welche bei den soeben genannten Versuchen vorhanden

waren. Die von mir angestellten Versuche waren ja darauf gerichtet, das oxydierende Vermögen einer statischen Zellsuspension kennen zu lernen. Die grosse Dichte dieser Suspension, sowie die Abwesenheit mehrerer wichtiger wachstumsbedingender Faktoren, wie z.B. das Fehlen von assimilierbaren Stickstoffverbindungen im Medium, sowie endlich die kurze Dauer des Versuches gaben Veranlassung zu der Erwartung, dass aktives Wachstum, wenn auch nicht völlig ausgeschlossen, doch jedenfalls in quantitativer Hinsicht von nur ganz geringer Bedeutung sein würde.

Inzwischen sind in der Literatur schon mehrere Angaben zu finden, aus denen hervorzugehen scheint, dass auch unter Bedingungen, welche aktive Zellvermehrung ausschliessen, dennoch der Atmungsvorgang mit einer nicht unerheblichen Assimilation verknüpft ist. Ich erinnere z.B. daran, dass FÜRTH und LIEBEN (1922) bei der Oxydation von Milchsäure durch Presshefe feststellten, dass nur 50% des Kohlenstoffs aus der verschwundenen Milchsäure als Kohlensäure zurückgefunden werden konnte, die andere Hälfte war offenbar von den Zellen assimiliert worden. Von LUNDIN (1923) sind diese Angaben bestätigt und in verschiedener Hinsicht erweitert worden.

Für alle diese Versuche ist es jedoch kennzeichnend, dass sie sich auf längere Dauer (24 Stunden u.d.) ausdehnen. Dies bedeutet, dass es gar nicht ausgeschlossen ist, dass mehrere Zellen aus der anfänglichen Population absterben und dass die dabei in das Medium übergehenden Substanzen aktives Wachstum der übrigen Zellen ermöglichen.

Es ist darum wichtig, dass MEYERHOF (1925) in seiner klassischen Abhandlung über die sogenannte PASTEURSche Reaktion der Alkoholhefe überzeugend dartat, dass auch bei Atmungsversuchen auf kurze Dauer und in Medien, welche ebenfalls keinen assimilierbaren Stickstoff enthielten, ein Teil der verwendeten Substrate stets als Assimilationsprodukte der Hefe zurückgefunden wurde <sup>1)</sup>.

Deutlicher tritt das betreffende Phänomen jedoch hervor in den Untersuchungen von COOK und STEPHENSON (1928), wobei unter ähnlichen Versuchsbedingungen die Veratmung verschiedener Substrate, wie Laktat, Acetat und Formiat, durch *Bacterium coli* und durch *Bacterium alcaligenes* studiert wurde. Während Formiat vollständig oxydiert wurde, traf dies für die beiden andern erwähnten Substrate nur teilweise zu und in

---

<sup>1)</sup> Die Frage nach dem Mechanismus der PASTEURSchen Reaktion kann hier ausser Betracht bleiben.

Versuchen, welche nur einige Stunden dauerten, wurde offenbar  $1/4$  bis  $1/3$  dieser Substrate assimiliert.

Zu einem anscheinend entgegengesetzten Resultat gelangte LINEWEAVER (1930) in einer Untersuchung über die Oxydation verschiedener organischer Substrate durch *Azotobacter vinelandii*. Er schliesst nämlich aus seinen Experimenten, dass in allen Fällen fast vollständige Oxydation dieser Substrate stattfindet. Hierzu ist jedoch zu bemerken, dass LINEWEAVER seine ebenfalls mit der manometrischen Methode angestellten Versuche auf relativ längere Zeit (12—30 Stunden) ausdehnte. Die von ihm gegebenen Kurven bezüglich der Sauerstoffaufnahme zeigen nun deutlich, dass, genau wie in den Versuchen von COOK und STEPHENSON, die Atmungsgeschwindigkeit meistens schon nach wenigen Stunden erheblich zurückgeht, was darauf hinweist, dass in diesem Augenblick das Substrat praktisch schon aus dem Medium verschwunden ist<sup>1)</sup>. Der hier-nach nur sehr langsam aufgenommene Sauerstoff wird daher sehr wohl verbraucht werden können für eine Veratmung der in der ersten Phase gebildeten Assimilationsprodukte. Unter diesen Umständen kann es nicht wundern, dass nach der gewählten langen Versuchsperiode auch diese Produkte wieder veratmet werden, wodurch der Anschein erweckt wird, dass eine direkte fast vollständige Oxydation der anfänglichen Substrate stattgefunden habe.

Ein recht wertvoller Beitrag zum einschlägigen Problem ist in einer erst neulich veröffentlichten Arbeit von BARKER (1936) geliefert worden, von der dieser Autor mich mit grosser Liebenswürdigkeit schon vor deren Erscheinung Kenntnis nehmen liess.

Da die Ergebnisse BARKERS für meine nachher zu besprechenden Versuche von grösster Wichtigkeit sind, werde ich hier einigermassen ausführlich auf diese Arbeit eingehen.

Gleich wie viele niedrige grüne Algen ist die farblose *Prototheca Zopfii* Krüger fähig, zahlreiche Fettsäuren zu oxydieren, während auch Hexosen und einige Alkohole gut assimiliert werden (BARKER 1935).

BARKER hat nun die oxydative Verarbeitung einer Anzahl dieser Verbindungen, in Medien ohne Stickstoff in assimilierbarer Form, mit Hilfe der WARBURGSchen Methodik einer quantitativen Untersuchung unterzogen. Zuerst hat er hierbei das Verhalten von Glycerin als Atmungs-substrat eingehend untersucht. Er fand hierbei, dass Zusatz von Glycerin

---

<sup>1)</sup> Für eine nähere Begründung dieser Ansicht vergleiche man die Ausführungen im § 2 dieses Kapitels.

zu einer Suspension von *Prototheca*-Zellen eine bedeutende Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit bewirkte, welche in hohem Grade unabhängig war von der Glycerinkonzentration. Diese erhöhte Geschwindigkeit blieb nun jedoch in seinen Versuchen, bei denen nur geringe Mengen Glycerin hinzugefügt wurden, nur auf kürzere Zeit erhalten und zwar desto kürzer, je geringer die zugefügte Menge Glycerin war. Die Geschwindigkeitsabnahme, welche nun eintrat, zeigte immer im Anfang einen sehr plötzlichen Verlauf; bei der nun folgenden langsamen Atmung ging die Geschwindigkeit allmählich linear mit der Zeit zurück. Doch war die Geschwindigkeit immer etwas höher als diejenige der „Eigenatmung“, d.h. der Atmung, welche nach der gleichen Zeit im Kontrollversuch ohne Substrat auftrat. Und zwar war dieser Unterschied um so bedeutender, je grösser die im eigentlichen Versuche hinzugefügte Glycerinmenge war. BARKER gibt nun mehrere Argumente zu Gunsten der Auffassung, dass die erwähnte starke Geschwindigkeitsabnahme auf dem Umstand beruhe, dass in diesem Augenblick das Atmungssubstrat völlig verbraucht sei. Die hiernach einsetzende langsamere Atmung ginge auf Kosten eines in der ersten Phase gebildeten Assimilationsproduktes vor sich.

Diese Ansichten wurden nun vor allem dadurch gestützt, dass BARKER feststellen konnte, dass der respiratorische Quotient in der Phase der stark erhöhten Atmungsgeschwindigkeit wesentlich verschieden war von demjenigen, welcher vor dem Glycerinzusatz und auch in der zweiten langsamen Phase gefunden wurde. Hierzu kam dann die sehr bemerkenswerte Tatsache, dass die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs und die gebildete Kohlensäuremenge in Bezug auf die Menge des verbrauchten Glycerins stark zurückblieben im Vergleich zu denjenigen, welche sich bei Annahme vollständiger Oxydation erwarten liessen.

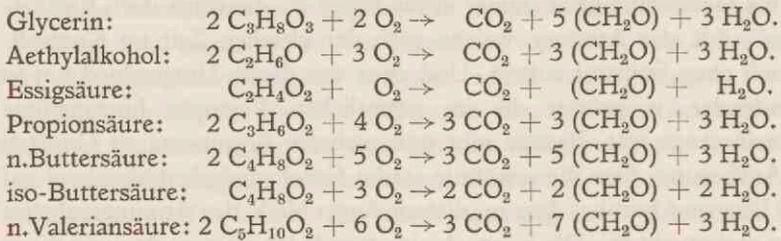
Hieraus dürfte mit Sicherheit auf die Bildung eines Assimilationsproduktes während der ersten Atmungsphase geschlossen werden.

BARKER führte nun zahlreiche Versuche aus, bei welchen sehr verschiedenartige Substrate benutzt wurden und fand hierbei genau die gleichen Phänomene. Dabei machte er sich die Aufgabe, in allen Fällen im Augenblick des Verschwindens bestimmter Mengen der zugesetzten Substrate die aufgenommene Sauerstoffmenge und die ausgeschiedene Kohlensäuremenge zu bestimmen. Es ist deutlich, dass diese Daten genügen, um sowohl die Menge, wie auch die empirische Zusammensetzung des gebildeten Assimilationsproduktes zu berechnen.

Hierbei ergab sich nun das überraschende Resultat, dass die Zusammen-

setzung der erhaltenen Assimilationsprodukte in allen Fällen die gleiche war, d.h. völlig unabhängig von dem sehr verschiedenen Oxydations-bezw. Reduktionszustande des benutzten Substrates. Und zwar war diese Zusammensetzung immer fast genau diejenige eines Kohlenhydrats ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). Ausserdem machte es bei einer ersten Betrachtung den Eindruck, als ob immer ein bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis bestände zwischen der verbrauchten Substratmenge und derjenigen des gebildeten Assimilationsproduktes.

Die hier folgenden Gleichungen geben hiervon eine Vorstellung:



Da, wie schon erörtert worden ist, mehrere Anhaltspunkte für die Auffassung sprechen, dass auch unter den von mir beachteten Versuchsbedingungen mit der Oxydation organischer Verbindungen durch Spirillen assimilatorische Vorgänge verknüpft sind, war es angebracht zu prüfen, inwieweit hierbei ähnliche, wie die von BARKER beobachteten Erscheinungen auftreten würden. Über die diesbezüglichen Versuche wird in den nächsten Paragraphen berichtet werden. Ein für mich recht glücklicher Umstand war, dass ich vielmals persönlich mit BARKER auf sehr angenehme Weise die hierbei vorkommenden Probleme habe besprechen können.

## § 2. ALLGEMEINE BEMERKUNGEN ZUR AUSFÜHRUNG DER VERSUCHE UND ZUR VERWERTUNG DER ERGEBNISSE.

Bei den Versuchen zur Prüfung der Frage, inwieweit unter den angegebenen Bedingungen bei der Oxydation organischer Verbindungen assimilatorische Vorgänge stattfinden, habe ich mich hauptsächlich auf eine Untersuchung einer kleinen Zahl organischer Säuren beschränken müssen. Wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, geschieht nämlich im allgemeinen die Oxydation von Kohlenhydraten bzw. Alkoholen durch die Spirillen im Vergleich zu derjenigen der meisten organischen Säuren so langsam, dass die erstgenannten Substanzen sich für die Versuche nicht gut eignen.

Es ist im Zusammenhang mit der Erklärung der Versuchsergebnisse wichtig, sofort zu bemerken, dass die Änderung des pH in den Versuchen, zu denen das Na- oder Ca-Salz einer organischen Säure als Atmungssubstrat diente, keinen Einfluss auf die Oxydationsgeschwindigkeit ausübte. Die Verschiebung der Reaktion belief sich nämlich im allgemeinen höchstens auf 0.6 pH-Einheiten, also bis zu pH 8.0. Im Kapitel VI § 5 ist schon gezeigt worden, dass zwischen pH 7.4—8.0 eine Änderung der H-Ionenkonzentration fast keinen Einfluss auf die Atmung hat. Sicherheitshalber stellte ich nahezu stets nach Beendigung eines Versuches mit Hilfe der Glaselektrode das pH der zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme verwendeten Zellsuspension fest.

Zur Verdeutlichung des bei den hiernach zu erwähnenden Versuchen angewandten Verfahrens und der Berechnung und Erklärung der Ergebnisse, werde ich jetzt zu einer ausführlichen Besprechung eines Versuches mit *Spirillum tenue* übergehen.

In Figur 3 sind die Ergebnisse eines Versuches graphisch wiedergegeben, bei dem die Oxydationsgeschwindigkeit von Na-Acetat in mehreren

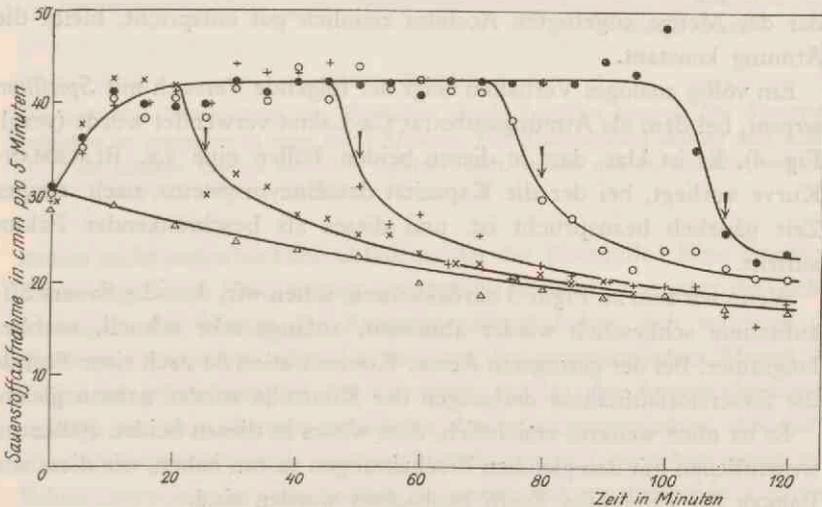


Fig. 3.

Die oxydative Verarbeitung von Na-Acetat durch *Spirillum tenue*. Die Sauerstoffaufnahme ist angegeben in cmm pro 5 Minuten. Das Kontrollgefäß enthielt kein Acetat (△); die anderen Gefäße enthielten Acetatmengen, welche sich zu einander verhielten wie 1 (×) : 2 (+) : 3 (○) : 4 (●). Die Pfeile geben den Augenblick an, von dem angenommen wird, dass das Acetat gerade völlig verbraucht ist.

Konzentrationen als eine Funktion der Zeit ermittelt wurde. Jedes Gefäss enthielt in einen Seitenfässchen 0,2 ccm 5% KOH und im anderen 0,4 ccm einer Na-Acetat-Lösung, deren Konzentration bekannt war. Insgesamt wurden einschliesslich des Thermobarometers 6 Manometer benutzt. Eines diente zur Kontrolle, mit im Seitenfässchen ausschliesslich 0,4 ccm destilliertem Wasser; die anderen 4 Gefässe enthielten Acetat-Lösungen, deren Konzentrationen sich zueinander verhielten wie 1 : 2 : 3 : 4. In sämtliche Gefässe wurden 2,4 ccm Zellsuspension gebracht. Als Gasphase diente Luft. Nachdem während einer halben Stunde geschüttelt worden war, wurden die Acetat-Lösungen der Zellsuspension zugesetzt und die Sauerstoffaufnahme beobachtet, indem alle 5 Minuten eine Ablesung vorgenommen wurde.

Aus Figur 3 ersehen wir, dass, während in der Kontrolle die Sauerstoffaufnahme allmählich und linear mit der Zeitdauer abnimmt, die Sauerstoffaufnahme in den anderen Gefässen nach dem Zufügen des Acetates rasch ansteigt. Die Steigerung hält so lange an, bis die Sauerstoffaufnahme nach etwa 20 Minuten eine gewisse konstante Grösse erreicht, die nahezu unabhängig ist von der Acetat-Konzentration. Während eines Zeitraums, der der Menge zugefügten Acetates ziemlich gut entspricht, bleibt die Atmung konstant.

Ein völlig analoges Verhalten zeigt der folgende Versuch mit *Spirillum serpens*, bei dem als Atmungssubstrat Ca-Laktat verwendet wurde (vergl. Fig. 4). Es ist klar, dass in diesen beiden Fällen eine s.g. BLACKMAN-Kurve vorliegt, bei der die Kapazität des Enzymsystems nach einiger Zeit gänzlich beansprucht ist, und dieses als beschränkender Faktor auftritt.

Wenn wir nun zu Figur 3 zurückkehren, sehen wir, dass die Sauerstoffaufnahme schliesslich wieder abnimmt, anfangs sehr schnell, nachher langsamer. Bei der geringsten Acetat-Konzentration ist nach einer Stunde die Sauerstoffaufnahme derjenigen der Kontrolle wieder nahezu gleich.

Es ist ohne weiteres ersichtlich, dass wir es in diesen beiden Fällen im wesentlichen mit den gleichen Erscheinungen zu tun haben, wie diese von BARKER für *Prototheca Zopfii* beobachtet worden sind.

Die hier folgende Analyse der beobachteten Erscheinungen ist denn auch in engem Anschluss an die BARKERSchen Ausführungen vorgenommen worden.

Da die Zeitdauer, während der die Atmung konstant bleibt, ungefähr der Acetatmenge proportional ist und weiter die Sauerstoffaufnahme in sämtlichen Gefässen plötzlich so scharf abnimmt, ist die Annahme

begründet, dass der Atmungsabfall der vollkommenen Substratumwandlung zuzuschreiben ist.

Auf welchen Umstand ist es dann aber zurückzuführen, dass die Atmungsgeschwindigkeit nach vollständiger Umwandlung des Sub-

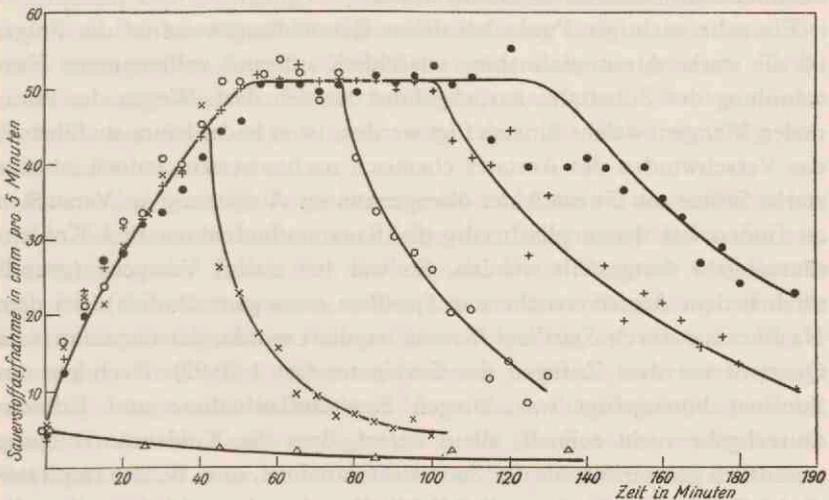


Fig. 4.

Die oxydative Verarbeitung von Ca-Laktat durch *Spirillum serpens*. Die Sauerstoffaufnahme ist angegeben in cmm pro 5 Minuten. Das Kontrollgefäß enthielt kein Laktat ( $\Delta$ ); die anderen Gefäße enthielten Laktatmengen, welche sich zu einander verhielten wie 1 ( $\times$ ) : 2 ( $\circ$ ) : 3 ( $+$ ) : 4 ( $\bullet$ ).

strates nicht augenblicklich abfällt zu der der Kontrolle? Eine zweifache Erklärung dieser Erscheinung ist möglich: nämlich entweder die Zellen (richtiger: die Menge der Atmungsenzyme) haben sich während des Versuches vermehrt, oder die Atmung der ursprünglichen Menge der Zellen ist grösser als die der Kontrolle, infolge der Anwesenheit eines anfangs aus dem Acetate gebildeten Assimilationsproduktes, das später allmählich oxydiert wird. Es ist nicht recht möglich, zwischen diesen zwei Erklärungsweisen zu entscheiden, voraussichtlich werden beide wohl zum Teil zutreffen. Gegen die Wachstumshypothese spricht die kurze Dauer des Versuches und das Fehlen von Stickstoffverbindungen im Medium. Es gibt denn auch mehr Andeutungen zu Gunsten der zweiten Erklärungsweise. In diesem Falle müsste man nämlich erwarten, dass die Menge des Assimilationsproduktes der Menge umgewandelten Substrates proportional ist. Aus Figur 3 geht nun hervor, dass in den acetathaltigen Kulturen

die Steigerung der finalen Atmungsintensität im Vergleich zu der Kontrolle annähernd der Menge des zugefügten Acetates proportional ist. Dies entspricht völlig der Erwartung, wenn wir annehmen, dass die Atmungsgrösse in der letzten Phase des Versuches von der Menge des vorhandenen Assimilationsproduktes bestimmt wird.

Ein sehr wichtiger Punkt bei dieser Betrachtungsweise ist die Frage, ob die starke Atmungsabnahme tatsächlich auf eine vollkommene Umwandlung des Substrates zurückgeführt werden darf. Wegen der minimalen Mengen, welche hinzugefügt werden, ist es leider kaum ausführbar, das Verschwinden des Acetates chemisch nachzuweisen. Jedoch ist eine starke Stütze zu Gunsten der obengenannten Auffassung in Versuchen zu finden, bei denen gleichzeitig die Sauerstoffaufnahme und Kohlen säureabgabe festgestellt wurden. So war bei einem Versuche (grundsätzlich dem Acetatversuche mit *Spirillum tenue* ganz ähnlich), bei dem Na-Succinat durch *Spirillum Itersonii* oxydiert wurde, der respiratorische Quotient vor dem Zufügen des Succinates fast 1 (0.92). Nachdem das Succinat hinzugefügt war, stiegen Sauerstoffaufnahme und Kohlen säureabgabe recht schnell, allein derart, dass die Kohlen säurebildung wesentlich grösser war als die Sauerstoffaufnahme, m.a. W. der respiratorische Quotient war grösser als 1 (1.31). Von dem Augenblick an, dass die Atmung scharf abnahm, bekam der respiratorische Quotient jedoch wieder einen Wert von nahezu 1 (1.02). Offenbar war in jenem Augenblick die primäre Succinatoxydation mit einem respiratorischen Quotienten grösser als 1 abgelaufen und begann ein zweiter Oxydationsprozess mit einem niedrigeren Quotienten.

Ein anderer Versuch, bei dem Butyrat durch *Spirillum Itersonii* oxydiert wurde, unterschied sich insofern von dem mit Succinat, als hier der respiratorische Quotient der primären Butyratoxydation weit unter 1 lag (0,64). Nachdem die erste Oxydation beendet war, stieg der respiratorische Quotient wieder und belief sich für die zweite Oxydationsphase auf 0.95.

Es scheint mir, dass diese Tatsachen deutlich dafür sprechen, dass das Substrat nach dem starken Atmungsabfall aus der Zellsuspension verschwunden ist und dies wird für die folgenden Ausführungen denn auch als Grundlage angenommen.

Um nun aber den zur vollständigen Verarbeitung einer gewissen Menge Substrates benötigten Sauerstoff zu ermitteln, ist es erforderlich zu entscheiden, welcher Punkt auf der Zeitkurve übereinstimmt mit dem vollkommenen Verschwinden des Substrates. Da der Übergang von einer

Atmungsphase in die andere nicht immer sehr scharf ist, wird bei der Bestimmung dieses Punktes einige Willkür nicht auszuschliessen sein. Das eine Mal wird vielleicht das Substrat noch nicht ganz verschwunden sein, ein anderes Mal ist das Substrat bereits eine Zeitlang vollständig verbraucht. Der Übergang ist jedoch meistens so deutlich, dass man nie weit vom Punkte der vollständigen Verarbeitung entfernt sein kann. Bei einer genügenden Anzahl Versuche werden sich die geringen Fehler überdies ausgleichen. In Figur 3 bezeichnen die Pfeile die Punkte auf den Kurven, bei denen angenommen wird, dass das Substrat völlig verschwunden sei.

Eine andere wichtige Frage ist, in welchem Masse bei diesen Versuchen neben der Sauerstoffaufnahme infolge der Substratoxydation, die sog. Eigenatmung der Zellen eine Rolle spielt. Diese Frage ist von BARKER gründlich diskutiert worden, sodass ich in dieser Beziehung auf seine Publikation bezugnehmen kann. Seine Folgerung ist, dass die Eigenatmung bei Anwesenheit einer oxydierbaren Substanz mehr oder weniger zurückgedrängt wird. In welchem Masse diese Zurückdrängung erfolgt, hängt ab von der Geschwindigkeit, mit der das Substrat oxydiert wird. Bei Anwesenheit einer leicht oxydierbaren Substanz darf man annehmen, dass die Eigenatmung nahezu ausgeschaltet ist. Hingegen würde die Eigenatmung bei Verwendung einer nur langsam verarbeiteten Verbindung ein nicht zu vernachlässigender Faktor sein, dem man in irgendwelcher Weise Rechnung tragen müsse.

Im allgemeinen braucht man keine Korrektion einzuführen. Es zeigt sich nämlich aus den Figuren 3 und 4, dass die Atmungsintensität nahezu unabhängig ist von der Substratkonzentration. Dies bedeutet, dass sogar bei sehr geringer Konzentration das Enzymsystem völlig beansprucht ist, wodurch die Oxydation anderer Substanzen — in diesem Falle derjenigen, welche verantwortlich sind für die Eigenatmung — praktisch ausgeschaltet sein wird.

Die Tabelle IV zeigt die bei der oxydativen Verarbeitung der verschiedenen Acetatmengen aufgenommenen Mengen Sauerstoff, wobei die Werte der Blankokorrektion gleich Null gesetzt sind.

Deutlich geht aus der 3ten Spalte hervor, dass zur vollständigen Verarbeitung der vier verschiedenen Acetatmengen die diesen entsprechenden Quantitäten Sauerstoff verwendet worden sind. Die 4te Spalte lehrt jedoch, dass diese Mengen nur etwa die Hälfte der theoretisch zur vollständigen Oxydation erforderlichen betragen. Aus der guten Übereinstimmung zwischen den Werten der geringsten und der grössten Menge oxydierten

Substrates — wobei im ersten Falle eine eventuell anzuwendende Blankokorrektion nicht ohne Bedeutung sein würde — darf man schliessen, dass die Eigenatmung nahezu ganz zurückgedrängt worden ist.

TABELLE IV.

*Sauerstoffaufnahme bei der oxydativen Verarbeitung von Na-Acetat durch Spirillum tenue.*

Quantität des zugefügten Acetates, ccm. einer 0,1 molaren Lösung.	Verbrauchter Sauerstoff in cmm.		
	Theoretisch; berechnet für vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.
0,1	448	236	52,7
0,2	896	457	51,0
0,3	1344	692	51,5
0,4	1792	929	51,8

Dies ist desto auffallender, weil die Eigenatmung bei diesem Versuche und im allgemeinen bei *Spirillum tenue* im Vergleich mit der Geschwindigkeit, mit der mehrere Substrate oxydiert werden, ziemlich hoch ist.

Da die Eigenatmung bei den anderen untersuchten *Spirillum*-Arten gering ist (vergl. hierzu z.B. Figur 4), habe ich bei der Berechnung der Ergebnisse der hiernach zu erwähnenden Versuche auch stets unterlassen eine Blankokorrektion anzubringen.

### § 3. DIE OXYDATIVE VERARBEITUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN DURCH *SPIRILLUM SERPENS* (MÜLLER) WINTER.

*Spirillum serpens* stellt wegen seiner grossen Zellen und leichten Züchtbarkeit ein äusserst geeignetes Objekt für manometrische Versuche dar. Um mich möglichst gut in die Methodik einzuarbeiten, habe ich eine grosse Anzahl Versuche mit diesem Organismus gemacht. Meist wurden die Zellen kultiviert auf Peptonagar, ein einziges Mal auch wohl auf Peptonagar mit 0,5% Ca-Laktat. Auf letztgenanntem Nährboden entstehen recht zierlich gewundene und gut bewegliche Zellen, die sehr volutinreich sind. Für das Ergebnis der Versuche ist es aber gleichgültig, welchen Nährboden man verwendet.

Es mag hier vielleicht noch erwähnt werden, dass man in der Beweglichkeit der Zellen ein recht taugliches Kontrollmittel besitzt hinsichtlich des „Gesundheitszustandes“ der Zellen. Während nämlich nach Beendigung eines Versuches die Zellen in den substratenthaltenden Gefässen wegen ihrer grossen Beweglichkeit einen höchst eindrucksvollen Anblick darbieten, sind die Zellen im Kontrollgefäss infolge der „Hungerkur“ grösstenteils unbeweglich.

Die gleichen Erscheinungen, welche sich bei dem im vorhergehenden Paragraphen besprochenen Versuch über die Acetat-Verarbeitung durch *Spirillum tenue* zeigen, treten auch bei der oxydativen Verarbeitung verschiedener organischer Verbindungen durch *Spirillum serpens* auf. Die primäre Umwandlung des Substrates geht schnell vor sich und resultiert offenbar in der Bildung eines ziemlich stabilen Assimilationsproduktes. Die weitere Oxydation dieses Produktes erfolgt langsam. Auch die respiratorischen Quotienten zeigten sich in mehreren Fällen wiederum verschieden. Bei einem Versuche hatte die primäre Oxydation von Na-Acetat z.B. einen respiratorischen Quotienten 1.04; der respiratorische Quotient der zweiten Oxydationsphase belief sich hingegen auf 0.92. Bei einem Versuche mit Propionat waren diese Zahlen 0.70 bzw. 0.88.

Tabelle V zeigt die Mengen aufgenommenen Sauerstoffs und gebildeter Kohlensäure bei der Oxydation einiger organischer Säuren. Die Daten dieser Tabelle sind zusammengefasst in Tabelle VI, in der der aufgenommene Sauerstoff und die gebildete Kohlensäure wiedergegeben sind als Moleküle pro Molekül umgewandelten Substrates. Die in solcher Weise erhaltenen Zahlen werden mit den zur vollständigen Oxydation zu Kohlensäure und Wasser berechneten Zahlen verglichen.

Aus den Tabellen geht hervor, dass die primäre Oxydation der verschiedenen Verbindungen immer eine unvollständige ist. Während man bei der Oxydation von Propionsäure und Bernsteinsäure noch 70—80% des Kohlenstoffs als Kohlensäure wiederfindet, wird der Kohlenstoff von Essigsäure zu nur 50% zu Kohlensäure oxydiert.

Weiter zieht es die Aufmerksamkeit auf sich, dass die Mengen Sauerstoff und Kohlensäure in einem einfachen stöchiometrischen Verhältnis zu den Mengen umgewandelten Substrates stehen. Bei der Oxydation von Essigsäure wird z.B. pro 1 Molekül Substrat gerade ein Molekül Sauerstoff aufgenommen und gleichfalls 1 Molekül Kohlensäure gebildet. Auch bei den anderen Verbindungen lassen sich jedenfalls annähernd derartige einfachen Verhältnisse zurückfinden.

Wie schon bemerkt, sind jedoch diese Verhältnisse niemals den theoreti-

TABELLE V.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum serpens*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbrauchter Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,1	448	249	55,5					1
	2	0,2	896	442	49,3	896	468	52,2	1,06	2
	3	0,1	448	242	54,0	448	246	54,9	1,01	3
	4	0,2	896	453	50,6	896	473	52,8	1,04	3
	5	0,2	896	490	54,7	896	543	60,6	1,11	5
	6	0,2	896	493	55,0	896	487	54,4	0,99	6
	7	0,2	896	428	47,8	896	465	51,9	1,09	7
	8	0,1	448	261	58,3					8
	9	0,2	896	523	58,4					9
	10	0,3	1344	792	58,9					10
	11	0,05	224	119	53,1					11
	12	0,1	448	223	49,8					12
	13	0,2	896	393	43,9					13
	14	0,1	448	192	42,9					14
	15	0,1	448	209	46,7					15
	16	0,2	896	449	50,1					16
	17	0,3	1344	715	53,2					17
	18	0,2	896	403	45,0					18
	19	0,2	896	412	46,0					19
	20	0,2	896	442	49,4	896	471	52,6	1,05	20
	21	0,1	448	233	52,0					21
	22	0,2	896	458	51,1					22
	23	0,2	896	480	53,6	896	500	55,8	1,04	23
	24	0,05	224	99	44,2					24
	25	0,1	448	246	54,9					25
	26	0,1	448	242	54,0					26
	27	0,1	448	240	53,6					27
	28	0,2	896	463	51,7	896	487	54,5	1,05	28
	29	0,2	896	420	46,9	896	436	48,7	1,04	29
	30	0,1	448	222	49,6					30
	31	0,2	896	431	48,1	896	450	50,2	1,04	31
Propionsäure	32	0,05	392	332	84,7					32
	33	0,1	784	684	87,2					33
	34	0,1	784	637	81,3	672	543	80,8	0,85	34
	35	0,1	784	692	88,3					35
	36	0,2	1568	1314	83,8					36
	37	0,1	784	668	85,2					37
	38	0,1	784	677	86,4	672	569	84,7	0,84	38
	39	0,2	1568	1339	85,4	1344	1230	91,5	0,84	39
	40	0,1	784	697	88,9					40

TABELLE V.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum serpens*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,1	448	249	55,5					1
	2	0,2	896	442	49,3	896	468	52,2	1,06	2
	3	0,1	448	242	54,0	448	246	54,9	1,01	3
	4	0,2	896	453	50,6	896	473	52,8	1,04	3
	5	0,2	896	490	54,7	896	543	60,6	1,11	5
	6	0,2	896	493	55,0	896	487	54,4	0,99	6
	7	0,2	896	428	47,8	896	465	51,9	1,09	7
	8	0,1	448	261	58,3					8
	9	0,2	896	523	58,4					9
	10	0,3	1344	792	58,9					10
	11	0,05	224	119	53,1					11
	12	0,1	448	223	49,8					12
	13	0,2	896	393	43,9					13
	14	0,1	448	192	42,9					14
	15	0,1	448	209	46,7					15
	16	0,2	896	449	50,1					16
	17	0,3	1344	715	53,2					17
	18	0,2	896	403	45,0					18
	19	0,2	896	412	46,0					19
	20	0,2	896	442	49,4	896	471	52,6	1,05	20
	21	0,1	448	233	52,0					21
	22	0,2	896	458	51,1					22
	23	0,2	896	480	53,6	896	500	55,8	1,04	23
	24	0,05	224	99	44,2					24
	25	0,1	448	246	54,9					25
	26	0,1	448	242	54,0					26
	27	0,1	448	240	53,6					27
	28	0,2	896	463	51,7	896	487	54,5	1,05	28
	29	0,2	896	420	46,9	896	436	48,7	1,04	29
	30	0,1	448	222	49,6					30
	31	0,2	896	431	48,1	896	450	50,2	1,04	31
Propionsäure	32	0,05	392	332	84,7					32
	33	0,1	784	684	87,2					33
	34	0,1	784	637	81,3	672	543	80,8	0,85	34
	35	0,1	784	692	88,3					35
	36	0,2	1568	1314	83,8					36
	37	0,1	784	668	85,2					37
	38	0,1	784	677	86,4	672	569	84,7	0,84	38
	39	0,2	1568	1339	85,4	1344	1230	91,5	0,84	39
	40	0,1	784	697	88,9					40

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
n. Buttersäure	41	0,05	560	298	53,2	448	209	46,6	0,70	41
	42	0,1	1120	591	52,8	896	407	45,4	0,69	42
	43	0,2	2240	1129	50,4					43
	44	0,05	560	303	54,1					44
	45	0,1	1120	565	50,4	896	367	41,0	0,65	45
	46	0,1	1120	585	52,2					46
	47	0,1	1120	540	48,2					47
	48	0,2	2240	1086	48,5					48
	49	0,3	3360	1646	49,0					49
	50	0,4	4480	2357	52,5					50
	51	0,1	1120	688	61,4					51
	52	0,2	2240	1104	49,3					52
	53	0,1	1120	645	57,6	896	460	51,3	0,71	53
	54	0,05	560	308	55,0					54
	55	0,1	1120	546	48,8					55
	56	0,1	1120	504	45,0					56
	57	0,1	1120	507	45,3					57
	58	0,1	1120	652	58,2	896	455	50,8	0,70	58
	59	0,1	1120	591	52,8					59
	60	0,2	2240	1156	51,6	1792	773	43,1	0,67	60
	61	0,1	1120	620	55,4					61
	62	0,1	1120	568	50,6	896	385	43,0	0,68	62
Milchsäure	63	0,2	1344	871	64,8	1344	868	64,6	1,00	63
	64	0,05	336	240	71,4					64
	65	0,1	672	451	67,1					65
	66	0,2	1344	868	64,6	1344	876	65,2	1,01	66
	67	0,1	672	420	62,5					67
	68	0,1	672	449	66,8					68
	69	0,2	1344	867	64,5	1344	856	63,7	0,99	69
	70	0,2	1344	867	64,5	1344	852	63,4	0,98	70
	71	0,2	1344	856	63,7	1344	836	62,1	0,98	71
	72	0,1	672	465	69,2					72
	73	0,2	1344	886	65,9	1344	883	65,7		73
Brenztraubensäure	74	0,3	1680	982	58,5	2016	1245	61,8	1,27	74
	75	0,3	1680	970	57,7	2016	1234	61,2	1,27	75
	76	0,3	1680	884	52,6	2016	1150	57,0	1,30	76
	77	0,3	1680	856	51,0	2016	1117	55,4	1,30	77
	78	0,3	1680	1005	59,8	2016	1273	63,1	1,27	78
	79	0,3	1680	1018	60,6	2016	1287	63,8	1,26	79
Bernsteinsäure	80	0,1	784	659	84,1					80
	81	0,1	784	624	79,6					81
	82	0,1	784	583	74,4	896	671	74,9	1,14	82
	83	0,1	784	647	82,5					83
	84	0,1	784	644	82,1	896	743	82,9	1,15	84

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
n. Buttersäure	41	0,05	560	298	53,2	448	209	46,6	0,70	41
	42	0,1	1120	591	52,8	896	407	45,4	0,69	42
	43	0,2	2240	1129	50,4					43
	44	0,05	560	303	54,1					44
	45	0,1	1120	565	50,4	896	367	41,0	0,65	45
	46	0,1	1120	585	52,2					46
	47	0,1	1120	540	48,2					47
	48	0,2	2240	1086	48,5					48
	49	0,3	3360	1646	49,0					49
	50	0,4	4480	2357	52,5					50
	51	0,1	1120	688	61,4					51
	52	0,2	2240	1104	49,3					52
	53	0,1	1120	645	57,6	896	460	51,3	0,71	53
	54	0,05	560	308	55,0					54
	55	0,1	1120	546	48,8					55
	56	0,1	1120	504	45,0					56
	57	0,1	1120	507	45,3					57
	58	0,1	1120	652	58,2	896	455	50,8	0,70	58
	59	0,1	1120	591	52,8					59
	60	0,2	2240	1156	51,6	1792	773	43,1	0,67	60
	61	0,1	1120	620	55,4					61
	62	0,1	1120	568	50,6	896	385	43,0	0,68	62
Milchsäure	63	0,2	1344	871	64,8	1344	868	64,6	1,00	63
	64	0,05	336	240	71,4					64
	65	0,1	672	451	67,1					65
	66	0,2	1344	868	64,6	1344	876	65,2	1,01	66
	67	0,1	672	420	62,5					67
	68	0,1	672	449	66,8					68
	69	0,2	1344	867	64,5	1344	856	63,7	0,99	69
	70	0,2	1344	867	64,5	1344	852	63,4	0,98	70
	71	0,2	1344	856	63,7	1344	836	62,1	0,98	71
	72	0,1	672	465	69,2					72
	73	0,2	1344	886	65,9	1344	883	65,7		73
Brenztraubensäure	74	0,3	1680	982	58,5	2016	1245	61,8	1,27	74
	75	0,3	1680	970	57,7	2016	1234	61,2	1,27	75
	76	0,3	1680	884	52,6	2016	1150	57,0	1,30	76
	77	0,3	1680	856	51,0	2016	1117	55,4	1,30	77
	78	0,3	1680	1005	59,8	2016	1273	63,1	1,27	78
	79	0,3	1680	1018	60,6	2016	1287	63,8	1,26	79
Bernsteinsäure	80	0,1	784	659	84,1					80
	81	0,1	784	624	79,6					81
	82	0,1	784	583	74,4	896	671	74,9	1,14	82
	83	0,1	784	647	82,5					83
	84	0,1	784	644	82,1	896	743	82,9	1,15	84

schen, für vollständige Oxydation zu Kohlensäure und Wasser berechnet, gleich. Da nun die Molekularmengen der bei diesen unvollständigen Oxydationen reagierenden Stoffe — Sauerstoff und Substrat — und eines

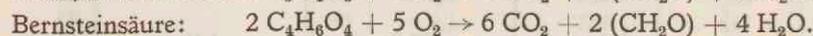
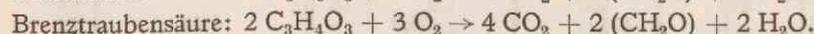
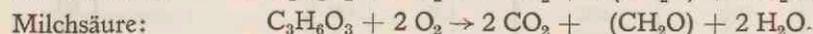
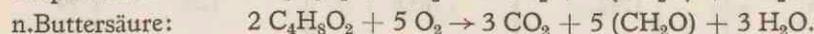
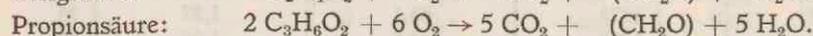
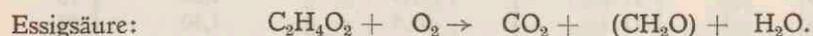
TABELLE VI.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum serpens*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die theoretischen Werte sind für vollständige Oxydation zu Kohlensäure und Wasser berechnet worden.

Substrat	Verbrauchter Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	2.00	1.03	2.00	1.07	1.00	1.05
Propionsäure	3.50	3.00	3.00	2.49	0.86	0.84
n. Buttersäure	5.00	2.60	4.00	1.84	0.80	0.69
Milchsäure	3.00	1.98	3.00	1.91	1.00	0.99
Brenztraubensäure	2.50	1.42	3.00	1.81	1.20	1.28
Bernsteinsäure	3.50	2.82	4.00	3.16	1.14	1.15

der Reaktionsprodukte — Kohlensäure — bekannt sind, ist es möglich, die empirische Zusammensetzung des anderen Produktes (oder der anderen Produkte) abzuleiten. Es ist nun angebracht zu prüfen ob, genau wie bei den BARKERSchen Versuchen mit *Prototheca Zopfii*, auch hier der nicht als Kohlensäure zurückgefundene Kohlenstoff des Substrats in der Zusammensetzung eines Kohlenhydrats auftritt.

Der Umstand, dass es tatsächlich möglich ist, die Substanzbilanz schliessend zu machen durch die Annahme, dass Kohlenhydrat — neben Wasser — gebildet wird, spricht sehr zu Gunsten dieser Ansicht:



Um ein derartiges Ergebnis zu bekommen, war es jedoch nötig, die experimentell gefundenen Daten für den Gaswechsel einigermaßen abzurunden, sodass ganzzahlige Molekülverhältnisse resultierten. Tabelle VII gibt eine Übersicht von der Grösse dieser Korrekturen.

TABELLE VII.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum serpens*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die als „theoretisch“ angegebenen Werte sind diejenigen, welche den gegebenen Gleichungen zu Grunde gelegt worden sind.

Substrat	Verbrauchter Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	1.00	1.03	1.00	1.07	1.00	1.05
Propionsäure	3.00	3.00	2.50	2.49	0.83	0.84
n. Buttersäure	3.00	2.60	2.00	1.84	0.66	0.69
Milchsäure	2.00	1.98	2.00	1.91	1.00	0.99
Brenztraubensäure	1.50	1.42	2.00	1.81	1.33	1.28
Bernsteinsäure	2.50	2.82	3.00	3.16	1.20	1.15

Der Unterschied zwischen den experimentellen und den in Rechnung gebrachten Daten ist zu vernachlässigen für Essigsäure, Propionsäure und Milchsäure; die Übereinstimmung ist jedoch etwas weniger gut für Bernsteinsäure und Brenztraubensäure. Bernsteinsäure wird nur langsam von *Spirillum serpens* oxydiert, sodass hierbei die Eigenatmung möglicherweise nicht ganz zu vernachlässigen ist. Bei Buttersäure ist allerdings die notwendige Korrektur merklich grösser als bei den anderen Verbindungen.

Immerhin weisen die für diese 6 Verbindungen erhaltenen Zahlen darauf hin, dass das neben der Kohlensäure gebildete Oxydationsprodukt von *Spirillum serpens* ungefähr die Zusammensetzung eines Kohlenhydrates hat. Die Tatsache, dass dies zutrifft unabhängig von der Konstitution der oxydierten Verbindung ist eine kräftige Stütze für die Annahme, dass dieser Stoff in der Tat assimiliert und nicht ausgeschieden wird. Bei der Oxydation organischer Verbindungen durch Essigbakterien wird nämlich in manchen Fällen ein unvollkommen oxydiertes Produkt ausge-

schieden. Dieses Produkt kann jedoch recht verschiedenartig sein und wird gänzlich durch die Konstitution der oxydierten Verbindung bedingt.

Kommen wir jetzt noch einmal auf die Tabellen zurück, so fällt es auf, wie sehr die Mengen des Assimilationsproduktes bei den verschiedenen Verbindungen auseinanderlaufen. Während bei Essigsäure 50% des Kohlenstoffs assimiliert wird, geht bei Propionsäure nicht weniger als etwa 80% als Kohlensäure verloren.

Auch Bernsteinsäure wird mit einer geringen Ausbeute assimiliert. Die Regelmässigkeit, welche BARKER für *Prototheca* feststellte, nämlich dass im allgemeinen die Menge des Assimilationsproduktes, gebildet pro Molekül umgewandelter Fettsäure, mit der Länge der Kohlenstoffkette zunimmt, trifft hier nicht zu. Während bei der Oxydation von 1 Mol Essigsäure 1 Mol  $\text{CH}_2\text{O}$  und bei der Oxydation von Buttersäure ungefähr 2,5 Molen  $\text{CH}_2\text{O}$  gebildet werden, erhalten wir bei der Umwandlung von 1 Mol Propionsäure nur 0,5 Mol  $\text{CH}_2\text{O}$ .

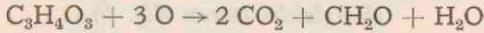
Schliesslich werde ich noch erwähnen, dass sich während der Oxydation von Brenztraubensäure Erscheinungen feststellen liessen, welche von denjenigen bei der Oxydation der anderen organischen Verbindungen wesentlich abwichen. Es zeigte sich nämlich, dass, während die Druckänderungen in dem zur Ermittlung der Sauerstoffaufnahme verwendeten Gefässe einen normalen Verlauf aufwiesen, diese Änderungen in dem zur Kohlensäurebestimmung gebrauchten Gefässe ganz anders verliefen. Im Anfang wurde offenbar ein Übermass an Kohlensäure produziert. Dies veranlasste mich zu einer näheren Prüfung dieser Sachlage, indem ich die respiratorischen Quotienten für verschiedene Perioden der Substratverarbeitung bestimmte. Im Anschluss hieran wurde dies auch bei einem Laktat-Versuch festgestellt. Wie in Figur 5 und in Tabelle VIII angegeben zeigte es sich hierbei, dass der respiratorische Quotient bei der Oxydation von Laktat während der ganzen Periode der Substratverarbeitung praktisch gleich 1 ist. Dagegen liegt der respiratorische Quotient bei der Oxydation von Pyruvat im Anfangstrajekt AB weit oberhalb 1, kommt im zweiten Trajekt BC in die Nähe von 1 und fällt im letzten Trajekt CD beträchtlich unterhalb 1. Diese Abnahme des respiratorischen Quotienten weist darauf hin, dass während des Oxydationsprozesses zwei oder mehr Prozesse neben oder nach einander verlaufen. Wenn wir uns eine Vorstellung von den möglicherweise stattfindenden Prozessen machen wollen, liegt es nahe an eine Dekarboxylierung des Brenztraubensäuremoleküls zu denken unter Bildung eines Moleküls Acetaldehyds und eines Moleküls Kohlensäure.



Der respiratorische Quotient dieser Reaktion ist  $\infty$ . Hierauf würde dann eine (unvollkommene) Oxydation des Acetaldehyds nach folgender Gleichung vor sich gehen:



Der respiratorische Quotient dieser Reaktion beträgt 0,67; der respiratorische Quotient der Gesamtreaktion:



ist 1.33.

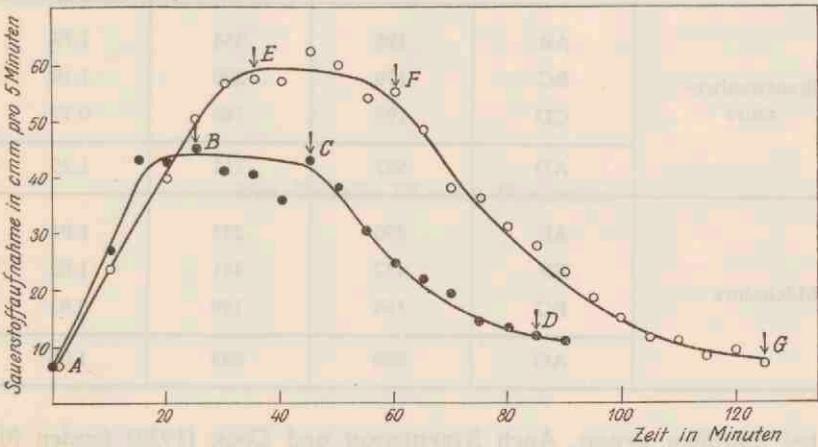


Fig. 5.

Die Sauerstoffaufnahme während der Verarbeitung von 0,15 ccm einer 0,1 molaren Na-Pyruvat Lösung (●), bzw. 0,2 ccm einer 0,1 molaren Ca-Laktat Lösung (○), durch *Spirillum serpens*. Bei den mit Pfeilen markierten Punkten ist auch die Menge der gebildeten Kohlensäure bestimmt worden. (Vergleiche hierzu Tabelle VIII).

Die in der Tabelle VIII verzeichneten Werte für den Verlauf des respiratorischen Quotienten während des Oxydationsprozesses stehen in gutem Einklang mit dieser Vorstellung, falls man annimmt, dass die Dekarboxylierung der Brenztraubensäure und die daran anschließende Oxydation des Acetaldehyds in den Zellen nebeneinander stattfinden.

Es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu bemerken, dass MEYERHOF (1925) bei der Oxydation von Acetaldehyd durch Presshefe einen respi-

ratorischen Quotienten = 0.69 feststellen konnte, was darauf hinweist, dass die Oxydation von Acetaldehyd hier auf ähnliche Weise verläuft wie

TABELLE VIII.

Die im Laufe der oxydativen Verarbeitung von 0,15 ccm einer 0,1 molaren Na-Pyruvat-Lösung, bzw. 0,2 ccm einer 0,1 molaren Ca-Laktat-Lösung durch *Spirillum serpens* gefundenen respiratorischen Quotienten.

(Vergleiche hierzu Fig. 5).

Substrat	Trajekt der Substratverarbeitung.	Verbrauchter Sauerstoff in cmm.	Gebildete Kohlensäure in cmm.	Respiratorischer Quotient.
Brenztraubensäure	AB	198	354	1.79
	BC	176	209	1.19
	CD	193	148	0.77
	AD	567	711	1.25
Milchsäure	AE	290	293	1.01
	EF	432	441	1.02
	FG	164	149	0.91
	AG	886	883	1.00

bei *Spirillum serpens*. Auch STEPHENSON und COOK (1928) fanden für *Bacterium coli*, dass bei der vollständigen Umwandlung eines Moleküls Brenztraubensäure 1,5 Moleküle Sauerstoff verbraucht werden. Es ist wahrscheinlich, dass die (unvollkommene) Oxydation der Brenztraubensäure auch hier auf ähnliche Weise wie bei *Spirillum serpens* vor sich geht.

#### § 4. DIE OXYDATIVE VERARBEITUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN DURCH *SPIRILLUM ITERSONII* NOV. SPEC.

In den Tabellen IX und X sind die Ergebnisse, die bei der oxydativen Verarbeitung einiger organischer Verbindungen durch *Spirillum Itersonii* erhalten wurden, zusammengefasst.

Es ist deutlich, dass auch hier die primäre Oxydation der verschiedenen Verbindungen immer eine unvollständige ist, während überdies die Mengen Sauerstoff und Kohlensäure annähernd in einem einfachen stöchiometrischen Verhältnis zu den Mengen umgewandelten Substrates

Verzeichnis der ...

Kategorie		Bezeichnung	Wert	Einheit	Vermerk
1.01	100	100	1.0	1	
1.02	200	200	2.0	2	
1.03	300	300	3.0	3	
1.04	400	400	4.0	4	
1.05	500	500	5.0	5	
1.06	600	600	6.0	6	
1.07	700	700	7.0	7	
1.08	800	800	8.0	8	
1.09	900	900	9.0	9	
1.10	1000	1000	10.0	10	
1.11	1100	1100	11.0	11	
1.12	1200	1200	12.0	12	
1.13	1300	1300	13.0	13	
1.14	1400	1400	14.0	14	
1.15	1500	1500	15.0	15	
1.16	1600	1600	16.0	16	
1.17	1700	1700	17.0	17	
1.18	1800	1800	18.0	18	
1.19	1900	1900	19.0	19	
1.20	2000	2000	20.0	20	
1.21	2100	2100	21.0	21	
1.22	2200	2200	22.0	22	
1.23	2300	2300	23.0	23	
1.24	2400	2400	24.0	24	
1.25	2500	2500	25.0	25	
1.26	2600	2600	26.0	26	
1.27	2700	2700	27.0	27	
1.28	2800	2800	28.0	28	
1.29	2900	2900	29.0	29	
1.30	3000	3000	30.0	30	
1.31	3100	3100	31.0	31	
1.32	3200	3200	32.0	32	
1.33	3300	3300	33.0	33	
1.34	3400	3400	34.0	34	
1.35	3500	3500	35.0	35	
1.36	3600	3600	36.0	36	
1.37	3700	3700	37.0	37	
1.38	3800	3800	38.0	38	
1.39	3900	3900	39.0	39	
1.40	4000	4000	40.0	40	
1.41	4100	4100	41.0	41	
1.42	4200	4200	42.0	42	
1.43	4300	4300	43.0	43	
1.44	4400	4400	44.0	44	
1.45	4500	4500	45.0	45	
1.46	4600	4600	46.0	46	
1.47	4700	4700	47.0	47	
1.48	4800	4800	48.0	48	
1.49	4900	4900	49.0	49	
1.50	5000	5000	50.0	50	

Für Tabelle IX siehe Rückseite.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum Itersonii*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,2	896	441	49,2					1
	2	0,1	448	245	54,7					2
	3	0,2	896	380	42,4	896	416	46,8	1,09	3
	4	0,2	896	483	53,9					4
	5	0,2	896	475	53,0	896	501	55,9	1,05	5
	6	0,2	896	454	50,7	896	487	54,4	1,07	6
	7	0,2	896	460	51,3	896	485	54,1	1,05	7
Propionsäure	8	0,2	1568	1108	70,7	1344	881	65,5	0,80	8
	9	0,1	784	551	70,3	672	435	72,2	0,79	9
	10	0,1	784	503	64,2	672	388	57,7	0,77	10
	11	0,2	1568	1244	79,3	1344	1031	76,7	0,83	11
	12	0,2	1568	1260	80,4	1344	954	71,0	0,76	12
n. Buttersäure	13	0,1	1120	452	40,4					13
	14	0,2	2240	893	39,9					14
	15	0,2	2240	864	38,6					15
	16	0,2	2240	967	43,2	1792	714	39,8	0,74	16
	17	0,2	2240	945	42,2	1792	630	35,2	0,67	17
	18	0,2	2240	877	39,2	1792	564	31,5	0,64	18
	19	0,2	2240	958	42,8	1792	636	35,5	0,66	19
	20	0,2	2240	968	43,2	1792	630	35,2	0,65	20
	* 21	0,2		364			238		0,66	21
	* 22	0,2		484			293		0,61	22
Milchsäure	23	0,2	1344	834	62,1	1344	852	63,4	1,02	23
	24	0,1	672	428	63,7	672	428	63,7	1,00	24
	25	0,1	672	482	71,7					25
	26	0,2	1344	799	59,4					26
	27	0,2	1344	933	69,4					27
Brenztraubensäure	28	0,1	560	338	60,4					28
	29	0,1	560	334	59,6					29
	30	0,1	560	368	65,7					30
	31	0,2	1120	638	57,0					31
	32	0,2	1120	785	70,1	1344	974	72,5	1,24	32
	33	0,2	1120	638	57,0	1344	884	66,1	1,39	33
	34	0,2	1120	689	61,5	1344	911	67,8	1,32	34
	35	0,2	1120	745	66,5	1344	937	69,7	1,26	35
Bernsteinsäure	36	0,2	1568	868	55,2	1792	1097	61,1	1,26	36
	37	0,2	1568	810	51,7	1792	1058	59,0	1,31	37
	38	0,2	1568	832	53,1					38
	39	0,2	1568	838	53,4	1792	1038	57,9	1,24	39
	40	0,2	1568	774	49,5	1792	1027	57,4	1,33	40
	41	0,2	1568	782	49,9	1792	1046	58,4	1,34	41
	42	0,2	1568	772	49,2	1792	975	54,4	1,26	42
	43	0,2	1568	806	51,4	1792	1056	58,9	1,31	43
	44	0,2	1568	817	52,1					44
	45	0,3	2352	1174	49,9					45
46	0,4	3136	1604	51,1					46	

\* Versuch beendet bevor das Substrat völlig verbraucht war.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch Spirillum Itersonii.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,2	896	441	49,2					1
	2	0,1	448	245	54,7					2
	3	0,2	896	380	42,4	896	416	46,8	1,09	3
	4	0,2	896	483	53,9					4
	5	0,2	896	475	53,0	896	501	55,9	1,05	5
	6	0,2	896	454	50,7	896	487	54,4	1,07	6
	7	0,2	896	460	51,3	896	485	54,1	1,05	7
Propionsäure	8	0,2	1568	1108	70,7	1344	881	65,5	0,80	8
	9	0,1	784	551	70,3	672	435	72,2	0,79	9
	10	0,1	784	503	64,2	672	388	57,7	0,77	10
	11	0,2	1568	1244	79,3	1344	1031	76,7	0,83	11
	12	0,2	1568	1260	80,4	1344	954	71,0	0,76	12
n. Buttersäure	13	0,1	1120	452	40,4					13
	14	0,2	2240	893	39,9					14
	15	0,2	2240	864	38,6					15
	16	0,2	2240	967	43,2	1792	714	39,8	0,74	16
	17	0,2	2240	945	42,2	1792	630	35,2	0,67	17
	18	0,2	2240	877	39,2	1792	564	31,5	0,64	18
	19	0,2	2240	958	42,8	1792	636	35,5	0,66	19
	20	0,2	2240	968	43,2	1792	630	35,2	0,65	20
	* 21	0,2		364			238		0,66	21
	* 22	0,2		484			293		0,61	22
Milchsäure	23	0,2	1344	834	62,1	1344	852	63,4	1,02	23
	24	0,1	672	428	63,7	672	428	63,7	1,00	24
	25	0,1	672	482	71,7					25
	26	0,2	1344	799	59,4					26
	27	0,2	1344	933	69,4					27
Brenztraubensäure	28	0,1	560	338	60,4					28
	29	0,1	560	334	59,6					29
	30	0,1	560	368	65,7					30
	31	0,2	1120	638	57,0					31
	32	0,2	1120	785	70,1	1344	974	72,5	1,24	32
	33	0,2	1120	638	57,0	1344	884	66,1	1,39	33
	34	0,2	1120	689	61,5	1344	911	67,8	1,32	34
	35	0,2	1120	745	66,5	1344	937	69,7	1,26	35
Bernsteinsäure	36	0,2	1568	868	55,2	1792	1097	61,1	1,26	36
	37	0,2	1568	810	51,7	1792	1058	59,0	1,31	37
	38	0,2	1568	832	53,1					38
	39	0,2	1568	838	53,4	1792	1038	57,9	1,24	39
	40	0,2	1568	774	49,5	1792	1027	57,4	1,33	40
	41	0,2	1568	782	49,9	1792	1046	58,4	1,34	41
	42	0,2	1568	772	49,2	1792	975	54,4	1,26	42
	43	0,2	1568	806	51,4	1792	1056	58,9	1,31	43
	44	0,2	1568	817	52,1					44
	45	0,3	2352	1174	49,9					45
	46	0,4	3136	1604	51,1					46

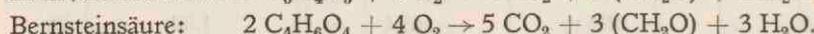
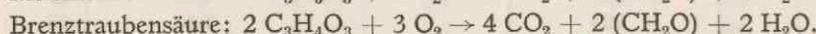
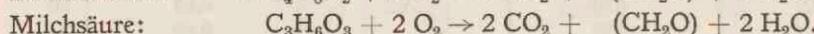
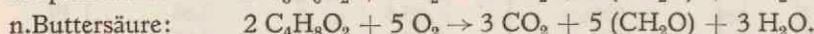
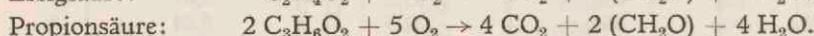
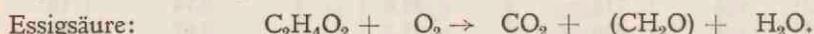
\* Versuch beendet bevor das Substrat völlig verbraucht war.

TABELLE X.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum Itersonii*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die theoretischen Werte sind für vollständige Oxydation zu Kohlensäure und Wasser berechnet worden.

Substrat	Verbrauchter Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	2.00	1.02	2.00	1.06	1.00	1.07
Propionsäure	3.50	2.55	3.00	2.01	0.86	0.79
n. Buttersäure	5.00	2.06	4.00	1.44	0.80	0.66
Milchsäure	3.00	1.96	3.00	1.91	1.00	1.01
Brenztraubensäure	2.50	1.55	3.00	2.06	1.20	1.30
Bernsteinsäure	3.50	1.80	4.00	2.33	1.14	1.29

stehen. In dem im vorigen Paragraphen erörterten Sinne können wir die folgenden Gleichungen aufstellen:



Aus der Tabelle XI ist nun zu ersehen, inwieweit die experimentellen Daten von den in Rechnung gebrachten abweichen.

Für Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure und Brenztraubensäure ist die Abweichung zu vernachlässigen. Für Bernsteinsäure ist der Unterschied etwas bedeutender, während für Buttersäure die Korrektur für den verbrauchten Sauerstoff recht beträchtlich ist.

Als merkwürdiger Umstand ergibt sich hierbei, dass zwar die für *Spirillum Itersonii* erhaltenen Gleichungen für Essigsäure, Buttersäure, Milchsäure und Brenztraubensäure den, für *Spirillum serpens* aufgestellten gleich sind, doch dass bei den beiden Arten für Propionsäure und Bernsteinsäure wesentlich andere Verhältnisse zwischen Substrat und Assimilationsprodukt auftreten.

Immerhin scheint es auf Grund der erhaltenen Ergebnisse berechtigt zu schliessen, dass auch das Assimilationsprodukt von *Spirillum*

TABELLE XI.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum Itersonii*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die als „theoretisch“ angegebenen Werte sind diejenigen, welche den gegebenen Gleichungen zu Grunde gelegt worden sind.

Substrat	Verbrauchter Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	1.00	1.02	1.00	1.06	1.00	1.07
Propionsäure	2.50	2.55	2.00	2.01	0.80	0.79
n. Buttersäure	2.50	2.06	1.50	1.44	0.60	0.66
Milchsäure	2.00	1.96	2.00	1.91	1.00	1.01
Brenztraubensäure	1.50	1.55	2.00	2.06	1.33	1.30
Bernsteinsäure	2.00	1.80	2.50	2.33	1.25	1.29

*Itersonii* ungefähr die Zusammensetzung eines Kohlenhydrates hat.

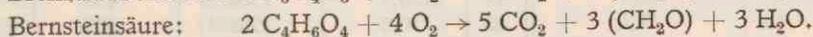
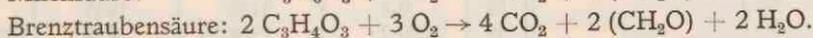
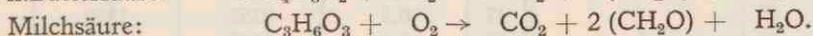
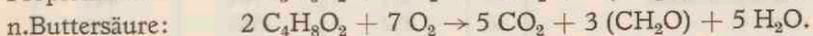
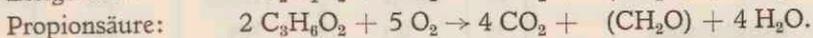
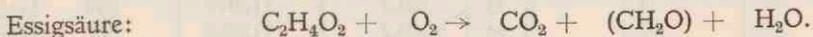
Auch hier konnte aus Versuchen, bei denen der respiratorische Quotient für verschiedene Trajekte der Verarbeitung bestimmt wurde, geschlossen werden, dass die Oxydation der Brenztraubensäure wahrscheinlich über eine Dekarboxylierung zu Acetaldehyd vor sich geht.

#### § 5. DIE OXYDATIVE VERARBEITUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN DURCH *SPIRILLUM TENUE* (MÜLLER) EHRENBERG.

Die Tabellen XII und XIII zeigen die Ergebnisse der Versuche mit *Spirillum tenue*.

Es ist sofort ersichtlich, dass auch hier die Oxydation der verschiedenen Verbindungen immer eine unvollständige ist, während die Mengen Sauerstoff und Kohlensäure annähernd in einem einfachen stöchiometrischen Verhältnis zu den Mengen der umgewandelten Substrate stehen.

In dem im § 3 angegebenen Sinne können wir nun wieder die folgenden Gleichungen aufstellen:



Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum tenue*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,1	448	236	52,7					1
	2	0,2	896	457	51,0					2
	3	0,3	1344	692	51,5					3
	4	0,4	1792	929	51,8					4
	5	0,2	896	425	47,4	896	465	51,9	1,09	5
	6	0,2	896	435	48,5	896	466	51,9	1,07	6
	7	0,2	896	425	47,4	896	446	49,8	1,05	7
Propionsäure	8	0,2	1568	1099	70,1	1344	893	66,4	0,81	8
	9	0,2	1568	1082	69,0	1344	864	64,3	0,80	9
	10	0,1	784	610	68,9	672	522	77,7	0,86	10
	11	0,1	784	598	66,5	672	488	72,6	0,82	11
n. Buttersäure	12	0,3	3360	1913	56,9					12
	13	0,2	2240	1490	66,5	1792	1100	61,4	0,74	13
	14	0,2	2240	1482	66,1	1792	1054	58,8	0,71	14
	15	0,1	1120	804	71,8	896	606	67,6	0,75	15
	16	0,1	1120	790	70,5	896	590	65,8	0,75	16
	17	0,1	1120	693	61,9					17
	18	0,2	2240	1287	57,5					18
	* 19	0,1		317			230		0,73	19
	* 20	0,1		305			214		0,70	20
Milchsäure	21	0,1	672	181	26,9					21
	22	0,2	1344	336	25,0					22
	23	0,3	2016	480	23,8					23
	24	0,4	2688	657	24,4					24
	25	0,2	1344	475	35,3	1344	517	38,5	1,09	25
	26	0,2	1344	450	33,5	1344	514	38,2	1,14	26
	27	0,2	1344	522	38,8	1344	575	42,8	1,10	27
	28	0,2	1344	481	35,8	1344	460	34,2	0,96	28
	29	0,2	1344	415	30,9	1344	423	31,5	1,02	29
	30	0,2	1344	417	31,0	1344	421	31,3	1,01	30
	Brenztraubensäure	31	0,2	1120	757	67,6	1344	956	71,1	1,26
32		0,2	1120	736	65,7	1344	933	69,4	1,27	32
33		0,2	1120	699	62,4	1344	916	68,2	1,31	33
34		0,2	1120	661	59,0	1344	868	64,6	1,31	34
Bernsteinsäure	35	0,1	784	445	56,8					35
	36	0,2	1568	848	54,1					36
	37	0,3	2352	1350	57,4					37
	38	0,4	3136	1685	53,7					38
	39	0,2	1568	858	54,7	1792	1079	60,2	1,26	39
	40	0,2	1568	952	60,7	1792	1166	65,1	1,22	40
	41	0,2	1568	909	58,0	1792	1165	65,0	1,28	41

\* Versuch beendet bevor das Substrat völlig verbraucht war.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum tenue*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbraucher Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,1	448	236	52,7					1
	2	0,2	896	457	51,0					2
	3	0,3	1344	692	51,5					3
	4	0,4	1792	929	51,8					4
	5	0,2	896	425	47,4	896	465	51,9	1,09	5
	6	0,2	896	435	48,5	896	466	51,9	1,07	6
	7	0,2	896	425	47,4	896	446	49,8	1,05	7
Propionsäure	8	0,2	1568	1099	70,1	1344	893	66,4	0,81	8
	9	0,2	1568	1082	69,0	1344	864	64,3	0,80	9
	10	0,1	784	610	68,9	672	522	77,7	0,86	10
	11	0,1	784	598	66,5	672	488	72,6	0,82	11
n. Buttersäure	12	0,3	3360	1913	56,9					12
	13	0,2	2240	1490	66,5	1792	1100	61,4	0,74	13
	14	0,2	2240	1482	66,1	1792	1054	58,8	0,71	14
	15	0,1	1120	804	71,8	896	606	67,6	0,75	15
	16	0,1	1120	790	70,5	896	590	65,8	0,75	16
	17	0,1	1120	693	61,9					17
	18	0,2	2240	1287	57,5					18
	* 19	0,1		317			230		0,73	19
	* 20	0,1		305			214		0,70	20
	Milchsäure	21	0,1	672	181	26,9				
22		0,2	1344	336	25,0					22
23		0,3	2016	480	23,8					23
24		0,4	2688	657	24,4					24
25		0,2	1344	475	35,3	1344	517	38,5	1,09	25
26		0,2	1344	450	33,5	1344	514	38,2	1,14	26
27		0,2	1344	522	38,8	1344	575	42,8	1,10	27
28		0,2	1344	481	35,8	1344	460	34,2	0,96	28
29		0,2	1344	415	30,9	1344	423	31,5	1,02	29
30		0,2	1344	417	31,0	1344	421	31,3	1,01	30
Brenztraubensäure		31	0,2	1120	757	67,6	1344	956	71,1	1,26
	32	0,2	1120	736	65,7	1344	933	69,4	1,27	32
	33	0,2	1120	699	62,4	1344	916	68,2	1,31	33
	34	0,2	1120	661	59,0	1344	868	64,6	1,31	34
Bernsteinsäure	35	0,1	784	445	56,8					35
	36	0,2	1568	848	54,1					36
	37	0,3	2352	1350	57,4					37
	38	0,4	3136	1685	53,7					38
	39	0,2	1568	858	54,7	1792	1079	60,2	1,26	39
	40	0,2	1568	952	60,7	1792	1166	65,1	1,22	40
	41	0,2	1568	909	58,0	1792	1165	65,0	1,28	41

\* Versuch beendet bevor das Substrat völlig verbraucht war.

TABELLE XIII.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum tenue*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die theoretischen Werte sind für vollständige Oxydation zu Kohlensäure und Wasser berechnet worden.

Substrat	Verbrauchter Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	2.00	1.00	2.00	1.03	1.00	1.07
Propionsäure	3.50	2.57	3.00	2.11	0.86	0.82
n. Buttersäure	5.00	3.22	4.00	2.54	0.80	0.73
Milchsäure	3.00	0.92	3.00	1.08	1.00	1.05
Brenztraubensäure	2.50	1.59	3.00	2.05	1.20	1.29
Bernsteinsäure	3.50	1.98	4.00	2.53	1.14	1.25

Aus der Tabelle XIV ist zu ersehen, inwieweit die experimentellen Daten von den in Rechnung gebrachten abweichen.

TABELLE XIV.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum tenue*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die als „theoretisch“ angegebenen Werte sind diejenigen, welche den gegebenen Gleichungen zu Grunde gelegt worden sind.

Substrat	Verbrauchter Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	1.00	1.00	1.00	1.03	1.00	1.07
Propionsäure	2.50	2.57	2.00	2.11	0.80	0.82
n. Buttersäure	3.50	3.22	2.50	2.54	0.71	0.73
Milchsäure	1.00	0.92	1.00	1.08	1.00	1.05
Brenztraubensäure	1.50	1.59	2.00	2.05	1.33	1.29
Bernsteinsäure	2.00	1.98	2.50	2.53	1.25	1.25

Für Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure und Bernsteinsäure ist der Unterschied zu vernachlässigen, nur für Buttersäure ist die Korrektur für den verbrauchten Sauerstoff recht bedeutend.

Es fällt sofort auf, dass die gegebenen Gleichungen sich teilweise mit den für *Spirillum serpens* und teilweise mit den für *Spirillum Itersonii* aufgestellten decken. Nur die Milchsäure wird von *Spirillum tenue* offenbar auf andere Weise verarbeitet als von den beiden letztgenannten Arten.

Immerhin kann aus den erhaltenen Ergebnissen geschlossen werden, dass das Assimilationsprodukt von *Spirillum tenue* gleichfalls ungefähr die Zusammensetzung eines Kohlenhydrates hat.

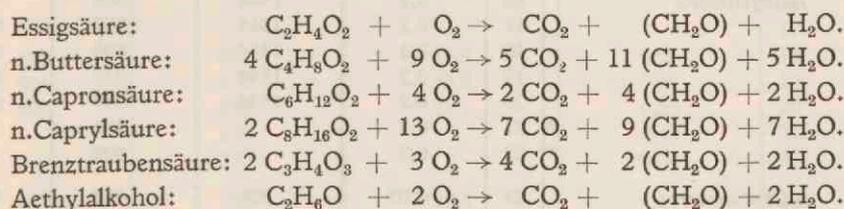
Es konnte festgestellt werden, dass die Oxydation von Brenztraubensäure wahrscheinlich über eine Dekarboxylierung zu Acetaldehyd vor sich geht.

#### § 6. DIE OXYDATIVE VERARBEITUNG ORGANISCHER VERBINDUNGEN DURCH *SPIRILLUM UNDULA* (MÜLLER) EHRENBERG.

Wie schon vorher erwähnt wurde, oxydiert *Spirillum undula* Propionsäure, Milchsäure und Bernsteinsäure so langsam, dass es nicht möglich war, diese Verbindungen als Substrat für Atmungsversuche zu verwenden. Dagegen wurden n.Capronsäure, n.Caprylsäure und Aethylalkohol genügend schnell oxydiert, um ihre Untersuchung zu ermöglichen.

In den Tabellen XV und XVI sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Es ergibt sich hieraus, dass die Oxydation der untersuchten Verbindungen immer eine unvollständige ist. Bei der Auswertung dieser Daten auf die bekannte Weise, erhält man die folgenden Gleichungen:



Aus Tabelle XVII geht hervor, in welchem Masse die experimentell gefundenen Zahlen korrigiert werden müssen.

Für Essigsäure, Brenztraubensäure und Aethylalkohol ist die Korrektur nur sehr gering, jedoch für Buttersäure, Capronsäure und Caprylsäure recht bedeutend.

Es muss in dieser Beziehung allerdings bemerkt werden, dass, was die Capronsäure und die Caprylsäure anbelangt, bei der geringen Zahl der

TABELLE XV.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum undula*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbrauchter Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,1	448	214	47,8					1
	2	0,2	896	541	60,4	896	562	62,7	1,04	2
	3	0,2	896	531	59,3	896	550	61,4	1,04	3
	4	0,2	896	460	51,3	896	480	53,6	1,04	4
	5	0,2	896	457	50,1	896	477	53,2	1,04	5
n. Buttersäure	6	0,1	1120	424	37,9					6
	7	0,1	1120	438	39,1	896	272	30,4	0,62	7
	8	0,1	1120	457	40,8	896	288	32,1	0,63	8
	9	0,1	1120	459	41,0	896	299	33,4	0,65	9
	10	0,1	1120	454	40,5	896	277	30,9	0,61	10
	11	0,1	1120	456	40,7					11
Brenztraubensäure	12	0,2	1120	747	66,7	1344	933	69,4	1,25	12
	13	0,2	1120	730	65,2	1344	907	67,5	1,24	13
	14	0,2	1120	670	59,8	1344	854	63,5	1,27	14
	15	0,2	1120	661	59,0	1344	815	60,6	1,23	15
Aethylalkohol	16	0,2	1344	866	64,4					16
	17	0,2	1344	860	64,0					17
	18	0,2	1344	836	62,2	896	482	53,8	0,58	18
	19	0,2	1344	839	62,4	896	478	53,3	0,57	19
	20	0,2	1344	839	62,4	896	458	51,1	0,55	20
	* 21	0,2		464			226		0,49	21
	* 22	0,2		699			375		0,54	22
n. Capronsäure	23	0,05	896	424	47,3	672	252	37,5	0,69	23
	24	0,05	896	416	46,4	672	238	35,4	0,57	24
n. Caprylsäure	25	0,1	2464	1461	59,3					25
	26	0,05	1232	704	57,1	896	414	46,2	0,59	26
	27	0,05	1232	699	56,7	896	404	45,1	0,58	27

\* Versuch beendet bevor das Substrat völlig verbraucht war.

TABELLE XV.

Sauerstoffaufnahme, Kohlensäurebildung und respiratorischer Quotient bei der oxydativen Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum undula*.

Substrat	Nr.	Zugefügte Quantität ccm einer 0,1 molaren Lösung.	Verbrauchter Sauerstoff in cmm.			Gebildete Kohlensäure in cmm.			Respirato- rischer Quotient.	Nr.
			Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.	Theoretisch; berechnet f. vollständige Oxydation.	Beobachtet.	Prozent der Theorie.		
Essigsäure	1	0,1	448	214	47,8					1
	2	0,2	896	541	60,4	896	562	62,7	1,04	2
	3	0,2	896	531	59,3	896	550	61,4	1,04	3
	4	0,2	896	460	51,3	896	480	53,6	1,04	4
	5	0,2	896	457	50,1	896	477	63,2	1,04	5
n. Buttersäure	6	0,1	1120	424	37,9					6
	7	0,1	1120	438	39,1	896	272	30,4	0,62	7
	8	0,1	1120	457	40,8	896	288	32,1	0,63	8
	9	0,1	1120	459	41,0	896	299	33,4	0,65	9
	10	0,1	1120	454	40,5	896	277	30,9	0,61	10
	11	0,1	1120	456	40,7					11
Brenztraubensäure	12	0,2	1120	747	66,7	1344	933	69,4	1,25	12
	13	0,2	1120	730	65,2	1344	907	67,5	1,24	13
	14	0,2	1120	670	59,8	1344	854	63,5	1,27	14
	15	0,2	1120	661	59,0	1344	815	60,6	1,23	15
Aethylalkohol	16	0,2	1344	866	64,4					16
	17	0,2	1344	860	64,0					17
	18	0,2	1344	836	62,2	896	482	53,8	0,58	18
	19	0,2	1344	839	62,4	896	478	53,3	0,57	19
	20	0,2	1344	839	62,4	896	458	51,1	0,55	20
	* 21	0,2		464			226		0,49	21
	* 22	0,2		699			375		0,54	22
n. Capronsäure	23	0,05	896	424	47,3	672	252	37,5	0,69	23
	24	0,05	896	416	46,4	672	238	35,4	0,57	24
n. Caprylsäure	25	0,1	2464	1461	59,3					25
	26	0,05	1232	704	57,1	896	414	46,2	0,59	26
	27	0,05	1232	699	56,7	896	404	45,1	0,58	27

\* Versuch beendet bevor das Substrat völlig verbraucht war.

TABELLE XVI.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum undula*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die theoretischen Werte sind für vollständige Oxydation zu Kohlensäure und Wasser berechnet worden.

Substrat	Verbraucher Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	2.00	1.08	2.00	1.12	1.00	1.04
n. Buttersäure	5.00	2.00	4.00	1.27	0.80	0.63
n. Capronsäure	8.00	3.75	6.00	2.19	0.75	0.63
n. Caprylsäure	11.00	6.35	8.00	3.66	0.73	0.59
Brenztraubensäure	2.50	1.57	3.00	1.96	1.20	1.25
Aethylalkohol	3.00	1.89	2.00	1.06	0.67	0.55

TABELLE XVII.

Die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen durch *Spirillum undula*. Sauerstoff und Kohlensäure sind in Molen pro Mol verarbeitetes Substrat angegeben worden. Die als „theoretisch“ angegebenen Werte sind diejenigen, welche den gegebenen Gleichungen zu Grunde gelegt worden sind.

Substrat	Verbraucher Sauerstoff.		Gebildete Kohlensäure.		Respiratorischer Quotient.	
	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.	Theoretisch.	Beobachtet.
Essigsäure	1.00	1.08	1.00	1.12	1.00	1.04
n. Buttersäure	2.25	2.00	1.25	1.27	0.56	0.63
n. Capronsäure	4.00	3.75	2.00	2.19	0.50	0.63
n. Caprylsäure	6.50	6.35	3.50	3.66	0.54	0.59
Brenztraubensäure	1.50	1.57	2.00	1.96	1.33	1.25
Aethylalkohol	2.00	1.89	1.00	1.06	0.50	0.55

Versuche und bei der geringen Menge zugefügten Substrates ein geringfügiger Pipettierfehler einen beträchtlichen Einfluss auf das Endergebnis ausüben kann.

Bei einem Vergleich mit den für die anderen *Spirillum*-Arten aufge-

stellten Gleichungen fällt es auf, dass *Spirillum undula* Essigsäure und Brenztraubensäure auf die gleiche Weise oxydiert, dass dagegen Buttersäure wieder ganz anders verarbeitet wird.

Auch hier liefern die erhaltenen Ergebnisse wieder einen Hinweis dafür, dass das gebildete Assimilationsprodukt ungefähr die Zusammensetzung eines Kohlenhydrates hat.

Aus dem Verlaufe des respiratorischen Quotienten konnte gleichfalls geschlossen werden, dass die Oxydation von Brenztraubensäure wahrscheinlich über eine Dekarboxylierung zu Acetaldehyd stattfindet.

#### § 7. EINIGE WEITERE BEOBACHTUNGEN ÜBER DEN ASSIMILATIONSVORGANG.

Die in den vorhergehenden Paragraphen beschriebenen Beobachtungen, welche lehrten, dass unter den gewählten Bedingungen immer ein beträchtlicher Teil des Substrats assimiliert wird, liessen die Frage aufkommen, ob dieser Sachverhalt durch den physiologischen Zustand der für die Versuche benutzten Zellen bedingt wurde, oder ob diese Assimilationsvorgänge stets mit der Atmung verknüpft waren.

Um eine Einsicht in diese Frage zu bekommen, habe ich folgenden Versuch vorgenommen. Es wurde die Art der Substratverarbeitung bei Zellen untersucht, welche vorher reichlich Gelegenheit hatten sich unter aktive Zellvermehrung praktisch ausschliessenden Bedingungen mit Assimilationsprodukten zu sättigen.

Hierzu wurden die wie gewöhnlich auf Peptonagar gezüchteten Zellen von *Spirillum serpens* durch sorgfältiges Abzentrifugieren möglichst vollständig von den Bestandteilen des Peptonagars befreit und dann in einer Phosphatpufferlösung suspendiert. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde nun zu einem manometrischen Versuch benutzt, wobei als Atmungssubstrat 0,2 ccm einer 0,1 molaren Ca-Laktat-Lösung verwendet wurde. Hierbei zeigte es sich, dass erwartungsgemäss pro Mol verarbeiteten Substrates etwa ein Mol  $\text{CH}_2\text{O}$  assimiliert wurde.

Die andere Hälfte der Zellsuspension wurde, nachdem ein Übermass Na-Laktat zugefügt worden war, in einen Erlenmeyer gebracht. Diese wurde dann während etwa 9 Stunden bei 30° C aufbewahrt, wobei durch starkes Schütteln für einen genügenden Sauerstoff-Zutritt zu der Zellsuspension gesorgt wurde. Allerdings trat hierbei eine unerwünschte Verschiebung des pH ein. Um eine Beschädigung der Zellen möglichst zu vermeiden, wurden die Zellen deshalb alle 3 Stunden wieder abzentrifugiert und dann aufs neue in Pufferlösung mit Übermass Na-Laktat suspendiert. Nach

9-stündigem Schütteln wiesen die meisten Zellen noch immer eine gute Beweglichkeit auf, während mikroskopisch keine Entwicklung anderer Mikroorganismen festgestellt werden konnte. Nun wurden die Zellen abermals sehr sorgfältig (zweimal) abzentrifugiert, um eventuell noch vorhandenes Laktat zu entfernen. Darauf wurden sie wieder in der Phosphatpufferlösung suspendiert und diese Zellsuspension für einen manometrischen Versuch benutzt. Es zeigte sich nun, dass bei der Verarbeitung von 0,2 ccm einer 0,1 molaren Ca-Laktat-Lösung noch stets pro Mol Laktat etwa ein Mol  $\text{CH}_2\text{O}$  assimiliert wurde. Dabei war die Atmungsintensität ( $Q_{\text{O}_2}$ ) dieser Zellsuspension allerdings bedeutend niedriger als diejenige der bei dem ersten manometrischen Versuche benutzten Zellsuspension, sodass daraus die Folgerung gezogen werden muss, dass ein Teil der Zellen abgestorben oder stark beschädigt worden war. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Zellsuspensionen bestand darin, dass bei den während 9 Stunden mit einem Übermass Laktat geschüttelten Zellen die Eigenatmung viel grösser war. Dies ist vollkommen begreiflich, da die Zellen während der 9-stündigen Behandlung mit Laktat eine grosse Menge Assimilationsprodukt haben aufspeichern können.

Der Versuch lehrt also, dass auch bei Zellen, welche sich vorher unter Ausschluss von Zellvermehrung mit Assimilationsprodukten haben sättigen können, die Atmung in gleichem Masse mit den Assimilationsvorgängen verknüpft bleibt.

Eine zweite Frage, welcher ich noch näher getreten bin, ist die nach der Natur der gebildeten Assimilationsprodukte.

Da die Assimilation offenbar ebenso gut stattfindet unter Verhältnissen, welche die Zellvermehrung praktisch verhindern, lag es auf der Hand an Reservesubstanzen zu denken.

Wie schon im Kapitel IV häufig erwähnt, bilden alle untersuchten *Spirillum*-Arten unter gewissen Wachstumsverhältnissen reichlich Volutin. Es schien daher wichtig zu untersuchen, ob auch bei den kurzfristigen Atmungsversuchen eine Volutinbildung festzustellen wäre. Es zeigte sich nun, dass dies tatsächlich zutraf.

Bei Kulturen auf Peptonagar besitzen die Zellen von *Spirillum serpens* nach etwa 24 Stunden nur wenig Volutin (Abb. 11). Nachdem nun von einer Suspension derartiger Zellen innerhalb etwa 2 Stunden 0,2 ccm einer 0,1 molaren Ca-Laktat-Lösung verarbeitet worden war, stellte es sich heraus, dass nahezu sämtliche Zellen eine reichliche Menge Volutin enthielten (Abb. 12). Die Zellen im Kontroll-Gefäss (denen kein Laktat zugefügt war) zeigten sich dagegen wiederum nahezu volutinfrei.



Abb. 11.

*Spirillum serpens.*

Die Zellen einer Zellsuspension photographiert vor dem Beginn eines manometrischen Versuches, wobei 0,2 ccm einer 0,1 molaren Ca-Laktat Lösung als Atmungssubstrat diente. Die Zellen enthalten praktisch kein Volutin. (Vergr. 1200).

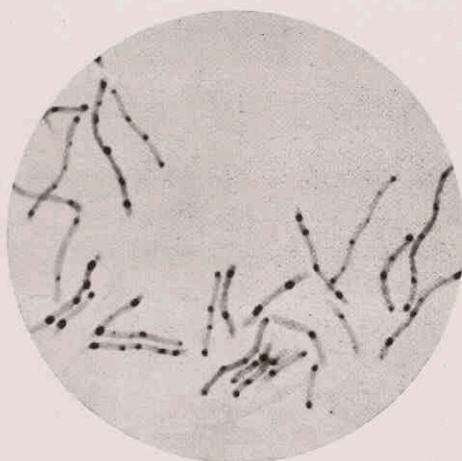


Abb. 12.

*Spirillum serpens.*

Die Zellen der in Abb. 11 abgebildeten Zellsuspension, nach dem Laktatversuch photographiert. Sämtliche Zellen enthalten nun reichlich Volutin.

(Vergr. 1200).

Über die Zusammensetzung des Volutins ist leider noch verhältnismässig wenig bekannt. Auf Grund der Untersuchungen von ZIKES (1922) und von GLAUBITZ (1923), aber besonders auf Grund derjenigen von VAN HERWERDENS (1917) kann man schliessen, dass man es hier mit einer der Gruppe der Nukleine angehörigen Substanz zu tun hat. VAN HERWERDEN wies nach, dass zur Bildung von Volutin durch Hefe die Anwesenheit von Phosphat durchaus erforderlich ist. Weiter wurde wahrscheinlich gemacht, dass unter dem Einflusse einer Nuklease aus dem Volutin Phosphorsäure abgespalten wurde.

Auch ich habe die Unentbehrlichkeit von Phosphorsäure für die Volutinsynthese in *Spirillum serpens* bestätigen können, indem ich die Zellen nicht in Phosphatpuffer, sondern in destilliertes Wasser mit Laktat suspendierte. Beim Vergleich mit der Kontrolle ohne Substratzusatz war dann praktisch keine Zunahme des Volutingehalts bemerkbar. Es muss jedoch bemerkt werden, dass die Assimilation als solche auch bei Abwesenheit von Phosphat stattfindet, sodass Volutin offenbar nicht das einzige, sondern nur eines der Assimilationsprodukte darstellt.

## KAPITEL VIII.

### DIE UNTRENNBARKEIT DER ATMUNGS- UND ASSIMILATIONSVORGÄNGE.

„In all cases we have seen that the chains of reactions which lead to synthesis have their starting-points at some intermediate stage of a dissimilation process. So we are forced to conclude that an absolute separation of dissimilation and assimilation processes, which was indispensable for a preliminary ordering of the apparent chaos of biochemistry, cannot be maintained. In reality both types of processes are closely intermingled, both are only manifestations of biochemistry one and indivisible.“

A. J. KLUYVER, The chemical activities of microorganisms, S. 91. London 1931.

Wenn wir die Ergebnisse der im vorigen Kapitel mitgeteilten Versuche überblicken, muss an erster Stelle festgestellt werden, dass die von den *Spirillum*-Arten bewirkte Oxydation der in den angestellten Versuchen gebotenen verschiedenartigen organischen Verbindungen niemals zu einer quantitativen Umwandlung des Substrats in Kohlensäure und Wasser führt. Im Gegenteil sprechen alle gesammelten Erfahrungen dafür, dass immer ein wesentlicher Teil des verarbeiteten Substrats in ein Assimilationsprodukt, das die empirische Zusammensetzung eines Kohlenhydrates hat, übergeführt wird.

Diese Sachlage erklärt auch, weshalb bei der Oxydation von Essigsäure und Milchsäure durch die untersuchten *Spirillum*-Arten — im Gegensatz zu dem, was bei der Oxydation der meisten übrigen Substrate zutrifft — der respiratorische Quotient nahezu dem bei vollständiger Oxydation theoretisch zu erwartenden Quotienten gleich ist (vergl. hierzu die Tabelle III), trotzdem ein beträchtlicher Teil des Kohlenstoffs dieser Verbindungen assimiliert wird. Hat doch das Assimilationsprodukt die gleiche empirische Zusammensetzung wie die genannten Verbindungen.

Es muss ausdrücklich bemerkt werden, dass man aus dem Werte des respiratorischen Quotienten nicht schliessen darf, dass eine organische Verbindung völlig zu Kohlensäure und Wasser oxydiert wird. Falls nämlich die empirische Zusammensetzung von Substrat und Assimilationsprodukt gleich ist, wird der respiratorische Quotient den gleichen Wert haben wie bei vollständiger Oxydation des Substrats.

Die Tatsache, dass Kohlenhydrate diese Bedingung annähernd erfüllen und dass die meisten Atmungsversuche immer mit Kohlenhydraten vorgenommen worden sind, ist wohl der Grund, dass man bisher der mit der Atmung so untrennbar verknüpften Assimilation so wenig Aufmerksamkeit gewidmet hat.

Die Ansicht, dass ein Teil des verarbeiteten Substrats tatsächlich assimiliert wird, wird nun einerseits dadurch gestützt, dass keinerlei Anhaltspunkte für eine Ausscheidung unvollkommener Oxydationsprodukte in das Medium gefunden worden sind, andererseits durch die Tatsache, dass die Bildung eines typischen Assimilationsproduktes, nämlich des Volutins, direkt experimentell festgestellt werden konnte.

Es erhebt sich die Frage, welche Bedeutung man diesen Ergebnissen beimessen soll. Es muss offenbar zunächst gefolgert werden, dass der angestellte Versuch, den Dissimilationsprozess der *Spirillum*-Arten isoliert zu studieren, fehlgeschlagen ist. Deutlich hat es sich herausgestellt, dass auch unter dazu anscheinend durchaus günstigen Verhältnissen immer synthetische Vorgänge neben den dissimilatorischen Prozessen auftreten. Unerwarteterweise hat sich unter den gewählten Bedingungen die Synthese genau so geltend gemacht wie bei den üblichen Versuchen, bei welchen Wachstum, d.h. Zellvermehrung, des untersuchten Organismus beabsichtigt wird.

Im Vorhergehenden haben wir nun im Anschluss an die ausführlich erörterten Ausführungen BARKERS stets die Vorstellung erweckt, dass das gebildete Assimilationsprodukt unabhängig von der chemischen Natur des gebildeten Substrats immer die Zusammensetzung oder jedenfalls die Oxydationsstufe eines Kohlenhydrats hat. Nun unterliegt es keinem Zweifel, dass tatsächlich der „verschundene“, d.h. nicht als Kohlensäure zurückgefundene Teil des Substrats annähernd die empirische Zusammensetzung  $\text{CH}_2\text{O}$  hat. Doch scheint es voreilig hieraus zu schliessen, dass die stattgefundene Synthese auf einen Kohlenhydrataufbau beschränkt ist.

Es muss in diesem Zusammenhang betont werden, dass die angenommenen Brutto-Reaktionen in verschiedenen Fällen nur ganz annähernd durch die experimentellen Daten gestützt werden. Wir haben im vorigen Kapitel häufig bemerken müssen, dass in bestimmten Fällen ziemlich bedeutende Abweichungen vorkamen und zwar solche, welche ausserhalb der Fehlergrenze lagen. Aber auch in allen denjenigen Fällen, in welchen die Übereinstimmung zwischen den von der „Theorie“ geforderten und den experimentellen Daten durchaus befriedigend war, zeigte es sich, dass fast immer eine kleine Abweichung vorlag, welche sich darin äusserte,

dass der gefundene respiratorische Quotient etwas höher war als der theoretische Wert. Dies bedeutet, dass das gebildete Assimilationsprodukt in Wirklichkeit eine etwas weiter reduzierte Zusammensetzung hat, als einem Kohlenhydrat entspricht.

Es ist nun wichtig darauf hinzuweisen, dass die zwar noch sparsam vorliegenden Daten über die Brutto-Zusammensetzung der Trockensubstanz lebender Zellen alle darauf deuten, dass diese Substanz etwas weiter reduziert ist als ein Kohlenhydrat. So fand YAMAGATA (1935), dass die Trockensubstanz vom Myzel von verschiedenen *Aspergillus*-Arten, in hohem Grade unabhängig von der Natur der verwendeten Kohlenstoffquelle, einen „Verbrennungsquotienten“ (d. i. das Verhältnis zwischen der bei der Verbrennung produzierten Kohlensäure und dem dabei aufgenommenen Sauerstoff) von etwa 0,95 aufweist (vergl. hierzu auch TAMIYA, 1935).

Für die chemische Zusammensetzung der Purpurbakterien ist VAN NIEL (1936) vor kurzem zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt.

Wenn man diese Ergebnisse betrachtet, wird man zu grosser Vorsicht gemahnt bei der Interpretation der Tatsache, dass der assimilierte Teil der verschiedenen Substrate immer annähernd Kohlenhydratzusammensetzung hat. Dies könnte nämlich auch nur bedeuten, dass dieser Teil des Substrats in „Zellsubstanz“, d. h. also in mannigfache verschiedene Stoffe, umgewandelt worden ist. Eine derartige Auffassung ist auch geeigneter, die bei bestimmten Substraten auftretenden nicht unbedeutenden Abweichungen von der Theorie verständlich zu machen.

Ein direkter Beweis dafür, dass tatsächlich das Resultat der Synthese nicht auf Kohlenhydrat beschränkt ist, ist schliesslich noch in dem schon mitgeteilten Umstand zu finden, dass die Substratverarbeitung in bestimmten Fällen mit einer erheblichen Neubildung von Volutin in den Zellen verknüpft ist.

Nehmen wir auf Grund der gegebenen Ausführungen an, dass die beobachtete Synthese in Wirklichkeit eine Vermehrung von „Zellsubstanz“ bedeutet, so fragt es sich, ob dies eine Zellvermehrung einschliesst. Spezielle Versuche zur Beantwortung dieser Frage habe ich nicht vorgenommen. Die blosser Überlegung, dass im Medium mehrere Wachstumsfaktoren fehlen — eine schwache Impfung in dieses stickstofffreie Medium würde ja niemals zu einem sichtbaren Wachstum führen — macht es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass irgend eine bedeutende Zellvermehrung stattgefunden hat.

Es ist jedoch eine andere Frage, inwieweit die erfolgte Synthese trotzdem

als Wachstum bezeichnet werden soll. Die Antwort hierauf ist durch die Definition des Begriffes Wachstum bedingt. Zweifellos gibt es Untersucher, die geneigt sind, diesen Begriff so weit zu fassen, dass jede Zunahme des Trockengewichts eines Organismus darunter fällt. In diesem Falle muss die aufgeworfene Frage selbstverständlich bejahend beantwortet werden. Andere Untersucher dagegen werden nur von Wachstum reden, wenn es sich um eine Vermehrung der „vitalen“ Bestandteile der Zelle, also um einen „Plasmawuchs“, handelt.

Gibt es nun Veranlassung zu schliessen, dass im diskutierten Falle „Plasmawuchs“ eingetreten ist?

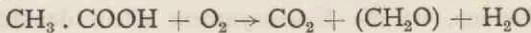
Offensichtlich würde dies bedeuten, dass unter den beobachteten Verhältnissen unter anderen auch Eiweissynthese stattgefunden habe. Da die Zellen jedoch dem Medium keine Stickstoffverbindungen haben entnehmen können, ist die Eiweissynthese allein denkbar, wenn die normalen Zellen neben dem im Protoplasma verkörperten Eiweiss stickstoffhaltige Reservesubstanzen enthalten, welche dann zusammen mit Abbauprodukten des stickstofffreien Substrats zu Eiweiss umgebaut werden.

Diese Möglichkeit scheint mir nicht auszuschliessen zu sein. Jedoch sprechen die Ergebnisse mehrerer Versuche dagegen, dass in der kurzen Periode der Substratverarbeitung irgend eine beträchtliche Vermehrung von Protoplasma, also ebenfalls von den Katalysatorsystemen des Atmungsprozesses, eingetreten ist. Ich erinnere hier an den im § 2 des vorigen Kapitels beschriebenen Versuch, welcher überzeugend lehrt, dass die optimale Atmungsgeschwindigkeit weitgehend unabhängig ist von der Konzentration des zugefügten Substrats. Falls die Verarbeitung dieses Substrats zu einer Neubildung von Protoplasma, d.h. also auch von Atmungskatalysatoren, führen würde, könnte man erwarten, dass bei den Versuchen mit zunehmenden Substratmengen auch die optimale Atmungsgeschwindigkeit steigen würde. Innerhalb der Fehlergrenzen ist jedoch hiervon nichts zu spüren. Auch das im § 7 des vorigen Kapitels beschriebene Experiment, bei welchem die Zellen vor dem eigentlichen Versuche längere Zeit in einem stickstofffreien Laktat-Medium geschüttelt wurden, zeigt, dass die Synthese auch unter diesen Bedingungen in unverringertem Masse auftritt, obgleich man doch annehmen kann, dass eventuelle Reservestickstoffsubstanzen im Vorversuche völlig verbraucht seien. Wir dürfen daher schliessen, dass die stets wieder beobachtete Synthese höchstens nur teilweise zu Gunsten eines „Plasmawuchses“ stattfindet.

Wenn wir also auf Grund des Vorhergehenden geneigt sind zu schliessen, dass die synthetischen Vorgänge bei der Substratverarbeitung zu sehr

verschiedenen Zellbestandteilen führen, scheint es doch nicht ausgeschlossen, dass diese Vorgänge ihren Ausgangspunkt bei einem primären Assimilationsprodukt nehmen, welches die empirische Zusammensetzung  $\text{CH}_2\text{O}$  haben könnte. Für eine derartige Annahme, welche von BARKER befürwortet wird, spricht besonders die Tatsache, dass in bestimmten Fällen nicht nur der respiratorische Quotient fast genau den aufgestellten Gleichungen entspricht, sondern dass auch ein sehr einfaches stöchiometrisches Verhältnis zwischen Substrat und Assimilationsprodukt, berechnet als  $\text{CH}_2\text{O}$ , zu existieren scheint.

Ich erinnere in diesem Zusammenhang nur an die für alle untersuchten *Spirillum*-Arten bei der Verarbeitung von Acetat erhaltenen Ergebnisse. Es wurde immer gefunden, dass die beobachtete Umwandlung fast genau der Gleichung:



entspricht.

Dies ist um so bemerkenswerter, weil BARKER auch für *Prototheca Zopfii* genau das gleiche Resultat erhielt.

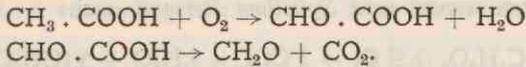
Ein derartiges einfaches stöchiometrisches Verhältnis zwischen dem Gesamtverbrauch des Substrats und der Menge des gebildeten Assimilationsproduktes widerspricht offenbar der üblicheren Auffassung, dass willkürlich ein mehr oder weniger grosser Prozentsatz des Substrates in den Dissimilationsvorgang bezogen wird, der übrige Teil dagegen Umwandlungen unterliegt, die zur Synthese der Zellbestandteile führen.

Es braucht kaum betont zu werden, dass die Vorstellung, nach welcher das primäre Assimilationsprodukt ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) sein würde, das dann hierauf in verschiedenartige synthetische Vorgänge bezogen wird, in hohem Grade suggestiv ist. Da allgemein angenommen wird, dass für die photosynthetischen, Kohlensäure assimilierenden Zellen ebenfalls  $\text{CH}_2\text{O}$  das erste Assimilationsprodukt ist, würde hierdurch eine neue Übereinstimmung im Stoffwechsel der heterotrophen und der autotrophen Zellen ans Licht getreten, sowie die Assimilation einer „einheitlichen Deutung“ näher gebracht sein.

Es scheint daher wichtig zu prüfen, inwieweit die Ergebnisse der vorgenommenen Versuche sich dazu eignen, die betreffende Annahme zu stützen.

Betrachten wir hierzu an erster Stelle den Fall der Acetatverarbeitung etwas genauer. Es scheint hier möglich, zur Erklärung der gefundenen stöchiometrischen Verhältnisse einen einfachen Reaktionsmechanismus

zu entwerfen. Man kann sich denken, dass hier die zwei folgenden Reaktionen nach einander vor sich gehen:

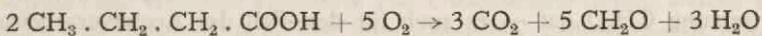


Es wird deutlich sein, dass dies ein sehr wichtiger Gesichtspunkt wäre. Dies würde nämlich bedeuten, dass Atmung und Assimilation gleichsam in ein und derselben chemischen Reaktionsfolge verkörpert seien. Was man auf Grund der freierwerdenden Kohlensäure Atmung zu nennen pflegt, wäre also in diesem Gedankengange nichts anders als die „Späne“, welche bei der unter Sauerstoffaufnahme verlaufenden Assimilation abfallen. Die Unterscheidung zwischen Atmung (Dissimilation) und Assimilation würde also nur eine Abstraktion darstellen.

Es fragt sich nun, inwieweit eine derartige Ansicht sich tatsächlich verallgemeinern lässt. Dies würde heissen, dass ganz allgemein eine Kette von Reaktionen — unter denen eine oder mehrere sauerstoffverbrauchenden — vom Substrat zum Assimilationsprodukt mit Kohlensäure als Abfallprodukt führen würde. Von einem gesonderten Atmungsprozess würde dann keine Rede mehr sein.

Eine nähere Betrachtung der Reaktionen bei den sonstigen untersuchten Substraten lehrt jedoch, dass diese Auffassung nicht aufrecht zu erhalten ist.

Die blosse Tatsache, dass die Butyratverarbeitung von *Spirillum serpens* und *Spirillum Itrersonii* in der gegebenen Vorstellung nach der Gleichung verläuft:

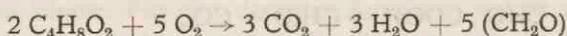


und diese Organismen daher anscheinend aus zwei (also einer geraden Zahl) Molekülen fünf (also eine ungerade Zahl) Moleküle  $\text{CH}_2\text{O}$  bilden würden, zeigt zur Genüge, dass nicht ein und derselbe Prozess unter Kohlensäure-Ausscheidung vom Butyrat bis zum Assimilationsprodukte führt, sondern dass die verschiedenen Moleküle Butyrat einer verschiedenen Umwandlung unterliegen. Denn es ist doch als völlig ausgeschlossen zu betrachten, dass die Katalysatoren der Zellen immer gleichzeitig zwei Moleküle Buttersäure in eine einzelne Reaktion hineinbeziehen würden.

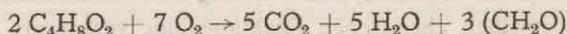
Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung gelangt man, wenn man sich überlegt, dass verschiedene *Spirillum*-Arten ein und dasselbe Substrat auf sehr verschiedenartige Weise verarbeiten, d.h. dass das Verhältnis zwischen der gebildeten Kohlensäuremenge und der Menge des scheinbaren Assimilationsproduktes recht beträchtliche Unterschiede aufweist.

So wurde gefunden, dass Butyrat von den verschiedenen Arten folgendermassen verarbeitet wird:

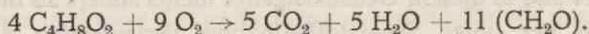
von *Spirillum serpens* und *Spirillum Itersonii* nach:



von *Spirillum tenue* nach:



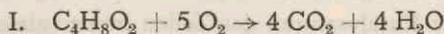
von *Spirillum undula* nach:



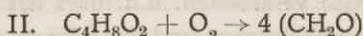
Die bedeutenden Unterschiede zwischen diesen Gleichungen, sowie die Unmöglichkeit, für jede einzelne Gleichung einen einfachen passenden Reaktionsmechanismus zu entwerfen, spricht nun wohl sehr stark für die Ansicht, dass die aufgestellten Gleichungen nur fiktiv sind und ihnen nur insofern Bedeutung beizulegen ist, als sie ein annäherndes Bild geben von dem Grade, in welchem das Substrat in die assimilatorischen Vorgänge hineinbezogen wird.

Mit Hinblick auf die obenerwähnte spezielle Sachlage bei der Acetatverarbeitung ist es in diesem Zusammenhang wichtig zu bemerken, dass STEPHENSON und COOK (1928) bei der (unvollkommenen) Oxydation von Acetat durch *Bacterium coli* bzw. *Bacterium alcaligenes* feststellen konnten, dass pro Molekül verarbeiteten Acetates 1,5 Sauerstoffmoleküle verbraucht wurden. Dies würde also bedeuten, dass — falls man annimmt, dass auch hier das primäre Assimilationsprodukt die empirische Zusammensetzung  $\text{CH}_2\text{O}$  hat — es auch für den Fall der Acetatverarbeitung nicht immer möglich ist, zur Erklärung der gefundenen stöchiometrischen Verhältnisse einen einfachen Reaktionsmechanismus heranzuziehen.

Wenn wir nochmals den Fall der Butyratverarbeitung betrachten, so ist es ebenso gut denkbar, dass die aufgestellten Gleichungen nur die Resultante sind von Vorgängen zweierlei Art, nämlich von einem eigentlichen Atmungs Vorgange nach der Gleichung:



und von verschiedenartigen Assimilationsprozessen, welche, da die Gesamtzusammensetzung der gebildeten Zellsubstanz jedenfalls annähernd  $(\text{CH}_2\text{O})$  beträgt, durch die Brutto-Gleichung:

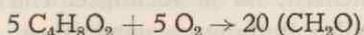


wiedergegeben werden können.

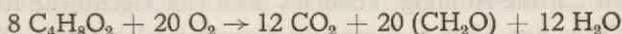
Für den Fall der Butyratverarbeitung von *Spirillum serpens* müsste man in diesem Sinne schliessen, dass die Reaktionen I und II in einem Verhältnis von 3 : 5 vor sich gehen würden. Man hätte dann nämlich:



und



oder summiert:



also genau das in der experimentell gefundenen Brutto-Gleichung auftretende Verhältnis.

Die vorhergehenden Ausführungen dürften genügen, um die Aussage zu begründen, dass den aufgestellten Gleichungen, mit denen versucht worden ist, die gesamten Substratverarbeitungen zu erfassen, keiner Realität entsprechen und dass dieselben daher auch nicht zu der Folgerung berechtigen, dass ein Produkt der empirischen Zusammensetzung ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) als primäres Assimilationsprodukt auftritt.

In Wirklichkeit steht in diesen Gleichungen ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) an Stelle des Gemisches der sehr verschiedenartigen bei der Assimilation gebildeten Zellsubstanzen, deren Gemisch jedoch eine nur unbedeutend von ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) abweichende Zusammensetzung hat.

Anstatt einer einzelnen Gleichung, welche unter Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe vom Substrat zu ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) führt, müssten dann in Wirklichkeit vielleicht Hunderte von Gleichungen treten, welche jede für sich vom Substrat bis zu den verschiedensten Zellsubstanzen führen.

Denkt man sich in diese Sachlage tiefer hinein, so kommt man zu einem bemerkenswerten Ergebnis. Für jede bei der Assimilation gebildete Substanz hat man dann eine Reaktionskette, welche summiert das von BARKER befürwortete Prinzip der Bildung eines Assimilationsproduktes, kombiniert mit Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe, darstellt.

Dies bedeutet, dass jede Reaktionskette gekennzeichnet ist durch einen Effekt, den ich schon oben als „Späne-Atmung“ bezeichnet habe. Bedenkt man hierbei, dass auch unter den dazu anscheinend ungünstigen Bedingungen die Assimilationsvorgänge in quantitativer Hinsicht recht bedeutend sind, dann kann man mit Sicherheit darauf schliessen, dass die Gesamt-„Späne-Atmung“ ebenfalls einen recht erheblichen Teil der gemessenen Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe umfassen wird.

Man gelangt sogar zu der Frage, ob nicht möglicherweise die Gesamt-

Atmung auf eine „Späne-Atmung“ zurückgeführt werden könne. Dies würde also einerseits bedeuten, dass eine eigentliche Atmung, d.h. eine vollständige Überführung des Substrats in Kohlensäure und Wasser, niemals auftritt und andererseits, dass Atmung und Synthese auch im Wesen untrennbar sind.

Zurzeit fehlt noch die Möglichkeit, um die Richtigkeit einer derartigen Vorstellung einer experimentellen Prüfung zu unterziehen.

Doch auch wenn neben der aus den Assimilationsvorgängen resultierenden „Späne-Atmung“ ebenfalls noch eine eigentliche Atmung, also eine vollständige Umwandlung von Substratmolekülen in Kohlensäure und Wasser stattfände, so muss man bei dem heutigen Stande unserer Kenntnisse doch folgern, dass die Mittel fehlen, um eine praktische Trennung zwischen der eigentlichen Atmung und der von „Späne-Atmung“ begleiteten Assimilation durchzuführen. Weder die Sauerstoffaufnahme, noch die Kohlensäureabgabe geben hierfür irgendwelchen Anhaltspunkt. Für mehrere der Fragestellungen, wie man diese in den Arbeiten von MOLLIARD (1922), von TERROINE und WURMSER (1922), von ALGERA (1932) und von TAMIYA (1935) antrifft, scheint dieser Gesichtspunkt von unverkennbarer Bedeutung.

## ZUSAMMENFASSUNG.

Im Anschluss an die neuzeitlichen Ansichten wurde die Abgrenzung der Gattung *Spirillum* Ehb. g. diskutiert und eine Übersicht der den Vertretern dieser Gattung gewidmeten Literatur gegeben. Daraus ergab sich, dass fast ausschliesslich beiläufig gemachte, mehr oder weniger unzusammenhängende Daten und Beobachtungen, welche sich übrigens noch in verschiedenen Punkten widersprechen, vorlagen. Im grossen und ganzen beschränkten sich die Kenntnisse der saprophytischen *Spirillum*-Arten nur auf Angaben über die Verbreitung und Anhäufung dieser Organismen; nur eine einzige Art, *Spirillum tenue*, war etwas näher studiert worden. Deshalb ist versucht worden, durch ein eingehenderes Studium der betreffenden Organismen die Lücken auf diesem Gebiete einigermassen auszufüllen.

Die Ursache der Spärlichkeit der vorhandenen Daten dürfte wohl an erster Stelle in dem Umstand zu suchen sein, dass die Reinzüchtung von Spirillen noch immer eine ungenügend gelöste Aufgabe war. Es wurde daher der Ausarbeitung geeigneter Isolierungsmethoden besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

1. Die Isolierung der in Oberflächenwasser vorkommenden Spirillen zeigte sich wesentlich leichter als die Isolierung der in Anhäufungen mit Mist erhaltenen Spirillen. Nach einigen vergeblichen Versuchen gelang es, auch die Schwierigkeiten bei der Reinzüchtung der letztgenannten Organismen zu überwinden. Im ganzen wurden etwa 60 Stämme verschiedener Herkunft in Reinkultur gebracht.

2. Auf Grund der morphologischen und physiologischen Eigenschaften konnten unter den isolierten Stämmen fünf Gruppen unterschieden werden. Vier dieser Gruppen wurden identifiziert mit den folgenden früher beschriebenen Arten: *Spirillum serpens* (Müller) Winter, *Spirillum tenue* (Müller) Ehb. g., *Spirillum undula* (Müller) Ehb. g. und *Spirillum Kutscheri* Migula. Für die fünfte noch nicht beschriebene Art wurde der Name *Spirillum Itersonii* vorgeschlagen. Mit Hinblick auf die Unzulänglichkeit der betreffenden Systematik wurden die wichtigsten Merkmale der Gattung *Spirillum* zusammenfassend dargestellt. Ausserdem wurde eine Übersicht der wichtigsten Eigenschaften derjenigen Arten gegeben, welche sich zurzeit in dieser Gattung mit genügender Schärfe unterscheiden lassen.

3. Bezüglich ihres Stoffwechsels müssen die isolierten Arten zu den chemo-heterotrophen Organismen gerechnet werden. Im allgemeinen sind die untersuchten Arten durch ihren obligat oxydativen Stoffwechsel charakterisiert. Von dieser Regel gibt es nur eine Ausnahme: es zeigte sich nämlich, dass *Spirillum Itersonii* imstande ist unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, falls Nitrate zur Verfügung stehen. Es konnte dabei allerdings die bemerkenswerte, für denitrifizierende Bakterien, soweit bekannt, bis jetzt nicht beschriebene Tatsache festgestellt werden, dass dies nur zutrifft, wenn neben Nitraten auch geeignete Stickstoffquellen, wie z.B. Ammonverbindungen, anwesend sind. Offenbar muss hieraus geschlossen werden, dass für *Spirillum Itersonii* Nitrate wohl für die Oxydation des Dissimilationssubstrates brauchbar sind, dass jedoch zum Aufbau des Zelleiweisses andere Stickstoffquellen unbedingt erforderlich sind.

4. Alle isolierten *Spirillum*-Arten sind imstande, ihren Stickstoffbedarf mit Hilfe einer Stickstoff in komplexer Form enthaltenden Substanz wie Pepton zu decken. Gleich gute Stickstoffquellen sind ausserdem auch Asparagin und  $\text{NH}_4$ -Verbindungen, während sich dagegen Harnstoff, Nitrat und Nitrit als ganz unbrauchbar erwiesen.

5. Es wurde festgestellt, dass die Entwicklung der Spirillen an eine neutrale bis schwach alkalische Reaktion gebunden ist. Für das aus Jauche isolierte *Spirillum Kutscheri* wurde allerdings das optimale pH etwas höher als für die anderen Arten gefunden. Es ergab sich, dass die optimale Temperatur für das Wachstum aller isolierten *Spirillum*-Arten in der Nähe von  $35^\circ \text{C}$  liegt.

6. Bei der Untersuchung der Verwendbarkeit verschiedener Verbindungen als einziger Kohlenstoffquelle für das Wachstum der Spirillen stellte es sich heraus, dass in dieser Hinsicht beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten existieren. Als einzige Kohlenstoffquelle für *Spirillum Kutscheri* erwiesen sich nur Pyruvat und Malat als einigermaßen brauchbar. Obgleich hinsichtlich der vier anderen *Spirillum*-Arten festgestellt werden konnte, dass sie betreffs ihres Wachstums sämtlich der Verarbeitung organischer Säuren angepasst sind, wurden auch für diese Organismen mehrere Unterschiede aufgefunden. So kann *Spirillum Itersonii* sehr verschiedenartige Verbindungen angreifen, während andererseits *Spirillum serpens* sich ganz und gar auf die organischen Säuren beschränkt.

7. Für den Erfolg der Wachstumsversuche erwies sich die Anwesenheit von Calcium als ausschlaggebend. Es wurde auf die Möglichkeit

hingewiesen, dass das Calcium für die im Medium auftretenden Ionen-gleichgewichte von Bedeutung sei, wobei besonders an den Antagonismus zwischen den Elementen Calcium und Magnesium gedacht werden muss.

8. Da die Mikro-Aerophilie der Spirillen (Spirillenlinie!) suggeriert, dass die Eigenart dieser Bakteriengruppe sich in erster Instanz in den speziellen Bedürfnissen des Atmungsvorganges äussern würde, wurde diesem Prozess ein näheres Studium gewidmet.

Bei den diesbezüglichen Versuchen wurden die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäurebildung bei der Veratmung organischer Verbindungen durch Zellsuspensionen mittels der direkten manometrischen Methode nach WARBURG bestimmt. Hierbei wurde unter Bedingungen gearbeitet, welche Zellvermehrung möglichst ausschlossen, indem dem Medium keine assimilierbaren Stickstoffverbindungen zugesetzt wurden und ausserdem die Versuchsdauer möglichst eingeschränkt wurde.

Es zeigte sich nun hierbei, dass die festgestellten respiratorischen Quotienten  $\left(\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}\right)$  in mehreren Fällen beträchtlich von den theoretischen, für vollkommene Oxydation bis zu Kohlensäure und Wasser berechneten, Quotienten abwichen. Es handelt sich bei den betreffenden Atmungsprozessen also zweifellos um unvollständige Oxydationen.

9. Diese Sachlage könnte nun ihre Erklärung darin finden, dass unter den obengenannten Verhältnissen neben dem Atmungsvorgange doch noch assimilatorische Prozesse aufgetreten seien. Für eine zweite Möglichkeit, nämlich die Ausscheidung von unvollkommen oxydierten Dissimilationsprodukten in das Medium unter dem Einflusse des Stoffwechsels der Spirillen, liessen sich keinerlei Anhaltspunkte auffinden.

Die erstgenannte Ansicht wurde ausserdem wesentlich durch die Tatsache gestützt, dass für einige andere Mikroorganismen von früheren Untersuchern — besonders klar von BARKER für *Prototheca Zopfii* Krüger — nachgewiesen worden ist, dass auch unter Verhältnissen, wie diese bei meinen Versuchen vorlagen, neben dem Atmungsvorgange in quantitativer Hinsicht recht bedeutende assimilatorische Prozesse stattfinden.

10. Für eine eingehendere Analyse dieser Frage wurden die Oxydationsprozesse unter Bedingungen, welche eine genaue Feststellung der bei der Veratmung einer bestimmten Quantität des Atmungssubstrates aufgenommenen Sauerstoffmenge bzw. gebildeten Kohlensäuremenge ermöglichten, verfolgt.

Es stellte sich nun für alle untersuchten *Spirillum*-Arten heraus,

dass tatsächlich die oxydative Verarbeitung organischer Verbindungen immer eine unvollständige war und in der Bildung von Assimilationsprodukten resultierte. In Übereinstimmung mit dem von BARKER für *Prototheca Zopfii* erhaltenen Ergebnis hatte das Assimilationsprodukt unabhängig von der Natur des verwendeten Substrates annähernd die Zusammensetzung — jedenfalls die Oxydationsstufe — eines Kohlenhydrates. Doch schien es voreilig, hieraus zu schliessen, dass die stattgefundene Synthese auf einen Kohlenhydrataufbau beschränkt war, weil in verschiedenen Fällen nicht unbeträchtliche Abweichungen von der oben genannten Regel auftraten. Ausserdem gaben die gefundenen respiratorischen Quotienten eine Anweisung, dass in Wirklichkeit das Assimilationsprodukt eine etwas weiter reduzierte Zusammensetzung hat, als einem Kohlenhydrate entspricht.

Mit Hinblick auf die zwar noch sparsam vorliegenden Daten bezüglich der empirischen Brutto-Zusammensetzung der Trockensubstanz lebender Zellen, welche alle darauf deuten, dass diese Substanz etwas weiter reduziert ist als ein Kohlenhydrat, wurde gefolgert, dass bei den betreffenden Versuchen ein Teil des Substrates in „Zellsubstanz“, in deren mannigfache Verschiedenheit, umgelagert worden war. Ein direkter Beweis, dass tatsächlich das Resultat der Synthese nicht auf Kohlenhydrat beschränkt ist, war in der für *Spirillum serpens* gemachten Beobachtung zu finden, dass die Substratverarbeitung in bestimmten Fällen mit einer erheblichen Neubildung von Volutin in den Zellen verknüpft war.

Wenn also auch damit gerechnet werden müsste, dass die synthetischen Vorgänge bei der Substratverarbeitung zu sehr verschiedenen Zellbestandteilen führen können, so schien es dennoch nicht ausgeschlossen, dass diese Vorgänge alle ihren Anfang nehmen bei einem primären Assimilationsprodukt, das dann die empirische Zusammensetzung  $\text{CH}_2\text{O}$  haben könnte.

Diese Annahme, welche von BARKER befürwortet wird, würde also bedeuten, dass ganz allgemein vom Substrat eine Kette von Reaktionen — unter denen eine oder mehrere sauerstoffverbrauchenden — zum primären Assimilationsprodukt führen würde, wobei dann Kohlensäure als Abfallprodukt entstehen würde. Die wäre also ein Vorgang, der sich als „Späne-Atmung“ bezeichnen lässt. Von einem gesonderten Atmungsprozess würde dann gar keine Rede mehr sein.

Eine nähere Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse lehrte jedoch, dass diese Auffassung nicht aufrecht zu erhalten ist. Vielmehr musste geschlossen werden, dass anstatt einer einzelnen Kette von Reaktionen,

welche unter Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe vom Substrat bis zu  $(\text{CH}_2\text{O})$  führt, zahlreiche Reaktionsketten verlaufen, welche jede für sich vom Substrat bis zu den verschiedenartigen Zellsubstanzen führen. Für jede bei der Assimilation gebildete Substanz hätte man dann eine Reaktionskette, deren Gesamtheit dem von BARKER befürworteten Prinzip der Bildung eines Assimilationsproduktes, kombiniert mit Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe, entspricht.

Jede Reaktionskette wäre demnach gekennzeichnet durch den Effekt der oben als „Späne-Atmung“ bezeichnet worden ist. Da die Assimilationsvorgänge in quantitativer Hinsicht recht bedeutend waren, erhob sich sogar die Frage, ob nicht möglicherweise die Gesamt-Atmung auf eine „Späne-Atmung“ zurückgeführt werden könnte. Dies würde also einerseits bedeuten, dass eine eigentliche Atmung, d.h. eine vollständige Überführung des Substrats in Kohlensäure und Wasser, niemals aufträte und andererseits, dass Atmung und Synthese auch im Wesen untrennbar seien.

Eine experimentelle Prüfung der Richtigkeit einer derartigen Vorstellung ist zurzeit noch nicht möglich. Doch auch wenn neben der aus den Assimilationsvorgängen resultierenden „Späne-Atmung“ ebenfalls noch eine eigentliche Atmung, also eine vollständige Umwandlung von Substratmolekülen in Kohlensäure und Wasser, stattfände, so muss man bei dem heutigen Stande unserer Kenntnis doch folgern, dass die Mittel fehlen um eine praktische Trennung zwischen der eigentlichen Atmung und der von „Späne-Atmung“ begleiteten Assimilation durchzuführen. Weder die Sauerstoffaufnahme, noch die Kohlensäureabgabe geben hierfür irgendwelchen Anhaltspunkt.

Die Versuche wurden in dem Laboratorium für Mikrobiologie, Technische Hochschule, Delft angestellt. Herrn Professor Dr. Ir. A. J. KLUYVER bin ich für seine stetige Unterstützung und unentbehrliche Kritik zum grossen Dank verpflichtet. Auch Herrn Dr. Ir. T. Y. KINGMA BOLTJES möchte ich hier meinen besten Dank für die schöne Ausführung der Mikrophotographien aussprechen.

## LITERATUR.

- ALGERA, L., Energiemessungen bei *Aspergillus niger* mit Hilfe eines automatischen Mikro-Kompensations-Calorimeters. Diss. Groningen 1932.
- BAARS, J. K., Over sulfaatreductie door bacteriën. Diss. Delft 1930.
- BARKER, H. A., Journ. Cell. and Comp. Physiol. 7, 73, 1935.
- , Journ. Cell. and Comp. Physiol. 8, 231, 1936.
- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 4th Ed. 1934.
- BERTHELOT, A., Bull. de la Soc. de Chimie biologique 6, 326, 1924.
- BEIJERINCK, M. W., Centr. f. Bakt. 14, 827, 1893.
- , Centr. f. Bakt. 15, 10, 1894.
- , Centr. f. Bakt. II, 1, 1, 49, 104, 1895.
- , Proceedings Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam 1, 14, 1898.
- , Centr. f. Bakt. II, 7, 561, 1901.
- , Versl. der Afd. Natuurkunde Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam, 30, 431, 1923.
- , Centr. f. Bakt. II, 63, 353, 1925.
- BÖESEKEN, J. und H. I. WATERMAN, Proceedings Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam 14, 928, 1912.
- BONHOFF, Archiv für Hygiene 26, 162, 1896.
- COHN, F., Biologie der Pflanzen 1, Heft 2, 127, 1872.
- DIMITROFF, V. T., Journal of Bact. 12, 19, 1926.
- DIXON, M., Manometric Methods. Cambridge, 1934.
- DOBELL, C., Antony van Leeuwenhoek and his „little animals“. Amsterdam, 1932.
- DOOREN DE JONG, L. E. DEN, Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces. Diss., Delft 1926.
- EHRENBERG, C. G., Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Berlin, 1838.
- ELEMA, B., De bepaling van de oxydatie-reductiepotentiaal in bacteriëncultures en hare beteekenis voor de stofwisseling. Diss., Delft 1932.
- ELLIS, D., Centr. f. Bakt. I. 33, 1, 1903.
- ESMARCH, E. VON, Centr. f. Bakt. 1, 225, 1887.
- , Centr. f. Bakt. I. 32, 561, 1902.
- FÜRTH, O. und F. LIEBEN, Biochem. Zeitschr. 128, 144, 1922.
- , Biochem. Zeitschr. 132, 615, 1922.

- FUHRMANN, F., *Centr. f. Bakt.* II, 25, 129, 1910.
- GLAUBITZ, M., *Biochem. Zeitschr.* 139, 77, 1923.
- GROENEWEGE, J., Departement van Landbouw, Nijverheid en Handel. Mededeelingen van het Algemeen Proefstation voor den Landbouw, Nr. 7, 1921.
- HENRICI, A. T., *Morphologic variation and the rate of growth of bacteria.* Springfield 1928.
- HERWERDEN, M. A. VAN, *Proceedings Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 20, 70, 1917.
- HOOGERHEIDE, J. C., *Bijdrage tot de kennis van de reactie van Pasteur.* Diss., Delft, 1935.
- ITERSON, G. VAN, *Proceedings Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* 5, 685, 1902.
- KINGMA BOLTIJES, T. Y., *Onderzoekingen over nitrificerende bacteriën.* Diss., Delft, 1934.
- KITASATO, S., *Centr. f. Bakt.* 3, 72, 1889.
- KLUYVER, A. J., *The chemical activities of micro-organisms.* London, 1931.
- , and C. B. VAN NIEL, *Zentr. f. Bakt.* II, 94, 369, 1936.
- KREBS, H. A., in: C. Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen*, 3, 635, 1929.
- KUTSCHER, *Zeitschr. f. Hygiene* 20, 46, 1895a.
- , *Centr. f. Bakt.* I, 18, 614, 1895b.
- LEHMANN, K. B. und R. O. NEUMANN, *Bakteriologische Diagnostik.* 7te Aufl. München, 1927.
- LIEBEN, F., *Biochem. Zeitschr.* 135, 240, 1923.
- LINWEAVER, H., *Journ. of Biol. Chem.*, 99, 575, 1933.
- LUNDIN, H., *Biochem. Zeitschr.* 141, 310, 342, 1923.
- MANEVAL, W. E., *Stain Technology* 4, 21, 1929.
- MEYER, A., *Die Zelle der Bakterien.* Jena, 1912.
- MEYERHOF, O., *Biochem. Zeitschr.* 162, 43, 1925.
- MIGULA, W., *System der Bakterien.* Jena, 1897—1900.
- MOLLIARD, M., *C. r. Soc. de Biol.* 87, 219, 1922.
- NIEL, C. B. VAN, *Archiv f. Mikrobiologie* 3, 1, 1931.
- , and F. M. MULLER, *Recueil des travaux botaniques néerlandais* 28, 245, 1931.
- , *Archiv f. Mikrobiologie* 7, 323, 1936.
- REICHENBACH, H., *Centr. f. Bakt.* I, 29, 553, 1901.
- RIEMSDIJK, M. VAN, *Centr. f. Bakt.* I, 113, 161, 1929.

- RIPPEL, A. und U. STOESS, *Archiv f. Mikrobiologie* 3, 492, 1932.
- ROELOFSEN, P. A., *On photosynthesis of the Thiorhodaceae*. Diss. Utrecht, 1935.
- RUYS, A. CH., *De verwekker van de rattebeet-ziekte*. Diss. Amsterdam, 1925.
- RUYS, A. CH., „Seuchenbekämpfung, Ätiologie, Prophylaxe und experim. Therapie der Infektionskrankheiten des Menschen und der Tiere,“ 6, 195, 1929.
- , en F. C. KUIPERS, *Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde* 73, 1207, 1929.
- SARDJITO, M., *Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië*, 72, 1359, 1932.
- , *Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië*, 73, 822, 1933.
- SCHRÖDER, M., *Centr. f. Bakt.* II, 85, 177, 1932.
- SOROKIN, N., *Centr. f. Bakt.* I, 465, 1887.
- , *Centr. f. Bakt.* 7, 123, 1890.
- SMITH, TH., *Centr. f. Bakt.* I, Referate 71, 413, 1921.
- STEPHENSON, M. and R. P. COOK, *Biochem. Journ.* 22, 1368, 1928.
- SWELLENGREBEL, N. H., *Ann. de l'Institut Pasteur* 21, 448, 562, 1907.
- , *Centr. f. Bakt.* I, 49, 529, 1909.
- TAMIYA, H., *Le bilan matériel et l'énergétique des synthèses biologiques*. Paris 1935.
- TERROINE, E. F. et R. WURMSER, *C. r. de l'Acad. d. Sc.* 174, 1, 1922.
- , *Bull. de la Soc. de Chim. Biol.* 4, 519, 1922.
- VAHLE, C., *Centr. f. Bakt.* II, 25, 178, 1910.
- VOGT, *Centr. f. Bakt.* I, 25, 801, 1899.
- YAMAGATA, S., *Acta Phytochimica* 8, 107, 1934.
- ZIKES, H., *Centr. f. Bakt.* II, 57, 21, 1922.
- ZETTNOW, *Centr. f. Bakt.* I, 19, 177, 393, 1896.
- , *Zeitschr. f. Hygiene* 24, 72, 1897.
- , *Centr. f. Bakt.* I, 78, 1, 1916.

## STELLINGEN.

---

### 1.

Het is aan twijfel onderhevig, of het begrip ademhaling overeenkomstig de thans gangbare voorstelling kan worden gehandhaafd; in ieder geval is bij den huidige stand onzer kennis bij cellen met heterotrophe leefwijze een scheiding tusschen ademhaling en assimilatie experimenteel niet door te voeren.

### 2.

Ten onrechte heeft men veelal uit het feit, dat bij de verbranding eener bepaalde organische verbinding onder den invloed van levende cellen een respiratoir quotiënt werd aangetroffen, hetwelk overeenstemde met de theoretische waarde voor volledige oxydatie, besloten, dat deze verbinding door de cellen uitsluitend in koolzuur en water wordt omgezet.

### 3.

Noch de theorie van MÜNCH, noch die van DE VRIES-CURTIS is in staat om een bevredigende verklaring te geven van de wijze, waarop het transport van de plastische voedingsstoffen in de plant plaats heeft.

T. G. MASON, E. J. MASKELL and E. PHILLIS, *Annals of Botany*, 50, 23, 1936.

### 4.

De inzichten van REYNOLDS en WYND aangaande het door hen waargenomen verschijnsel, dat bestraling van persgist met ultraviolet licht van een golflengte tusschen 2500 en 3000 Å op de door dit organisme bewerkte gisting een remmenden invloed uitoefent, zijn aan ernstige bedenkingen onderhevig.

E. S. REYNOLDS and F. LYLE WYND, *Annals of the Missouri Bot. Garden*, 22, 853, 1935.

## 5.

Het virus van de mozaikziekte van de tabakspant is een levenlooze substantie; de vermeerdering van het virus in de plant is op één lijn te stellen met een autokatalytisch proces.

W. M. STANLEY, *Phytopathology*, 26, 305, 1936.

## 6.

Bij de koolhydraatafbraak tijdens de spiercontractie zijn verschillende primaire reacties gekoppeld door rechtstreeksche overdracht van de fosphaatgroepen der in het spierweefsel aanwezige phospho-verbindingen.

J. K. PARNAS, *Klinische Wochenschr*, 29, 1017, 1935.

## 7.

De door KLUYVER en VAN NIEL voorgestelde classificatie der bacteriën verdient, ondanks haar onvolkomenheid, op grond van principieele overwegingen de voorkeur boven de tot dusver gebruikelijke indeelingen.

A. J. KLUYVER and C. B. VAN NIEL, *Zentr. f. Bakt.* II, 94, 369, 1936.

## 8.

Het voorkomen van polyploidie bij planten is voor de plantengeographie van groot belang; hierdoor toch kan eenerzijds een plantensoort zich bij een voor haar ongunstiger worden van het klimaat handhaven of anderzijds zelfs in streken met een voor haar ongunstiger klimaat binnendringen.

G. TISCHLER, *Bot. Jahrb.* 67, 1, 1935.







