

ZUR STOFFWECHSELPHYSIOLOGIE VON NITROSOMONAS

von

J. W. HES.

INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
Kapitel I. Kurze Übersicht über die Physiologie nitrifizierender Bakterien	234
Kapitel II. Material und Züchtungsmethoden.	
§ 1. Kulturen auf Nährstoff-Heyden-agar. ..	236
§ 2. Kulturen in flüssigen Medien	237
§ 3. Kontrolle auf die Reinheit der Kulturen	238
Kapitel III. Der Einfluss einiger Hinzufügungen.	
§ 1. Einleitung	239
§ 2. Versuchen mit Kulturen in flüssigen Medien	239
§ 3. Versuchen mit Agarnährboden	241
Kapitel VI. Die Atmung von Nitrosomonas.	
§ 1. Einleitung	244
§ 2. Der Sauerstoffverbrauch von Nitrosomonas	245
§ 3. Versuche mit fettsauren Salzen	247
§ 4. Das Schicksal einer ammoniakfreien Kultur	250
Kapitel V. Bestimmung des Rendements.	
§ 1. Einleitung	251
§ 2. Bestimmung des Kohlenstoffes	253
§ 3. Stickstoffbestimmung	256
§ 4. Literatur über die Kohlenstoffassimilation	257

§ 5. Bestimmung des N/C Verhältnisses ..	259
§ 6. Das N/C Verhältnis bei Kulturen denen Natriumazetat hinzugefügt worden ist	261
§ 7. N/C Verhältnis bei herabgesetzter Sauerstoffspannung	262
§ 8. Zusammenfassung der bestimmten N/C Verhältnisse dieses Kapitels	264
Kapitel VI. Ein Kalorimeterversuch.	
§ 1. Einleitung	264
§ 2. Methode	265
§ 3. Der Versuch	267
Kapitel VII. Schlussbetrachtungen	
Zusammenfassung	274
Literatur	275

KAPITEL I.

Kurze Übersicht über die Physiologie nitrifizierender Bakterien.

Es haben die bekannten Versuche von SCHLOESSING und MÜNTZ (48, 49, 50) gezeigt, dass die Nitrifikation ein mikrobiologischer Prozess ist. Die Erreger dieses Prozesses wurden in Gartenerde anwesend gefunden. Es handelte sich nun darum, diese Organismen zu isolieren. 13 Jahre später (1890) gelang dies WINOGRADSKY (56), erst nachdem er festgestellt hatte, dass die üblichen Medien für die Isolation unbrauchbar seien. Erst nach Weglassung aller organischen Stoffe aus dem Nährboden hatte er Erfolg. Er kam zu der Entdeckung, dass hier zwei Organismen wirkten; der eine oxydierte Ammoniak zu Nitrit, der andere Nitrit zu Nitrat. Sie wurden später bezw. Nitrosomonas und Nitrobacter genannt.

Zu einer guten Entwicklung muss für Nitrosomonas das pH 8.5—8.8, für Nitrobacter 8.3—9.3 sein (MEYERHOF 35, 36, 37). Dieser pH-Bereich ist eng begrenzt, weshalb eine gehörige Pufferung durch Karbonate der Nährlösungen erforderlich ist.

Von Anfang an machte die Entdeckung WINOGRADSKYS, dass das Vorhandensein organischen Stoffes (worunter auch sehr geeignete Nährstoffe anderer Organismen) die Entwicklung dieser Bakterien hemmte, einen tiefen Eindruck. Es ist dieses Phänomen der Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen, namentlich auch deshalb, weil in dem Boden, in dem ja immer eine ziemlich

grosse Menge organischen Stoffes vorhanden ist, eine sehr gute Nitrifikation möglich ist.

Verschiedene Autoren nehmen darum denn auch die Existenz heterotropher nitrifizierender Bakterien an. Es kommt mir aber vor, dass man mit WINOGRADSKY und WINOGRADSKY (59) und KINGMA BOLTJES (25, 26) annehmen darf, dass ihre Existenz in keinem einzigen Falle nachgewiesen ist.

Es ist der Effekt einer grossen Anzahl organischer Stoffe untersucht worden (z.B. von WINOGRADSKY und OMELIANSKY, 58; MEYERHOF, 36, 37; HEUBÜLT, 22; KINGMA BOLTJES, 26). Im allgemeinen darf man sagen, dass diese Stoffe imselben Grade die Atmung und das Wachstum (Vermehrung) der Bakterien hemmen, wenigstens falls mit aktiv wirkenden Kulturen geimpft wird (KINGMA BOLTJES, 25).

Es bilden dabei die fettsauren Salze eine Ausnahme, welche in gewissen Konzentrationen (z.B. 0.05 n) die Atmung wohl hemmen, nicht aber das Wachstum (KINGMA BOLTJES, 25. Siehe auch Kap. V § 5). Merkwürdig ist auch die Entdeckung von KINGMA BOLTJES, dass Nährstoff-Heyden die Entwicklung der Bakterien fordert, ja diese sogar andern organischen Stoff besser vertragen macht, sodass die Kultur auf einem Agarnährboden ermöglicht wird. Ausdrücklich ist aber hier schon zu erwähnen, dass weder Nährstoff-Heyden, noch fettsaure Salze veratmet werden (Kap. IV). Die einzigen Stoffe, welche veratmet werden, sind Ammoniak oder Nitrit.

Diese Organismen, welche also keinen organischen Stoff zum Aufbau ihrer Zellen verwenden, müssen deshalb eine andere Kohlenstoffquelle haben. Diese wird durch das in ihrem Medium anwesende Kohlensäuregas gebildet, wie WINOGRADSKY (56), MEYERHOF (35), BONAZZI (5) nachwiesen. Sie müssen also zu den Autotrophen gerechnet werden.

Eingehend untersuchte MEYERHOF (36, 37) die Atmungshemmung, was hier also heisst: die Ammoniak-, bzw. Nitritoxydation, durch verschiedene Gifte und Narkotika. Die Hemmung war in der Regel stärker als dies bei anderen Gegenständen war. Insbesondere gilt dies für die Hemmung durch lipoid-lösliche Stoffe.

Gute Zusammenfassungen desjenigen, was über nitrifizierende Bakterien bekannt ist und wobei auch die neuere Literatur besprochen wird, findet man bei STEPHENSON (51), WINOGRADSKY und WINOGRADSKY (59), KINGMA BOLTJES (25, 26) und KNIGHT (29).

KAPITEL II.

Material und Züchtungsmethoden.

§ 1. *Kulturen auf Nährstoff-Heyden-agar.*

Es ergibt sich aus der Literatur, dass Erhaltung und Züchtung von Reinkulturen nitrifizierender Bakterien eine lange währende und schwierige Arbeit ist. Es ist also wohl ein besonders glücklicher Umstand, dass Dr. KINGMA BOLTJES damals Konservator am „Laboratorium voor Microbiologie“ der „Technische Hoogeschool“ in Delft, jetzt in Amsterdam, mir Reinkulturen zur Verfügung stellte. Ausserdem wurde durch seine Untersuchung das Anhalten der Kulturen auf Agarnährboden, dem 0.5% Nährstoff-Heyden zugesetzt worden ist, ermöglicht. Dies bedeutet, bei ehemals verglichen, als entweder Kieselsäureplatten oder minerale Nährlösungen gebraucht werden mussten, eine bedeutende Vereinfachung.

Die Zusammensetzung des Nährbodens für *Nitrosomonas* ist:

0.2% Ammoniumsulfat
 0.5% Nährstoff-Heyden
 0.2% Natriumchlorid
 0.3% Dikaliumphosphat
 0.05% Magnesiumsulfat
 Spur Ferrisulfat
 1% basisches Magnesiumkarbonat
 1.5% Agar
 in Leitungswasser.

Man hat darauf zu achten, dass für die Überimpfung immer neugegossene, noch feuchte Röhren benutzt werden, um die Impfung gelingen zu lassen. Für Austrocknung sind diese Organismen besonders empfindlich. Deshalb lassen sich hier mit Erfolg, statt Wattenpfropfen, die Aluminiumdeckel nach KAPSENBERG verwenden, wobei die Austrocknung tatsächlich auf ein Minimum beschränkt ist. Die beimpften Röhren werden in einen dunklen Thermostat gestellt bei 28° C.

Das Ammoniumsulfat wurde immer getrennt in 5% Lösung sterilisiert. Diese wurde dann später steril in abgemessenen Quantitäten, dem noch nicht geronnenen Nährboden beigelegt. Dazu wurde ein von ROELOFSEN (48) beschriebener und abgebildeter Apparat benutzt. Dieser Apparat besteht aus einer Bürette mit einer daran verbundenen Vorratflasche; das Ganze wird so sterilisiert. Die Ausströmungsöffnung der Bürette ist mit einer Glaskappe versehen, worunter die Röhren während der Beifüllung gehalten werden.

Indem gut geschüttelt wird, wird das basische Magnesiumkarbonat gleichmässig über den Inhalt verteilt. Die Entwicklung von *Nitrosomonas* lässt sich nun daran feststellen, dass die obere Schicht des Nährbodens sich klärt. Die durch die Oxydation des Ammoniaks entstandene salpetrige Säure und die frei werdende Schwefelsäure lösen nämlich einiges Magnesiumkarbonat aus der oberen Schicht.

Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich, dass, wenn noch heisse Röhren mit Kapsenbergdeckel abgeschlossen wurden, durch die Sporen aus der Luft, welche mit der bei Abkühlung eingesaugten Luft hereingekommen waren, Infektion auftrat.

Auf Anraten Herrn Dr. KINGMA BOLTJES, der dieselbe Erfahrung gemacht hatte, verschloss ich die Röhren bis nach der Impfung durch Wattenpfropfen. Dann erst wurden die trocken sterilisierten Deckel aufgesetzt.

§ 2. Kulturen in flüssigen Medien.

Als Kulturflüssigkeit wurde eine Lösung, wie sie von WINOGRADSKY angegeben wurde, gebraucht.

Ihre Zusammensetzung ist:

1	g Ammoniumsulfat
1	g Dikaliumphosphat
2	g Natriumchlorid
0.5	g Magnesiumsulfat
0.01	g Ferrisulfat
10	g basisches Magnesiumkarbonat
1	l Leitungswasser.

Es wurde in Erlemeyer von verschiedener Grösse kultiviert. In Hinsicht auf eine gute Aeration wurde das Quantum Flüssigkeit je Kolben so gewählt, dass ihre Höhe ± 1 cm betrug. Die Kolben wurden mit Wattenpfropfen abgeschlossen. Auch hier wurde die Lösung getrennt sterilisiert und danach auf die im vorigen § beschriebene Weise mit Ammoniumsulfat versehen.

Der Fortschritt der Nitrifikation wurde hier an der Hand von mit Hilfe langer Pipetten genommenen Proben von ± 1 cc verfolgt. Diese Pipetten wurden jedesmal mit einigen Zehnzahlen zugleich in einer weiten Glasröhre in einem Ofen sterilisiert.

Der Ammoniakschwund wurde durch Beibringung einiger Tropfen Nessler's Reagens bei einer solchen Probe konstatiert, das Entstehen von Nitrat wurde festgestellt, indem in die Probe eine kleine Menge (± 25 mg) des pulverförmigen Reagens von Griess-Romijn geworfen wurde. Dies Reagens wird hergestellt, indem man 1 Teil α -Naphtylamine, 10 Teile Sulfanilsäure und

90 Teile Weinsäure in einem Mörser zusammenreibt. Dies Reagens ist ausserordentlich empfindlich. Eine geringe Menge Nitrit (0.01 mg Natriumnitrit je l) gibt noch eine deutliche Rotfärbung. Deshalb darf auch nur aus einer intensiven Rotfärbung auf Nitritation geschlossen werden. Eine unbeimpfte Flüssigkeit gibt meistens schon nach einigen Wochen mit dem Reagens eine deutliche Rotfärbung durch aus der Luft aufgenommene Spuren von Stickoxyden, die bei der Verbrennung von Leuchtgas entstehen. Dies kann zu gefährlichen Scheinfolgerungen führen.

§ 3. Kontrolle auf die Reinheit der Kulturen.

Aus der kritischen Betrachtung, welcher KINGMA BOLTJES (25) die verschiedenen Publikationen über nitrifizierende Bakterien unterwirft, ergibt sich wohl sehr überzeugend, wie gross die Gefahr, falsche Folgerungen zu machen ist, wenn die Kulturen nicht rein waren.

Dass auf dem Nährstoff-Heyden-agar allerhand Heterotrophen wachsen können, ist nicht verwunderlich. Wohl ist es mehr oder weniger überraschend, dass auch eine Nährlösung nach WINOGRADSKY so oft davon infiziert wird, z.B. von *Bacillus oligocarbohilus* und *Hyphomicrobium vulgare*. Die Gefahr einer Infektion ist hier deshalb so gross, weil die nitrifizierenden Bakterien sehr langsam wachsen und eine Infektion also schon bald die Oberhand gewinnen kann. Dass diese Gefahr durchaus nicht eingebildet ist, zeigt sich z.B. aus Figuren von als rein betrachteten Kulturen, welche FRED und DAVENPORT (11) ihrer Publikation beifügen. Deutlich lässt sich darauf *Hyphomicrobium vulgare* unterscheiden, wie auch KINGMA BOLTJES (25) bemerkt.

Als Reinheitskriterium gilt das Ausbleiben von Wachstum in Bouillon oder auf Peptonagar. Beim Gebrauch von Bouillon ist besonders darauf zu achten, dass verhältnismässig schwer geimpft wird, sonst weisen auch die Heterotrophen darin manchmal kein Wachstum auf.

Um die Reinheit zu kontrollieren benutzte ich Peptonagarplatten. Die Kulturen wurden darauf abgestrichen und die Platten mehrere Tage in einem Thermostat bei 28° C aufbewahrt. Zeigte sich danach auch nur eine Spur von Wachstum, so wurde die betreffende Kultur entfernt und die etwa damit erzielten Ergebnisse weiter nicht mehr in Betracht gezogen.

Ich will hier nachdrücklich darauf hinweisen, dass ich also mit Reinkulturen autotropher nitritierender Bakterien arbeitete. Zum Überfluss möchte ich hier noch bemerken, dass ich auch durch die Darlegung KINGMA BOLTJES', die Existenz heterotropher nitrifizierender Bakterien für sehr unwahrscheinlich halte.

KAPITEL III.

Der Einfluss einiger Hinzufügungen.

§ 1. *Einleitung.*

Die Beobachtung der Tatsache, dass die Nitrifikation ausgezeichnet im Boden verläuft und dennoch durch unschuldige, ja sogar als gute Nährstoffe geltende organische Verbindungen schon bei verhältnismässig niedriger Konzentration die Entwicklung und Atmung völlig gehemmt wird, hat immer einen tiefen Eindruck gemacht. Man weiss ja, dass der Boden reich ist an organischem Stoff. Verschiedene Forscher fanden, dass die Nitrifikation im Boden immer besser verlief als in einer Flüssigkeitskultur. Eine grosse Anzahl solcher Untersuchungen wird von STEVENS und WHITHERS erwähnt (53).

Boden und Bodenextrakte, welche den Flüssigkeitskulturen beigelegt werden, weisen jedoch keine Förderung der Nitrifikation auf. (MAKRINOFF, 34; KINGMA BOLTJES, 25). MURRAY (40) fand zwar einen fördernden Einfluss, aber seine Kulturen waren nicht rein und es ist bekannt, dass das Vorhandensein von Heterotrophen manchmal die Entwicklung von Nitrifizierern fördern kann (OMELIANSKY, 45). In MAKRIKOFFS Untersuchung förderte Bodenextrakt wohl die Entwicklung der Bakterien auf Magnesiumgips und Magnesiumplatten.

Die Wirkung eines Bodenextraktes kann natürlich zweierlei Natur sein. Man kann dabei denken an eine Hinzufügung von Nährstoffen in einer günstigen Form, aber auch an das Wachstum beschleunigende oder fördernde, sogenannte Wuchsstoffe.

PRINGSHEIM (45) denkt z.B. bei der Hinzufügung von Bodenextrakten an Eisen in einer gut aufnehmbaren Form; LWOFF und LEDERER (33) an Stickstoff in besonders günstigen Verbindungen.

Aus den Wahrnehmungen von HARTMANN (19), FÖYN (12), HAMMERLING (18) u.A. gewinnt man den Eindruck, dass hier die Rede ist von Wuchsstoffen.

All dies war für mich Grund, einige Versuchsreihen anzustellen. Obgleich diese wenig Neues zu Tage förderten, halte ich die Ergebnisse dennoch für wichtig genug, sie hier mitzuteilen.

§ 2. *Versuche mit Kulturen in flüssigen Medien.*

Flüssigkeitskulturen von bekannter Zusammensetzung fügte ich bei: Bodenextrakt, Extrakt von Bakterien und Hefeextrakt.

Bodenextrakt wurde hergestellt, indem ich gleiche Teile humusreicher Gartenerde und destillierten Wassers während 3 Stunden kochte. Nach Filtration wurde der Extrakt zum ursprünglichen

Volumen angefüllt und bis auf die Hälfte verdünnt. Solche Extrakte waren lichtbraun und klar und enthielten je 100 cc \pm 80 mg trockenen Stoffes. Diese Lösung wurde dann bei der Zusammensetzung der Kulturflüssigkeit statt des Leitungswassers genommen. Um Hefeextrakt zu gewinnen, wurde 100 g trockene Bäckerhefe während 4 Stunden bei 70° C mit 100 cc 70% Alkohol extrahiert. Ein solcher Extrakt enthält, nach WASSINK (55), u.A. Bios und Vitamin B. Nach Filtration wurde der Alkohol über einer kleinen Flamme ausgedampft und das Ganze danach bis 50 cc mit destilliertem Wasser ergänzt. Als Lösungsmittel für die Nährlösungen verwendete ich jetzt Leitungswasser mit 10 cc dieses Extraktes je 100 cc. Um eine Nährlösung mit Bakterienextrakt zu erhalten wurde in der Kulturlösung je 100 cc 8 mg getrocknete Bakterien suspendiert und danach sterilisiert. Dazu wurde Material von Nitrosomonas und von Spirillum rubrum verwendet.

Von den zu untersuchenden Flüssigkeiten nahm ich je Kolben 100 cc; 1½ % von der 5% Ammoniumsulfatlösung wurde hinzugefügt. Es wurde mit 1 cc einer gut wirkenden Kultur beimpft und bei 20° C kultiviert.

Wie sich erwarten liess, wies keine der untersuchten Reihen eine Beschleunigung der Nitrifikation auf. Statt dessen konstatierte ich bei den Reihen mit Bakterienextrakt, und in noch höherem Grade bei denen mit Hefeextrakt, eine Hemmung.

Die Ergebnisse der Reihen mit Bakterienextrakt sind gesammelt in Tabelle 1. Die Hemmung ist ebenso deutlich bei Hinzufügung von Nitrosomonas, wie bei Hinzufügung von Spirillum rubrum. Wir haben also die merkwürdige Tatsache zu konstatieren, dass Nitrosomonaszellen Stoffe enthalten, welche wenigstens nach Heizung auf 120° C die Nitrifikation hemmen.

Tabelle 1.

Einfluss einer Beifügung getrockneter Bakterien bei einer Kultur auf die Geschwindigkeit der Nitrifikation.

— bezeichnet, dass am betreffenden Datum alles Ammoniak verwandelt ist, + eine positive Nitritreaktion.

Beimpft am 14—XI						
Hinzufügung	keine		Nitrosomonas		Spirillum rubrum	
Reaktion auf	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂
Datum						
26—XI	—	+	+	+	+	+
3—XII			—	+	—	+

Noch auffälliger sind die Hemmungen, die sich in den Versuchen mit Hefeextrakt zeigen; schon sehr geringe Konzentrationen genügen um eine sehr starke Hemmung auf der Nitritation zu erhalten.

Tabelle 2.

Einfluss der Beifügung von Hefeextrakt bei einer Kultur auf den Verlauf der Nitritation.

— bezeichnet dass am betreffenden Datum alles Ammoniak verwandelt ist, + eine positive Nitritreaktion.

Beimpf am 11—XII										
Hinzugefügte Anzahl cc Hefeextrakt	0		$\frac{1}{2}$		1		3		10	
Reaktion auf	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂	NH ₃	NO ₂
Datum										
22—XII	—	+	+	+	+	+	+	+	+	?
29—XII			—	+	+	+	+	+	+	?
2—I					—	+	+	+	+	+
5—I							—	+	+	+
25—I									+	+

§ 3. Versuche mit Agarnährboden.

Wie schon bemerkt wurde, fand KINGMA BOLTJES, dass Nährstoff-Heyden die Entwicklung nitrifizierender Bakterien im hohem Grade fördert. Beifügung dieses Stoffes bei Flüssigkeitskulturen, lässt keine günstige Wirkung verspüren. Diese Tatsachen erübrigten also die Bestimmung des Effektes bei Beifügung der Stoffe aus dem vorigen § bei Agarnährboden. Ich setzte darum die folgenden Nährboden zusammen.

1. Kontrollennährboden, deren Zusammensetzung war:

- 0.2 % Ammoniumsulfat
- 0.2 % Natriumchlorid
- 0.1 % Dikaliumphosphat
- 0.05 % Magnesiumsulfat
- Spur Ferrisulfat
- 1 % basisches Magnesiumkarbonat
- 1.5 % Agar
- in Leitungswasser.

2. Nährstoff-Heyden-agar, wie Nährboden 1, ausser einer Hinzufügung von 0.5% Nährstoff-Heyden.

3. Bodenextrakt-agar, wie Nährboden 1, ausser einem Ersatz des Leitungswassers durch Gartenerdeextrakt, hergestellt wie im vorigen §.

4. Hefeextrakt-agar, wie Nährboden 1, ausser einem Ersatz des Leitungswassers durch den fünf Mal verdünnten Hefeextrakt, hergestellt wie im vorigen §.

5. Lehm Bodenextrakt-agar; wie Nährboden 3, jedoch der Gartenerdeextrakt ersetzt durch einen ebenso bereiteten Extrakt aus Lehm Boden.

Von diesen Nährboden wurden Röhren gegossen mit 10 cc Agar. Vor dem Gerinnen wurde wieder das Ammoniumsulfat auf die bekannte Weise hinzugefügt. Vor dem Gerinnen wurde dermassen geschüttelt, dass das Magnesiumkarbonat so gut wie möglich durch die ganze Lösung regelmässig suspendiert war. Dann wurden die Röhren schnell in senkrechter Stellung abgekühlt. Es wurde beimpft durch vorsichtige Auftropfung von $\frac{1}{2}$ cc einer gutwirkenden Kultur. Es wurde während 14 Tage in einem dunklen Thermostat bei 26° C kultiviert. Dann wurden die Kulturen wahrgenommen und als Mass für die Entwicklung der

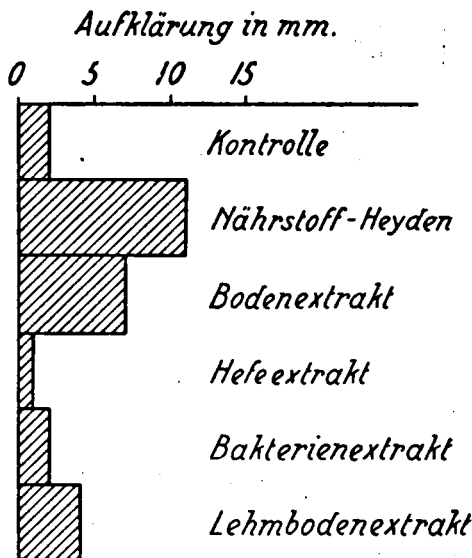


Fig. 1.

Den Effekt verschiedener Stoffe auf die Entwicklung von *Nitrosomonas* auf einem Agarboden angegebendes Diagram. Als Mass ist die Höhe der geklärten Schicht in den betreffenden Röhren genommen.

geklärte Teil der oberen Seite des Nährbodens gewählt. Dies wurde bestimmt durch Messung dieses Teiles bei der gegen das Licht gehaltenen Röhre. Fig. 1 zeigt die Ergebnisse von 4 gleichen Versuchsreihen.

Daraus zeigt sich, dass ausser Nährstoff-Heyden, auch Bodenextrakt fördernd wirkt, weniger stark ist dies auch der Fall mit dem Lehm Bodenextrakt. Dabei ist noch zu bemerken, dass Beifügung von Bodenextrakt bei einem Nährboden, der schon 0.5% Nährstoff-Heyden enthielt, keinen deutlich fördernden Einfluss aufwies, über den Effekt in einer Kultur hinaus, der nur Nährstoff-Heyden beigefügt worden war. Dass Gartenerdeextrakt besser wirkt als Lehm Bodenextrakt ist schon ein Anzeichen davon, dass die günstige Wirkung von Stoffen organischen Charakters herrührt. Der Extrakt von Gartenerde ist ja viel reicher an organischen Bestandteilen als der Lehm Bodenextrakt.

Um dies weiter zu bestimmen, wurden sowohl der Gartenerdeextrakt als der Lehm Bodenextrakt und der Nährstoff-Heyden in einem Tiegel eingedampft, getrocknet und durch Glühung verascht. Das Residuum wurde nach Hinzufügung eines Tropfens 30% Wasserstoffsuperoxyd und einiger Tropfen Salzsäure wieder zum ursprünglichen Volumen in destilliertem Wasser gelöst. Die so erhaltenen Lösungen ersetzten in den folgenden Nährboden das Leitungswasser:

6. veraschter Bodenextrakt-agar,

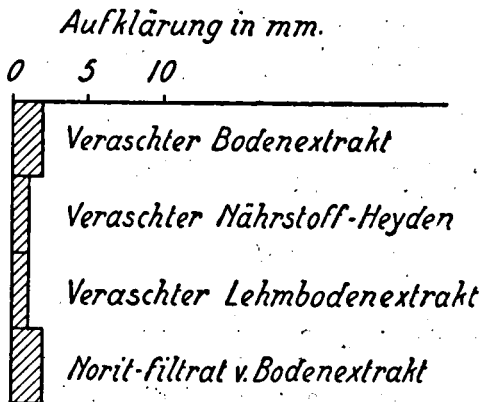


Fig. 2.

Den Effekt der Asche verschiedener Stoffe auf die Entwicklung von Nitrosomonas auf einem Agarboden angeben des Diagram. Als Mass ist die Höhe der geklärten Schicht in den betreffenden Röhren genommen.

7. veraschter Lehm Bodenextrakt-agar,
8. veraschter Nährstoff-Heyden-agar.

Für Nährboden 9 wurde als Lösungsmittel das Filtrat eines Gartenerdeextraktes, der mit Norit geschüttelt worden war, genommen. Dies Filtrat war vollkommen klar und farblos. Aus Figur 2 zeigt sich, dass sich bei keinem dieser Nährboden einen fördernden Einfluss der Asche oder des Filtrates konstatieren liess. Wir dürfen also daraus schliessen, dass der das Wachstum fördernde Stoff des Bodenextraktes ein organischer ist. (Es bleibt natürlich daneben auch eine Wirkung eines z.B. organisch gebundenen Metalles möglich). Der bessere Verlauf der Nitrifikation im Boden kann zum Teil daher rühren. Wir können uns als Ursachen dieses besseren Verlaufs dann weiter noch das Vorhandensein von Heterotrophen und wahrscheinlich günstiger Aérationsbedingungen denken.

KAPITEL IV.

Die Atmung von *Nitrosomonas*.

§ 1. *Einleitung.*

Wie sich aus dem Vorhergehenden schon zeigt, verstehe ich unter Atmung bei *Nitrosomonas* die Ammoniakoxydation. Von vornherein ist eine Veratmung anderer, organischer Stoffe nicht ausgeschlossen. Gemeint ist dann eine Atmung wie wir sie bei heterotrophen Organismen finden.

MEYERHOF (35) fand bei seinen Nitrobakterkulturen, dass die verbrauchte Menge Sauerstoff übereinstimmte mit der Menge, die erforderlich gewesen wäre, die gefundene Menge Nitrat aus Nitrit entstehen zu lassen. Darin sieht er einen Beweis dafür, dass diese Oxydation von Nitrit zu Nitrat die einzige Atmungsreaktion sei, die hier auftritt.

KLEIN und SVOLBA (24) bezweifeln dies. Sie weisen darauf hin, dass die Fehlergrenze ($\pm 4.5\%$) der Versuche MEYERHOFs eine solche Folgerung nicht gestattet. Sie arbeiten mit nitritierenden Bakterien und wollen dabei neben der Ammoniakoxydation noch eine Atmung nachweisen. Das Kennzeichen der Atmung im allgemeinen ist für sie, dass dabei als Zwischenprodukt Azetaldehyd auftritt, im Gegensatz zu der Assimilation wobei ein Zwischenprodukt Formaldehyd ist. Das auftretende Azetaldehyd, wollen sie nun nachweisen durch Beifügung von Dimedon bei den Kulturen, das das gebildete Azetaldehyd wenigstens zum Teil binden würde. Tatsächlich finden sie, auch in ammoniakfreien Kulturen

einiges Azetaldehyd gebunden. Daraus wird dann auf eine Atmung geschlossen, und auch auf das Vorhandensein eines Reservestoffes. Besonders im Lichte neuerer Untersuchungen von BARKER (3) und GIESBERGER (14) wird die Methode einigermassen bedenklich. Diese Untersuchungen, zwar mit ganz andern heterotrophen Organismen, nämlich bzw. Prototheca, einer farblosen Alge, und Spirillen, ermöglichen es doch, dass Atmung und Synthese keine unabhängigen, sondern wahrscheinlich mit einander in Zusammenhang stehenden Prozesse sind.

Übrigens können die Versuche durch die Tatsache, dass die von KLEIN und SVOLBA verwendeten Kulturen in Bouillon Wachstum zeigten und also gewiss keine Reinkulturen von Autotrophen waren, hier ausser Betracht gelassen werden.

Auch BONAZZI (6) nimmt ausdrücklich neben der Nitrifikation noch eine Atmung mit Zellenmaterial an. Der Prozess würde dazu dienen, die Nitrifikation einzuleiten („initiation of the process of nitrosofermentation“).

§ 2. Der Sauerstoffverbrauch von *Nitrosomonas*.

Um zu bestimmen, ob bei *Nitrosomonas* neben der Ammoniak-oxydation noch ein anderer sauerstoffverbrauchender Stoffwechselprozess aufträte, schlug ich einen andern Weg ein. Ich ging dabei aus von der Annahme, dass wenn es einen solchen Prozess gäbe, die Möglichkeit bestehe, dass er in Hinsicht auf die Ammoniak-oxydation wenig Sauerstoff verbrauche. Messungen könnten deshalb am besten unternommen werden, wenn die Ammoniak-oxydation ausgeschlossen wäre. Das liess sich natürlich am einfachsten verwirklichen bei Kulturen, die all ihr Ammoniak verbraucht hatten. Die für diese Versuche benötigten Kulturen wurden gezüchtet in Erlemeyern von 1 l, versehen mit 200 cc Kulturflüssigkeit mit 3 cc der 5% Ammoniumsulfatlösung und beimpft.

Nachdem das beigelegte Ammoniak verbraucht war und die Reinheit sich durch eine Impfung auf Peptonagar erwiesen hatte, wurden sie für die Untersuchung bestimmt. Für diese und andere Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurde das allgemein angewendete Warburgverfahren befolgt. Die gebrauchten Atmungsgefässe hatten einen Inhalt von 15 cc und waren mit einem Nebenröhrchen versehen. Die Kapillare wurde mit Brodie-flüssigkeit gefüllt. In das Nebenröhrchen wurde ein wenig Lauge getan. Dies ist hier nötig für die Aufnahme der durch die bei der Ammoniak-oxydation entstandenen Säuren freigemachten Kohlensäure. Für eine gute Versorgung mit Sauerstoff wurden die Ge-

fässe fortwährend geschüttelt, während sie im Wasserbad mit einer Temperatur von 26°C hingen. Nachdem eine Stunde geschüttelt worden war, wurde mit den Wahrnehmungen angefangen.

Jede halbe Stunde wurde die den Sauerstoffverbrauch anzeigende Druckverringerung abgelesen. Um einen genügenden Sauerstoffverbrauch erhalten zu können, nahm ich für jeden Versuch 50 cc der Kultur. Diese wurden abzentrifugiert und die Bakterien wieder suspendiert in 15 cc des Mediums, das untersucht werden sollte. Um osmotischen Unterschieden vorzubeugen wurde für die Zusammensetzung dieses Mediums stets als Lösmittel das Filtrat der Nährlosung nach WINOGRADSKY verwendet.

Selbstverständlich wurde, bevor die zu untersuchende Suspension in die Atmungsgefäße gebracht wurde, noch eine Impfung auf Peptonagar gemacht.

Zu meiner grossen Überraschung sah ich bei den ersten von mir angestellten Versuchen mit einer Ammoniakfreien Kultur anfangs einen deutlichen Sauerstoffverbrauch. Nach kurzer Zeit

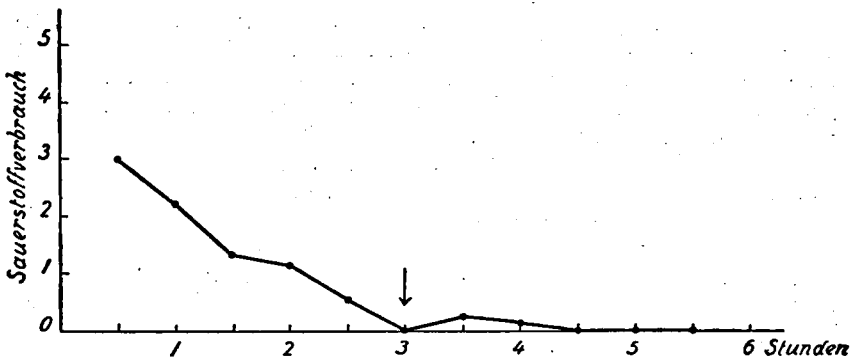


Fig. 3.

Sauerstoffverbrauch einer scheinbar ammoniakfreien Kultur. Bei — ∇ — ist tatsächlich alles Ammoniak geschwunden. Der Sauerstoffverbrauch ist angegeben in mm Brodie-Flüssigkeitsdruckabnahme je halbe Stunde.

nahm dies ab bis 0, auf welchem Niveau es dann blieb. Ein Beispiel eines solchen Versuches ist graphisch dargestellt in Figur 3. Zur Erklärung dieser Wahrnehmung stellte sich Folgendes heraus.

Um zu bestimmen, ob eine Kultur ammoniakfrei geworden sei,

reagierte ich in einer Probe mit Nessler's-reagens auf Ammoniak. Wenn ich dann keine Färbung entstehen sah, so wurde die Kultur als ammoniakfrei betrachtet. Wenn die Probe einige Zeit z.B. eine halbe Stunde so stehen bleibt, so entsteht manchmal doch noch ein lichtbrauner Niederschlag. Man gewinnt den Eindruck, dass dieses Ammoniak aus den Bakterien diffundieren muss.

Bei Kulturen, bei denen auch nachdem sie längere Zeit gestanden haben, keine Braunfärbung auftritt, habe ich nie einigen Sauerstoffverbrauch wahrnehmen können.

Als Beispiel eines solchen Versuches möge der in Fig. 4 graphisch dargestellte dienen.

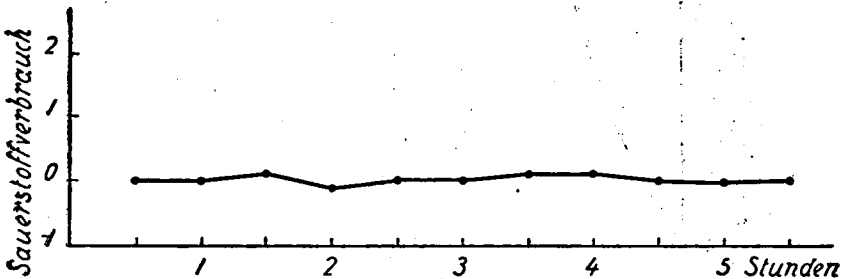


Fig. 4.

Sauerstoffverbrauch einer wirklich ammoniakfreien Kultur. Sauerstoffverbrauch wie in Fig. 3 angegeben.

Der Schluss, der sich aus diesen Versuchen ziehen lässt ist dieser, dass neben der Ammoniakoxydation bei *Nitrosomonas* keine sauerstoffverbrauchenden Stoffwechselprozesse auftreten. Ebensovienig bildet *Nitrosomonas* Reservestoffe, welche unter Sauerstoffverbrauch verarbeitet werden.

§ 3. Versuche mit fettsauren Sälen.

Im Zusammenhang mit den in Kap. V § 5 mitgeteilten Versuchen, schien er mir nicht undienlich, noch einmal deutlich zu zeigen, dass fettsaure Säle durch *Nitrosomonas* nicht veratmet werden. Ich stellte dies fest für Natriumazetat, Natriumbutyrat und Natriumpropionat in Konzentrationen von 0.05 n. Das Versehen der Atmungsgefäße fand wieder auf dieselbe Weise statt wie bei den Versuchen des vorigen Paragraphen. Die fettsauren Säle wurden in den erwünschten Konzentrationen im Filtrat

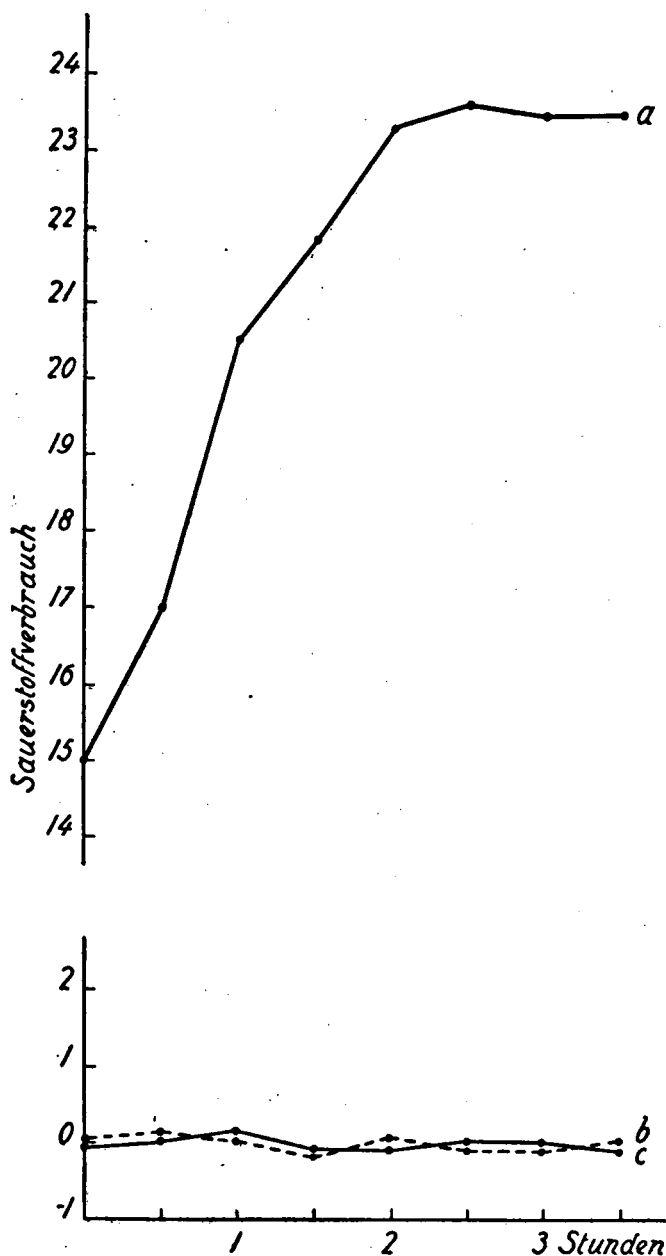


Fig. 5.

Sauerstoffverbrauch von gleichen Proben einer ammoniakfreien Kultur; Kurve a nach Hinzufügung von 0.05% Ammoniumsulfat, Kurve b ohne Hinzufügung und Kurve c nach Hinzufügung von 0.05 n Natriumazetat. Sauerstoffverbrauch angegeben wie in Fig. 3.

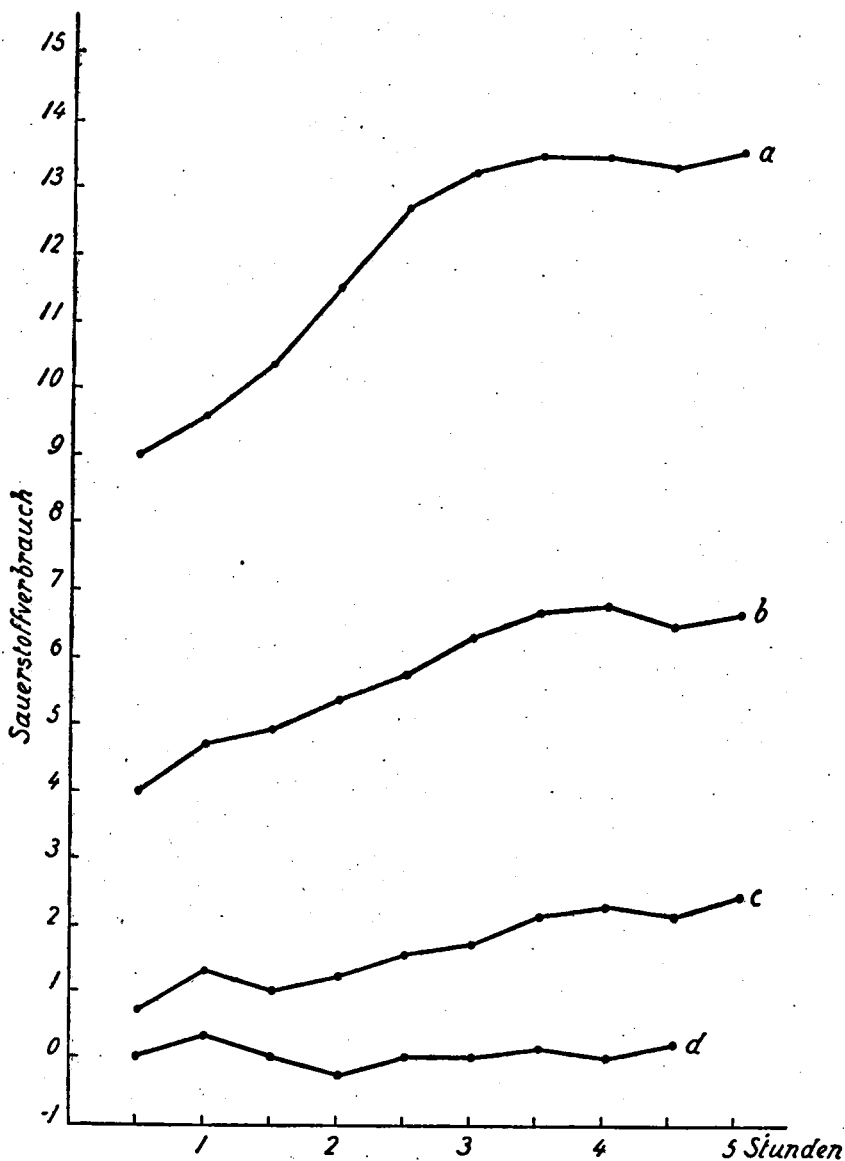


Fig. 6.

Sauerstoffverbrauch von gleichen Proben einer ammoniakfreien Kultur; welche genommen wurden 1, 2, 3 und 4 Wochen, nachdem sie ammoniakfrei geworden ist, nach Hinzufügung von 0.05% Ammoniumsulfat, angegeben durch die Kurve a, b, c, und d. Sauerstoffverbrauch angegeben wie in Fig. 3.

der Nährlösung gelöst und die abfiltrierten Bakterien darin wieder suspendiert. Die Ergebnisse waren für alle drei Salze dieselben. In Figur 5 sind als Beispiel die Ergebnisse des Versuches mit Natriumazetat graphisch dargestellt worden. Man ersieht daraus, dass die Kurve c, den Sauerstoffverbrauch einer Suspension, der 0.05 n Natriumazetat beigefügt worden ist, sowohl wie die Kurve b, die den Sauerstoffverbrauch einer ammoniakfreien Suspension angibt, praktisch mit der X-Achse zusammenfallen. Als Kontrast damit wurde der Sauerstoffverbrauch in einer gleichen Suspension versehen mit 0.05% Ammoniumsulfat, mit der Kurve a angegeben. All dies zeigt deutlich, dass man hier berechtigt ist, den Schluss zu ziehen: fettsäure Salze werden nicht durch Nitrosomonas veratmet. Natriumazetat in einer Konzentration von 0.05 n hemmt nach MEYERHOF die Atmung mit 12%.

Bei Wiederholung dieses Versuches fand ich dies bestätigt.

§ 4. *Das Schicksal einer ammoniakfreien Kultur.*

Eine Tatsache, die ich zu wiederholten Malen habe konstatieren können, ist diese, dass aus ammoniakfreien Kulturen, die so einen Monat oder noch länger gestanden haben, noch Impfungen möglich sind, die gut gelingen. Um den Verlauf einer solchen Kultur einmal genauer zu bestimmen, wurde eine Kultur in 300 cc Kulturflüssigkeit mit 5 cc 5% Ammoniumsulfatlösung angestellt. Nachdem dieses Ammoniak verbraucht war, wurde der Kolben in einem Thermostat bei 22° C verwahrt. Nach einer Woche wurde eine Probe von 50 cc genommen, diese wurde abzentrifugiert und die Bakterien wieder in 15 cc frischer Nährlösung suspendiert, welche 0.05% Ammoniumsulfat enthielt. Zwei Warburgatmungsgefäße wurden beide mit 7 cc dieser Suspension versehen und ihr Sauerstoffverbrauch bestimmt. Jedesmal nach einer Woche wurde dieser Versuch wiederholt. Die Resultate sind in der graphischen Darstellung in Figur 6 wiedergegeben worden. Jede Kurve stellt das Mittlere zweier gleichen Versuche dar. Aus der Figur zeigt sich, dass wir eine fortwährende Abnahme des Sauerstoffverbrauches zu sehen bekommen. Nach 4 Wochen liess dieser sich nicht mehr mit der angewendeten Methode vermessen.

Darauf wurde aus der Kultur in zwei Kontrollkölbchen mit 50 cc Nährlösung, mit $\frac{1}{2}$ cc 5% Ammoniumsulfatlösung, beimpft. Nach Verlauf von 14 Tagen zeigten diese Kontrollkölbchen eine deutliche Nitritreaktion. Dies war auch, jedoch in geringerem Masse, der Fall mit einer solchen Impfung nach 5 Wochen; in

den Kolben nach 6 Wochen trat keine Nitritation mehr auf. Nach dieser Zeit gab es also keine lebenden Zellen mehr.

Aus den Versuchen dieses Kapitels ergibt sich nirgends die Veratmung irgendeines andern Stoffes als von Ammoniak. Die Tatsache, das man nach 6 Wochen noch lebende Organismen findet, lässt sich aus der Annahme erklären, dass die Bakterien eine geringe Menge Reserveammoniak besitzen, wodurch sie noch eine Zeitlang am Leben bleiben können. Weiter kann beim Absterben der Zellen eine kleine Menge Ammoniak frei werden, die natürlich von den noch lebenden Zellen unmittelbar veratmet wird. Der für diese Veratmung erforderliche Sauerstoff ist denn auch so gering, dass sie nicht merkbar ist.

KAPITEL V.

Bestimmung des Rendements.

....Für ammoniak- und nitritoxydierende Bakterien werden ganz andere ökonomische Werte angegeben, als sie Winogradsky feststellte....

Das sind so abweichende Werte, dass sie unbedingt eine Nachprüfung bedürfen;....

Rippel, in Fortschritte der Botanik I.

§ 1. Einleitung.

Die nitrifizierenden Bakterien bauen ihren Zellenstoff auf aus anorganischem Kohlenstoff in der Form von Kohlendioxyd, wie überzeugend nachgewiesen wurde: GODLEWSKY (15, 16), MEYERHOF (35), BONAZZI (5). Die dazu benötigte Energie wird durch die Reaktion $\text{NH}_4\text{OH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ herbeigeschafft.

Die übliche Art und Weise, das Rendement dieses Prozesses anzugeben, ist das Aufstellen des Verhältnisses zwischen der Menge Stickstoff, die das oxidierte Quantum Ammoniak enthielt, und der Menge Kohlenstoff, die in der gebildeten Bakterienmasse festgelegt wurde. Dies wurde zum ersten Mal gemacht von WINOGRADSKY (56). Diese merkwürdige Arbeitsmethode wurde befolgt, weil die Menge gebildeter Zellen ziemlich gering ist und dadurch schwer und nur mit wahrscheinlich grossem Verluste zu isolieren. Als Mass für die Bakterienmenge nimmt man also den darin festgelegten Kohlenstoff, mit der stillschweigenden und wie mir scheint berechtigten Annahme, dass unter gleichen Umständen die chemische Zusammensetzung einer Bakterie wenig wechselt. Dieser Kohlenstoff wird dann durch Verbrennung auf nassem Wege bestimmt.

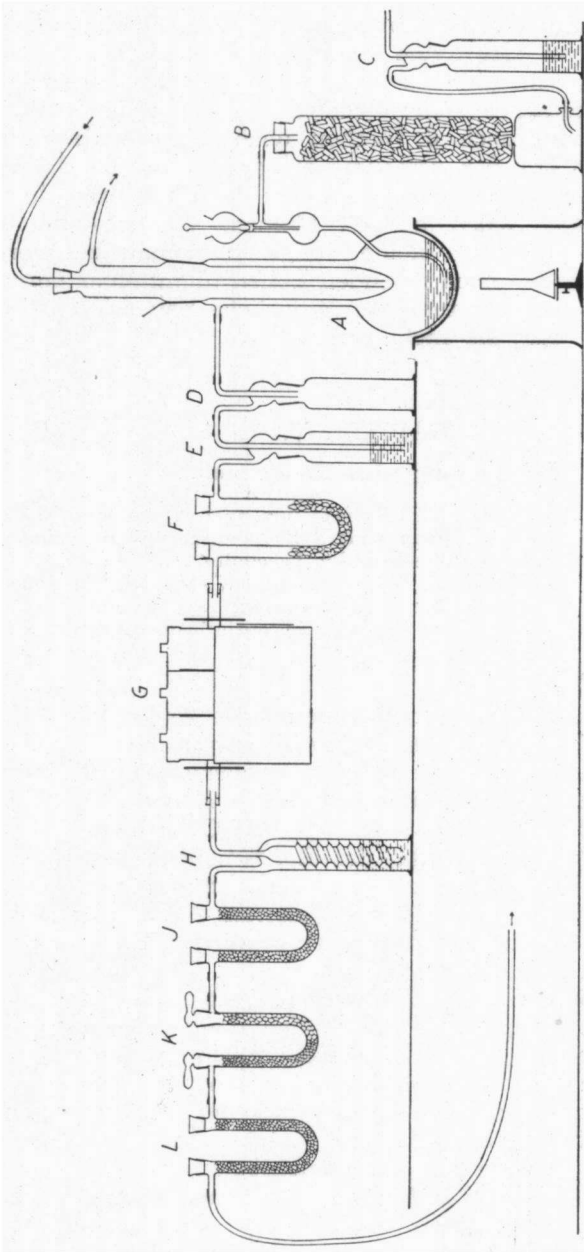


Fig. 7.
Anordnung der Apparatur für Kohlenstoffbestimmung auf nassem Wege.

§ 2. Die Bestimmung des Kohlenstoffes.

Zur Bestimmung des in den Bakterien festgelegten Kohlenstoffes befolgte ich ein Verfahren, das in der Literatur als das „Messinger Verfahren“ bekannt steht. Dies ist ursprünglich ein Verfahren um den Kohlenstoffgehalt von Stahl zu bestimmen. Als ein solches wird er denn auch von TREADWELL (54) erwähnt. Besprechung dieses Verfahrens findet sich auch bei RABEN (47), MEYERHOF (35), HENZE (21). Die verwendete Apparatur ist schematisch in Figur 7 dargestellt.

Sie besteht hauptsächlich aus einem in einem Sandbad aufgestellten Verbrennungskolben nach CORLEIS (A). Die Verbrennung des Stoffes geschieht durch lange währendes Kochen mit einer Chromschwefelsäuremischung in diesem Kolben. Eine Anzahl Kochsteinchen auf dessen Boden verhüten störendes Stößen. Das hier entstehende CO_2 wird von einer durch eine Wasserstrahlluftpumpe erzeugte Luftströmung durch die Absorptionsröhre K geführt. Bevor man die Luftströmung in den Kolben hineinlässt, wird sie kohlenstofffrei gemacht, indem man sie durch ein mit einer Lösung von Kaliumhydroxyd gefülltes Waschfläschchen C und einen mit grobkörnigem Natriumhydroxyd gefüllten Trockenturm passieren lässt. Damit vermieden wird, dass Wasserdampf durch die Luftströmung mitgeführt wird, ist der Kolben mit einem eingeschliffenen Kühler geschlossen. Bevor die Luftströmung die Absorptionsröhre erreicht, passiert sie ein Waschfläschchen E, eine U-röhre F, die Verbrennungsröhre G, ein Schrauben-Waschfläschchen H und eine U-röhre I. Das Waschfläschchen E enthält eine mit Schwefelsäure angesäuerte 20% Lösung von Kaliumjodid um Chlor zurückzuhalten. Das eventuell bei der Verbrennung frei werdende Chlor macht aus dem Kaliumjodid Jodium frei, das in der U-röhre F, am sich darin befindenden grobkörnigen metallischen Antimon absorbiert wird.

Die Verbrennungsröhre G enthält langfaserigen Asbest und darin Kupferoxyd. Die Röhre wird in einem Fletcheröfchen bis glühend erhitzt. Das bei der Verbrennung manchmal entstehende Kohlmonoxyd wird dann zu Kohlendioxyd oxidiert. Schrauben-Waschfläschchen H und U-röhre I dienen zur Trocknung der Luft, H enthält konzentrierte Schwefelsäure und I Phosphor-pentoxyd. Die Absorptionsröhre K enthält in der einen Hälfte Natronkalk, um zu verhüten, dass Wasser, das bei der Absorption frei werden kann, abgeführt wird. Werden bei einer Verbrennung grössere Mengen Kohlenstoffgas (z.B. mehr als 50 mg) frei, so empfiehlt es sich, den Natronkalk, wenigstens zum Teil durch

Natriumhydroxyd zu ersetzen. Dann ist man sicher, bei der hier nötigen ziemlich grossen Geschwindigkeit der Luftströmung, tatsächlich all das Kohlensäuregas zu absorbieren. U-röhre L. dient zur Abschliessung, sie ist teilweise gefüllt mit Natronkalk, teilweise mit Chlorkalk. Zwischen Kolben A und Waschfläschchen E, stellte ich noch ein Waschfläschchen D. Die sonst bis an den Boden reichende Röhre wurde abgebrochen. Das Fläschchen dient nun dazu, bei Störung der Luftpumpe z.B. durch Verringerung des Wasserdrucks, die Jodkaliumlösung aufzunehmen, da diese sonst in die kochende Chromschwefelsäuremischung geraten könnte.

Bevor eine Bestimmung gemacht wird, wird die ganze Apparatur während einer Stunde mit Kohlensäurefreier Luft durchgespült.

Ich gab eine titrimetrische Bestimmung der Kohlensäure auf, weil auch das einfachere gravimetrische Verfahren sehr befriedigende Ergebnisse zeigte. Die Absorptionsröhre wurde auf einer schnellwiegenden, in Zehnteln von Milligrammen genauen Waage gewogen. Um das Verfahren besser kennen zu lernen und um es zu prüfen, führte ich, bevor ich zu Bestimmungen in Bakterien überging, eine Reihe Bestimmungen in Stoffen von einem bekannten Kohlenstoffgehalt aus. Von diesen werde ich hier eine Anzahl mitteilen. Ich fing an mit Bestimmungen in Oxalsäure und Saccharose. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 erwähnt.

Tabelle 3.

Vergleich zwischen der durch Verbrennung auf nassem Wege erhaltenen Menge CO_2 und der aus der verbrannten Menge Stoff berechneten.

Untersuchter Stoff	Menge in mg	Erwartete Menge CO_2 in mg	Gefundene Menge CO_2 in mg
Oxalsäure	126	88	88.0
"	126	88	87.8
Saccharose	171	264	263.2
"	171	264	263.8
"	171	264	263.0

Die Verbrennungsdauer war bei diesen Bestimmungen 2 Stunden, während keine Verbrennungsröhre gebraucht wurde. Als ich diese Versuche mit Benzoessäure, Asparagin und Harnstoff wiederholte, fand ich jedoch Werte, welche weit unter den erwarteten blieben. Hier konnte ich erst befriedigende Ergebnisse

erzielen, wenn ich eine Verbrennungsröhre mit glühendem Kupferoxyd einschaltete und die Verbrennungsdauer zu 5 Stunden hinaufführte. Die so erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 4 gesammelt worden.

Tabelle 4.

Vergleich zwischen der durch Verbrennung auf nassem Wege erhaltenen Menge CO_2 und der aus der verbrannten Menge Stoff berechneten.

Stoff	Stoffmenge in mg	Erwartete Menge CO_2 in mg	Gefundene Menge CO_2 in mg
Harnstoff	30	22	22.6
"	30	22	21.6
"	30	22	23.0
"	60	44	42.4
Benzoësäure	24.4	61.6	61.8
"	24.4	61.6	62.0
Asparagin	100.8	105.6	106.1
"	100.8	105.6	105.4

Es schien mir nun besonders wichtig, die Ergebnisse noch einmal an einem mehr biologischen Material zu prüfen. Herr Prof. C. B. van Niel stellte mir eine Menge getrocknetes Material von *Spirillum rubrum* zur Verfügung. Da man annehmen darf, dass dessen Zusammensetzung nicht bedeutend von der von *Nitrosomonas* abweichen wird, schien mir dies ein besonders günstiges Prüfungsobjekt. Herr Dr. v. d. Zanden bestimmte auf meine Bitte den Kohlenstoffgehalt des Materials ¹⁾. Es wurden zwei Bestimmungen gemacht, die bezw. 47.89 und 47.49 also durchschnittlich 47.7% Kohlenstoff ergaben. Ich machte auf nassem Wege 3 Bestimmungen, die in Tabelle 5 erwähnt werden.

Tabelle 5.

Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes von *Spirillum rubrum* auf nassem Wege.

Menge Bakterien in mg	Daraus erhaltene mg CO_2	Menge Kohlenstoff in mg	Kohlenstoff- gehalt in %
12.7	22.0	6.00	47.2
9.3	15.8	4.40	47.3
12.6	21.7	5.92	47.0

¹⁾ An dieser Stelle sage ich Herrn Dr. v. d. Zanden herzlichsten Dank für seine grosse Bereitwilligkeit.

Durchschnittlich fand ich also nach dieser Tabelle im Material 47.2% Kohlenstoff, oder 1.05% zu wenig. Ich habe deshalb bei meinen Versuchen mit Bakterien auch eine Korrektur von 1% angebracht.

Um den in den Bakterien einer Kultur festgelegten Kohlenstoff zu bestimmen, muss natürlich erst der anorganisch gebundene Kohlenstoff entfernt werden. Dies geschah durch Hinzufügung eines geringen Übermasses verdünnter Schwefelsäure. Um alle so entstandene Kohlensäure zu entfernen, wird die so behandelte Kulturflüssigkeit eine Stunde gekocht, wobei kohlensäurefreie Luft durchgeführt wird. All dies lässt sich ausgezeichnet anstellen in dem Corleis Verbrennungskolben mit den davor geschalteten Gefässen. Nach Abkühlung wird der Rest des Apparates auch eingeschaltet und wieder eine halbe Stunde kohlensäurefreie Luft durchgeführt. 5 Gramm technische Chromsäure und 40 cc konzentrierte Schwefelsäure werden nun hinzugefügt. (Um alle Spuren organischen Stoffes aus der Schwefelsäure zu entfernen ist diese vor dem Gebrauch mit 5 g Chromsäure je 1 2 Stunden gekocht worden).

Nun wird vorsichtig bis zum Sieden erhitzt. Dieses Sieden wird 5 Stunden fortgesetzt. Während dieser ganzen Zeit wird langsam kohlensäurefreie Luft durchgesaugt. Am folgenden Tag wird die Gewichtszunahme der Absorptionsröhre bestimmt.

§ 3. Stickstoffbestimmung.

Zur Bestimmung der Menge Stickstoff, welche die gebildete Nitritmenge enthält, wurde das Verfahren Devardas, in der Modifikation von NIEUWENBERG und DE GROOT (43) befolgt. Die zu untersuchende Flüssigkeit wird alkalisch gemacht mit Kaliumhydroxydlösung; einiges Aluminiumpulver und ein paar Tropfen einer Kupfersulfatlösung zugesetzt. Nachdem die so entstandene heftige Wasserstoffentwicklung vorüber ist, ist der Nitritstickstoff zu Ammoniak reduziert. Durch Destillation wird dieses ausgetrieben und in 0.1 n Salzsäure aufgefangen und durch Rücktitration mit 0.1 n Natronlauge bestimmt.

Wie im Kapitel II erwähnt worden ist, wurde das Ammoniumsulfat in abgemessenen Mengen aus einer Bürette hinzugefügt. Dennoch ist es notwendig, nach Ablauf der Kultur den Stickstoff des gebildeten Nitrits zu bestimmen, weil aus der alkalischen Nährlösung Ammoniak schwindet. Merkwürdigerweise ist dieser Verlust aus einer Kultur von *Nitrosomonas* geringer, als aus eine unbeeimpften Nährlösung, wie ich deutlich konstatieren konnte.

Dies hängt wahrscheinlich zusammen mit dem Phänomen, das auch MEYERHOF (37) konstatierte, nämlich dass durch die Atmung der Bakterien und die damit zusammengehende fortwährende Bildung salpetriger Säure und das Freiwerden dadurch von Schwefelsäure, eine wirkende Kultur immer etwas weniger alkalisch ist als eine unbeimpfte Nährlösung.

§ 4. Literatur über die Kohlenstoffassimilation.

Fünf Autoren bestimmten das Verhältnis zwischen dem oxidierten Stickstoff und dem gebildeten organischen Kohlenstoff. In der Folge wird dies einfach das N/C Verhältnis genannt werden. Ihre Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst worden.

Tabelle 6.

Die in der Literatur erwähnten Werte für das N/C Verhältnis bei nitrifizierenden Bakterien.

Autor	Gefundenes Verhältnis N/C von:	
	Nitrosomonas	Nitrobacter
Winogradsky	35	
Coleman		41 ; 64
Meyerhof		100 ; 135
Nelson	14.3	76
Engel	79	

WINOGRADSKY (56) bestimmte das N/C Verhältnis für den Nitritbildner. Um eine genügende Menge Bakterien zu erhalten, saugte er, nachdem das Ammoniak verbraucht war, seine Kulturen durch Asbestfilter ab. Dann wurden die Bakterien wieder in frische Lösung gebracht. Dies wurde so einige Male wiederholt. Selbstverständlich ist dabei die Infektions- und Verunreinigungsgefahr wohl besonders gross. Der oxidierte Stickstoff wurde in der Summe der gesammelten Nährlösungen bestimmt. Die Verbrennung der Bakterien geschah nach dem Verfahren von WOLFF, DEGENER, HERZFELD, wie dies von TIEMANN und GÄRTNER (53) erwähnt wird.

Dieses Verfahren erfordert ziemlich viel Arbeit, so muss z.B.

die zu untersuchende Lösung zu einem kleinen Volumen eingedampft werden. Eine Verbrennungsröhre fehlt. Die vorgeschriebene Versuchsdauer, kaum eine Stunde, scheint zu kurz zu einer völligen Verbrennung. All dies macht das Verfahren weniger empfehlenswert. Weiter ist zu bemerken, dass als WINOGRADSKY diese Bestimmungen machte, die beiden nitrifizierenden Bakterien noch nicht scharf von ihm getrennt worden waren. Eine wahrscheinlich geringe Verunreinigung der nitritierenden Bakterien mit nitratierenden ist deshalb nicht unmöglich.

COLEMAN (7) nennt seine Versuche vorläufig. Es ist seine Absicht die Festlegung des CO_2 als organischen Stoffes für Nitrobacter nachzuweisen, wie WINOGRADSKY dies für Nitrosomonas tat. Er bestimmte den Kohlenstoff nach einem von KÖNIG (30) mitgeteilten Verfahren. Die Verbrennung geschieht hier in einer Lösung von Kaliumpermanganat, einigem Mercurisulfat, und Chromschwefelsäure. Es muss solange gekocht werden, bis keine Gasblasen mehr entweichen; es wird nämlich keine Luft durchgesaugt. Ich glaube nicht, dass man so die letzten Reste des entstandenen Kohlensäuregas aus der Lösung entfernt. Eine Verbrennungsröhre fehlt. Die gefundenen Werte für den Nitratbildner weichen bedeutend von den in MEYERHOFs zuverlässiger Untersuchung erhaltenen ab. Dies kann daher rühren, dass die verwendeten Kulturen wahrscheinlich nicht rein waren.

Die Arbeit MEYERHOFs (35) macht einen sehr soliden Eindruck. Das N/C Verhältnis wurde für Nitrobacter bestimmt. Die verwendeten Kulturen stammten von OMELIANSKY. Die Kohlenstoffbestimmungen wurden nach dem Verfahren von Messinger gemacht; die entstandene Kohlensäure wurden titrimetrisch bestimmt. Abgesehen von letzter Tatsache arbeitete ich nach demselben Verfahren. Das gefundene N/C Verhältnis erwies sich für junge Kulturen günstiger als für ältere (Bezw. 100 und 135).

Von NELSON (41) wurde für die Kohlenstoffbestimmung das Verfahren von HECK (20) angewendet, ein ziemlich einfaches Verfahren, Kohlenstoff im Boden zu bestimmen. Es gibt keine Verbrennungsröhre, wohl aber wird etwa entstandenes Chlor in Silbersulfat zurückgehalten. Über die Bestimmung werden wenig Einzelheiten erwähnt. Seine Verhältnisse fallen besonders günstig aus, wahrscheinlich weil seine Kulturen ziemlich sicher nicht rein waren.

ENGEL (9) wendet auch das Verfahren von Messinger an, jedoch mit Weglassung der Verbrennungsröhre und der Absorptionseinrichtung für Chlor. Zwar genügt ihm die Trocknung der Luft nur durch Schwefelsäure vor dem Erreichen der Absorp-

tionsröhre nicht und er will dazu ausschliesslich Phosphor-pentoxyd gebrauchen. Die Versuchsdauer ist kurz, nämlich etwa eine Stunde. Er sagt jedoch, nur die Assimilation von Kohlendioxyd durch *Nitrosomonas* nachweisen und bestätigen zu wollen. In einer folgenden Publikation (10) stellt er nochmals eine Reihe Versuche an, um das N/C Verhältnis zu bestimmen. Im ersten Versuch wird das etwa entstehende Chlor durch Silbernitrat gebunden, bei den drei darauffolgenden lässt er aus der Nährlösung das Natriumchlorid einfach weg, um zu verhüten, dass Chlor entstehe. Dies macht nach seinen Versuchen keinen grossen Unterschied.

Die Bakterien werden in sehr komplizierten Gefässen gezüchtet. Luft kann nur hineinkommen an mit Chromschwefelsäure befeuchteten Bimsstein vorbei. Die gefundenen Werte fallen ziemlich ungünstig aus; das gesetzte Ziel aber, der Nachweis der Assimilation von Kohlensäuregas ist erreicht worden.

§ 5. *Bestimmung des N/C Verhältnisses.*

Die Kulturen, welche zu dieser Bestimmung dienen sollten, wurden in Erlemeyern platten Modells, welche also eine verhältnismässig grosse Bodenfläche hatten, mit einem Inhalt von 2 l (Kulturkolben 10 G, Katalog Schott u. Gen, Jena) gezüchtet. Sie enthielten 200 cc Kulturflüssigkeit und wurden versehen mit 3 cc der 5% Ammoniumsulfatlösung in der bekannten Weise. Es wurde beimpft mit 1 cc aus einer nicht infizierten gut wirkenden Kultur. Nachdem die erste Portion Ammoniak verbraucht war, wurde noch einmal 3 cc hinzugefügt, nach deren Verbrauch wieder 4 cc. Insgesamt wurde also in dieser Weise 10 cc 5% Ammoniumsulfatlösung verbraucht.

Es wurde in dunkeln Thermostaten kultiviert. Ein paar Mal täglich wurden, zu einer guten Aeration, die Kolben vorsichtig geschüttelt. Um Fehler zu vermeiden, wurden die Kolben abgeschlossen, indem ich aus Stanniol genügend grosse Kappen um die Hälse beugte. Wattenpfropfen waren hier unverwendbar, weil dann Flöckchen in die Flüssigkeit geraten würden.

Selbstverständlich geschahen Behandlungen wie Probenahme, Schütteln und Hinzufügen von Ammoniumsulfat mit der grössten Vorsicht, um Infektion so viel wie möglich zu vermeiden.

Bevor zu einer Bestimmung übergegangen wurde, wurde immer erst eine Kontrolleimpfung auf Peptonagar gemacht.

In einer Probe von 20 cc wurden zwei Stickstoffbestimmungen gemacht. Der Rest der Kultur diente zur Kohlenstoffbestimmung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 gesammelt worden.

Tabelle 7.

Bestimmung des N/C Verhältnisses für *Nitrosomonas* bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur in ° C	Versuchs- dauer in Tagen	Oxidierter Stickstoff in mg	Gefundener Kohlenstoff in mg	N/C Verhältnis	Durch- schnittlich
22	46	116.0	3.23	36.2	34.9
		118.2	3.45	34.3	
		135.6	3.81	35.6	
		112.7	3.38	33.3	
27	30	109.1	3.08	35.4	33.3
		101.1	3.09	32.8	
		115.6	3.44	31.7	
		106.2	3.20	32.2	
		110.0	3.03	33.6	
32	21	98.2	3.15	31.2	32.3
		112.1	3.43	32.7	
		96.3	2.92	32.9	

Wie es sich aus der Tabelle ergibt, sind drei Versuchsreihen angestellt worden, nämlich bei 22, 27 und 32° C. Es macht den Eindruck, alsob das N/C Verhältnis bei höherer Temperatur günstiger sei. Die Unterschiede liegen jedoch innerhalb der Fehlergrenze.

MEYERHOF (35) fand bei *Nitrobacter* bei jungen Kulturen ein günstigeres N/C Verhältnis als bei älteren. Das bedeutet dann zugleich, dass eine ältere Kultur mehr Nitrit verbraucht hat. Darum wäre es denkbar, dass ich bei meinen Versuchen nicht das günstigste Verhältnis gefunden hätte. Um dies zu untersuchen, stellte ich die in Tabelle 8 mitgeteilten Versuchsreihen an.

Es wurde ein Teil der Kolben analysiert, nachdem die Kulturen ± 65 mg Stickstoff oxidiert hatten, ein anderer Teil erst, nachdem ± 200 mg oxidiert war.

Tabelle 8.

Bestimmung des N/C Verhältnisses in jungen und alten Kulturen.

Temperatur in ° C	Oxidierter N in mg	Gefundener C in mg	N/C Verhältnis	Durch- schnittlich	Versuchs- dauer in Tagen
28	61.2	1.82	33.6	33.5	20
	65.0	2.06	31.6		
	66.1	1.87	35.3		
28	185.6	4.02	46.2	45.1	45
	195.4	4.45	43.9		

Bei jüngeren Kulturen fand ich also kein N/C Verhältnis, das günstiger ist als das der Versuche von Tabelle 7. Wohl aber fand ich bei älteren Kulturen ein ungünstigeres Verhältnis.

Aus den gegebenen Tatsachen von Tabelle 8 und Tabelle 9 lässt sich berechnen, dass während der Zeit, dass 0—0.10% NO_2^- anwesend ist, das N/C Verhältnis 33.5 ist. Für 0—0.18% NO_2^- und 0—0.31% NO_2^- wird das Verhältnis bezw. 33.3 und 45.1. Daraus geht hervor dass während der Zeit, dass 0.18—0.31% NO_2^- anwesend war, das N/C Verhältnis sehr ungünstig, nämlich 76.7 gewesen sein muss.

Das entstandene Nitrit hemmt also nicht nur die Atmung (MEYERHOF, 35), sondern auch schon in ziemlich schwachen Konzentrationen in hohem Grade die Synthese.

§ 6. Das N/C Verhältnis bei Kulturen, denen Natriumazetat hinzugefügt worden ist.

Schon in Kapitel I wurde auf das abweichende Verhalten der Bakterien zu fettsauren Salzen hingewiesen. Natriumazetat z.B. hemmt nach MEYERHOF (37) in einer Konzentration von 0.05 n die Atmung von Nitrosomonas mit 12%. Eine Kultur, der diese Konzentration beigefügt wird, hat aber schneller sein Ammoniak verbraucht, als eine Kultur ohne diese Hinzufügung.

In einer Versuchsreihe mit Erlemeyern von 1 l mit 200 cc Kulturflüssigkeit war bei Anwesenheit von 0.05 n Natriumazetat das beigefügte Ammoniak (3 cc 5% Ammoniumsulfat) schon nach 18 Tagen geschwunden; in der Kontrollreihe erst nach 22 Tagen. Um dies zu erklären muss man annehmen, dass das Azetat, obgleich es die Atmung hemmt, die Zunahme der Bakterien fördert.

Ist dieser Gedankengang richtig, so muss dies sich natürlich im N/C Verhältnis zeigen. Die Versuchsreihe, welche zur Be-

stimmung dienen sollte, wurde, abgesehen von der Azetatbeifügung, wie die Reihe aus dem vorigen § behandelt. Bevor ich zur Kohlenstoffbestimmung übergang, wurden die Kulturen während 15 Minuten in einer grossen Zentrifuge abzentrifugiert. Der Inhalt von jeder der 6 Röhren war 50 cc. Dieses Abzentrifugieren verläuft ausgezeichnet, weil die Bakterien in einer Kultur sich um die festen Teilchen Magnesiumkarbonat anhäufen. Die abzentrifugierte Masse wird einige Male mit destilliertem Wasser gewaschen und jedesmal wieder zentrifugiert. Danach wird sie im Corleiskolben auf die bekannte Weise mit verdünnter Schwefelsäure behandelt, wobei die letzten Spuren Azetat schwinden.

Aus den erhaltenen Ergebnissen zeigt sich die Richtigkeit des Gedankenganges; tatsächlich ist ein günstigeres N/C Verhältnis gewonnen. (Tabelle 9). In Kapitel VII wird eine etwaige Erklärung dafür besprochen werden.

Tabelle 9.

Bestimmung des N/C Verhältnisses bei Nitrosomonas, in Kulturen, denen 0.05 n Natriumazetat beigelegt wurde.

Temperatur	Gefundener oxidierter N	Gefundener Kohlenstoff	Verhältnis N/C	Durch- schnittlich	Versuchs- dauer in Tagen
28° C	97.4	3.41	28.5	28.4	25
	102.3	3.74	27.3		
	114.4	3.93	29.1		
	118.3	4.12	28.7		

§ 7. N/C Verhältnis bei herabgesetzter Sauerstoffspannung.

Im Jahre 1928 erschien von MEYERHOF und BURK (38) eine Abhandlung über die Stickstofffixation durch Azotobacter. Sie fanden, dass bei niedriger Sauerstoffspannung, niedriger als die maximum Spannung für die Atmung, das Verhältnis zwischen dem festgelegten Stickstoff und dem verbrauchten Sauerstoff günstiger sei als bei höherer Sauerstoffspannung. Es wurde dann also verhältnismässig mehr Stickstoff festgelegt, die Stickstofffixation nahm nicht so schnell ab mit der Sauerstoffspannung als die Atmung. Man kann sich denken, dass hier gleichsam zwei konkurrierende Wasserstoffakzeptoren wirken, nämlich Sauerstoff und Stickstoff, wobei bei der Abnahme des einen (Sauerstoffs), der andere (Stickstoff) sich besser des Wasserstoffes bemächtigen kann.

Bei *Nitrosomonas* hat man auch zwei Akzeptoren für den Wasserstoff, nämlich Sauerstoff und Kohlendioxyd. Man würde hier also auch bei einer Sauerstoffspannung, die niedriger ist als die wobei das Optimum der Atmung liegt, ein günstigeres N/C Verhältnis erwarten können.

Das Atmungsoptimum liegt hier bei 10% Sauerstoff. Ich wählte für einen Versuch 2% Sauerstoff, die Atmung ist dann etwa 1/3 Teil des Optimalen. Anfangs glaubte ich, den Versuch anstellen zu können, indem ich aus einer Bombe Stickstoff mit 2% Sauerstoff langsam durch die Kultur sprudeln liess. Dies zeigte sich unausführbar. Nach einigen Tagen war dann alles Ammoniak schon ausgetrieben. Darum wurde eine Versuchsanordnung, wie sie schematisch angegeben wird in Figur 8, gewählt.

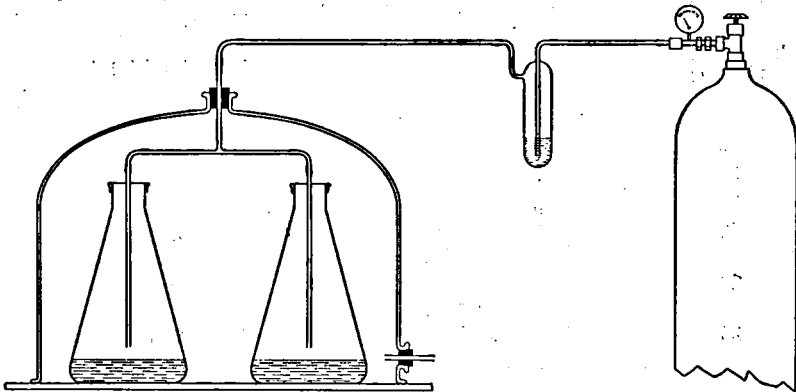


Fig. 8.

Anordnung für die Kultur von *Nitrosomonas* unter herabgesetzter Sauerstoffspannung.

Die Kulturkolben wurden auf eine Glasplatte unter eine Glocke gestellt. Die Stanniolkappen wurden durchbohrt und mit einem Aluminiumring verstärkt. Durch die Durchbohrung reichte eine Glasröhre gerade bis an die Flüssigkeitsfläche in die Kolben hinein. Stickstoff mit 2% Sauerstoff wurde nun sehr langsam durch die Kolben geleitet. Das Ganze wurde die ersten Tage nach der Impfung und nach der Beifüllung täglich einige Male vorsichtig geschüttelt. Nach Ablauf des Versuches erwiesen sich nur zwei Kolben nicht infiziert, diese wiesen aber sehr deutlich das erwartete günstigere N/C Verhältnis auf, wie sich aus Tabelle 10 ergibt.

Tabelle 10.

Bestimmung des N/C Verhältnisses für eine Nitrosomonas-kultur bei herabgesetzter Sauerstoffspannung.

Temperatur	Oxidierter N	Gefundener C	N/C Verhältnis	Durchschnittlich
28° C	92.3	3.07	30.1	29.5
	97.5	3.39	28.8	

§ 8. Zusammenfassung der bestimmten Werte der N/C Verhältnisse dieses Kapitels.

Tabelle 11.

Die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen N/C Verhältnisse.

Temperatur in ° C	Umstände	N/C Verhältnis
22	normal	34.9
27	"	33.3
32	"	32.3
28	beigefügt 0.05 n Natriumazetat	28.4
28	herabgesetzte O ₂ Spannung	29.5
28	ältere Kultur	76.7

Aus Tabelle 11 ergibt sich, dass das N/C Verhältnis bei Nitrosomonas günstiger ausfällt bei Hinzufügung von 0.05 n Natriumazetat oder bei Erniedrigung der Sauerstoffspannung; vielleicht auch durch Temperaturerhöhung. In jungen Kulturen finden wir günstigere Verhältnisse als in älteren.

KAPITEL VI.

Ein Kalorimeterversuch.

§ 1. Einleitung.

Wenn man die Reaktion $\text{NH}_4\text{OH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 77.87 \text{ Kal.}$, welche die Ammoniakoxydation durch Nitrosomonas angibt, betrachtet, und dabei bedenkt, dass sich aus den im Kapitel II angestellten Kohlenstoffbestimmungen zeigt, dass in

Hinsicht auf das Quantum oxydiertes Ammoniak, nur wenig Kohlensäuregas reduziert wird, so gewinnt man den Eindruck, dass diese Bakterien durch die grosse Menge frei werdender Wärme, wohl ein besonders günstiges Objekt für kalorimetrische Bestimmungen darstellen. Dennoch erschwert das langsame Wachsen dieser Bakterien die Wärmebestimmung.

MEYERHOF (35) stellte einen Kalorimeterversuch mit dem Nitratbildner an. Eine gut wirkende Kultur wurde in ein Dewar-Gefäss gestellt, dessen Abkühlungswert durch Eichung genau bekannt war. An einem empfindlichen Beckmann-Thermometer wurde die durch die Kultur verursachte Temperaturerhöhung abgelesen. Daraus ergibt sich dann die produzierte Wärme. Es stellte sich heraus, dass die gefundene Wärmeproduktion ziemlich genau mit der erwarteten übereinstimmte.

Durch glückliche Umstände konnte ich über die automatische Mikro-kompensations-kalorimeter nach ALGERA verfügen.

Ich verrichtete damit eine Wärme-messung bei Nitrosomonas.

§ 2. Methode.

Die automatische Mikro-kompensations-kalorimeter wurde von ALGERA (1, 2) gebaut und beschrieben. Für eine detaillierte Beschreibung kann deshalb auf ihn verwiesen werden.

Hier genügt eine kurze Beschreibung. Das von Prof. ZERNIKE angegebene Prinzip des Kalorimeters ist dieses, dass die entstandene Wärme sofort durch eine gleich grosse Menge Kälte kompensiert wird. Dazu befindet sich in dem Gefäss, in dem der Wärme produzierende Organismus kultiviert wird, als Kältequelle eine dünnwandige Kupferröhre, mit destilliertem Wasser. Wenn durch dieses Wasser scharf getrocknete Luft gepumpt wird, so entsteht eine Abkühlung, indem Wasser verdampft. Durch Eichung mit einer bekannten Wärmequelle (einem Manganindraht von bekanntem Widerstand, durch den ein bekannter Strom fliesst), ist die Menge Kalorien, welche einem Pumpenschlag entspricht, bekannt. Die zur Kompensation der von dem Organismus produzierten Wärme nötige Anzahl Pumpenschläge ergibt dann also durch Multiplikation die Anzahl produzierter Kalorien.

Das Kulturgefäss, dass ALGERA für Bestimmungen bei *Aspergillus niger* konstruierte, eignete sich nicht für *Nitrosomonas*. Das zu konstruierende Gefäss musste einen ziemlich grossen Inhalt haben, um eine Kultur enthalten zu können, bei der Wärmemessung ausführbar sein würde. Ein zweites Erfordernis war, dass das verwendete Material nicht angreifbar durch die ziemlich alkalische Nährlösung sein dürfte. Letzteres schloss

Kupfer schon aus. Darum wurde Kupfer auf verschiedene Weisen behandelt, u.A. verzinkt und verchromt. Verchromtes Kupfer schien verwendbar, es stellte sich aber heraus, dass es technisch nicht möglich sei die Verchromung tadellos innerhalb des Kulturgefäßes auszuführen. Als auch ein verplattiniertes Kupfergefäß sich als untauglich erwies, entschloss ich mich endlich dazu das Kulturgefäß innen mit einer dünnen Platinschicht zu bekleiden, wie auch das in das Kulturgefäß hineinreichende kupferne Verdampfungsgefäß. Letzteres wurde ausserdem zu einer bessern Wärmeleitung mit vier platinblechernen Flügeln versehen.

Das Kulturgefäß wurde zu einer guten Wärmeisolation in eine Dewar-Flasche gestellt; die Flasche steht wieder in einem dickwandigen Kupferzylinder. Die Kompensation der Wärme kommt nun wie folgt zustande. Von einer Reihe Thermoelementen ist die eine Lötstelle auf dem Kulturgefäß festgeklemmt. Die andere steckt in einer Seitenröhre des eben genannten Kupferzylinders. Da das Wasserbad, in das der ganze Apparat untergetaucht ist, mit Hilfe eines besonders empfindlichen Thermometers auf einer bestimmten Temperatur (beim angestellten Versuch 27°C) gehalten wird, bleibt der Punkt in der Seitenröhre immer auf derselben Temperatur. Sobald im Kulturgefäß einige Wärme produziert wird, wird ein thermoelektrischer Strom entstehen. Dieser Strom wird nach einem Spiegelgalvanometer geleitet. Ein darauf gerichteter intermittierender Lichtbüschel fällt mit seinem Rande gerade auf ein Schirmchen, das vor einer photoelektrischen Zelle aufgestellt ist. Ist der Galvanometer stromlos, so fällt das Licht gerade nicht in die photoelektrische Zelle hinein. Wird einige Wärme im Kulturgefäß produziert, so fällt der Lichtbüschel ein wenig am Schirmchen vorbei in die Zelle hinein. Der dann entstehende photoelektrische Strom wird mittels einiger Elektronenröhren verstärkt und macht dann ein Relais umschlagen. Dadurch wird die Pumpe, welche die trockene Luft durch das Verdampfungsgefäß presst, in Tätigkeit gesetzt. Die Luft wird getrocknet, indem sie durch einige mit Phosphor-pentoxyd gefüllten Röhren geleitet wird. Als Pumpe wurde dazu eine Quecksilberpumpe gebraucht, die mit Hilfe von Ventilen so konstruiert ist, dass die Luft sowohl beim hinauf- als beim hinuntersteigen des Reservoirs, immer in derselben Richtung gepresst wird. Die Anzahl der Pumpenschläge kann abgelesen werden, indem bei jedem Schläge ein elektrischer Kontakt hergestellt wird wodurch die Schläge auf einem mit regelmässiger Geschwindigkeit abrollenden Papierstreifen notiert werden.

Eine zweite im Bade aufgestellte Quecksilberpumpe pumpt

während des Versuches mit sich gleichbleibender Geschwindigkeit Luft durch die Kultur. Durch das Passieren von ein paar Waschfläschchen mit Kulturflüssigkeit und einer im Bade aufgehängten Bleispirale ruft diese Luftströmung keine Temperaturschwankungen hervor. Durch ein Gasverteilungsrohr (33 c G Katalogus Schott u. Gen, Jena) strömt die Luft in kleinen Blasen durch die Kultur. Dadurch wird sowohl eine gute Aeration, als eine gehörige Mischung der Kultur erhalten.

§ 3. *Der Versuch.*

Bei dem von ALGERA angestellten Versuch mit *Aspergillus niger* wurde die Flüssigkeit im Kulturgefäß mit sehr wenig Material beimpft. Zuerst war daher die Wärmeproduktion so ziemlich nihil, wonach sie langsam anstieg und messbar wurde. Bei *Nitrosomonas* konnte nicht in dieser Weise verfahren werden, da erst nach langem Kultivieren und Erfrischen der Nährlösung eine genügende Menge Bakterien entstehen könnte.

Darum wurden fünf gut wirkende Kulturen, welche alle etwa 130 mg Stickstoff oxydiert hatten, abzentrifugiert, nachdem ihre Reinheit sich erwiesen hatte. Die abzentrifugierten Bakterien wurden so oft wieder aufs neue in dem sterilen Filtrat einer Nährlösung suspendiert, dass sich nur noch eine sehr schwache Nitritreaktion verspüren liess. Die so erhaltene Suspension wurde in zwei Teile von 250 cc verteilt; ein war für den Kalorimeter, der andere für die Kontrolle bestimmt. Jeder Teil bekam 5 cc Ammoniumsulfatlösung.

Die Schwierigkeit war nun, die Kultur in das Kulturgefäß zu bringen ohne all zu grosse Temperaturschwankungen. Sie wurde schliesslich so gelöst, dass die Kultur, nachdem sie im Kolben eine Zeitlang ins Bad untergetaucht aufbewahrt war, mit der Hand noch etwas erwärmt wurde. Dann wurde sie schnell durch die Röhre, wodurch die Aérationsluft entwich, in den Kalorimeter gegossen. Indem die Pumpgeschwindigkeit in der ersten Zeit gross genommen wurde, wurde die ein wenig zu hohe Temperatur ziemlich schnell, (im mitgeteilten Versuch in ± 2 Stunden) auf die richtige Temperatur gebracht und es konnte mit der Messung angefangen werden. Die nächsten 3 Stunden wurden noch nicht mitgerechnet. Danach dauerte der Versuch noch 12 Stunden.

Der Verbrauch des Ammoniaks wurde geprüft, indem aus der Kontrollekultur, die im Bade hangen blieb, am Anfang des Versuchs ein paar Proben genommen wurden und darin eine Nitritbestimmung ausgeführt wurde. Nach beendetem Versuch

wurde sowohl in der Kontrollekultur als in der Kultur im Kalorimeter das entstandene Nitrit bestimmt. Weil nun der Nitritgehalt dieser zwei Kulturen gleich befunden wurde, war der Verbrauch der Kultur aus dem Kalorimeter bekannt. Dieser betrug während des Versuches 25.5 mg Ammoniak, was mit 21.0 mg Stickstoff übereinstimmt. Zur Kompensation der dabei frei werdenden Wärme waren, wie sich herausstellte, 58 Pumpenschläge nötig. Durch Eichung des Kalorimeters mit einer Wärmequelle, die ± 10 kal stündlich produzierte, wurde für den kalorischen Wert eines Pumpenschlages 2.08 kal. gefunden. Als bekannte Wärmequelle wurde ein Manganindraht genommen, dessen Widerstand genau bestimmt war. Dieser wurde zur Isolation mit Ventil Schlauch umgeben ins Kulturgefäß gebracht. Ein Akkustrom von bekannter Stärke wurde hindurch geleitet, eine einfache Berechnung gibt dann die produzierte Wärme je Zeiteinheit. Diese wird mit der Anzahl Pumpenschlägen in der Wahrnehmungszeit verglichen.

Die frei werdende Wärme betrug also $58 \times 2.08 = 120.64$ kal. Ein Teil dieser Wärme stellt die Neutralisationswärme dar des entstandenen HNO_2 mit dem $\text{Mg}(\text{OH})_2$ der Nährlösung. Dessen Betrag ist aber in der Literatur nicht bekannt. Da die Neutralisationswärme von HNO_2 und Na OH nach LANDOLT-BÖRNSTEIN (31), 10,25 Kal ist, und die Neutralisationswärme der verschiedenen Säuren mit NaOH nicht bedeutend von der mit $\text{Mg}(\text{OH})_2$ abweicht, so darf man die von HNO_2 mit $\text{Mg}(\text{OH})_2$ auch wohl auf ± 10 Kal. ansetzen. Im Versuch entstand $\frac{47}{14} \times 21.0 = 70.5$ mg HNO_2 . Dessen Neutralisationswärme wird etwa $\frac{10}{47} \times 70.5 = 15.00$ kal betragen.

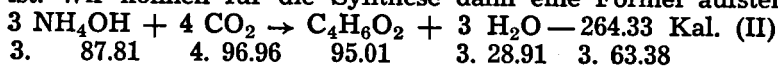
Der Rest der gemessenen Wärme, $120.64 - 15 = 105.64$ kal, ist also die Wärme, die frei wird, wenn im Stoffwechsel von Nitrosomonas 25.5 mg NH_3 verarbeitet wird.

Wir haben also zu untersuchen, ob dies mit der theoretisch zu erwartenden Menge übereinstimmt. Nachstehendes ist ein Versuch dazu. Ein Versuch, weil es schwer ist, alle vor sich gehenden Prozesse zu übersehen und richtig einzuschätzen. Für die Atmung von Nitrosomonas können wir folgende Reaktion aufstellen:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{NH}_4\text{OH} & + & 2\text{O}_2 & \rightarrow & \text{HNO}_2 & + & 2\text{H}_2\text{O} & + & 77.87 \text{ Kal (I).} \\ 87.81 & & 0 & & 28.91 & & 2. & 68.38 \end{array}$$

Von den Produkten der damit zusammengehenden Synthese wissen wir wenig. Wir dürfen wohl annehmen, dass ihre Zusammensetzung nicht sehr viel von derjenigen der Thiorhodaceae

abweichen wird; GAFFRON (13) nimmt dafür eine Zusammensetzung $(C_4 H_6 O_2)_n$ an, womit auch van NIEL (42) einverstanden ist. Wir können für die Synthese dann eine Formel aufstellen:



3. 87.81 4. 96.96 95.01 3. 28.91 3. 63.38

Für den Bildungswert von $C_4H_6O_2$ ist hier der von Krotonsäure (Verbrennungswert 498 Kal) genommen.

Aus den Versuchen von Kapitel V ist bekannt, dass, wenn insgesamt 33.3 mg N (als NH_4OH) oxydiert wird, 1 mg C reduziert wird.

In Reaktion (II) wird dann $\frac{3 \times 14}{4 \times 12} = 0.875$ mg N verbraucht.

In Reaktion (I) also $33.3 - 0.875 = 32.425$ mg. Das Verhältnis zwischen den verbrauchten Mengen in (I) und (II) ist also $32.425 : 0.875$.

Im Versuch wurde insgesamt 21.0 mg N verbraucht, davon also in Reaktion (I)

$$\frac{32.425 \times 21.0}{33.3} = 20.499 \text{ mg.}$$

Nach der Formel wird daraus frei

$$\frac{20.449 \times 77.87}{14} = 113.74 \text{ kal.}$$

In Reaktion (II) wird $21.0 - 20.449 = 0.551$ mg N verbraucht. Dabei wird nach der Formel aufgenommen:

$$\frac{0.551 \times 264.33}{3 \times 14} = 3.47 \text{ kal.}$$

Theoretisch muss also bei der Verarbeitung von 21 mg Ammoniak N durch Nitrosomonas frei werden:

$$113.74 - 3.47 = 110.27 \text{ kal.}$$

Obgleich die Übereinstimmung mit der gemessenen Wärme (105.64 kal) nicht besonders gut ist, kann man dennoch wohl annehmen, dass die theoretische Betrachtung nicht viel von der Wirklichkeit abweichen wird, aber also auch dass die Ammoniakoxydation tatsächlich hier der einzige energieliefernde Prozess ist.

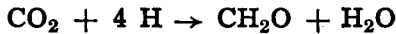
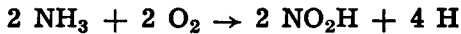
KAPITEL VII.

Schlussbetrachtungen.

HUEPPE (23) nannte die Nitrifikation eine Chlorophyllwirkung ohne Chlorophyll. Das bei der Synthese frei werdende O_2 würde das NH_3 zu Nitrit oxydieren; es würden Kohlenhydrate gebildet werden.

WINOGRADSKY (56) zweifelte dies an, es war von einem Freiwerden von O_2 keine Rede, das aufgenommene O_2 stimmte ungefähr mit der oxydierten Ammoniakmenge überein. Er stellte sich vor, dass aus CO_2 und NH_3 ein Amid z.B. Harnstoff gebildet würde. Dieser Harnstoff sollte dann durch die Bakterien weiter verarbeitet werden, wie bei Heterotrophen, die von Harnstoff leben.

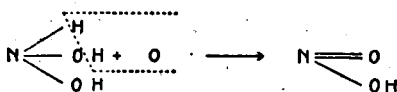
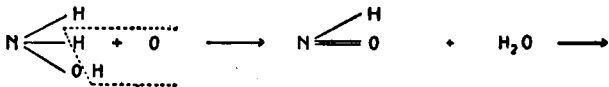
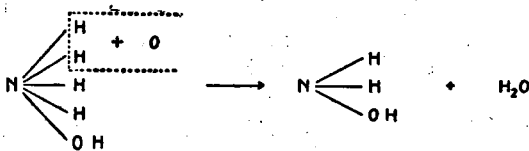
LOEW (32) lehnt die Meinung seiner Vorgänger ab und gibt die modern anmutenden Formeln:



Der Wasserstoff eines Teiles des verbrauchten NH_3 sollte zur Bildung von Formaldehyd aus CO_2 dienen. Das Formaldehyd sollte nicht zu Kohlenhydrat kondensiert, sondern in einer Eiweissynthese aufgenommen werden.

Über den Mechanismus der Ammoniakoxydation ist wenig mit Sicherheit bekannt. BONAZZI (6) weiss aus der Literatur, dass H_2O_2 in vitro NH_3 zu NO_2 oxydieren kann und findet, dass Nitrosomonaszellen Katalase-aktiv sind. Ohne Eisen wachsen die Bakterien nicht. Er nimmt deshalb eine Eisenverbindung an, die als Peroxyd dient. GOPALA und PANDALAI (17) finden aber, dass die Oxydation in vitro von NH_3 und H_2O_2 auch ohne Anwesenheit von Eisen gut verläuft.

KLUYVER und DONKER (28) nehmen als Zwischenprodukte der Nitritation Hydroxylamin und untersalpetrige Säure an und fassen die Oxydation als eine Dehydrogenation auf, nach den Formeln:



CORBET (8) versuchte, diese Theorie zu beweisen. Er findet tatsächlich in seinen Rohkulturen Hydroxylamin. In seiner Besprechung dieser Veröffentlichung sagt KLUYVER (27), dass wie interessant dieser Fund auch ist, dies dennoch nicht viel besagt, da mit Rohkulturen gearbeitet wurde.

RAO und PANDALAI verhalten sich ablehnend zur Theorie BONAZZIS, weil H_2O_2 sowohl NH_3 zu NO_2 wie zu NO_3 oxydiert, auch ohne Hinzufügung von Eisen. Produkte wie Hydroxylamin und untersalpetrige Säure können sie ebensowenig nachweisen wie einen Verbrauch hinzugefügten Hydroxylamins.

Dennoch nehmen sie, nachdem sie finden, dass HCN die Nitritation hemmt, an, dass hier ein katalytischer Prozess vorliegt, wobei das Enzym Eisen enthalten wird.

Aus der Konstatierung, dass Hinzufügen von Ferrosälen die Hemmung durch HCN nicht aufhebt, ergäbe sich, dass vorzugsweise das innere Eisen angegriffen würde.

An sich ist dies wohl möglich, ihre Versuche beweisen es aber nicht, da natürlich komplexe Zyanverbindungen gebildet werden, von denen sie selbst nachweisen, dass sie auch besonders stark hemmend wirken.

Übrigens macht die Mitteilung; dass sie mit „very pure cultures“ arbeiteten, wohl Verunreinigung mit Heterotrophen wahrscheinlich.

Bei allen Untersuchungen nach Zwischenprodukten, wie diese durch die Formeln von KLUYVER und DONKER angegeben werden, hat man sich indessen wohl bewusst zu sein, dass die Tatsache, dass es nicht gelingt, die erwarteten Produkte zu isolieren, oder deren Verbrauch nachzuweisen, die Theorie nicht ausschliesst.

Man muss dann annehmen, dass die Zwischenprodukte nur kurz existieren und also in sehr niedriger Konzentration anwesend sind. Dadurch kann das Abfangen unmöglich werden; einen Verbrauch sieht man nicht, weil jede beigefügte Konzentration zu hoch und dadurch schädlich sein kann.

Der Stoffwechsel von *Nitrosomonas* kann nun so aufgefasst werden, dass die Energie der Ammoniakoxydation verbraucht wird, um mit Hilfe des Wasserstoffs von Ammoniak das CO_2 zu reduzieren.

Die entstandenen Produkte können dann eine empirische Zusammensetzung haben, die etwa der Formel $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ entspricht (Siehe Kapitel VI, § 3).

Die Ammoniakoxydation stellt die Atmung von *Nitrosomonas* dar. Die Oxydation kann dann wie in der von KLUYVER und DONKER angegebenen Weise vor sich gehen. Das Ferment könnte

Eisen enthalten. Das in dem Verhältnis zwischen der Menge Stickstoff, welche die oxidierte Ammoniakmenge enthielt und dem in der gebildeten Menge Zellenmaterial festgelegten Kohlenstoff ausgedrückte Stoffwechselrendement wird in älteren Kulturen d.h. zugleich Kulturen mit einem höheren Nitritgehalt, ungünstiger. Dies lässt sich wenigstens zum Teil erklären, wenn man annimmt, dass bei einer höheren Nitritkonzentration, die Erhaltungsenergie des schon gebildeten Materials grösser wird. Ein grösserer Teil der verfügbaren Energie muss also dazu angewendet werden.

ROELOFSEN (47) fand, dass auch die autotroph ernährten Thiorhodaceae einen organischen Reservestoff bildeten, der in Dunkelperioden unter Bildung von CO_2 und Säuren verbraucht wird.

Von vornherein ist bei *Nitrosomonas* die Bildung eines solchen Stoffes und ein Verbrauch nach der Veratmung des verfügbaren Ammoniaks nicht unwahrscheinlich. In einer ammoniakfreien Kultur wurde jedoch in keinem einzigen Falle ein Sauerstoffverbrauch oder eine Kohlensäureproduktion konstatiert. Die Existenz eines Reservestoffes zeigt sich also aus den Versuchen nicht. Die organischen Stoffe, insoweit sie untersucht sind, sind in Bezug auf ihren Effekt auf der Nitrifikation in drei Gruppen zu verteilen.

Gruppe 1 enthält die meisten bis jetzt untersuchten Stoffe, Gruppe 2 Nährstoff-Heyden und Bodenextrakte, Gruppe 3 die fettsauren Salze.

Was die Stoffe der 1. Gruppe betrifft, so zeigt sich, dass ihr hemmender Einfluss immer mit einer Hemmung der Atmung zusammengeht; dies kann auf einer Verdrängung des anorganischen Atmungssubstrates durch die betreffenden organischen Stoffe beruhen (KINGMA BOLTJES, 25).

Die günstige Wirkung der Stoffe von Gruppe 2 Nährstoff-Heyden und auch Bodenextrakte (Kapitel III), bei Kulturen auf Agar-boden, liesse sich nach KINGMA BOLTJES möglicherweise wie folgt erklären: Der Aufbau des Zellenmaterials verläuft vom Kohlendioxyd ab selbstverständlich über mancherlei einfache Zwischenprodukte. Einige dieser Zwischenprodukte könnten Bestandteilen, von Nährstoff-Heyden (Bodenextrakt) entsprechen. Die Bestandteile könnten dann in den Stoffwechsel aufgenommen werden. Dafür spricht ausserdem die Tatsache, dass Beifügung von Nährstoff-Heyden bei einer Kultur die darin herrschende Oxydations-Reduktions Potential beeinflusst und die Stoffe also unter Einfluss der Bakterien chemische Änderungen erleiden. In einer unbeimpften Kulturflüssigkeit tritt diese Änderung nicht

auf. Aus diesem Grunde achtet KINGMA BOLTJES es nicht ausgeschlossen, dass die nitrifizierenden Bakterien als chemomixotroph betrachtet werden müssen.

Die Stoffe von Gruppe 3, die fettsauren Salze haben in bestimmten niedrigen Konzentrationen (für Natriumazetat 0.05 n) die Eigenschaft, dass sie, wenn sie einer Kultur beigelegt werden, deren Atmung $\pm 10\%$ hemmen. Dennoch schwindet aus einer Kultur, in der diese Stoffe von Anfang an, anwesend sind, das Ammoniak schneller.

Das N/C Verhältnis einer solchen Kultur fällt günstiger aus. Man muss also eine Förderung der Vermehrung der Bakterien annehmen. Die Vermehrung der Anzahl der Zellen ist so stark, dass die für jede gesonderte Zelle auftretende Atmungshemmung nicht nur gut gemacht wird, sondern sogar noch eine Beschleunigung des Ammoniakverbrauchs die Folge ist.

Zunächst denkt man dann natürlich an eine Erklärung wie bei Gruppe 2. Wäre dies aber der Fall, so würden die Fettsäuren wohl einen sehr merkwürdigen Ausnahmefall bilden, wenn man bedenkt, dass andere einfache organische Stoffe wie Glukose, Glyzerin, Harnstoff und dergleichen in derselben Konzentration die Nitrifikation schon sehr stark hemmen.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist zu finden, wenn wir folgendes erwägen.

Die Thiorhodaceae können ausser reduzierten S-Verbindungen nach MULLER (39) auch organische Stoffe wie Wasserstoffdonatoren zu ihrer Synthese verwenden.

Aus GAFFRONS Versuchen erfolgt, dass auch die Athiorhodaceae dies tun (VAN NIEL, 42). Nun sind dies photosynthetisierende Bakterien.

Vor kurzem wies BARKER (4) nach, dass die methanbildenden Bakterien die verfügbaren organischen Stoffe als Wasserstoffdonatoren verwenden bei der Bildung von Methan aus Kohlensäure.

Man könnte sich nun also denken, dass die Fettsäuren auch für Nitrosomonas einen geeigneten Wasserstoffdonator darstellen in der Chemosynthese.

Es ist dann zu bemerken, dass dies nur für Kulturen gilt, die über genügend Ammoniak verfügen und bei ziemlich niedrigen Konzentrationen des fettsauren Salzes (z.B. für Natriumazetat 0.05 n).

Ob tatsächlich eine Dehydrogenierung der Fettsäuren stattfindet, soll auf Grund weiterer Versuche, wobei das entstandene Zellmaterial und die verschwundene Fettsäure vergleichend bestimmt werden, entschieden werden.

ZUSAMMENFASSUNG.

Kapitel II. Mit Hilfe von Reinkulturen wurde eine Untersuchung angestellt über den Stoffwechsel von *Nitrosomonas europaea* WINOGRADSKY. Als Kulturmedien wurden die minerale Nährlösung nach WINOGRADSKY und Nährstoff-Heyden-agar nach KINGMA BOLTJES verwendet.

Kapitel III. Es stellte sich heraus, dass Bodenextrakte, besonders humusreiche Gartenerde ebenso wie Nährstoff-Heyden, die Entwicklung auf Agarnährboden förderten.

Kapitel IV. Bei *Nitrosomonas* wurden keine anderen sauerstoffverbrauchenden Prozesse gefunden als die Oxydation von Ammoniak zu Nitrit.

Kapitel V. Das Gewichtsverhältnis zwischen dem Stickstoff, der die oxydierte Menge Ammoniak enthielt, und dem in den gebildeten Bakterien festgelegten Kohlenstoff wurde bestimmt als 33.3 : 1.

Dieses N/C Verhältnis war ungünstiger in alten, also mehr Nitrit enthaltenden Kulturen (Tabelle 8).

Hinzufügung einer niedrigen Konzentration (0.05 n) Natriumazetat und Herabsetzung der Sauerstoffspannung machten dieses Verhältnis günstiger (Tabelle 11).

Kapitel VI. Ein Kalorimeterversuch, bei dem die beim Stoffwechsel frei werdende Wärme gemessen wurde, zeigte, dass neben der Ammoniakoxydation keine bedeutenden energieliefernden Prozesse auftreten können.

Diese Untersuchung wurde ausgeführt im Laboratorium für Pflanzenphysiologie der Reichs-Universität Groningen.

Dem Direktor dieses Instituts, Herrn Prof. Dr. W. H. ARISZ, bin ich für seine Hilfe und Leitung grossen Dank schuldig.

Neben ihm bin ich Herrn Prof. Dr. A. J. KLUYVER in Delft, Herrn Prof. Dr. C. B. VAN NIEL in Carmel (Kalifornien) und Herrn Dr. T. Y. KINGMA BOLTJES in Amsterdam dankbar für die Art und Weise, wie sie mir mit Rat und Tat beistanden.

Groningen, April 1937.

LITERATUR.

1. ALGERA, L., An automatic micro-compensation calorimeter. Proc. Kon. Akad. v. Wet. Amsterdam, 34, 1931.
2. ——— Energiemessungen bei *Aspergillus niger* mit Hilfe eines automatischen Mikro-Kompensations-Kalorimeter. Rec. d. trav. bot. Néerl., 29, 1932.
3. BARKER, H. ALBERT, The oxidative metabolism of the colorless alga, *Prototheca zopfii*. Journ. Cell. and Comp. Physiol, 7, 1935.
4. ——— On the biochemistry of the methane fermentation Arch. f. Mikrobiologie, 7, 1936.
5. BONAZZI, A., On nitrification IV. The Carbon and Nitrogen Relations of the Nitrite Ferment. Journ. of Bact. 6, 1921.
6. ——— On nitrification V. The mechanism of ammonia oxidation. Journ. of Bact. 8, 1923.
7. COLEMAN, LESLIE C., Untersuchungen über Nitrifikation. Zeitschr. f. Bakt. Abt. II, Bd. 20, 1908.
8. CORBET, A. S., The formation of hyponitrous acid as an intermediate compound in the biological or photochemical oxidation of ammonia to nitrous acid. II Microbiological oxidation. Biochem. Journ. 6, 1935.
9. HORST, ENGEL, Die Kohlenstoffassimilation des Nitritbildners. Planta 8, 1929.
10. ——— Weitere Untersuchungen über Nitritbakterien. Planta 12, 1931.
11. FRED, E. B. and AUDREY DAVENPORT, The effect of organic nitrogenous compounds on the nitrate-forming bacteria. Soil Science 11, 1921.
12. FÖYN, B., Lebenszyklus der Chlorophyceae *Cladophora Suhriana* Kütz. Arch. Protistenkunde 83, 1934.
13. GAFFRON, H., Über den Stoffwechsel der schwefelfreien Purpurbakterien. Biochem. Zeitschr. 260, 1933.
14. GIESBERGER, G., Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Spirillum* Ehb. Diss. Utrecht, 1936.
15. GODLEWSKY, E., Sur la Nitrification. Anz. d. Akad. d. Wissens. in Krakau, 1895.
16. ——— Über die Nitrifikation des Ammoniaks und die Kohlenstoffquellen bei der Ernährung nitrifizierender Fermente. Zentrbl. f. Bakt. Abt. II 2, 1896.
17. GOPALA, RAO G. and K. M. PANDALAI, On the biological oxidation of ammonia by nitrification. Arch. f. Mikrobiol. 7, 1936.
18. HAMMERLING, J., Entwicklungs- und Formbildungvermögen von *Acetabularia mediterranea*. Biol. Zentrbl. 51, 1931.
19. HARTMANN, M., Untersuchungen über die Sexualität von *Ectocarpus siliculosus*. Arch. Protistenkunde 83, 1934.
20. HECK, A. FLOYD, A method for determination of Total Carbon and also for the Estimation of Carbondioxyde evolved from Soils. Soil Science. 28, 1929.
21. HENZE, M., Untersuchung an Seetieren. Abderhalden, E., Handb. der biochem. Arbeitsmeth. III-2, Berlin 1910.
22. HEUBÜLT, J., Untersuchungen über Nitritbakterien. Planta 8, 1929.
23. HUEPE, F., Die hygienische Beurtheilung des Trinkwassers vom biologischen Standpunkte. Schilling's Journ. f. Gasbel. u. Wasserversorgung, 1887.
24. KLEIN, G. u. T. SVOLBA, Zwischenprodukte bei Assimilation und Atmung. Zeitschr. f. Bot. 19, 1926.

25. KINGMA BOLTJES, T. Y., Onderzoekingen over nitrificeerende bacterien. Diss. Delft, 1934.
26. ——— Untersuchungen über die nitrifizierenden Bakterien. Arch. f. Mikrobiol. 6, 1935.
27. KLUYVER, A. J., Bacterial Metabolism. Annual Rev. of Bioch. V, 1936.
28. ——— und H. J. L. DONKER, Die Einheit in der Biochemie. Chemie der Zelle und Gewebe 13, 1926.
29. KNIGHT, B. C. J. G., Bacterial Nutrition. London 1936.
30. KÖNING, J., Die Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. Praktisches Handbuch, Berlin 1911.
31. LANDOLT und BÖRNSTEIN, Physikalisch-Chemische Tabellen. Berlin 1923.
32. LOEW, O., Über die Ernährungsweise des Nitrifizierenden Spaltpilzes Nitrosomonas. Bot. Centrbl. 46, 1891.
33. LWOFF, A. et E. LEDERER, Remarques sur „l'extrait de terre" envisagé comme facteur de croissance pour les flagellés. Compt. rend. Soc. de Biol. 119, 1935.
34. MAKRIKOFF, J., Magnesia-Gipsplatten und Magnesia-Platten mit organischer Substanz als sehr geeignetes festes Substrat für die Kultur der Nitrifikationsorganismen. Zentrbl. f. Bakt. Abt. II, 24, 1909.
35. MEYERHOF, OTTO, Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. I Die Atmung des Nitratbildners. Pflügers Archiv 164, 1916.
36. ——— Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. II Beeinflussung der Atmung des Nitratbildners durch chemische Substanzen. Pflügers Archiv 165, 1916.
37. ——— Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. III Die Atmung des Nitritbildners und ihre Beeinflussung durch chemische Substanzen. Pflügers Archiv 166, 1917.
38. ——— und DEAN BURK, Über die Fixation des Luftstickstoffs durch Azotobacter. Zeitschr. f. Physik. Chemie 139, 1928.
39. MÜLLER, F. M., On the metabolism of the purple sulphur bacteria in organic media. Diss. Utrecht 1933.
40. MURRAY, T. J., Food accessory substances and the nitrite bacteria. Proc. of the Soc. for Experim. Biology and Medicine 20, 1923.
41. NELSON, D. H., Isolation and characterization of Nitrosomonas and Nitrobacter. Zentrbl. f. Bakteriologie Abt. II 83, 1931.
42. NIEL, C. B. VAN, On the metabolism of the Thiorhodaceae. Arch. f. Mikrobiologie 7, 1936.
43. NIEUWENBURG, C. J. en G. P. DE GROOT, De bepaling van nitraatstikstof door reductie tot ammoniak. Chemisch Weekbl. 24, 1927.
44. OMELIANSKY, V., Über die Isolierung der Nitrifikationsmikroben aus der Erdboden. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, 5, 1899.
45. PRINGSHEIM, E. G., Das Rätsel der Erdbakchung. B. B. C. Abt. A, 55, 1936.
46. RABEN, E., Ist organisch gebundener Kohlenstoff in nennenswerter Menge in Meereswasser vorhanden? Wissenschaftl. Meeresunters. Abt. Kiel, N. F. 11, 1909.
47. ROELOFSEN, P. A., On photosynthesis of the Thiorhodaceae. Diss. Utrecht 1935.
48. SCHLOESSING et MÜNTZ, Sur la nitrification par les ferments organisés. Compt. Rend. de l'Acad. d. Sc. Paris 84, 1877.

49. — et — Recherches sur la nitrification par les ferments organisé. Compt. Rend. de l'Acad. d. Sc. Paris 86, 1878.
50. — et — Recherches sur la nitrification. Compt. Rend. de l'Acad. d. Sc. Paris 89, 1879.
51. STEPHENSON, M., Bacterial Metabolism. London etc. 1930.
52. STEVENS, F. L. and W. A. WITHERS, Studies in Soil Bacteriology IV. The Inhibition of Nitrification by Organic Matter, compared in Soils and in Solutions. Zentr.bl. f. Bakt. Abt. II 27, 1910.
53. TIEMANN F. und A. GÄRTNER, Die chemische und mikroskopisch-bakteriologische Untersuchung des Wassers. Braunschweig 1889.
54. TREADWELL, F. P., Lehrbuch der Analytischen Chemie. Leipzig etc. 1930.
55. WASSINK, E. C., Begrenzende Bedingungen bei der Atmung von Phycomyces. Rec. d. trav. bot. Néerl. 31, 1934.
56. WINOGRADSKY, S., Recherches sur les organismes de la nitrification. Ann. de l'Institut Pasteur, 4, 1890.
57. — Recherches sur les organismes de la nitrification. Ann. de l'Institut Pasteur, 5, 1891.
58. — und W. OMELIANSKY, Über den Einfluss der organischen Substanzen an die Arbeit der nitrifizierenden Mikroben. Zentrbl. f. Bakt. Abt. II 5, 1899.
59. — et H. WINOGRADSKY, Etudes sur la microbiologie du Sol. VII Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification. Ann. de l'Institut Pasteur. 50. 1933.