Studien über die Physiologie der schwefeloxydierenden Bakterien.

Von

Yoshikazu Emoto.

Eingegangen am 13 Februar, 1933.

Inhalt.

- I. Einleitung.
- II. Übersicht über die Untersuchungen der schwefeloxydierenden Bakterien.
- III. Methodik und Materialien.
- IV. Systematik.
- V. Physiologische Untersuchungen an *Thiobacillus thermanus*.
 - 1. Einfluss der Temperatur.
 - 2. Einfluss der ultravioletten Strahlen.
 - 3. Verhalten zwischen der Grösse der Oberfläche des Kulturmediums und der Oxydation des Schwefels.
 - 4. Einfluss der Reaktion der Flüssigkeit auf das Wachstum der Bakterien.
 - 5. Über den Einfluss der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die Tätigkeit der schwefeloxydierenden Bakterien.
 - a. Einfluss der Säuren.
 - b. Einfluss der Salze.
 - c. Einfluss der Bakterien auf unlösliches Phosphat.
 - d. Verhalten der Bakterien gegenüber Schwefel.
 - e. Einfluss der Kohlehydrate und der organischen Stickstoffverbindungen.
 - 6. Kohlenstoffassimilation.
 - 7. Atmung.
 - 8. Über Cytochrom und Katalase der schwefeloxydierenden Bakterien.
 - 9. Oxydationspotential.
- VI. Das Leben der schwefeloxydierenden Bakterien in der Natur.
- VII. Zusammenfassung.
- VIII. Literaturverzeichnis.
- Anhang. Verwendung der schwefeloxydierenden Bakterien.

I. Einleitung.

In der Erde sowie in der Luft und im Wasser befinden sich verschiedene Mikroorganismen und betätigen sich in mannigfacher Lebensweise. Durch Temperatur und chemische Bestandteile unterscheiden sie sich voneinander. Unter anderem wurden besonders Schwefelbakterien in verschiedenem Habitat gefunden und von vielen Forschern untersucht.

Die in früherer Zeit gemachten Untersuchungen verdanken wir den Studien von WINOGRADSKY (74, 75), MOLISCH (48) usw. und in neuerer Zeit besonders BAVENDAMM (6).

Über die Physiologie der Schwefelbakterien, welche Schwefel in den Zellen enthalten, sind—wie wir schon gesehen haben—von vielen Forschern Mitteilungen gemacht worden, doch über Schwefelbakterien, welche keinen Schwefel in den Zellen enthalten, ist das Studium noch ungenügend. Der Chemismus der biologischen Vorgänge im Leben der Schwefelbakterien dürfte ein sehr interessantes Forschungsgebiet sein; besonders gilt dies von den schwefeloxydierenden Bakterien. Leider haben wir keine ausreichenden Kenntnisse darüber, wenn auch WAKSMAN und seine Mitarbeiter derartige Bakterien erforscht haben.

Die thermalen Mikroorganismen von Japan sind nur wenig erforscht (17) und harren noch näherer Untersuchung. Im Herbst des Jahres 1924 fand ich, dass die Reaktion eines Gemisches von Thermalwasser und dessen schlammartigem schwefelhaltigem Absatz aus den Yumoto-Schwefelthermen bei Nikko stark sauer war, und vermutete, dass in diesem Gemisch Mikroorganismen entwickelt waren, welche Schwefel oxydieren können; und es gelang mir, eine schwefeloxydierende Bakterie daraus zu kultivieren (14). Ich untersuchte seit der Zeit die Materialien aus verschiedenen Thermen Japans und stellte fest, dass derartige Bakterien vornehmlich in Schwefelthermen leben. Es gelang mir, 3 Arten zu isolieren (15, 16, 17).

In dieser Arbeit beabsichtige ich, hauptsächlich die Ernährungsphysiologie einer der vier obigen Arten zu schildern. Der physiologische Vorgang, besonders das Verhalten der Bakterien zum Schwefel—die Schwefeloxydation in den Zellen—ist aber so kompliziert, dass ich denselben noch nicht vollkommen zu erklären imstande bin.

II. Übersicht über die Untersuchungen an schwefeloxydierenden Bakterien.

Die farblosen, nicht fadenbildenden Schwefelbakterien, welche Schwefel und Schwefelverbindungen oxydieren, teilen wir in zwei Gruppen. Zur ersteren dieser Gruppen gehören *Thiobacillus thioparus* BEIJERINCK und *Th. denitrificans* BEIJERINCK, welche von dem in Medium enthaltenen Schwefelwasserstoff oder Thiosulfat Schwefel freimachen, wobei dieser sich nicht in denselben Zellen, sondern in der Lösung häuft. Die Bakterien werden im Boden, Kanalwasser oder Meerwasser gefunden und entwickeln sich in alkalischen Medien, während saure Reaktion für die Entwicklung hindernd ist. Über diese *Thiobacillus*-Arten verdanken wir die Untersuchungsergebnisse NATHANSOHN (49), BEIJERINCK (7), JACOBSEN

(19, 20), LIESKE (35), GEHRING (18) und anderen.

Von der zweiten Gruppe kennen wir fünf Arten, nämlich eine Art *Thiobacillus thiooxidans* WAKSMAN et JOFFE und vier von mir isolierte *Thiobacillus*-Arten, welche elementaren Schwefel oder Thiosulfat oxydieren; bei diesen Arten wird Schwefel weder in den Zellen noch in dem Medium angehäuft, sondern wird in dem Masse zu Schwefelsäure, wie das Medium pH=1,0 oder weniger wird. Die schwefeloxydierenden Bakterien wurden in Amerika, Dänemark, Deutschland, Indien und Japan erforscht.

In Amerika veröffentlichte WAKSMAN (61, 62, 63, 64, 65, 69) sein prachtvolles Werk über die neulich von ihm entdeckten Bakterien, besonders auch über die Klassifikation und physiologische Betrachtung der Schwefelbakterien; desgleichen über die morphologischen und physiologischen Eigenschaften des *Thiobacillus thiooxidans*, Isolierungs- und Kulturmethode derselben. Es ist ihm gelungen, die Bakterien auf festem Nährboden zu kultivieren und Reinkulturen zu bekommen. Durch diese Reinkulturen konnten er und seine Mitarbeiter die physiologischen Studien genau weiter führen. Er hat eine andere *Thiobacillus*-Art, den sogenannten *Thiobacillus B*, im Erdboden gefunden, welche Thiosulfat schnell oxydiert und Schwefel in der Lösung ausscheidet. Diese Art lebt gewöhnlich in kultiviertem Boden; sie spielt mit *Thiobacillus thiooxidans* in Bezug auf Schwefeloxydation in dem Boden eine Rolle und kann bei einer Reaktion von pH=9,8 bis 1,0 Schwefeloxydation erzeugen. BROWN (9) hat von einer gleichen Bakterie wie der von WAKSMAN-JOFFE beschrieben aus der Gartenerde, dem Schlamm der Durchlüftungszimmer des Kloakenwassers und dem Erdboden-Schwefel-Kompost mitgeteilt und gesagt, dass ihr Stamm ein *Pseudomonas* mit einer Geißel ist, von der Art des *Thiobacillus*. Er bekam die Studienergebnisse über die Physiologie seiner Bakterien und die Veränderung der Bodenreaktion durch Überimpfung derselben.

STARKEY (55) berichtete über die Physiologie der Bakterien, dass sich die Oxydation beträchtlich vermindert, wenn der Schwefel nicht auf der Oberfläche des Mediums schwebt, dass jedoch ein neues Zusetzen von Schwefel auf die Oberfläche den Oxydationsprozess beschleunigt. Während der Reaktion des Kulturmediums oberhalb von pH=6,0 findet keine Schwefeloxydation statt. Er stellte fest, dass die Formen des Schwefels einen Unterschied in der Sulfat-Menge veranlassen, nämlich dass die präzipitierte Form eine maximale Menge gibt, die rhombischen und amorphen Formen dagegen weniger. Die Entwicklung hörte auf beim Fehlen von Kohlensäure oder Sauerstoff. Bei der Vermehrung des partialen Druckes der Kohlensäure wurde die Oxydationsgeschwindigkeit

keit vergrößert. STARKEY (56) berichtete weiter über die Kohlenstoff- und Stickstoffernährung unter saurer Bedingung. Er teilte mit, dass die Bakterien sich gegen höhere Säurekonzentration gleichgültig zeigen, und dass keine anderen autotrophen Bakterien in sauren Medien sich gut entwickeln, sondern ihr bestes Wachstum nur in alkalischer Flüssigkeit bekommen. Ungeachtet der höher konzentrierten Lösung und der grösseren H-Ionenkonzentration sind die Bakterien ausserordentlich tolerant gegen die verbundenen Einflüsse der beiden Faktoren. Glukose verhindert das Wachstum des Organismus und ist als Energiequelle oder Kohlenstoffquelle nur wenig brauchbar. Die Verwendung dieses Kohlehydrates bei Vorhandensein von anorganischem Schwefel als Energiequelle ist feststehend.

Übereinstimmend mit der Verminderung der Oxydation, die durch verschiedene Faktoren verursacht wird, wie Säure-, Nitrat- oder Peptonkonzentration, ist die Verringerung der Fähigkeit, die Energie zu verwerten, welche für die Kohlenstoffassimilation nützlich ist. Dies zeigt, dass eine nachteilige Veränderung in dem Stoffwechsel des Organismus eingetreten ist. Überdies erklärte STARKEY, dass Ammonium-Stickstoff die einzige Stickstoffquelle ist, welche Bakterien benutzen, wobei etwa 1 % Kaliumnitrat die Oxydation gänzlich verhindert. Auf der anderen Seite stellte er fest, dass weder Pepton noch Aminosäure als Stickstoff- oder Kohlenstoffquelle verwendbar sind. WAKSMAN und JOFFE (70) haben die Ergebnisse der gleichen Versuche über Transformation von unlöslichen Phosphaten veröffentlicht. Sie (71, 72) berichteten ferner über die Kohlenstoffassimilation und Atmung der Bakterien *Thiobacillus thiooxidans*, indem sie angaben, dass diese Bakterien in kohlensäurefreier Luft nicht wachsen können, dass sie Kohlensäure aus der Luft aufnehmen und danach Sauerstoff abgeben. In der gleichen Zeit verbrauchen diese Bakterien eine grössere Menge von Sauerstoff für die Oxydation, welche ihnen die nötige Energie für ihre Lebenstätigkeit liefert. Sie stellten weiter fest, dass Ammoniumsulfat die günstigste Substanz für die Atmung der Bakterien ist, während Natriumnitrat und Natriumcyanid am schädlichsten sind, dass sie einen S/C-Wert von durchschnittlich 31,82 haben; und dass 6,65 % der Gesamtenergie für die Kohlenstoffassimilation verwandt wird.

Trotz aller Bemühungen bei ihren Kulturversuchen konnten LIPMAN, WAKSMAN und JOFFE (44) keine echte Reinkultur bekommen, doch konnten sie erklären, dass derartige Bakterien, welche in einem Gemisch von Schwefel und unlöslichem Phosphat aufgewachsen sind, immer eine stärkere Säurebildung erzeugen, auch wenn neutralisierende Mittel (Trikalziumphosphat) vorhanden sind. Sie stellten weiterhin Erörterungen

an über die Umwandlung unlöslicher Phosphate zu löslichen Phosphaten während des Kulturintervalles. LIPMAN und WAKSMAN (43) berichteten über die Schwefeloxydation im Boden und über die Ergebnisse ihrer Untersuchungen an *Thiobacillus thiooxidans* und die Verwendung dieser Bakterien. Unter Benutzung von Schwefel zeigten dieselben eine wirkungsvolle Heilkraft gegen die Kartoffel- und Batatekrankheit, wenn eine angemessene Menge Schwefel, um die H-Ionenkonzentration genügend zu verkleinern, beigegeben wurde. Nach ihrer Meinung gilt dasselbe auch bei einer Verbesserung des Alkalibodens.

In Dänemark fand JENSEN (21) eine dem *Thiobacillus thiooxidans* gleichartige Bakterie im Boden. Er impfte diesen Organismus mit einer Mischung von 100 g reinem Quarzsand, 2 g Schwefel respektive 5 g pulverisiertem Schwefelkies und 12 ccm Nährlösung und bemerkte, dass die Bakterien ungefähr die gleiche Menge Pyrit-Schwefel und elementaren Schwefel oxydiert hatten. Nach seiner Untersuchung kann kaum ein Zweifel daran bestehen, dass Schwefel als Energiematerial für *Thiobacillus thiooxidans* dienen kann, obwohl die gefundenen Sulfatmengen infolge der weniger günstigen Reaktion, die durch den geringen Kalziumkarbonatgehalt im Sand verursacht worden war, nur klein waren. Er versuchte es wieder mit Gartenboden und 2% Schwefelkies und stellte fest, dass der Schwefelkies in saurem Boden sehr schnell oxydiert, während im alkalischen Boden nur eine relativ schwache Oxydation stattfindet.

In Deutschland untersuchte DREWS (11) stark sauren Moorboden in dem Moorversuchsfeld des Landwirtschaftlichen Institutes in Kiel, auf dem sich trotz starker Kalkdüngung überhaupt kein pflanzliches Wachstum einstellte. Der pH-Wert der oberen (Humus) Schichten dieses Bodens beträgt 3,4, während die unteren Schichten (30–90 cm) vollständig steril sind. Die stark saure Bodenprobe dieses Moorbodens verhielt sich in biochemischer Hinsicht äusserst indifferent. Die üblichen sonst im Boden vorkommenden mikroorganischen Prozesse, nämlich Eiweisszersetzung, Zellulosezersetzung, Nitrifikation, Denitrifikation und Stickstoffbindung entwickelten sich in dieser stark sauren Probe sehr langsam oder unterblieben gänzlich. Als Ursache der ungewöhnlichen Säurebildung wurde das Vorhandensein von *Thiobacillus thiooxidans** festgestellt. Diese Bakterien vermögen die im Boden vorhandenen Schwefelverbin-

*) Die von DREWS isolierten Bakterien sind ebenso beweglich wie diejenigen, welche JENSEN aus dänischem Boden gezüchtet hat. DREWS gab der Vermutung Ausdruck, dass es sich in beiden Fällen (JENSEN und DREWS) um eine bewegliche europäische Varietät zu handeln scheint. Ich möchte aber darauf hinweisen, dass der WAKSMAN und JOFFE-Stamm Gram negativ, und dieser DREWS-Stamm wahrscheinlich mit dem von mir isolierten Stamm, nämlich *Thiobacillus thiooxidans*, identisch ist.

dungen zu Schwefelsäure zu oxydieren und die Säuregrade des Bodens wirksam zu erhöhen.

In Indien untersuchten AYYAR, PERUMAL und NORRIS (3) die Schwefel-oxydation in einer grossen Menge von aktiviertem Schlamm und ihren Einfluss auf die Löslichkeit der mineralen Phosphate. Sie berichteten, dass ohne neutralisierende Stoffe die Lebensmöglichkeit der schwefelzersetzten Exemplare bis an $\text{pH}=1,6$ heranreicht, und dass sich eine schnelle Entstehung von titrierbarer Säure ergab, während sich bei Exemplaren, denen minerales Phosphat zugesetzt war, eine grössere Bildung von Säure zeigte, welche zur Bildung löslichen Phosphates gebraucht wird. AYYAR und NORRIS (2) erklärten, dass sich während des Prozesses der Durchlüftung und der Schwefeloxydation, die Anzahl der fäkalen und faulen Bakterien vermindere. Nach der Reaktion des Mediums, in welchem der Oxydationsprozess vor sich geht, sahen sie verschiedene Organismen, z. B. bei $\text{pH}=5,2$ Actinomyceten, bei $\text{pH}=3-4$ Pilze; und sie fanden, dass *Fusarium* die widerstandsfähigste Form unter den Pilzen ist. Bei $\text{pH}=2,1$ beginnen die schwefeloxydierenden Bakterien sich stark zu vermehren und gelten als die einzige Art, die in dieser Reaktion leben kann. AYYAR isolierte eine Bakterie aus dem oben erwähnten Material, welches eine Reaktion von $\text{pH}=2,1$ hat. Diese Bakterie wächst auf gewaschenem Agar, Kieselgallert und Gipsplatten, und ihre Kultureigenschaften sind verschieden von denen der WAKSMAN-JOFFE-Bakterien. Die Aeration der Kulturen verzögerte den Oxydationsprozess, und das Schwefel-Kohlenstoff-Verhältnis der Bakterien war 40,75. Aus seinem Versuchsergebnis zog AYYAR den Schlusss, dass die Eigentümlichkeit dieser Bakterien in dem morphologischen und physiologischen Verhalten, in dem höheren Schwefel-Kohlenstoff-Verhältnis und in anderen Charaktereigenschaften liegt. Dies gibt Veranlassung, diese Bakterie als eine neue Art der schwefeloxydierenden Bakterien zu klassifizieren.

In Japan berichtete ich (14) über eine neue Bakterie, die ich in dem schleimigen, schwefelhaltigen Absatz der Yumoto-Schwefelthermen bei Nikko isolierte und *Thiobacillus thermitanus* benannte. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen über die Physiologie dieser Bakterie habe ich vorläufig mitgeteilt. Es ist mir (15) gelungen wieder drei neue Arten dieser Bakteriengruppe aus dem Schlamm verschiedener Schwefelthermen zu kultivieren. Diese sind *Thiobacillus lobatus*, *Th. crenatus* und *Th. umbo-natus* benannt.

III. Methodik und Materialien.

Isolierung der Bakterien: Im Herbst des Jahres 1924 begann ich—wie schon erwähnt,—schwefeloxydierende Bakterien zu kultivieren. Zur

Kultur dieser Bakterien habe ich WAKSMANS Medium Nr. 6 (63) verwendet, welches folgendes Rezept wiedergibt:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,20 g
MgSO_4	0,50 g
CaCl_2	0,25 g
KH_2PO_4	3,00 g
FeSO_4	Spur
Destilliertes Wasser	1000,0 ccm

ERLENMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt wurden mit 100 ccm dieser Lösung und mit 1,0 g Schwefel beschickt, an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 30 Minuten im Dampftopf sterilisiert und dann mit einigen Tropfen eines Gemisches von Thermalwasser und dessen schlammartigem schwefelhaltigem Absatz geimpft. Die Kulturen wurden bei 28° in einen Brutschrank gestellt. Die Nährlösung trübte sich nach einigen Tagen auffallend und reagierte stark sauer. Bei der mikroskopischen Beobachtung wurden in der Schwefelmasse und in dem Medium zahlreiche kleine Stäbchenbakterien gefunden, welche dem *Thiobacillus thiooxidans* ähnlich waren. Diese Bakterien wurden noch mehrmals überimpft und mit derselben Nährlösung angehäuft, dann wurden sie auf WAKSMANS Medium Nr. 10 (64) gezüchtet. Dieses Medium hat folgende Zusammensetzung:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	5,0 g
MgCl_2	0,1 g
NH_4Cl	0,1 g
CaHPO_4	5,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
Agar	20,0 g
Destilliertes Wasser	1000,0 ccm

Anstatt 10 g tertiäres Kalziumphosphat von WAKSAMANS Rezept gebrauchte ich 5,0 g sekundäres Kalziumphosphat. Da dieses Medium sehr leicht seine Festigkeit verliert, die Bakterien zu kultivieren, so machte ich die Mischung der Substanzen sehr sorgfältig und benutzte Thiosulfat und Phosphat vor der Sterilisation. Da die Bakterien niemals auf den Gusskulturen in der Petri-Schale wachsen, benutzte ich Ausstrichkulturen. Beim Ausstreichen eines Tropfens der bakterienhaltigen Lösung auf obengenanntem Substrat erschienen nach etwa einer Woche sehr kleine, runde Kolonien, an denen ich rundherum einen durchsichtigen Hof beobachtete. Dieser Hof wird von entstehender Schwefelsäure hervorgerufen, welche durch Oxydation von Schwefel gebildet wird und das Kalziumphosphat löst. Reinkulturen wurden beim Umimpfen in die obenerwähnte Nährlösung oder auf das Agarsubstrat erhalten; das stärkste Wachstum trat im Medium Nr. 6, nämlich mit schwefelbesetzter Lösung ein.

Physiologische Untersuchungen: Bei den physiologischen Untersuchungen bediente ich mich meist einer synthetischen Nährlösung von WAKSMAN mit umdestilliertem Wasser. Sämtliche Präparate wurden mit MERKS, oder KAHLBAUMS „garantiert reinen,“ oder „extra reinen“ Chemikalien hergestellt. Als Kulturgefäße wurden ERLÉNMEYER-Kolben von etwa 250 ccm Inhalt verwendet. Auf die Eigenschaft der Gläser wurde besonders achtgegeben, und nur Kolben von einheimischem Normalglas kamen zur Verwendung. Vor dem Gebrauch wurden die Gefäße mit einem Gemisch von Kaliumbichromat und Schwefelsäure behandelt und mit fließendem Wasser gründlichst gewaschen. Nach dem Trocknen wurden sie in gewöhnlicher Weise mit Wattepfropfen verschlossen und im Trockenschrank sterilisiert. Die Kolben wurden dann mit meistens 100 ccm der Nährlösung beschickt unter besonderer Beigabe von Schwefel in jeden Kolben (1,0 g) und im Dampftopf, wie schon einmal angegeben, sterilisiert. Nach der Sterilisation der Lösung wurden die Kulturkolben mit Bakterien besät, indem ein Tropfen von einwöchiger Kultur mit sterilisierter Pipette rasch hinzugefügt wurde. Diese Bakterienkulturen sind mit der obengenannten synthetischen Lösung rein gezüchtet worden. Nach der Aussaat wurden die Kulturen in einen auf 28° regulierten Thermostat gestellt. Nach Ablauf der Versuchsfrist wurde die H-Ionenkonzentration, die Titrationsazidität und der SO_3 -Gehalt der Kulturlösung bestimmt.

Die H-Ionenkonzentration der Lösung wurde mit Hilfe des Indikators von CLARK, oder elektrisch mit dem BOVIES-Apparat bestimmt.

Bei der Bestimmung der Titrationsazidität wurden 10 ccm der Kulturlösung aufgenommen und mit N/10 Natronlauge-Lösung und Phenolphthalein als Indikator titriert.

Bei der Sulfat-Analyse wurden 20 ccm Kulturflüssigkeit filtriert und mit Bariumchlorid behandelt, und in gewöhnlicher Weise der Niederschlag von Bariumsulfat nach der Wasserwaschung gewogen.

Die weiteren besonderen Methoden sind jeweils in den betreffenden Untersuchungen genau angegeben.

Materialien: Das erste Material für meine Versuche war, wie ich schon oben gesagt habe, ein Gemisch von Thermalwasser und schlammartigem, schwefelhaltigem Absatz der Yumoto-Schwefelthermen bei Nikko. Später sammelte ich Materialien von verschiedenen Thermen in Japan und isolierte die schwefeloxydierenden Bakterien in gleicher Weise (17).

IV. Systematisches.

Die Schwefelbakterien teilte WAKSMAN (62) in 5 Gruppen ein, unter Berücksichtigung ihres morphologischen und physiologischen Charakters: 1) Farblose, fadenbildende Bakterien, speichern Schwefel in ihren Zellen auf. 2) Farblose, nicht fadenbildende Bakterien, speichern Schwefel in ihren Zellen auf. 3) Purpurbakterien, oxydieren Schwefelwasserstoff und speichern Schwefel in ihren Zellen auf. 4) Bakterien oxydieren Schwefel und Schwefelverbindungen, aber speichern Schwefel ausserhalb ihrer Zellen auf. 5) Bakterien oxydieren elementaren Schwefel und speichern denselben weder innerhalb noch ausserhalb ihrer Zellen auf. Die Bakterien, von welchen ich hier spreche, gehören zur fünften Bakteriengruppe.

Die farblosen Schwefelbakterien der fünften Gruppe, welche Schwefel und Schwefelwasserstoff oxydieren, teilen wir in zwei Gruppen. Zur ersteren gehören *Thiobacillus thioparus* BEIJERINCK und *Th. denitrificans* BEIJERINCK, welche den Schwefel von dem in dem Medium enthaltenen Schwefelwasserstoff oder Thiosulfat freimachen, wobei der Schwefel nicht in denselben Zellen sondern in dem Medium angehäuft wird. Diese Bakterienarten werden im Erdboden oder Kanalwasser gefunden; sie entwickeln sich nur in alkalisch reagierenden Medien und vertragen nicht sauer reagierende. Eine Art der zweiten Gruppe, die Schwefel oder Thiosulfat oxydiert und Schwefel weder in den Zellen noch in dem Medium anhäuft sondern zu Schwefelsäure oxydiert und die Nährlösung stark sauer ($\text{pH}=1,0$ oder weniger) reagieren lässt und nur in saueren Medien wächst, kennen wir unter dem Namen *Thiobacillus thiooxidans* WAKSMAN et JOFFE. Dieser Bacillus wurde aus einem Gemisch von Schwefel und Erde oder von Schwefel, Phosphorit und Erde isoliert. In der schon erwähnten Weise können wir folgende vier japanische Arten aus dem Thermalwasser isolieren: *Th. thermitanus*, *Th. umbonatus*, *Th. crenulatus* und *Th. lobatus*. Aber auch einige Beispiele von ihrem Vorhandensein in dem mit Schwefel gemischten Boden der Vulkane und Badeorte können wir geben (17).

Morphologisch sind unsere Bakterien *Thiobacillus thermitanus* und *Th. umbonatus* der von WAKSMAN und JOFFE (69) beschriebenen Art *Thiobacillus thiooxidans* etwas ähnlich. Die zuletzt genannte Art ist in ihrer Beschreibung der Geissel nicht genau angegeben; es findet sich nur die Bemerkung: „the majority of the cells are not motile, although a few motile cells also can be found in (seven days old) cultures.“ In der Tat, bei unseren zwei Arten war es sehr schwer die Geissel zu färben, und erst nach vielen Versuchen nach LÖFFLER konnte ich sie mittels HIDAKAS

Tabelle. 1.

Art	<i>Th. thiooxidans</i>			<i>Th. thermotenus</i>	<i>Th. umbonatus</i>	<i>Th. lobatus</i>	<i>Th. crenatus</i>
	WAKSMAN u. JOFFE	BROWN	JENSEN	EMOTO	EMOTO	EMOTO	EMOTO
Stammend von	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Formen der Zelle	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Grösse	1,0 × 0,5 μ	2,0 × 0,5 μ	0,6-1,0 × 0,3-0,5 μ	2,0 × 0,5 μ	1,0-3,0 × 0,5-0,8 μ	1,0-1,8 × 0,5-0,8 μ	1,5-2,5 × 0,8-1,0 μ
Bewegung	±	—	—	+	+	+	+
Gram-Färbung	+	—	—	—	—	—	—
Form der Kolonie	rund?	rund	rund	rund	unregelmässig rundlich	unregelmässig rundlich	unregelmässig rundlich
Erhabenheit der Kolonie	erhaben	—	erhaben?	erhaben	buckelartig erhaben	flach	flach
Rand der Kolonie	glatt	—	glatt?	glatt	gekerbt	gelappt	gekerbt
Energiequelle	Schwefel, Thiosulfat	Schwefel, Thiosulfat	Schwefel, Thiosulfat	Schwefel, Thiosulfat	Schwefel, Thiosulfat	Schwefel, Thiosulfat	Schwefel, Thiosulfat
Optimale Temperatur	28-30°	37°	25°	28°	28°	28°	28°

und IMAI's Methode feststellen. Auch BROWN (9) schrieb, dass die Geißel der von ihm isolierten Bakterien sehr schwer zu färben ist; dies gelang ihm nur durch die von MUIR verbesserte PITFIELD-Methode nach EYRE. Er beobachtete eine monotriche Geißel, welche 5–10 μ lang ist. Er sagte: „do furnish evidence of flagellate on the morphological forms with the group known as *Thiobacillus thiooxidans*.“

In Bezug auf Gram-Färbung gaben WAKSMAN und JOFFE (69) an, dass ihre Bakterien Gram positiv sind, während unsere beiden Arten negativ sind. BROWN (9) und JENSEN (21) gaben keine Bemerkung darüber.

Die beiden weiteren Arten *Thiobacillus crenatus* und *Th. lobatus* sind noch niemals näher beschrieben worden.

Die bis jetzt bekannten schwefeloxydierenden Bakterien, die der Gruppe von *Thiobacillus* angehören, sind fünf, nämlich *Th. thiooxidans*, *Th. thermitanus*, *Th. lobatus*, *Th. crenatus* und *Th. umbonatus*.

Der besseren Übersicht wegen gebe ich in folgender Tabelle die Untersuchungsmerkmale dieser Bakterienarten an (Tabelle 1).

Es lässt sich folgende Diagnose über die *Thiobacillus*-Arten geben.

Gattung *Thiobacillus* BEIJERINCK.

Kurze Stäbchen, leiten ihre Energie aus der Oxydation von Sulfaten, Thiosulfaten oder elementarem Schwefel her, bilden Schwefel, Persulfate und Sulfate unter saurer oder alkalischer Reaktion und nehmen ihren Kohlenstoff aus Kohlensäure oder Bikarbonaten und Karbonaten in der Flüssigkeit.

I. Optimales Wachstum in alkalischer Reaktion.

- A. Aerobisch1. *Th. thioparus*.
- B. Anaerobisch2. *Th. denitrificans*.

II. Optimales Wachstum in saurer Reaktion.

- A. Gram positiv3. *Th. thiooxidans*.
- B. Gram negativ
 - 1. Kolonie rund, erhaben.
 - a. Rand der Kolonie glatt4. *Th. thermitanus*.
 - b. Rand der Kolonie gekerbt....5. *Th. umbonatus*.
 - 2. Kolonie unregelmässig, flach.
 - a. Rand der Kolonie gelappt6. *Th. lobatus*.
 - b. Rand der Kolonie gekerbt7. *Th. crenatus*.

V. Physiologische Untersuchungen an

Thiobacillus thermitanus.

Aus den japanischen Thermen, die wir aus einer anderen Abhand-

lung (17) kennen, isolierte der Verfasser vier Arten von schwefel-oxydierenden Bakterien; und eine Art davon, *Thiobacillus thermitanus*, wurde für physiologische Untersuchungen verwendet.

1. Temperatur.

a. Optimale Temperatur.

Die Temperatur und das Wachstum der Organismen stehen in engem Verhältnis zueinander; wir müssen die im Wasser lebenden Schwefelbakterien unterschiedlich von denen im Erdboden, Schlamm usw. besonders beobachten.

TRAUTWEINS Thionsäurebakterien (60) benötigen eine minimale Temperatur von ca. 6,9°; die optimale Temperatur befindet sich bei 27° und eine maximale zwischen 36,5° und 40°.

Das Wachstum vom *Beggiatoa* und *Thiothrix* war nach KEIL (30) bei einer Temperatur zwischen 6° und 25° recht unbedeutend; über 25° konnte er eine beträchtliche Steigerung der Lebenstätigkeit bemerken. Diese Steigerung des Wachstums und der Vermehrung hielt bei beiden Formen bei 30° noch an, darüber hinaus aber nicht weiter. Oberhalb von 35° liess die Lebenstätigkeit von *Thiothrix* plötzlich nach, bei 37–38° trat schon der Tod ein. *Beggiatoa* vertrug noch ganz gut eine Temperatur von 40–41°, erst bei 45° trat der Zerfall der Fäden und schnelles Absterben ein.

Nach KARLINSKI (29) wächst und vermehrt sich *Bakterium Ludwigi* aus den Ilidze-Thermen nicht unter 50°, und die günstigsten Temperaturen für das Wachstum sind 55–57°, die maximale 80°. *Bakterium Ilidzensis capsulatus* hat ebenfalls eine minimale Temperatur von 50°, eine optimale zwischen 59–60° und eine maximale bei 60–70°.

Die Erforscher der schwefeloxydierenden Bakterien, wie WAKSMAN und JOFFE (69), BROWN (9) und JENSEN (21), kultivierten die Bakterien bei verschiedenen Temperaturen z. B. 25°, 28° und 37°. STARKEY (55) berichtete, dass der *Thiobacillus thiooxidans* bei 27–38° ein maximales Wachstum aufweist, und dass bei niedrigeren Temperaturen eine Hemmung der Oxydation auftritt.

Um die Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur zu untersuchen, setzte ich die Kulturen, welche—wie im vorigen Abschnitt "Methodik" beschrieben—in WAKSMANS Medium Nr. 6 geimpft worden waren, Temperaturen von 18°, 28°, 37° und 60° aus und beobachtete nach je 8 Tagen die Trübung der Flüssigkeit, Azidität und Sulfatmenge.

Wie wir aus Tabelle 2 und 3 ersehen, wächst *Thiobacillus thermitanus* am günstigsten bei einer Temperatur von 28°; darunter wird seine Lebenstätigkeit allmählich verringert, während bei 37° und noch höherer Tem-

peratur kein Wachstum mehr vorkommt.

Tabelle 2.

Wachstum von *Thiobacillus thermanus* bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur	Nach 8 Tagen	Nach 15 Tagen
18°	+	++
28°	++	+++
37°	—	—
60°	—	—

Tabelle 3.

Analytische Ergebnisse der Kulturflüssigkeiten bei 28° und 37°.

Temperatur	Zeitdauer der Kultur	0 Tag	Nach 1 Woche	Nach 2 Wochen	Nach 3 Wochen
28°	Titration	2,2	10,3	21,4	21,6
	pH	4,4	1,4	1,2	-1,2
	SO ₃ *	41,49	—	—	922,82
37°	Titration	2,2	2,5	2,6	2,6
	pH	4,4	4,3	4,2	4,0
	SO ₃ *	41,49	—	—	47,93

*) „SO₃-Menge“ bedeutet dieselbe Menge pro 100 ccm Kulturflüssigkeit.
Dasselbe gilt für die folgenden Tabellen.

b. Der Einfluss höherer Temperatur auf die Bakterien.

Es scheint keine Mitteilung vorhanden zu sein über die Widerstandsfähigkeit von *Thiobacillus thioparus* und *Th. denitrificans* gegen höhere Temperaturen. TRAUTWEIN (60) beobachtete den Wärmetod seiner Thionsäurebakterien; sie wurden bei einer Temperatur von 40° innerhalb 3 Stunden in ihrer Lebenstätigkeit merklich geschädigt. Nach 60 Minuten waren nur wenige am Leben und bei 50° war die Probe schon nach 60 Minuten steril. Bei 55° trat der Tod zwischen 2 und 5 Minuten ein.

STARKEY (54) sagte, dass eine höher als 50-gradige Temperatur für *Thiobacillus thiooxidans* in kurzer Zeit verderblich ist und eine solche von 55° die Zellen einer lebhaften Kultur in 60 Minuten tötet.

Bei unserem Experiment beschickten wir das schon im voraus in bestimmter Temperatur gehaltene WAKSMANSCHES Medium Nr. 6 mit einer gewissen Menge der einwöchigen Kulturlösung, welche sofort in den

mittels eines Thermoregulators regulierten Trockenschrank gestellt wurde. Nach gewissen Intervallen wurde dieselbe herausgenommen, 3 Tropfen von der Lösung in die Nährlösung mit steriler Pipette umgeimpft und in den Brutschrank (28°) gestellt. Wir beobachteten die Kulturen nach 8 Tagen und erhielten das in Tabelle 4 wiedergegebene Resultat.

Tabelle 4.
Widerstandsfähigkeit gegen Hitze.

Temperatur Minuten	40°	50°	60°	70°	80°
1					—
2					—
3					—
4				+	—
5	+	+	+	+	—
10	+	+	+	+	—
20	+	+	+	—	—
30	+	+	—	—	—
40	+	+	—		
50	+	+	—		
60	+	+			
90	+	+			
120	+	+			

Wie wir aus der Tabelle ersehen, leben die Bakterien bei 40–50° noch 2 Stunden ; aber sie verlieren bei 60° in 30 Minuten, bei 70° in 20 Minuten und bei 80° sofort ihr Leben.

Es ist eine auffallende Tatsache, dass in der Natur unsere schwefel-oxydierenden Bakterien bei einer Temperatur von 80° in den Manza-Schwefelthermen leben (17), und von mir auch isoliert wurden, während sie in Reinkultur bei diesem Temperaturgrad sofort eingingen. Das kommt davon, dass die Kulturlösung nicht die gleichen Bestandteile des Thermalwassers enthält, in dem unsere Bakterien abhängig von anderen Organismen leben. Die Lebensbedingungen der schwefeloxydierenden Bakterien sind sehr kompliziert und es ist daher schwer, eine genauere Erklärung darüber abzugeben.

2. Einfluss der ultravioletten Strahlen.

Was die Einwirkung kurzwelliger Strahlen auf die Bakterien betrifft, so wurden zahlreiche Arbeiten bereits veröffentlicht. Für die Unter-

suchung wurden verschiedene Bakterienarten gebraucht, nämlich *Bacillus anthracis*, *Bac. typhi*, *Bac. prodigiosus*, *Bac. proteus mirabilis*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bacterium megathericum*, *Vibrio cholerae*, *V. Metschnikovii* usw. Diese Bakterien wurden durch ultravioletter Strahlen in kurzer Zeit getötet. Dagegen ist bisher das Verhalten der schwefeloxydierenden Bakterien gegenüber Einwirkung ultravioletter Strahlen noch nicht studiert worden.

Um den Einfluss der ultravioletten Strahlen auf unsere Bakterien zu untersuchen, wurde eine Agarplatte von WAKSMAN mit einer Kultur bestrichen oder punktiert, und dabei sorgfältig vermieden, die Platten weder zu stechen noch zu zerbrechen. Danach wurden die Bakterien den ultravioletten Strahlen (Wellenlänge 235–400 $\mu\mu$) einer Höhensonne nach Bach von der Quarzlampen-Gesellschaft Hanau von 7,8 Amp. und 110 Volt ausgesetzt, wobei die Entfernung 30 cm von der Quarzlampe betrug. Nach der Bestrahlung wurden die Kulturen bei 28° in einen Thermostat gestellt; und nach bestimmten Zeiten beobachteten wir die Kolonie und den Hof, welcher durch die Lebenstätigkeit der Bakterien

Tabelle 5.

Einfluss der ultravioletten Strahlen.

Dauer der Bestrahlung in Minuten	Durchmesser des Hofes in cm.	
	Nach 6 Tagen	Nach 9 Tagen
Kontrolle	2,3	2,3
1	1,5	1,9
2	0,6	1,2
3	0	0,5
4	0	0
5	0	0

Fig. 1. Einfluss der ultravioletten Strahlen (nach 6 Tagen).

- a. Kontrolle (bedeckt mit oberer Schale). b. 1-Minuten-Bestrahlung.
c. 2-Minuten-Bestrahlung. d. 3-Minuten-Bestrahlung.

um die Kolonie herum entsteht, und stellten das Leben der Bakterien fest (Tabelle 5).

Durch die Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen wurden unsere schwefeloxydierenden Bakterien, *Thiobacillus thermanus*, in kurzer Zeit beeinflusst, und zwar gingen sie in vier Minuten zu Grunde (Fig. 1).

3. Beziehung zwischen der Grösse der Oberfläche des Kulturmediums und der Schwefeloxydation.

Schon früher hat BROWN (9) diese Verhältnisse an seinen Bakterien studiert. Er hat drei Typen von Kolben mit 100 ccm Nährlösung verwendet: Einer derselben hat eine Flüssigkeitsoberfläche von etwa 300 cm², einer etwa 30 cm² und der dritte etwa 15 cm². Er kultivierte die Bakterien bei Zimmertemperatur. Das Ergebnis ist:

Grösse der Oberfläche in cm ²	pH		mg SO ₂ in 100 cem	Zunahme des SO ₃ pro 100cem
	0 Tag	7 Tage	15 Tage	
300	5,6	2,6	339,6	171,9
30	5,6	3,0	295,3	127,6
15	5,6	3,2	266,9	99,2
Kontrolle	5,6	5,5	167,7	—

Je grösser die Oberfläche, desto lebhafter ist die Schwefeloxydation. Die Kultur mit der grössten Oberfläche bringt etwa doppelt soviel Sulfatmenge hervor, als die mit der kleinsten Oberfläche. Es ist also klar, dass das Produzieren von Sulfat und die Änderung der H-Ionenkonzentration von der Grösse der Oberfläche der Kulturlösung abhängig sind.

Bei meinem Versuch brauchte ich besondere Kulturgefässe nach Tamiya (57), welche einen bestimmten „Oberflächenquotienten“ haben. Die Kulturgefässe haben einen „Oberflächenquotienten“ von etwa 1, 1/2, 1/5, 1/10 und 1/100 und wurden mit 200 ccm Nährlösung von WAKSMAN Nr. 6 beschickt. Nach gewöhnlicher Sterilisierung impfte ich die Kulturen mit zwei Tropfen der Bakterienlösung und behielt eine Temperatur von 28° bei. Initiale Titrationsazidität, H-Ionenkonzentration und Sulfatgehalt wurden vor der Impfung gemessen, indem ich von jedem Gefässe mit sterilisierter Pipette 5 ccm der Lösung abnahm, zusammenmischte und dann verbrauchte. Nach Ablauf der bestimmten Zeit entnahm ich dem Gefässe 20 ccm der Lösung und benutzte sie zur Messung.

Wie wir aus Tabelle 6 und Figur 2 erschen, geht bei dem Gefäss mit dem Quotienten 1 innerhalb 15 Tagen die initiale H-Ionenkonzentration

(pH=4,2) bis auf pH=1,0 zurück, während bei dem Quotienten 1/100 dieser Grad auch nach 45 Tagen nicht erreicht werden kann. In Bezug auf die Sulfatmenge bringt der Quotient 1/100 weniger als ein Viertel der Menge des Quotienten 1 in derselben Zeit hervor.

Wir können durch diesen Versuch feststellen, dass unsere Bakterien um so lebhafter oxydieren, je grösser der „Oberflächenquotient“ ist, oder mit anderen Worten: Je grösser die Oberfläche, desto kräftiger die Schwefeloxydation; und wir können unsere Bakterien als eine fakultative aerobe Art betrachten.

Tabelle 6.

Einfluss der Grösse der Oberfläche auf das Wachstum.

Oberflächenquotient		1	1/2	1/5	1/10	1/100
0 Tag	Titration	2,2 ccm	—	—	—	—
	pH	4,2	—	—	—	—
	SO ₂	25,38 mg	—	—	—	—
Nach 15 Tagen	Titration	24,2 ccm	20,0	17,3	13,0	6,2
	pH	1,0	1,05	1,05	1,35	1,90
	SO ₂	733,18 mg	576,81	504,11	383,40	147,46
Nach 30 Tagen	Titration	30,7 ccm	24,1	21,2	18,8	8,2
	pH	0,8	1,05	1,10	1,15	1,6
	SO ₂	1169,39 mg	929,34	770,22	678,32	267,49
Nach 45 Tagen	Titration	34,7 ccm	25,7	24,4	19,3	9,9
	pH	0,65	0,8	0,95	1,10	1,45
	SO ₂	1372,06 mg	1032,22	1006,06	775,08	331,27

Tabelle 7.

Einfluss des Luftzuges auf die Schwefeloxydation.

Kultur	Zeitdauer der Kultur	pH		Titrationsazidität	
		Oberflächenquotient		Oberflächengquotient	
		1/10	1/100	1/10	1/100
Normal	0 Tag	3,6	3,6	2,3 ccm	2,3 ccm
	Nach 8 Tagen	2,3	2,8	4,0	3,5
Luftzufuhr	0 Tag	3,6	3,6	2,3	2,3
	Nach 8 Tagen	2,2	2,4	4,2	3,8

Um den Einfluss des Luftzuges auf die Schwefeloxydation bei schlech-

ten Bedingungen festzustellen, benutzte ich TAMİYAS Gefäße mit $1/10$ und $1/100$ Oberflächenquotienten, indem ich durch ein Glasrohr mit kleinen Löchern die Kultur mit Luft beschickte.

Wie aus der Tabelle 7 zu ersehen ist, konnten wir bestätigen, dass die vermehrte Sauerstoffzufuhr für die Bakterien günstig ist. Das Resultat stimmt mit JOFFES Ergebnissen (22) überein, welcher ein Gemisch von Erdboden, Schwefel und Phosphorit mit *Thiobacillus thiooxidans* untersucht hat.

(Fortsetzung folgt.)