

Ueber die Organismen der Nitrification.

Von

S. Winogradsky.

(Vortrag, gehalten in der Sitzung der Zürcher. Naturforschenden Gesellschaft vom 22. Februar 1891.¹⁾)

Meine Herren!

Im letzten Wintersemester hielt uns Prof. Dr. E. Schulze einen Vortrag »Ueber die Entstehung der salpetersauren Salze im Boden«, in welchem er in trefflicher Weise den damaligen Zustand der Nitrificationsfrage geschildert hat.

Ich betrachte es als ein für mich sehr angenehmes Zusammentreffen, dass ich jetzt, nach kaum einem Jahre, mit einem Vortrage über fast dasselbe Thema zu folgen

¹⁾ Die nachstehenden Seiten enthalten diesen Vortrag ohne irgend welche weitere Bearbeitung in gänzlich unveränderter Form. Die ausführliche Behandlung der in demselben berührten Fragen findet sich in den nachfolgend citirten Arbeiten des Verfassers.

Ueber Schwefelbakterien. Botan. Zeitung 1887.

Ueber Eisenbakterien. Ibidem 1888.

Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bacterien. Heft 1: Leipzig bei Felix 1888.

Recherches physiologiques sur les Sulfobactéries. Ann. de l'Institut Pasteur. t. III. Nr. 2.

Recherches sur les organismes de la nitrification. Ann. de l'Institut Pasteur. t. IV. Nr. 4.

— 2^{me} mémoire. Ibidem. t. IV. Nr. 5.

— 3^{me} mémoire. t. IV. Nr. 12.

— 4^{me} mémoire. t. V. Nr. 2.

habe; denn dadurch wird meine Aufgabe, Ihnen, meine Herren, über die neuesten Arbeiten auf diesem Gebiete zu berichten, ganz ausserordentlich erleichtert.

Eine Einführung in das Thema, welche nothwendigerweise eine längere sein müsste, denn die Nitrificationsfrage ist eine sehr alte, kann ich jetzt umgehen.

Ich brauche Ihnen nicht zu sprechen von der wissenschaftlichen und praktischen Bedeutung des Nitrificationsprozesses, von der Verbreitung der Nitrate und Nitrite in der Natur, von der Bildung kleiner Mengen derselben aus atmosphärischem Stickstoff, von den chemischen Reagentien, welche zum Nachweis der Stickstoffsäuren dienen; hauptsächlich aber ist mir die Möglichkeit gegeben, die Geschichte der Ansichten über die Ursachen der Nitrification als in den Hauptzügen bekannt vorauszusetzen.

Nur in Folge dieser wesentlichen Vereinfachung meiner Aufgabe bin ich in der Lage, diese neuesten Arbeiten, welche, wie Sie vielleicht zugeben werden, einen namhaften Fortschritt in der Kenntniss der Nitrification darstellen, einigermaßen ausführlich zu besprechen.

Wie Sie, meine Herren, schon aus dem erwähnten Vortrag von Hrn. Prof. Schulze wissen, ist seit den Versuchen von Schlösing und Müntz in der uns interessirenden Frage eine Wendung eingetreten: es ist bewiesen worden, dass die Ursache der Ammoniak-Oxydation im Boden in der Thätigkeit der Microorganismen zu suchen ist.

Diese wichtige Thatsache, die wir den genannten französischen Agricultur-Chemikern verdanken, wurde zum Ausgangspunkte einer ganzen Reihe von Untersuchungen, die von Chemikern, Hygienikern, Botanikern, endlich Bacteriologen ausgeführt worden sind.

Ueber die Versuche von Schlösing und Müntz und über die Versuche anderer Gelehrten in dieser Richtung ist hier schon theilweise berichtet worden; dennoch kann ich einige Bemerkungen über diese Arbeiten nicht unterlassen.

Es scheint mir nothwendig, dieselben vom Standpunkte eines Bacteriologen etwas näher zu beleuchten; seit dem Befunde von Schlösing und Müntz ist ja die Nitrificationsfrage aus einer rein chemischen zu einer microbiologischen geworden, gehört also in unsere Disciplin.

Stellen wir also zuerst fest den Sinn der Entdeckung von Schlösing und Müntz.

Ich werde sie folgendermassen resumiren: Die Nitrification geht in einem Boden nur dann vor sich, wenn dieser die allgemeinen für lebende Wesen unentbehrlichen Bedingungen darbietet. Diese sind: passende Temperatur und Feuchtigkeit, Zufuhr von Sauerstoff und anderen Nährstoffen. Unterwirft man das Substrat Einflüssen, die lebenden Wesen allgemein schädlich sind, wie z. B. der Wirkung von Chloroform, der Austrocknung u. s. w., so hört der Prozess auf, solange diese schädliche Einwirkung fort dauert, oder für immer.

Irgend welche chemische, den Prozess ausschliessende Veränderung erleidet das Substrat dabei nicht, es bleibt nitrificationsfähig wie immer; denn führt man Microorganismenkeime, etwa mit einer Spur frischer Erde, ein, so hebt der Vorgang wieder allmählich an.

Folglich können bei der Nitrification unmöglich chemische Kräfte allein thätig sein, sondern es greift hier in räthselhafter Weise die Lebensthätigkeit von Organismen ein.

Das war das unbestreitbare Ergebniss der Versuche der genannten Forscher, das von späteren Forschern, namentlich von R. Warington, Storer, Emrich, Munro und mehreren anderen bestätigt wurde. Nun wollten S. und M. einen Schritt weiter thun und stellten die Frage, durch welche Organismen die Nitrification zu Stande gebracht wird? Gibt es spezifische Nitrificationserreger, wie es z. B. Alkoholgährungs-, Essiggährungs-erreger u. s. w. gibt? Schlösing und Müntz untersuchten nun ihre nitrificirten Lösungen microscopisch, sahen, dass dieselben von kleinen Körperchen wimmelten und glaubten nun diese Körperchen als das Nitrificationsferment — ferment nitrique — des Bodens ansprechen zu dürfen.

Indessen waren diese Beobachtungen viel zu summarisch, um unbedingten Glauben zu erwecken; denn, meine Herren, um eine Thatsache dieser Art zu beweisen, gibt es nur einen experimentellen Weg, und der ist: den fraglichen Organismus zu isoliren, ihn rein zu züchten und in Reincultur die ihm eigene Wirkung ausüben zu lassen. Bis das nicht gelungen ist, ist die Annahme eines specifisch wirkenden Organismus nicht nur nicht einwandfrei bewiesen, sondern sind auch nicht die ersten Anfänge einer Beweisführung gegeben.

Durch diese Bemerkungen will ich keineswegs die wichtigen Untersuchungen von Schlösing und Müntz unterschätzen. Ich will nur sagen, dass, um diese Frage weiter aufzuklären, es der Kenntniss der modernen Methoden der Microorganismenforschung bedurfte. Berufenere, hier Microbiologen, mussten nun die Arbeit aufnehmen und bis zum Ende führen.

Und es haben wirklich mehrere ihre Kräfte an dieser Aufgabe versucht, das Resultat war aber ein ganz merk-

würdiges und unerwartetes: eine Oxydationswirkung auf Ammoniaksalze liess sich bei keinem Microorganismus constatiren. Nirgends, im Boden, Wasser, Luft, liess sich auch nur einer finden, der auch nur Spuren von Nitraten oder Nitriten hätte bilden können.

Es würde mich zu weit führen, meine Herren, Ihnen über alle Untersuchungen, die während den letzten 6—7 Jahren über diese Frage gemacht worden sind, zu berichten. Meinem Zweck entspricht es viel besser, wenn ich nur wenige oder sogar eine einzige von diesen Arbeiten ausführlicher berühre und einer Kritik unterwerfe, hauptsächlich um zu zeigen, welcher Methoden man sich allgemein bediente. Dies dürfte uns am meisten interessiren; denn um zu erklären, warum man etwas gefunden oder nicht gefunden, braucht man in erster Linie zu wissen, wie man darnach gesucht hat.

Die Arbeit von Heraeus wurde in Hüppe's und dann in Koch's Laboratorium gemacht. Es wurden Methoden angewendet, welche als die vollkommensten, nach Einigen wohl als ganz unfehlbare gelten oder gegolten haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in mehreren bacteriologischen und hygienischen Lehrbüchern als massgebend in der Frage citirt. Wir besprechen in wenigen Worten zuerst die Methode und dann die Resultate.

Will man Microorganismen in irgend einem natürlichen Medium — Boden, Wasser — auffinden, so gilt das sogenannte Gelatine-Plattenverfahren als die vollkommenste Untersuchungsmethode. Sie gibt zugleich die Möglichkeit, die Microbensorten sofort provisorisch zu unterscheiden und mit vollkommener Sicherheit zu trennen. Sie besteht bekanntlich darin, dass man bestimmte Mengen des Substrats in flüssig gemachter Nährgelatine ge-

eigneter Zusammensetzung vertheilt und auf eine Glasplatte oder in flache Schalen ausgiesst und zum Erstarren bringt. Bald entwickeln sich die Keime zu gesonderten Colonien, welche im festgewordenen Nährmedium fixirt sind und sich nicht untereinander vermischen können. Nach dem Aussehen der Colonien kann man eine ungefähre Vorstellung gewinnen von der Zahl der Arten, welche zur Entwicklung gekommen sind. Man impft von allen ab, d. h. man sticht in die gewählten Colonien die Impfnadel ein und streift oder wäscht sie ab in den einzuimpfenden, keimfreien, festen oder flüssigen Nährsubstraten. Man bereitet sich auf diese Weise Reinculturen.

Diese äusserst einfache Methode hat ausgezeichnete Dienste geleistet und es war wirklich sehr verlockend zu glauben, dass sie allgemeine Anwendbarkeit in der Bacteriologie besitze.

Auf diese Weise hat Heraeus eine ganze Reihe von Microbensorten aus Boden und Wasser isolirt und mit ihnen in Reincultur Nitrifications-Versuche angestellt, welche folgendes Resultat ergaben: die Flüssigkeit gab nach einigen Tagen eine deutliche Nitrit- und Nitratreaction mit Diphenylamin oder Jodstärke; die Mengen waren aber so klein, dass sie nicht bestimmt werden konnten. Dasselbe Resultat erzielte er später mit einer ganzen Reihe anderer Bacterien verschiedener Herkunft, darunter mehrere pathogene, wie Typhusbacillen, Milzbrandbacillen und andere. Nach einigen bis mehreren Tagen Spuren von Nitriten, und weiter nichts. Für Jedermann, der etwas über die constante Anwesenheit von Spuren von Salpetersäure und von salpetriger Säure in der Luft unserer Laboratorien weiss, ist dieses Resultat ein

vollkommen negatives. Flüssigkeiten, besonders wenn sie alkalisch reagieren, selbst destillirtes Wasser, absorbiren ja nach einigen Tagen so viel von diesen Körpern aus der Luft, dass sie mit Hülfe unserer ausserordentlich empfindlichen Reagentien sich als salpetersäure- und salpetrigsäurehaltig erweisen. Ich brauche über diese Fehlerquelle mich nicht weiter zu verbreiten, da sie von Prof. Schulze in seinem Vortrage genügend erläutert wurde.

Merkwürdigerweise scheint sie Heraeus ganz unbekannt gewesen zu sein. Er deutet seine Befunde als positive, leugnet die Existenz eines specifischen Nitrificationserregers und schliesst, dass ein geringes Nitrificationsvermögen sehr vielen Microorganismen eigen sei. Indessen können wir diesen seinen Schlüssen nicht Vertrauen schenken und nehmen an, dass er gerade das Gegentheil davon bewiesen hat, was er zu beweisen glaubt, nämlich: dass es nicht gelingt, mit Hülfe des Gelatineplattenverfahrens nitrifizirende Organismen aufzufinden.

Von späteren Forschern bedienten sich alle im wesentlichen derselben oder ähnlicher Methoden, sie hatten auch ebensowenig Erfolg zu verzeichnen, mit dem Unterschiede, dass sie sich dieses negativen Resultates sehr wohl bewusst waren.

Diese vergeblichen Bemühungen veranlassten endlich den bekannten Berliner Botaniker Prof. Franck, jede Mitwirkung von Organismen bei der Nitrification ganz in Abrede zu stellen. Ihm stimmte aber kaum jemand zu. Es entspann sich eine lebhaftere Controverse zwischen ihm und zwei Berliner Chemikern, wobei die Chemiker für die Organismenwirkung eintraten, der Biologe aber den Vorgang als einen rein chemischen auffasste.

»Wenngleich man mir nicht nachsagen kann«, meinte unter Anderm Franck, »dass ich nicht verstände, Pilze dort zu finden und als Thäter nachzuweisen, wo sie wirklich an etwas schuld sind, so gehöre ich doch nicht mit zu denjenigen, welche der jetzigen Moderichtung huldigen, die für Alles, was man sich nicht erklären kann, ohne weiteres einen Bacillus verantwortlich zu machen sucht.«

Zum Schlusse dieser zu kurzen Litteraturübersicht muss ich noch zwei Arbeiten englischer Forscher, Perny Frankland mit Frau Frankland und R. Warington citiren. Der letztere namentlich ist ein langjähriger Arbeiter auf diesem Gebiete. Beide Forscher haben sich wieder der Mühe unterzogen, eine ganze Menge von Microorganismen aus Boden, Luft und Wasser zu isoliren und auf ihr Nitrificationsvermögen zu prüfen. Es fand sich bei keinem und haben die erwähnten Forscher dieses negative Resultat mit besonderem Nachdruck formulirt.

Wir stehen also vor einer ganz erdrückenden Reihe von negativen Befunden. Wie sind diese Thatsachen zu deuten? Franck und einige Andere meinten: man hat den betreffenden Microb nicht gefunden, folglich existirt er nicht. Indessen zeigt eine einfache Ueberlegung, dass je mehr sich diese negativen Befunde häuften, desto mehr die Annahme eines specifischen Nitrificationserregers an Wahrscheinlichkeit gewann, und wenn diese negativen Befunde eine sehr respectable Zahl erreicht haben, so wurde diese Annahme fast zur Gewissheit.

Diese Meinung klingt paradox, ist aber fast die einzig mögliche. Es steht, wie oben betont, seit Schlösing und Müntz fest, dass hier eine Organismenwirkung vor-

liegt, daran ist gar nicht zu zweifeln; die Frage war scharf gestellt, sicher entschieden, sie gehört auch, wenn so im Allgemeinen von Organismenwirkung die Rede ist, zu den relativ leicht zu lösenden Fragen. Diesen Punkt angenommen, bleiben zwei Möglichkeiten offen: entweder begleitet die Nitrification die Entwicklung von sehr verschiedenen Organismen, ist nur sozusagen eine indirecte Folge der von ihnen hervorgerufenen Prozesse oder die Ammoniakoxydation ist eine Lebenseinrichtung, welche nur ganz wenige oder einen einzigen Organismus characterisirt, der seinen gesammten Stoffwechsel an diese Thätigkeit angepasst hat, kurz dessen specifische Function sie ist.

Nun ist, meine Herren, klar, dass je mehr sich die negativen Befunde häuften, desto unwahrscheinlicher die erstere von diesen beiden Möglichkeiten wurde. Wo sind denn diese vielen indirecten Agenten der Nitrification, wenn man einen Microorganismus nach dem anderen, schliesslich so viele, ganz ausgeschlossen und nachgewiesen, dass sie Ammoniak zwar als Nahrung benutzen, aber unter keinen Umständen seine Vereinigung mit Sauerstoff vermitteln! Immer mehr und mehr drängte sich die Ueberzeugung auf, dass diese specifische Oxydationsthätigkeit ein Attribut von ganz wenigen Microbenarten ist, oder von einem einzigen, den man einfach nicht fangen konnte. Wegen ungeeigneten Untersuchungsmethoden, meine Herren! Das war die einfachste Erklärung.

Der Zufall wollte, dass ich, gleich bei meinen ersten bacteriologischen Untersuchungen, auf Organismen traf, welche sich gegenüber den üblichen Untersuchungen als ganz refractär erwiesen. Das Studium dieser höchst eigenenthümlichen Organismen war es, das mich zum Studium

der Nitrificationsorganismen vorbereitete und anregte. Ich bitte desshalb um Erlaubniss, Ihnen, meine Herren, das Wichtigste aus diesen meinen früheren Untersuchungen mitzutheilen, obgleich dies nicht ganz direct das Thema unseres Vortrages berührt; aber die hierbei gewonnenen Erfahrungen und Gesichtspunkte werden uns sehr gut in die Nitrificationsfrage einführen und das Verständniss mancher Erscheinung ungemein erleichtern.

In den Schwefelquellen trifft man immer eigenthümlich fädige, schleimige Massen, die wohl in keiner fehlen. Es sind fädige Bacterien, die lange, gewundene, verhältnissmässig dicke Fäden bilden, welche manchmal mit einer eigenthümlichen, schlangenartig kriechenden Bewegung begabt sind.

Die Gattung *Beggiatoa* ist ihr bekanntester Vertreter. Das interessanteste an diesen Organismen ist wohl ihr Zellinhalt, in welchem man glänzende, sehr stark lichtbrechende, infolge dessen schwarz conturirte Körner bemerkt. Prof. Cramer erkannte als der erste die Natur dieser Körner: sie bestehen aus reinem Schwefel. Der Fall ist einzig in seiner Art: keine anderen Organismen enthalten in ihren Zellen Schwefel abgelagert. Eine Erklärung der physiologischen Bedeutung dieser Schwefel einschlüsse wurde nur von dem bekannten Breslauer Botaniker Cohn versucht, fiel aber so wenig befriedigend aus, dass sie uns hier nicht weiter interessiren kann.

Vor vier Jahren unternahm ich die Untersuchung dieser Organismen; und es fiel mir sofort auf, gleich bei den ersten Beobachtungen über deren Verhalten in der Natur, wie auch bei den ersten Culturversuchen, dass ihr

Gedeihen in räthselhafter Weise mit dem Vorhandensein von H_2S in dem Substrate zusammenhängt.

Alle meine Bemühungen, die *Beggiatoa* zu züchten in allen möglichen festen und flüssigen Nährmedien, blieben erfolglos, solange mir nicht die Idee kam, H_2S in irgend einem Brunnenwasser gelöst ihnen zu bieten. Dann begannen sie sich sofort üppig zu vermehren.

Es war mir dann die Möglichkeit gegeben, ihre Lebensprozesse zu studiren.

Die erste Frage, die ich stellte, war: wie bilden die Fäden ihre Schwefelkörner? Es hat sich gezeigt, dass dies ausschliesslich durch Oxydation von Schwefelwasserstoff geschieht. Nimmt man schwefelfreie Fäden und versetzt sie in Schwefelwasserstoffwasser, so kann man direct unter dem Microscope diesen Vorgang verfolgen: man sieht unzählige schwarze Körnchen in den Zellen auftauchen und allmählich zu grösseren Körnern anwachsen, bis die Zellen mit Schwefel förmlich vollgestopft sind.

Das Merkwürdigste dabei ist aber, dass diese intracellularen Schwefelablagerungen nicht etwa ein Excret darstellen und nicht unbenutzt bleiben. Denn lässt man nachher dieselben schwefelerfüllten Fäden ohne H_2S , so sieht man diese ganze Menge von Schwefel, welche, wie eine einfache Ueberlegung zeigt, um mehrere Mal soviel wiegt wie die Substanz der Fäden, binnen 24 Stunden verschwinden. Was macht der Organismus damit, und wozu braucht er so viel Schwefel?

Das Ergebniss der in dieser Richtung angestellten Experimente war, dass der Organismus diesen Schwefel verbrennt, verathmet, als Schwefelsäure, als Sulfate ausscheidet, wobei gleichzeitig die kohlen sauren Salze des Substrats zerlegt werden.

Eine andere, ebenso seltene Eigenthümlichkeit dieser Wesen ist, dass sie in Flüssigkeiten, die kaum merkliche Spuren von organischer Substanz enthalten, wie die reinsten Quellwässer, gedeihen können. Sie sind ja farblose, chlorophyllfreie Organismen, daher unfähig CO_2 am Lichte zu assimiliren. Man hat also grosse Schwierigkeiten zu verstehen, wie Microben, die sonst so enorme Mengen organischer Substanz verbrauchen, in solchem Medium, wie reinstes Wasser, so gut gedeihen können.

Meine Herren! Alle Schwierigkeiten werden beseitigt und eine im Wesentlichen befriedigende Erklärung des Stoff- und Kraftwechsels bei diesen Organismen gegeben, in der folgenden Ueberlegung, welche ich vor vier Jahren ausgesprochen habe.

Nur der geringste Bruchtheil der von Microorganismen verbrauchten organischen Körper wird von ihnen als plastisches Material zum Aufbau ihrer Körper benutzt, der weitaus grösste Theil wird zerstört, in einfachere Verbindungen gespalten; und zwar in der Regel so, dass Körper entstehen von zusammen geringerer Verbrennungswärme als diejenigen Stoffe, aus welchen sie gebildet werden. Es wird also Energie frei, die dem Organismus zu Gute kommt.

Die Ernährung eines chlorophyllfreien Organismus wäre darnach erklärlich auch bei Benutzung von ganz minimalen Mengen organischer Substanz, unter der Bedingung aber, dass an Stelle der zersetzungsfähigen Kohlenstoffverbindung irgend ein Körper tritt, der durch eine bestimmte Umsetzung eine bestimmte Summe von Energie liefern könnte.

Der Schluss aus dieser kleinen Betrachtung leuchtet jedem ein: bei *Beggiatoa* und Consorten spielt H_2S

resp. der S die Rolle der gährungsfähigen, organischen Substanz oder, wenn man will, stellen diese Körper das Athmungsmaterial vor. Die Unentbehrlichkeit dieses Oxydationsprozesses für diese Wesen findet dadurch ihre vollständige Erklärung.

Damit war, meine Herren, ein neuer Typus von Organismen gefunden, deren wesentlichste Function, deren Lebensquelle, wenn ich so sagen darf, die Oxydation anorganischer, in der Natur verbreiteter Körper ist.

An die Ernährungsweise anderer Organismen sind diese Schwefelorganismen gar nicht angepasst, mit Zucker und Eiweiss können sie nichts anfangen, wie auch umgekehrt alle anderen Organismen sich bekanntlich ganz entschieden weigern, H_2S zu benutzen, ihn als Gift empfinden und selbst durch relativ kleine Mengen davon rasch getödtet werden.

Bald darauf habe ich einen analogen Fall kennen gelernt. Die Zeit mangelt mir, um auf die ebenfalls eigenthümliche Gruppe von Microorganismen näher einzugehen, die ich Ferrobacterien nannte. Was uns hier interessirt, ist Folgendes: an Stelle von H_2S resp. S tritt hier ein anderer leicht oxydirbarer Körper, nämlich Eisenoxydul. Von dem Vorhandensein von kohlsaurem Eisenoxydul im Substrat ist ihre Existenz abhängig, ohne diesen Körper gar nicht möglich. Daher bewohnen sie meistens die Eisenquellen, treten aber auch auf Wiesen und in Sümpfen auf, wo durch verschiedene Gährungsvorgänge, hauptsächlich die Cellulosegährung, Eisenoxyd beständig zu kohlsaurem Eisenoxydul reducirt wird. Der Process der Oxydation, der Eisenrostbildung, durch diese Organismen geht in sehr merkwürdiger Weise vor sich. Versetzt man die sogenannte *Leptothrix ochracea*

in eisenoxydulhaltiges Wasser, wo ich sie immer cultivirte, so sieht man Folgendes: die sehr dünnen Fäden oder Stäbchen fangen sofort an sich mit rostfarbenen Hüllen zu umgeben, welche die Dicke der farblosen Fäden um mehrere Male übertreffen. Dabei wachsen die Fäden, oder schieben sich aus ihren braunen Eisenoxydscheiden heraus, den Aufbau dieser Röhren immer weiter fortsetzend; manchmal schlüpft der Faden ganz aus seiner Röhre heraus und beginnt eine neue zu bilden. So entstehen ockerfarbige Rasen und Flocken, welche nur relativ wenig lebende Zellen enthalten, sondern meistens aus leeren Eisenoxydröhrchen bestehen; denn die eigentliche Körperbildung geht nur sehr langsam vor sich, der Oxydationsprozess aber rasch; so dass ein Faden wohl über hundert Mal so viel Eisenoxyd ausscheidet, als er im Gewichte zunimmt.

Ich erwähne nur noch beiläufig, dass an die Thätigkeit dieser Organismen sich eine für Mineralogen und Geologen interessante Frage knüpft, nämlich die Entstehung von Raseneisenerz und Lagern von andern sedimentären Eisenerzen, wie sie sonst heissen. In practischer Hinsicht verdienen sie auch Beachtung: sie sind nämlich berüchtigt durch ihr periodisches und so massenhaftes Auftreten in Wasserleitungen, dass statt Wasser aus denselben zeitweise ein rostbrauner Brei fliesst. Die Ursache dieser Erscheinung, für welche sehr verschiedene Erklärungen gegeben werden, liegt nach dem Gesagten in dem periodischen Gehalte von sonst vielleicht nicht schlechten Wässern an Eisenoxydul; dadurch werden sie auf einmal ein günstiges Nährmedium für die Ferrobacterien.

Nach dieser vielleicht etwas langen Abschweifung kehren wir zu der Nitrification zurück, und jetzt werden Sie, meine Herren, sofort ersehen, dass ich nicht unmotivirt unser eigentliches Thema verliess.

Erstens hat man nunmehr das Gefühl, die innere Ueberzeugung, dass specifische Nitrificationsorganismen wirklich existiren müssen und dass man Aussichten auf Erfolg hat sie zu suchen. Frägt man sich dann nach der physiologischen Bedeutung des Processes der Ammoniakoxydation, so hat man schon eine Antwort. Frägt man sich weiter nach den wesentlichsten Eigenschaften des präsumirten Nitrificationsfermentes, so sieht man sie schon im voraus. Aus denselben leitet sich aber die Untersuchungsmethode, hier also die Culturmethode, direct ab.

Wenn das Nitrificationsferment existirt, so muss es in der Erde massenhaft verbreitet sein, da ist es aber ohne Zweifel mit ganz enormen Mengen von sehr verschiedenen Microbenarten vermengt. Um es entdecken zu können, muss man also etwas Erde (als Einsaat) in ein Substrat einführen, das nur dem Nitrificationsmicrob günstig, den übrigen ihn begleitenden Microben aber ganz ungünstig ist. Dann wird der gewünschte Microb die Oberhand behalten, zur Wirkung gelangen, und, infolge seiner massenhaften Vermehrung, die Aufmerksamkeit auf sich zielen.

Es handelte sich also in erster Linie darum, ein richtig zusammengesetztes Nährmedium zu wählen. Keines der in der Bacteriologie gebräuchlichen, seien sie fest oder flüssig, schien mir passend, ich habe denn auch alle verworfen und ein sehr viel einfacheres angewendet. Um das Gedeihen der Nitrificationsorganismen — ich werde

sie kürzer und bequemer Nitrobacterien nennen — um ihr Gedeihen zu ermöglichen, musste es, nach meinen Erfahrungen mit analogen Organismen, zwei Bedingungen entsprechen: die erste und wichtigste ist selbstverständlich, das Vorhandensein des oxydablen anorganischen Stoffes, hier Ammoniumsalz; die zweite ist eine negative: es dürfen keine gährungsfähige organische Körper in der Lösung vorhanden sein und überhaupt nur Spuren organischer Substanz. Ueber weitere Bedingungen haben uns die vorzüglichen Untersuchungen von Schlösing über Nitrification in natürlichen Verhältnissen unterrichtet. Sie sind: möglichst uneingeschränkter Luftzutritt und Anwesenheit eines Alkali- oder Erdalkalicarbonates.

Zürcher Seewasser mit einem kleinen Zusatz von Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat und einem Ueberschuss von Magnesiumcarbonat erhielt 0.1 bis 0.5 Procent Ammonsulfat und wurde in dünner Schicht in solchen Kolben, wie sie einen hier sehen, gehalten. Damit wurden die besten Bedingungen für die Nitrification realisiert. Denn inficirte man diese Flüssigkeit mit einer Spur frischer Erde, so liess die Nitrification gar nicht lange auf sich warten. Als man nachher Culturserien machte, d. h. eine frische Cultur immer aus der letztinfectirten impfte, so steigerte sich noch die Intensität des Prozesses in ganz unerwarteter Weise. — Nach den Angaben meiner Vorgänger über Versuche in wässrigen Lösungen glaubte ich mit einem äusserst trägen, langwierigen Prozesse zu thun zu haben, der Wochen und Monate warten lässt, bis er sich endlich einstellt. Das war nun gar nicht der Fall. Bei häufigen Umsaaten war es keine Seltenheit, dass ich schon nach 24 Stunden unverkennbare Zeichen einer beginnenden Nitrification constatiren konnte. Nach

3 Tagen waren schon bestimmbare Mengen von N.-säuren da, und bald war alles Ammoniak spurlos verschwunden.

Nun hatte ich also die Ueberzeugung, dass ich die richtigen Bedingungen getroffen und dass die Nitrobakterien in meinen Gläsern in Massen leben und wirken müssen. Es schien leicht sie zu finden. Aber derartig sind manchmal, meine Herren, die Schwierigkeiten bei dieser Art Untersuchungen, dass ich noch ein grosses Stück Arbeit zu überwinden hatte, bis ich endlich sagen konnte: diese sind es, welche nitrificiren!

Sah man eine solche Cultur an, so bemerkte man auf den ersten Blick keine Zeichen irgend welcher Bacterienvegetation. Nur nach näherer Betrachtung konnte man doch auf der Oberfläche der vollkommen klaren nitrificirten Flüssigkeit einen Anflug, einen zarten Schleier bemerken. Dieser bestand aus verschiedenen Microorganismen, Stäbchen und Coccen, und es war Grund zu denken, dass irgend welche Form von ihnen, oder alle zusammen den Prozess bewirken. Denn die oxydirenden Organismen bilden bekanntlich mit Vorliebe Kahmhäute oder Decken auf der Oberfläche der Flüssigkeiten. Als ein altbekanntes Beispiel führe ich nur die essigbildende Kalmhaut, die Essigmutter, an. Ich habe dann alle diese schleierbildenden Arten untersucht, durch mikroskopische Untersuchungen, wie auch durch Culturversuche deren Zahl festgestellt, und dann alle isolirt. Das ging leicht, denn das Gelatineplattenverfahren war hier gut anwendbar. Ich habe darauf Nitrificationsversuche mit jeder in Reincultur angestellt. Alle aber fielen negativ aus, die Arbeit war umsonst.

Es ist mir dann der Gedanke gekommen, vorläufig die beständigen Umsaaten in immer frische Flüssig-

keit zu unterlassen, sondern durch wiederholte Ammonsulfatzusätze die Nitrification in einem und demselben Gefässe so lange zu unterhalten, bis der gesuchte Organismus durch seine grosse Vermehrung endlich seine Anwesenheit verrathen würde. Das half. Meine Aufmerksamkeit wurde bald von dem Magnesiabodensatz angezogen, der in seltsamer Weise sein Aussehen veränderte: er schien, wenn man die Gefässe lange in Ruhe liess, wie mit einer schleimigen Haut überzogen, die beim Schwenken des Gefässes zerriss, und sich dann zu schleimigen, etwas grau aussehenden Flocken zusammenballte. Die microscopische Untersuchung dieser Flocken liess einen charakteristischen ellipsoidischen Microben erblicken von nur $\frac{1}{1000}$ mm Länge, nur wenig länger als breit, welcher in solchen Mengen zugegen war, dass alle übrigen Arten zusammen genommen nur noch als höchst unbedeutende Spuren gelten konnten.

Dieser ovale Microb, meine Herren, war das Nitrificationsferment der Zürcher Erde. Alle Beobachtungen sprachen zu deutlich dafür, als dass man dies noch hätte bezweifeln können.

So war denn endlich ein Nitrobacterium gefunden, und nun musste man es rein erhalten. Keine Ausnahme ist ja zu dulden von dem Grundsatz, dass die an die Wirkung der Microorganismen knüpfenden Fragen mit Hülfe von Reinculturen gelöst werden müssen. Jetzt zeigte sich, wie die Arbeit erschwert wird, wenn jenes ausserordentlich einfache und bequeme Hilfsmittel — das Gelatineplattenverfahren — unanwendbar ist. Denn unanwendbar war es, meine Erwartungen haben sich vollkommen bestätigt. Führte man in die Gelatine in gewöhnlicher Weise eine Unmasse von Nitrobacterien und wenig fremde

Organismen ein, so bildeten nur letztere Colonien, die ersteren bildeten keine und kamen gar nicht mehr zum Vorschein.

Man musste sich also bequemen, auf irgend welche Weise diese fremden Organismen, dieses Bacterien-Unkraut, aus den Culturen in wässriger Lösung zu eliminiren. Dieser Theil der Arbeit war der langwierigste und unangenehmste, und ich werde Ihre Geduld, meine Herren, nicht auf die Probe setzen, und die Einzelheiten ganz übergehen. Nur eines will ich erwähnen, eine Beobachtung, die ich später verwerthen konnte und die zu einem beachtenswerthen Resultate führte.

Ich versuchte, um diese fremden Arten zu unterdrücken, die Cultur in ganz von organischen Substanzen befreiten wässrigen Lösungen: statt Seewasser nahm ich destillirtes Wasser und besonders reine Salze. Die meisten von den fremden Species gingen auch thatsächlich durch Erschöpfung zu Grunde, das Nitrobacterium aber, und das befremdete mich seiner Zeit sehr, schien den Unterschied gar nicht zu merken, entwickelte sich und nitrificirte mit derselben Energie wie früher.

Wir kehren später zu dieser Thatsache zurück, jetzt constatire ich nur, dass ich durch diesen Kunstgriff meinen Zweck doch nicht ganz erreichen konnte. Eine besonders hartnäckige Art liess sich nicht unterdrücken und blieb in den Culturen. Durch ein eigenartiges Verfahren erreichte ich endlich meinen Zweck und säuberte meine Culturen auch von dieser letzten fremden Art. Die nitrificirte Culturflüssigkeit auf die Nährgelatine gebracht, liess jetzt dieselbe dauernd steril.

Das Verfahren beschreibe ich hier nicht, weil dies sich nicht in zwei Worten thun lässt (ich habe es in der

ersten der schon im Drucke erschienenen Mittheilungen ausführlich besprochen), und weil ich dieses erste Verfahren bald durch ein vollkommeneres ersetzte. Dieses letztere will ich nun hier kurz beschreiben.

Es versteht sich ohne weiteres, dass man viel leichter und sicherer zum Ziele gelangt, vollkommen reines Ausaatmaterial zu bekommen, wenn die Möglichkeit gegeben ist, von einer reinen Colonie der gewünschten Species abzuimpfen, als wenn man auf eine Reihe fremder Species achten und dieselben eine nach der anderen eliminiren muss. So stellte ich mir zur Aufgabe, das Princip der Fixirung der Keime in gelatinirendem Medium, *coûte que coûte*, in Anwendung zu bringen und ein für die Nitrobakterien geeignetes festes Nährsubstrat zu finden.

Alle bekannten gelatinirenden Substanzen pflanzlicher und thierischer Herkunft erwiesen sich, trotz erneuter Versuche, als absolut ungeeignet, und musste ich zu den weniger bequem zu handhabenden mineralischen Gallerten meine Zuflucht nehmen. Mit Kieselgallerte, meine Herren, erreichte ich am leichtesten meinen Zweck.

Die beste Methode, eine wässrige leicht gelatinirende Lösung von Kieselsäure zu bereiten, ist bekanntlich die Methode von Graham: man giesst verdünntes Wasserglas in überschüssige verdünnte Salzsäure und unterwirft dies Gemisch der Dialyse, bis es von Salzsäure und Kochsalz befreit ist. Dann dampfe ich die Kieselsäurelösung bis zu einem bestimmten Concentrationsgrad ein und vermische sie in diesen Schalen, sogen. Platten, in bestimmtem Verhältniss, mit einer Mineralsalzlösung, welche Ammonsulfat und Soda und auch die üblichen Nährsalze enthält. Wenn dabei richtig verfahren wird, so ist die Gallerte von passender Consistenz, nicht hart

und knorpelig, wie sie sonst leicht wird, sondern weich und elastisch und bleibt, wenn sorgfältig vor Austrocknung geschützt, Wochen lang unverändert. Will man die Keime in dieser Gallerte vertheilen, so thut man das Aussaatmaterial hinein unmittelbar nach dem Vermischen von Kieselsäurelösung und Salzlösung; man hat Zeit es zu thun, denn es dauert gewöhnlich 5 Minuten, bis die Gallerte beginnt fest zu werden. Will man aber ihre Oberfläche mit dem Aussaatmaterial bestreichen — in Strichen impfen, wie man sagt — so wartet man $\frac{1}{4}$ Stunde, bis die Gallerte ganz fest geworden ist.

Auf diesem eigenthümlichen Nährboden entwickeln sich nun die Nitrobacterien sehr gut. Insbesondere wachsen sie schön auf der Oberfläche der Gallerte und bilden äusserst charakteristische kleine Colonien, die keinen andern gleichen. Wenn Sie, meine Herren, in dieses Microscop einen Blick geworfen, so haben sie kleine unregelmässige, stark glänzende Körner gesehen, die sehr kleinen Sandkörnchen vielleicht nicht unähnlich sind. Jedes Körnchen ist ein Paket, gebildet aus Hunderten und Tausenden von ovalen Zellchen, welche so dicht zusammengedrängt und verklebt sind, dass man bei schwächeren Systemen die einzelnen Zellchen nicht unterscheidet und das Ganze homogen glänzend erscheint. Bei tausendfacher Vergrößerung aber und in ungefärbtem Zustande unterscheidet man die einzelnen Individuen deutlich. Aus der Gallerte in eine wässrige Lösung gebracht zeigen diese Colonien, diese Klumpen, zunächst keine Veränderung. Erst nach 2—3 Tagen, oft noch später, sieht man sie unregelmässig anschwellen: die Zellchen werden durch Verquellen der sie verklebenden Substanz auseinandergetrieben; während diesem Prozess geht oft ein allge-

meines wildes Schwärmen los, und die Zellen zerstreuen sich definitiv nach allen Seiten.

Die Isolirung mit Hülfe der Cultur auf diesem festen Nährboden gelingt viel leichter. Die Colonien sind zwar viel kleiner als diejenigen, mit welchen die Bacteriologen sonst zu thun gewöhnt sind. Es liegt eben in der Natur dieser Organismen, dass ihr Wachstum und Substanzbildung viel schwächer als bei gewöhnlichen Bacterien sind. Doch, wenn man versteht, wie das jeder Bacteriologe eigentlich dürfte, seine Impfnadel unter dem Microscope sicher zu führen, so braucht man zur Isolirung nur Wochen statt Monate und selbst Jahre.

Wir haben also den Nitrificationsorganismus entdeckt, haben ihn vorwurfsfrei isolirt, haben nachgewiesen, dass er in Reincultur den charakteristischen Oxydationsprozess vermittelt. Und nun werden wir seinen physiologischen Eigenschaften etwas näher zu treten suchen.

Fragen wir zuerst nach der Energie des von ihm bewirkten Prozesses. Ist sie genügend, um ihn für das Nitrificationsagens des Bodens zu halten? Bekanntlich nitrificirt der normale Boden sehr energisch, es dürfen also meine Zahlen, um die obige Frage positiv beantworten zu können, nicht sehr bedeutend hinter den für den Boden constatirten stehen. Diese letzteren entnehme ich den neuesten Versuchen Schlösing's. Er experimentirte mit 200 gr. bester Erde, welche er in den besten Bedingungen der Durchlüftung, der Feuchtigkeit und Temperatur hielt. Die täglich oxydirte Menge von Ammoniakstickstoff betrug auf der Höhe des Prozesses in 3 Versuchen

3.5 4.1 9.0 mgr.

Diese Zahlen sieht er als sehr hohe an: auf eine Hectare

oder 3000 Tonnen Erde berechnet, macht das die respectable Menge von

62 75 168 Kilogramm

Stickstoff pro Tag.

Ein genauer Vergleich der Schlösing'schen Versuche mit meinen Reinculturen ist nicht möglich, ist aber auch nicht nöthig für unseren Zweck. Es genügt zu constatiren, dass in meinen Versuchen, die eher noch als die Schlösing'schen als Versuche im Kleinen angesehen werden können, die Schlösing'schen Zahlen nicht nur leicht erreicht, sondern noch weit übertroffen wurden. Leitet man die Nitrification in einer Cultur, wie Sie eine hier sehen, durch eine ganz minimale Aussaat ein, so erreicht die täglich oxydirte Menge von Ammoniakstickstoff unter Umständen schon am 10. oder 12. Tage 7 bis 10 mgr. Wird die Cultur älter, die Menge der Organismen grösser, so steigert sich die tägliche Leistung noch um ein Vielfaches. Die höchste Zahl, die ich erreicht habe, betrug 22 mgr. Ammoniakstickstoff pro Tag.

Die Nitrificationsenergie unseres Microben ist also reichlich genügend, um ihn für die entsprechenden Vorgänge im Boden verantwortlich zu machen.

Eine weitere den Oxydationsprozess betreffende Frage, welche uns interessiren kann, ist die Frage nach den Zwischen- und besonders Endproducten desselben. Schlösing und Müntz behaupteten, dass das einzige Product der Nitrification Salpetersäure sei.

Für den Boden, also für den Naturvorgang, dürfte das wohl meistens zutreffen, nicht aber für eine Reincultur der Nitrobacterien. Hier kommt es in der Regel nur zur Bildung von salpetriger Säure, von Nitriten.

Die Oxydation geht nicht weiter. Von Nitraten wird nur sehr wenig gebildet. Merkwürdigerweise, je intensiver der Prozess desto weniger; die Menge des Nitratstickstoffs erreicht dann nicht einmal ein Procent des gesammten nitrificirten Stickstoffes.

Es bleibt also zu erklären, warum im Boden die Oxydation vollständiger ist als in Reinculturen, in wässriger Lösung. Verändert sich, schwächt sich die Wirkung der Nitrobacterien bei der künstlichen Züchtung oder sind im Boden Einflüsse thätig, welche Nitrite in Nitrate überführen?

Ueber diese Frage, meine Herren, sind meine Untersuchungen noch nicht abgeschlossen, dennoch bin ich schon so weit, dass ich mich entschliessen kann, etwas über meine diesbezüglichen Beobachtungen mitzuthemen. Wir werden hier noch ein Beispiel für die im Boden massgebende Thätigkeit der Microorganismen kennen lernen.

Da die Umwandlung von Nitriten in Nitrate sich sehr leicht durch Einwirkung aller möglichen schwach oxydirenden Mittel vollzieht, so lag es zuerst nahe, diese Oxydation einfach den chemischen Affinitäten des Bodens zuzuschreiben. Um die Richtigkeit dieser Vermuthung zu prüfen, sterilisirte ich, in mehreren Kölbchen vertheilt, eine Bodenaufschwemmung und setzte dann in jedes Kölbchen ein wenig einer sterilisirten Nitritlösung, nur soviel, um eine Nitritreaction bestimmter Intensität hervorzurufen. Dann liess ich die Kölbchen seit dem 1. December im Dunkeln stehen bei einer Temperatur von 28°, schüttelte oft um und prüfte von Zeit zu Zeit auf salpetrige Säure. Die Reaction zeigte keine Neigung abzunehmen, blieb ungeschwächt bis den 15. Februar,

also 2 $\frac{1}{2}$ Monate, als ich den Versuch aufgab. Die durch Kochen von Nitroorganismen befreiten Bestandtheile des Bodens begünstigen also in keiner Weise die Verwandlung der Nitrite in Nitrate.

Ein anderer Versuch scheint mir in dieser Beziehung noch lehrreicher zu sein. Grössere Mengen frisch entnommener Erde wurden in zwei grosse Schalen mit gut übergreifenden Deckeln, sogenannte Doppelschalen, gelegt. Jede enthielt 800 gr. Die eine wurde dann in den Dampfsterilisationsapparat gestellt und längere Zeit der Wirkung von strömendem Dampf ausgesetzt. Die andere blieb unsterilisirt. Nach erfolgter Sterilisation wurde die erstere mit einer Aufschwemmung der Zürcher Nitrobakterien in reinem Wasser begossen, dann beide mit einer Ammonsulfatlösung begossen und bei 20° nebeneinander stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit prüfte ich beide in gleicher Weise auf Nitrate und Nitrite. Der Versuch begann den 10. November. Nach 10 Tagen hatte sich schon sehr viel Nitrat in der nicht sterilisirten Erde gebildet, von Nitriten aber waren nur höchst unbedeutende Spuren da. In der sterilisirten und nachträglich mit einer Reincultur geimpften Erde waren aber nur Nitrite zu finden. Das selbe Resultat ergab die Prüfung am 4. December. Das Ammoniak war schon aus beiden verschwunden, die unsterilisirte zeigte nur Nitrate, die sterilisirte nur Nitrite, enthält auch bis jetzt eine Menge davon. In der nicht sterilisirten, mit den verschiedenartigsten Organismen erfüllten Erde also hatte sich der Prozess unter ausschliesslicher Bildung von Nitraten vollzogen; in der sterilisirten dagegen bildeten sich fast nur Nitrite.

Diese Versuche zeigen mithin, 1) dass ein Nitrifi-

cationsorganismus, welcher in wässriger Lösung Nitrite bildet, auch in der Erde dasselbe thut, 2) dass die im Boden herrschenden chemischen Affinitäten die Umwandlung der Nitrite in Nitrate nicht bewirken und 3) dass dazu wahrscheinlich die Mitwirkung von anderen die Erde bewohnenden Microben nöthig ist.

Das wäre ungefähr das Wichtigste, was ich über das eigentliche Oxydationsphänomen bis jetzt ermitteln konnte. Dieses ist es hauptsächlich, dem die Nitrificationsorganismen das Interesse verdanken, welches sie von jeher bei Naturforschern und Praktikern erweckten. Mit der Kenntniss dieses Processes allein kann man sich jedoch in keiner Weise rühmen, die Physiologie dieser Organismen erschöpfend studirt zu haben. Eine Frage, das haben Sie wohl schon gemerkt, bedarf besonders der Aufklärung: Woher diese Organismen den zum Aufbau ihrer Körper nöthigen Kohlenstoff beziehen.

Ich habe schon erwähnt, dass die Nitrobacterien in Lösungen von anorganischen Salzen leben können, wo Kohlenstoff nur in Form von kohlen sauren Salzen ihnen geboten wird. Um dies zu erklären, musste man annehmen, dass entweder bei der Nitrification kein Zuwachs, keine Substanzbildung erfolgt, oder dass die Zellen den Kohlenstoff der Carbonate sich zu Nutze machen können. Die erstere Annahme war unwahrscheinlich; sie widersprach auch thatsächlich der directen Beobachtung. Nicht ausgeschlossen war aber, dass die Lösung, obwohl man organische Substanz nicht zugesetzt hatte, vielleicht doch Spuren davon enthielt.

Ich bemühte mich dann, diesen Einwand auszuschliessen, indem ich ganz ausserordentliche Massregeln traf, um absolut sicher zu sein, dass gar keine Spur or-

ganischen Kohlenstoffes in der Lösung geblieben sein konnte. Trotzdem ging das Wachsthum der Nitrobacterien ganz ebenso gut wie früher von Statten. Es war also kaum ein Zweifel möglich, dass sie auf Kosten von Kohlensäure und Ammoniak durch Synthese die ihre Körper bildenden Stoffe zu Stande bringen können.

Diese Behauptung aufzustellen ohne dafür gleich genaue zahlenmässige Beweise bringen zu können, schien mir indessen doch etwas bedenklich. Denn sie steht in schroffem Widerspruche mit der allbekannten und allerwichtigsten Lehre der Physiologie, nach welcher nur chlorophyll- oder allgemeiner chromophyllhaltige Pflanzen unter Einwirkung des Lichtes CO_2 assimiliren können. Auf dieser Doctrin waren ja alle unsere Vorstellungen von dem Kreislauf des Kohlenstoffes auf unserm Planeten während mehrerer Jahrzehnte begründet.

Hier aber, bei den Nitrobacterien, konnte weder von Chlorophyll, noch von Lichtwirkung die Rede sein. Diese Organismen sind vollständig farblos, Belichtung erweist sich hier, wie fast bei allen Bacterien, als entwicklungs-hemmend; daher cultivirte ich sie auch regelmässig im Dunkeln.

Wenn es gelingen würde zu beweisen, dass in einer Cultur der Nitrobacterien, welche am Anfange Kohlenstoff nur als Kohlensäure enthielt, verbrennlicher Kohlenstoff entsteht und diesen quantitativ zu bestimmen, so würde dann diese neue Thatsache offenbar über jeden Zweifel erhoben sein. Dies ist mir auch thatsächlich gelungen. Den organischen Kohlenstoff der Culturen bestimmte ich auf nassem Wege mit Hülfe der Chromsäure-Methode. Die Methode gibt etwas niedrige Resultate; trotzdem war die Anwendung derselben in diesem Falle

besonders sicher und bequem, weil sie die Möglichkeit gibt, unmittelbar vor der Verbrennung die Kohlensäure bis auf die letzten Spuren aus der Substanz zu entfernen.

Das Resultat, meine Herren, war, dass es in allen Culturen ohne Ausnahme, welche ich dieser Analyse unterwarf, gelang, einen Gewinn an verbrennlichem Kohlenstoff zu constatiren, der in acht Fällen die Zahlen betrug, welche Sie auf dieser kleinen Tabelle sehen:

Jüngere Culturen	Aeltere Culturen
mgr.	mgr.
4.6	15.2
4.8	19.7
7.1	22.4
10.2	26.4

Der Frage, wie diese Synthese vor sich geht und welche Stoffe daraus unmittelbar resultiren, konnte ich bis jetzt noch nicht näher treten.

Dagegen ist es mir gelungen, einen kleinen Schritt weiter in der Erforschung der Lebensvorgänge dieser Wesen zu thun. Es schien mir nämlich interessant, etwas über das gegenseitige Verhältniss dieser beiden Hauptprozesse — der Nitrification einerseits, der Assimilation andererseits — zu ermitteln. Vom theoretischen Standpunkte war es zu erwarten, dass dies Verhältniss als ein enges sich zeigen werde. Auch in anderer Hinsicht bot diese Frage Interesse: man konnte hoffen, dass ihre Entscheidung Anhaltspunkte bringen werde, um in der Zukunft einmal ein vollständiges Bild der Thätigkeit dieser Organismen im Grossen, in der Natur, zu entwerfen. Nitrite und Nitrate lassen sich ja leicht im Boden und Wässern bestimmen, man hat auch schon sehr viele Beobachtungen gemacht, welche erlauben, die Production dieser Stoffe

annähernd zu beurtheilen. Anders ist es mit der Bildung der organischen Substanz durch die Nitrobacterien; hier ist man natürlich nur auf Experimente mit Reinculturen angewiesen. Sollte man aber durch Versuche etwas Bestimmteres über das Verhältniss der beiden Prozesse ermitteln, so wäre die Möglichkeit gegeben, aus dem Ertrag des Nitrificationsprozesses in der freien Natur direct auf den Ertrag des Assimilationsprozesses zu schliessen.

Meine Erwartungen haben sich, meine Herren, thatsächlich bestätigt. In einer Reihe von vier Versuchen, in welchen ich alle Producte der Thätigkeit der Nitrobacterien — Nitrite, Nitrate und assimilirten Kohlenstoff — bestimmte, betragen für jede Cultur die Gesamtmengen des nitrificirten Stickstoffs und die Mengen des assimilirten Kohlenstoffs die Zahlen, die sie auf dieser Tabelle sehen:

	I.	II.	III.	IV.
N in mgr.	506.1	722.0	815.4	928.3
C in mgr.	15.2	19.7	22.4	26.4
	33.3	36.6	36.4	35.2

Sie sehen, meine Herren, dass, je grösser die Oxydation, desto grösser die Assimilation. Aber das ist nicht nur annähernd so. Denn dividirt man die Stickstoffzahlen durch die Kohlenstoffzahlen, so erhält man die Zahlen der dritten Reihe, welche das Verhältniss der beiden Prozesse ausdrücken, und aus ihnen ersieht man, dass dies Verhältniss beinahe constant bleibt: ein Theil C kommt auf 35 Theile im Mittel oxydirten Stickstoffs. Dieses Resultat war um so beachtenswerther, als weder die Dauer dieser vier Culturen, noch überhaupt die Bedingungen ihrer Führung die gleichen waren. Beide Prozesse sind also eng^o von einander abhängig: geht der eine, so ist auch der andere

im Gange, oder beide stehen stille. Diese Abhängigkeit ist, wie mir scheint, so zu denken, dass nämlich die Assimilation von der Nitrification abhängig ist; der erstere Prozess erfordert ja eine Arbeitsleistung, während der letztere sozusagen die einzige Kraftquelle darstellt, welche den betreffenden Organismen zur Verfügung steht.

Es bleibt mir, meine Herren, zu wenig Zeit übrig, um Ihnen etwas ausführlicher über ein interessantes, von früheren Forschern kaum noch berührtes Thema zu sprechen — nämlich über die geographische Verbreitung des Nitrificationsprozesses, wie wir ihn eben kennen gelernt haben. Obgleich wenig wahrscheinlich, ist es doch keineswegs ausgeschlossen, dass der Vorgang in entfernten Gegenden, unter verschiedenen klimatischen und Bodenverhältnissen, durch andere Ursachen bedingt wird oder sich wenigstens wesentlich anders abspielt.

Um dieser Frage näher zu kommen, habe ich unternommen, Bodenproben aus möglichst verschiedenen Gegenden, jedenfalls aus allen Welttheilen, zu beschaffen und dieselben nach dem schon für die Zürcher Erde durchgeführten Plane zu untersuchen. Durch das liebenswürdige Entgegenkommen mehrerer Gelehrten in Zürich und auswärts war mir die Möglichkeit gegeben, meine Aufgabe in Erfüllung zu bringen. Im Ganzen habe ich 5 europäische Bodenproben untersucht, 5 africanische (Algerien, Tunesien), 2 asiatische (Java, Japan), 2 südamerikanische (Brasilien, Ecuador) und endlich 1 australische.

Mit allen diesen Erdproben ist mir gelungen und zwar mit der grössten Leichtigkeit, die Nitrification einzuleiten und fortzuführen, ganz unter denselben Beding-

ungen, unter welchen das Zürcher Nitrobacterium arbeitet. Ohne Mühe habe ich auch jedesmal den thätigen Microorganismus gefunden, der meinem älteren Bekannten in morphologischer Beziehung, wenn nicht immer ganz gleich, so doch immer sehr ähnlich war. Seine Cultur gelang auch unbegrenzte Reihen von Generationen hindurch in derselben reinen Lösung von anorganischen Salzen, wie auf Kieselgallerte.

Obgleich diese meine Untersuchungen noch ziemlich weit vom Abschlusse sind, kann ich schon jetzt aus denselben folgende Schlüsse ziehen: dass erstens, jeder Boden, gleichgültig welcher Provenienz, den specifischen Nitrificationserreger enthält; dass zweitens, alle die Nitroorganismen in der ganzen Welt sich durch wesentlich die gleichen physiologischen Eigenschaften auszeichnen und demgemäss auch drittens, der von ihnen hervorgerufene Oxydationsprozess überall im Wesentlichen sich gleich bleibt.

Meine Herren, kaum eine andere Erscheinung ist so geeignet, uns vor der Thätigkeit der Microorganismen Respect einzuflossen, als die Nitrification. Sie ist fortwährend in der ganzen Erdkruste im Gange, wo nur passende Temperatur und Feuchtigkeit gegeben sind, denn Ammoniak und Kohlensäure sind ja überall vorhanden. Könnte man die jährliche oder auch nur die tägliche Production der Nitrate auf unserem Erdball irgendwie berechnen, so würde man zu einer ganz fabelhaften Ziffer gelangen; man denke nur, um bloss ein Beispiel anzuführen, dass ein einziger grösserer Fluss, wie die Seine, täglich über 230,000 Klgr. Nitrate dem Meere zuführt. Die reichsten Salpeterlösungen circuliren aber natürlich im Boden und dienen als Stickstoffquelle

für Pflanzen und mit ihnen für Menschen und Thiere. Und ausser diesen beweglichen Vorräthen sind ja noch mächtige Ansammlungen von Salpeter, besonders in Südamerika, bekannt, werden ausgebeutet und stellen ein enormes Capital vor.

Durch die eigentliche Nitrification, diesem grossartigsten von allen durch Microorganismen bedingten Vorgängen, ist die Thätigkeit der uns interessirenden Organismen aber noch lange nicht erschöpft. Sie hat eine andere beachtenswerthe Seite, ich meine die Rolle, welche sie im Kohlenstoffkreislauf erfüllen. Diese Rolle ist eine zweifache: erstens, besteht sie in der Zerlegung der kohlen-sauren Salze des Bodens, hauptsächlich des kohlen-sauren Kalkes. Für jeden Theil des gebildeten Salpetersäure-oder salpetrigen Säure-Stickstoffs wird ungefähr ein halber Theil Kohlensäure-Kohlenstoff frei. Diese Zersetzung der Erdalkalicarbonate geschieht kaum bei einem anderen Prozesse in solchem Umfange wie bei der Nitrification. Enorme Mengen von Kohlensäure werden also durch die Thätigkeit der Nitrobacterien in Freiheit gesetzt und können wieder in den Kreislauf des Lebens eintreten, statt diesem Kreislauf in Verbindung mit Erdbasen vielleicht für immer entzogen zu bleiben. Zweitens, wissen wir jetzt, dass ein Theil von dem Kohlenstoff der kohlen-sauren Basen auch direct in organische Substanz übergeführt wird. Freilich ist das nur ein sehr geringer Theil, und können diese allerkleinsten Wesen in keiner Weise mit den grünen Pflanzen in der Production von organischer Substanz wetteifern, doch da es sich in der Nitrification um so hohe Zahlen handelt, wird auch wohl diese ihre Arbeit durch ganz respectable Zahlen sich ausdrücken.

Nachdem ich nun jetzt, meine Herren, das Wichtigste über meine eigenen Untersuchungen mitgetheilt habe, muss ich noch erwähnen, dass ich nicht der einzige bin, dem es gelungen ist, die Kenntniss der Nitrification um einen Schritt weiter zu fördern. Die schon genannten englischen Forscher Warington einerseits, Percy Frankland und Frau anderseits haben ihre Bemühungen fortgesetzt und namentlich den letztgenannten gelang es, ein Nitrificationsferment zu entdecken und zu isoliren. Eine kurz gehaltene vorläufige Mittheilung darüber ist fast gleichzeitig mit meiner ersten Abhandlung erschienen, die ausführlichere ein halbes Jahr später. Sie sind auf einem wesentlich anderen Wege als ich zum Ziele gelangt. Die Uebereinstimmung ist aber eine fast vollkommene. Der ovale Microb, fast ebenso gross wie der Zürcher, den Frankland isolirt hat, bildet in Gelatine ebenfalls keine Colonien. Unbegrenzte Generationen hindurch nitrificirt er und pflanzt sich fort in reinen Lösungen von anorganischen Salzen, wie alle Nitrobacterien also. Eine Erklärung dieser Erscheinung wird von Frankland nicht versucht. Warington, obgleich er nicht so weit kam wie Frankland, spricht sich ganz in demselben Sinne wie der letztere aus.

So herrscht, wie Sie sehen, meine Herren, eine weitgehende Uebereinstimmung in den neuesten Arbeiten über Nitrification.
