

#### 419. Rudolf Scholder und Carl Friedrich Linström: Über die Oxydation von Oxalaten durch Bakterien.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Erlangen.]

(Eingegangen am 16. September 1930.)

Die photochemische Oxydation der Oxalsäure in wäßriger Lösung zu Kohlensäure durch den Sauerstoff der Luft wurde schon mehrfach eingehend untersucht<sup>1)</sup>. Es ist auch bekannt, daß die Oxalsäure durch Schimmelpilze, besonders im Dunkeln und nur in verd. Lösung, zerstört wird<sup>2)</sup>. Dagegen ergaben neuere Versuche<sup>3)</sup>, daß Bakterien auf einem Nährboden, der Oxalsäure als einzige Kohlenstoff-Quelle enthielt, nicht oder nur sehr spärlich gediehen. Nur der von K. Bassalik<sup>4)</sup> in den Exkrementen des Regenwurms entdeckte *Bacillus extorquens* ist — als einziger von 90 untersuchten Pilz- und Bakterien-Arten — befähigt, den Kohlenstoff von Oxalaten in einer Nährlösung zu verarbeiten. Nach Bassalik findet dabei unter Mitwirkung des Luft-Sauerstoffs eine oxydative Spaltung der Oxalsäure statt durch ein von dem *Bacillus* ausgeschiedenes Enzym<sup>5)</sup>. Alkalioxalate und ebenso die schwerlöslichen Oxalate der Erdalkalien werden dabei in Carbonate umgewandelt. Ein kleinerer Teil des Kohlenstoffs der Oxalsäure findet außerdem zum Aufbau der Leibessubstanz des Bakteriums Verwendung. Bei den Versuchen von Bassalik waren stets Nährstoffe in Form von gebundenem N, P, Mg und Fe anwesend. Über die bakterielle Zersetzung von Oxalaten in reinem destilliertem Wasser fanden wir keine Angaben.

##### A. Versuche mit Alkalioxalat-Lösungen.

Es wurde beobachtet, daß der Titer einer  $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat-Lösung, die in einer braunen Flasche aufbewahrt wurde, im Verlauf weniger Wochen stark abnahm. Diese Beobachtung deckt sich übrigens, wie wir nachträglich fanden, mit einer kurzen Angabe von E. S. Hopkins<sup>6)</sup>, der ebenfalls diese Titer-Abnahme bei  $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat-Lösung feststellte, ohne jedoch dafür eine Erklärung zu geben.

In Tabelle I ist eine Versuchsreihe wiedergegeben, die die Titer-Abnahme von sieben  $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat-Lösungen in bestimmten Zeitabständen zeigt. Die Zahlen geben den Verbrauch an  $\frac{1}{100}$ -n. Permanganat für 25 ccm der Natriumoxalat-Lösung an. Die Permanganat-Lösung wurde jedesmal vorher gegen frisch bereitete  $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat-Lösung eingestellt.

Für die Lösungen 1—3 wurde eine braune Flasche, für Lösung 4 eine blaue, für Lösung 5 eine grüne Flasche verwendet. Alle diese Flaschen wurden während der Versuchszeit im Dunkeln aufbewahrt. Lösung 6 befand sich in einer gewöhnlichen farblosen Flasche, Lösung 7 in einer völlig paraffinierten Flasche, beide im diffusen Tageslicht.

<sup>1)</sup> vergl. Literatur-Zusammenstellung in Beilstein, Handbuch d. Organ. Chemie 4. Aufl., II. Bd., S. 507 [1920].

<sup>2)</sup> C. Neubauer, Ztschr. analyt. Chem. **9**, 392 [1870]; C. Wehmer, Ber. Dtsch. Botan. Ges. **9**, 218 [1891].

<sup>3)</sup> H. Braun u. C. E. Cahn-Bronner, Biochem. Ztschr. **131**, 243 [1922]; H. Braun, A. Stamatelakis, S. Kondo, Biochem. Ztschr. **145**, 389 [1924].

<sup>4)</sup> Jahrbuch wissenschaftl. Botanik **53**, 235 [1923].

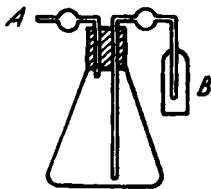
<sup>5)</sup> Über eine enzymatische Spaltung der Oxalsäure durch eine Oxydase vergl. W. Zaleski u. A. Reinhard, Biochem. Ztschr. **33**, 449 [1911]; M. Staehelin, Biochem. Ztschr. **96**, 1 [1919]; A. Bau, C. **1920**, IV 162.

<sup>6)</sup> Ind. engin. Chem. **15**, 149 [1923].

Tabelle I.

Nach Tagen:	1	2	3	4	5	6	7
0	26.35	25.00	25.00	25.50	25.50	26.02	25.50
2	—	—	—	—	—	—	25.46
3	25.32	—	—	—	—	25.70	—
4	—	—	—	—	24.92	—	—
5	16.10	—	—	24.90	—	24.78	—
6	14.00	—	—	—	—	—	—
7	10.56	—	—	—	—	—	—
8	10.30	—	—	—	—	—	—
9	8.41	—	—	—	—	—	—
10	6.50	—	—	—	—	—	—
11	5.50	—	—	—	—	23.12	24.00
12	3.50	—	—	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—	21.45	14.30
24	—	24.91	25.00	—	—	—	—
29	—	—	—	22.13	23.90	—	—
36	—	—	—	—	—	20.42	—
67	—	21.76	12.48	—	—	—	—
92	—	18.00	2.40	—	—	—	—

Die Versuche zeigen, daß der Titer sämtlicher Lösungen im Laufe der Zeit abnimmt, allerdings auch unter scheinbar gleichen Verhältnissen sehr unterschiedlich (Lösung 1–3). Bei Lösung 3 war nach 24 Tagen noch keine Änderung eingetreten, in den folgenden 68 Tagen verschwindet dagegen das Natriumoxalat fast ganz. Die Titer-Änderung ist unabhängig vom Gefäßmaterial und vom Licht und ist daher weder durch photochemische Zersetzung noch durch Schwermetall-Katalyse verursacht. Nunmehr wurde 1 l  $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat-Lösung in dem nebenstehend gezeichneten  $\frac{1}{2}$ -l-Kolben sterilisiert.



Kugel A und Glasteil B werden mit Wattestopfen gefüllt. Nach der Sterilisation wird der vorher lose Gummistopfen fest hineingedrückt. Zur sterilen Entnahme der Lösung wird bei A mit einem Gummiball durch die Watte filtrierte Luft hineingedrückt, so daß bei B nach Entfernung des Wattestopfens Lösung ausfließt. Darauf wird B sofort wieder mit Watte verschlossen. Anfangstiter der 2 Stdn. im Dampftopf sterilisierten Lösung: 25.70 ccm; Titer nach 30 Tagen 25.45 ccm, nach 60 Tagen 25.50. Die Lösung hatte also ihren Titer innerhalb der Versuchsfehler nicht geändert.

Damit ist erwiesen, daß der Zerfall des Natriumoxalats in der nicht sterilisierten Lösung im diffusen Licht und im Dunkeln lediglich der Wirkung von Mikro-organismen zuzuschreiben ist, die aus der Luft in diese Lösung gelangen.

#### Bakteriologische Untersuchung<sup>7)</sup>.

Je 1 ccm vom Bodensatz einer weitgehend zerfallenen Lösung wurde auf Leberbrühe und auf Agar übertragen. Nach 24-stdg. Aufenthalt im Brutschrank zeigte sich in der Brühe eine stark diffuse Trübung, während

<sup>7)</sup> Die bakteriologische Untersuchung wurde im Hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen mit gütiger Unterstützung von Hrn. Geh.-Rat Prof. Dr. Heim durchgeführt, dem wir auch an dieser Stelle dafür herzlich danken.

auf der Agarplatte lediglich eine geringe Menge von Sarcinen gewachsen waren, die nicht weiter untersucht wurden. Ein Tropfen der Leberbrühe wurde auf Agar geimpft, auf dem sich am anderen Tage ein üppiges Wachstum zeigte. Die Bakterien wuchsen in federigen leichten Kolonien. Ein gefärbtes Präparat zeigte grampositive, ziemlich lange Stäbchen, die wahrscheinlich Sporenbildner sind.

Von der Agarplatte wurde eine 2-mm-Öse in Fleischbrühe übertragen. Von dieser Brühe wurden sofort zwei Verdünnungen in Gelatine angelegt, die erste mit 2 Tropfen Fleischbrühe, die zweite mit 4 Tropfen der verflüssigten Gelatine. Nach 30 Stdn. war die Fleischbrühe kräftig getrübt, und die erste Gelatine-Platte war fast vollkommen verflüssigt. Auf der zweiten Gelatine-Verdünnung war ebenfalls eine Kolonie gewachsen, die auf die Gelatine auch verflüssigend wirkte. Von dieser Kolonie wurde etwas auf Schräg-Agar abgeimpft und als Reinkultur behandelt.

Nun war festzustellen, ob die auf diesem Wege gewonnene Kultur in Natriumoxalat-Lösung wachsen konnte, vor allem, ob sie imstande war, das Natriumoxalat zu zerstören. Tatsächlich zeigten mehrere sterile  $1/10$ - und  $1/100$ -n. Natriumoxalat-Lösungen, die mit Reinkultur geimpft waren, am anderen Tage nach 24-stdg. Stehen im Brutschrank eine mehr oder weniger kräftige Trübung. Dagegen überraschte der zweite Versuch. 11  $1/100$ -n. steriler Natriumoxalat-Lösung wurde mit einer jungen, frischen Reinkultur aus Fleischbrühe geimpft und 24 Stdn. in den Brutschrank gestellt. Sogar nach 3 Monaten hatte der Titer dieser Lösung nicht abgenommen. Anders verhielten sich in mehreren Parallelversuchen verschiedene  $1/100$ -n. sterile Natriumoxalat-Lösungen, die mit 2–3 ccm einer zerfallenen Lösung mit einer sterilen Pipette steril beimpft waren. Diese so geimpften Lösungen, die also nur die Keime einer zerfallenden Lösung enthalten konnten, zeigten eine Titer-Abnahme, wie es nach den früheren Versuchen auch zu erwarten war.

Aus der Gegenüberstellung dieser Ergebnisse muß also der Schluß gezogen werden, daß die Reinkultur nicht die Bakterien enthält, die den Oxalat-Zerfall bedingen. Weitere Untersuchungen nach der bakteriologischen Seite wurden nicht durchgeführt, da sie im Rahmen dieser Arbeit zu weit geführt hätten.

Tabelle II bringt vergleichende Versuche mit sterilisierten Lösungen (Kolben wie oben beschrieben), von denen je eine mit 3 ccm einer fast ganz zerfallenen  $1/100$ -n. Natriumoxalat-Lösung (Anfangswert: 25.0 ccm, Endwert: 1.72 ccm) geimpft worden war.

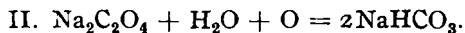
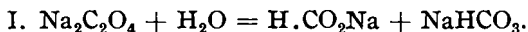
Tabelle II.

Nr.	Substanz	Verbrauch an ccm $1/100$ -n. Permanganat für 25 ccm Lösung.					
		Geimpft			Nicht geimpft		
		0	30	61 Tage	0	30	61 Tage
1	$1/10$ -n. $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ . . . . .	25.0	24.2	23.8	25.0	25.1	25.1
2	$1/30$ -n. „ . . . . .	25.3	24.1	23.6	25.3	25.2	25.3
3	$1/100$ -n. „ . . . . .	27.8	22.6	21.4	25.7	25.5	25.5
4	$1/100$ -n. „ . . . . .	27.8	21.7	19.6	—	—	—
5	$1/100$ -n. „ mit						
	Alkali . . . . .	25.3	25.0	25.1	—	—	—
6	$1/100$ -n. $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ mit						
	$\text{HgCl}_2$ . . . . .	25.5	25.4	25.4	—	—	—
7	$1/10$ -n. $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ . . . . .	25.2	25.2	25.2	25.3	25.2	25.3
8	$1/100$ -n. „ . . . . .	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4

Der Titer der nicht geimpften Lösungen blieb völlig konstant. Versuch Nr. 7 und Nr. 5 ergeben eindeutige  $p_H$ -Abhängigkeit der Bakterien, die offenbar nur in nahezu neutraler Lösung wirken können (Nr. 5 war an  $\text{NaOH } \frac{1}{100}\text{-n.}$ ). Ebenso hemmt  $\text{HgCl}_2$  schon in geringer Menge (Nr. 6: 10 mg/l) die bakterielle Tätigkeit. Versuche mit  $\frac{1}{100}\text{-n.}$  Kalium- und Ammoniumoxalat lieferten dasselbe Ergebnis wie die Versuche mit Natriumoxalat.

#### Reaktionsverlauf.

Es kamen 2 Gleichungen in Frage:



Die Versuche wurden mit mehreren Litern einer weitgehend zerfallenen Oxalat-Lösung angestellt. Es konnte die völlige Abwesenheit von Formiat nachgewiesen werden. Dagegen war Carbonat reichlich vorhanden, und zwar, wie das Verhalten gegen Phenol-phthalein und gegen Calciumsulfat-Lösung bewies, als Bicarbonat. Die Prüfung, ob eventuell bei der bakteriellen Umsetzung  $\text{CO}$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht, verlief negativ.

Daß die Umsetzung quantitativ nach Gleichung II verläuft, geht aus den folgenden Titrationen hervor:

Verbrauch für 25 ccm  $\frac{1}{100}\text{-n. Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -Lösung

vor dem Zerfall:	25.40 ccm $\frac{1}{100}\text{ n. KMnO}_4$
nach „ „	18.64 „ „ „
„ „ „	6.70 „ „ „ HCl

(Anfangs-Titer: 25.40 ccm, End-Titer  $\text{HCl} + \text{KMnO}_4$ : 25.34 ccm). Ein Parallelversuch bestätigte das Ergebnis.

Drei Versuche unter Sauerstoff, Stickstoff und Kohlensäure bewiesen, daß die Anwesenheit von Sauerstoff für die bakterielle Umsetzung notwendig ist. Die Lösungen waren sterilisiert und dann geimpft.

	Nach 0	70 Tagen
Unter Sauerstoff . . . . .	25.00	23.60
„ Stickstoff . . . . .	25.00	25.00
„ Kohlensäure . . . .	25.06	25.10

Damit ist im Sinne von Gleichung II bewiesen, daß für die bakterielle Umsetzung die Anwesenheit von Sauerstoff unerläßlich ist. Die Titer-Abnahme der Lösung unter Sauerstoff ist allerdings wesentlich geringer als bei einer Lösung, die unter Luft stand. (vergl. Tabelle I).

Titer-Konstanz einer  $\frac{1}{100}\text{-n.}$  Natriumoxalat-Lösung.

Nach E. S. Hopkins (l. c.) ändert sich der Titer einer  $\frac{1}{100}\text{-n. Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -Lösung bei Zugabe von 100 ccm Schwefelsäure (1:4) zu 1 l innerhalb von 2 Monaten nicht. Zur Prüfung dieser Angabe wurden die in Tabelle III wiedergegebenen Versuche angesetzt.

Tabelle III.

Vers. Nr.	1 l $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat nach	0	30	72 Tagen
1	im Dunkeln ohne Schwefelsäure, nicht sterilisiert	a) 25.0	24.1	21.0
		b) 25.0	24.6	22.2
2	im Dunkeln mit Schwefelsäure (100 ccm, 1:4) ..	a) 25.0	25.1	25.1
		b) 25.0	25.1	25.1
3	im diffusen Tageslicht mit Schwefelsäure.....	a) 25.0	24.85	24.1
		b) 25.0	25.05	24.5
4	im direkten Licht am Fenster mit Schwefelsäure	a) 25.0	14.4	3.3
		b) 25.0	12.8	1.9
5	wie 4, vorher sterilisiert .....	a) 26.5	3.5	0.4
		b) 26.9	4.1	0.3

Versuch 2 ergibt die Richtigkeit der Hopkinschen Angabe bei Aufbewahrung im Dunkeln. Versuch 3 und 4 dagegen zeigen eine von der Stärke der Belichtung abhängige Titer-Abnahme, die offenbar auf die photochemische Zersetzung der in der Lösung vorhandenen freien Oxalsäure zurückzuführen ist. Daß nicht Bakterien die Zersetzung bewirken, geht aus Versuch 5 hervor. Der Befund von Hopkins, dessen Lösungen in farblosen Flaschen im Laboratorium dem Tageslicht ausgesetzt waren, steht mit unsern Versuchen nicht in Widerspruch, da offenbar erst bei genügender Helligkeit und entsprechender Zeitdauer eine langsame photochemische Oxydation eintritt. Sterilisiert man daher durch Schwefelsäure-Zusatz nach Hopkins, so ist die Aufbewahrung der Lösungen im Dunkeln unbedingt ratsam.

Nach Versuch 8 von Tabelle II müßte ein viel geringerer Säure-Zusatz auch schon genügen. Versuche,  $\frac{1}{100}$ -n. Natriumoxalat-Lösung durch Zusatz von 2 ccm Quecksilber zu sterilisieren, schlugen fehl. Dagegen änderte sich der Titer einer mit  $\text{HgCl}_2$  versetzten (50 mg/l) und in einer braunen Flasche aufbewahrten Lösung innerhalb von 5 Monaten nicht (vergl. auch Tab. II, Vers. 6).

Abschließend ergibt sich, daß Alkalioxalate in starker Verdünnung ( $\frac{1}{100}$ -n.) in ziemlich kurzer Zeit durch den Luft-Sauerstoff unter Mitwirkung einer offenbar in der Luft reichlich vorhandenen Bakterienart in Bicarbonat übergeführt werden. Der *Bacillus extorquens* stirbt nach K. Bassalik außerhalb seiner Fundstellen rasch ab und dürfte daher mit dem hier vorliegenden Bakterium kaum identisch sein. Es erscheint wahrscheinlich, daß die bakterielle Einwirkung nicht in einer Veratmung des Kohlenstoffs zu Kohlensäure besteht, sondern rein enzymatischer Natur ist, daß also eine Oxydase die Überführung von Natriumoxalat in Natriumbicarbonat bewirkt. Die quantitativ bestätigte Beziehung  $\text{urspr. C}_2\text{O}_4 = \text{restl. C}_2\text{O}_4 + \text{CO}_2$  schließt die Verwendung des Oxalat-Kohlenstoffs zum Aufbau der Leibessubstanz der Bakterien aus, deren Menge zudem außerordentlich gering ist.

#### B. Versuche mit Aufschlammungen schwer löslicher Oxalate.

Es wurde beobachtet, daß in destilliertem Wasser aufgeschlammtes Bariumoxalat nach mehrmonatigem Lagern bei der Auflösung in Salzsäure beträchtliche Mengen Kohlensäure entwickelte. Nachstehend wird gezeigt, daß ganz allgemein die schwerlöslichen Oxalate zweiwertiger Metalle in wäßriger Aufschlammung, wenn auch sehr langsam, durch den

Luft-Sauerstoff unter Mitwirkung von Bakterien in die entsprechenden Carbonate übergeführt werden. Der Anteil des gebildeten Carbonats innerhalb der Versuchsdauer ist allerdings verhältnismäßig sehr gering.

Untersucht wurden die schwerlöslichen Oxalate von Ba, Sr, Ca, Zn, Cd, Hg, Pb, Mn, Co, Ni, Cu und Ag, und zwar in zwei Versuchsreihen. Die Oxalate wurden jeweils aus Ammoniumoxalat und den Sulfaten oder Chloriden der Metalle hergestellt. Das Ammoniumoxalat wurde zuvor auf Abwesenheit von Kohlensäure geprüft. Um möglichst vergleichbare Resultate zu bekommen, wurden die wäßrigen Aufschlämmungen sämtlicher Oxalate gleichmäßig beimpft. Bei der ersten Versuchsreihe wurde jede Flasche mit zwei 2-mm-Ösen einer Fleischbrühe-Kultur geimpft, die aus einer  $1/100$ -n. Natriumoxalat-Lösung, deren Titer stark abgenommen hatte, hergestellt worden war. Es wurden je etwa 10 g des luft-trocknen Oxalats in 50 ccm Wasser aufgeschlämmt und nach der Beimpfung in braunen Pulverflaschen, die mit Glasstopfen verschlossen waren, im Dunkeln 7 Monate aufbewahrt. Nach der Filtration wurden in den luft-trocknen Präparaten  $\text{CO}_2$  und  $\text{C}_2\text{O}_4$  bestimmt. Die zweite Versuchsreihe unterscheidet sich von der ersten dadurch, daß von jeder Substanz je 2 Aufschlämmungen von 10 g in 110 ccm Wasser im Erlenmeyer-Kolben angesetzt und dann sterilisiert wurden. In eine Aufschlämmung jeder Substanz wurde dann mit 3 ccm der S. 2732 beschriebenen Impflösung (zerfallene  $1/100$ -n.  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ -Lösung) geimpft. Damit waren auch noch die an sich sehr geringen Mengen Nährlösung ausgeschlossen, die bei der ersten Versuchsreihe durch Impfung mit der Fleischbrühe in die Versuche gelangten. Die Erlenmeyer-Kolben wurden mit Watte verschlossen, so daß eine sterile Durchlüftung möglich war, und blieben 10 Monate bis zur Aufarbeitung stehen. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen sind in Tabelle IV wiedergegeben.

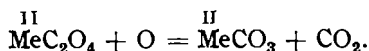
Tabelle IV<sup>8)</sup>.

Reihe I Nr.	Sub- stanz	% $\text{CO}_2$	Mol.-Verh.	Löslichkeit	Reihe II Nr.	% $\text{CO}_2$
			1000 $\text{C}_2\text{O}_4$ : $\text{CO}_3$	18° 10 <sup>-3</sup> Äqui- val./Liter		
1	$\text{BaC}_2\text{O}_4 + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ .	0.58	21.3	1.034	10	0.16
2	$\text{SrC}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ...	0.43	13.1	0.672	11	0.39
3	$\text{CaC}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ...	0.20	4.6	0.094	12	0.05
4	$\text{ZnC}_2\text{O}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ..	0.12	3.7	0.273	13	0.20
5	$\text{CdC}_2\text{O}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$ ..	0.28	11.4	0.499	14	0.05
6	$\text{PbC}_2\text{O}_4$ .....	—	—	0.014	15	0.48
7	$\text{MnC}_2\text{O}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ .	0.50	14.2	3.777	16	0.11
8	$\text{CoC}_2\text{O}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ..	0.20	5.9	0.287	17	0.50
9	$\text{NiC}_2\text{O}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ..	0.03	0.9	0.041	18	0.0

Die in der Tabelle nicht aufgeführten Oxalate von Cu, Hg und Ag waren bei beiden Versuchsreihen völlig carbonat-frei. Sie wirken, wie zu erwarten, bactericid. Bemerkenswert ist der Unterschied zwischen Nickel- und Kobaltoxalat; letzteres enthielt bei beiden Versuchsreihen reichlich Carbonat, während das Nickeloxalat der zweiten Reihe völlig kohlensäure-frei war,

<sup>8)</sup> Die analytischen Belege siehe am Schluß in Tabelle V und VI.

das der ersten nur einen ganz geringen  $\text{CO}_2$ -Gehalt ergab. Die sterilisierten, nicht geimpften Proben der Reihe 2 wurden quantitativ auf  $\text{CO}_2$  untersucht. Sie waren ausnahmslos völlig frei von Carbonat. Damit ist mit Sicherheit erwiesen, daß die beobachtete Umwandlung durch Bakterien unter Mitwirkung des Luft-Sauerstoffs bedingt ist, ganz entsprechend dem Vorgang bei den  $\frac{1}{100}$ -n. Alkalioxalat-Lösungen nach der Gleichung:



Interessant ist, daß schon äußerlich bei der zweiten Versuchsreihe unterschieden werden konnte, ob eine geimpfte oder nicht geimpfte sterilisierte Aufschlammung vorlag. Bei den geimpften und demzufolge carbonathaltigen Proben der Reihe 2 hatte sich der ganze Niederschlag am Glas festgesetzt und ließ sich mit Wasser nicht mehr aufschütteln, während dies bei den geimpften carbonat-freien Aufschlämmungen ohne weiteres möglich war. Beim Mangan- und Kobaltoxalat zeigte sich ein deutlicher Farbunterschied. Das geimpfte carbonathaltige Manganoxalat war braun gefärbt, ebenso enthielt das Kobaltoxalat zwischen dem hellroten Oxalat bräunliche Flocken. Der Nachweis von Formiat verlief auch hier negativ.

Zur Sicherstellung der quantitativen Verhältnisse bei der bakteriellen Oxydation wurden beim Manganoxalat (Nr. 7) nach Beendigung des Versuches Mn,  $\text{C}_2\text{O}_4$  und  $\text{CO}_2$  exakt bestimmt. Aus der Analyse (siehe am Ende) errechnete sich das Verhältnis  $\text{Mn}:\text{C}_2\text{O}_4:\text{CO}_3 = 1:0.978:0.02 = \text{Mn}:(\text{C}_2\text{O}_4 + \text{CO}_3) = 1:0.998$  in bester Übereinstimmung mit der oben angegebenen Reaktionsgleichung.

In der Tabelle IV sind außer dem Mol-Verhältnis 1000  $\text{C}_2\text{O}_4$  zu a  $\text{CO}_3$ , das einen unmittelbaren Maßstab für die Umsetzung gibt, auch noch die Löslichkeiten der Oxalate bei 18° angegeben nach den Bestimmungen von R. Scholder<sup>9)</sup>. Die Löslichkeit des Manganoxalats wurde neu bestimmt, während die des Bleioxalats einer Arbeit von Böttcher<sup>10)</sup> entnommen wurde. A. Bassalik (l. c.) stellte nämlich bei seinen Versuchen mit dem *Bacillus extorquens* fest, daß bei Gegenwart von Nährlösung die Oxalate von Ba, Sr und Ca umso besser und schneller zu Carbonaten verarbeitet wurden, je löslicher das betreffende Oxalat ist. Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die Tabelle IV, so findet man schon zwischen den beiden Versuchsreihen keinerlei Übereinstimmung. Es fällt weiterhin auf, daß das unlöslichste Oxalat, das des Bleis, verhältnismäßig viel Carbonat enthält. Offenbar spielt für die Verarbeitung der Oxalate durch Bakterien neben der Löslichkeit auch die verschieden stark schädigende Wirkung der Schwermetalle eine Rolle, die andererseits bei sehr geringer Löslichkeit des Oxalats wiederum stark vermindert wird.

### Analytisches.

Bei dem geringen Kohlensäure-Gehalt der Präparate war eine möglichst weitgehende Genauigkeit der  $\text{CO}_2$ -Bestimmung unerläßlich. Die Substanz wurde in einem

<sup>9)</sup> B. 60, 1523 [1927].

<sup>10)</sup> Ztschr. physikal. Chem. 46, 604 [1903].

Kölbchen mit 25-proz. Schwefelsäure gelöst, die Lösung zum Sieden erhitzt und durch Stickstoff die Kohlensäure in  $\frac{1}{20}$ -n.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung unter Luft-Ausschluß übergeführt. Der Stickstoff wurde peinlichst von  $\text{CO}_2$ -Spuren befreit und in vorgelegtem Barytwasser auf völlige Abwesenheit von Kohlensäure geprüft. In der nebenstehend gezeichneten Apparatur, die zunächst mit reinem Stickstoff gefüllt wurde, wurden durch A (Bürette) 25–30 ccm  $\frac{1}{100}$ -n.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung eingefüllt. Bei B trat in langsamem Gasstrom Stickstoff ein, der die Kohlensäure des Oxalats mit sich führte. Der Gasstrom ist, wie aus der Zeichnung ersichtlich, so geführt, daß eine quantitative  $\text{CO}_2$ -Absorption durch die Barytlauge sichergestellt ist. Bei C tritt der Stickstoff durch ein Natronkalk-Rohr aus. Ist die Kohlensäure quantitativ übergeführt, so läßt man die durch Carbonat getrübbte Lauge in einen mit Stickstoff gefüllten Kolben durch den Hahn abfließen, wäscht mehrmals mit Wasser (der dafür bestimmte Hahntrichter ist in der Figur nicht gezeichnet) und titriert mit  $\frac{1}{20}$ -n. Oxalsäure zurück (Phenol-phthalein!). Probe-Bestimmungen: Einwaage 0.0193 g  $\text{CaCO}_3$ ; gefunden 0.0195 g. — Einwaage 2.0576 g  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ; verbraucht 0.04 ccm  $\text{Ba}(\text{OH})_2 = 0.002\%$   $\text{CO}_2$ . Das zur Darstellung der Präparate verwendete Ammoniumoxalat war also innerhalb der Versuchsfehler kohlensäure-frei.

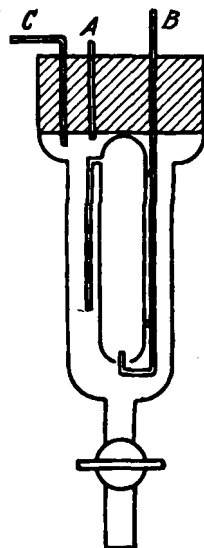


Tabelle V (erste Versuchsreihe).

Nr.		Ein- waage (g)	ccm $\frac{1}{20}$ -n. $\text{Ba}(\text{OH})_2$	% $\text{CO}_2$	Ein- waage (g)	ccm $\frac{1}{10}$ -n. $\text{KMnO}_4$	% $\text{C}_2\text{O}_4$
1	a)	0.7747	4.14	0.58	0.3295	28.20	37.65
	b)	0.4748	2.58	0.59	0.3667	31.39	37.66
2		2.1187	8.20	0.43	0.3406	34.22	44.22
3		2.0863	3.75	0.20	0.2387	31.66	58.37
4		2.0474	2.26	0.12	0.3029	30.88	44.86
5		2.8429	7.19	0.28	0.4448	34.01	33.64
					0.2754	21.00	33.55
7		1.9421	8.86	0.50	0.1892	20.80	48.37
8		2.1211	3.93	0.20	0.2183	23.22	46.80
9		3.3625	0.83	0.03	0.2983	31.30	46.81

Zu Versuch 7: Mn-Bestimmung: 0.3052, 0.3267 g Subst.: 0.1306, 0.1400 g  $\text{Mn}_2\text{O}_3$ . — Gef. Mn 30.85, 30.90%.

Tabelle VI (zweite Versuchsreihe).

Nr.	Ein- waage (g)	ccm $\frac{1}{20}$ -n. $\text{Ba}(\text{OH})_2$	% $\text{CO}_2$	Nr.	Ein- waage (g)	ccm $\frac{1}{20}$ -n. $\text{Ba}(\text{OH})_2$	% $\text{CO}_2$
10	2.9934	4.40	0.16	15	3.7870	16.37	0.48
11	3.3244	11.37	0.39	16	2.9888	3.00	0.15
12	2.3432	1.06	0.05	17	2.7588	12.86	0.50
13	3.8463	6.98	0.20	18	3.0963	0.02	0.00
14	3.3249	1.43	0.05				

Für die Unterstützung dieser Arbeit sei der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft auch an dieser Stelle herzlich gedankt.