

Forekomst af *Thiobacillus thiooxidans* i dansk Jord.

Af H. L. Jensen.

I November 1926 indkom der til Kalktrangsundersøgelse ved Statens Planteavlslaboratorium en Sandjord, som stammede fra udtørret Haybund i Lammefjorden, og som ved Reaktionsbestemmelse udviste en p_H -Værdi af ca. 2.2¹⁾ — maaske den stærkest sure Jordreaktion, der haves Meddelelse om. Denne overordentlig høje Brintionkoncentration viste sig at skyldes et rigeligt Indhold af fri Svovlsyre i Jorden, som desuden var rig paa opløselige Jærnforbindelser. Da Svovlsyren vanskeligt kunde tænkes at hidrøre fra andet end Iltning af Svovlforbindelser i Jorden, laa det nær at formode, at der i denne Jord forekom Mikroorganismer, der var i Stand til at ilte Svovl til Svovlsyre ved sur Reaktion. En saadan Bakterie, *Thiobacillus thiooxidans*, har i de senere Aar været Genstand for talrige amerikanske Forskeres Undersøgelser (*J. G. Lipman, J. S. Joffe, S. A. Waksman, R. L. Starkey*), men synes ikke hidtil at være iagttaget paa europæisk Grund. — Til Undersøgelse af, hvorvidt saadanne Organismer forekom i den nævnte Jord, anvendtes en Næringsopløsning af følgende Sammensætning: KH_2PO_4 2.0 g; $MgSO_4$ 0.2 g; NH_4Cl 0.2 g; destilleret Vand 1 Liter; til Portioner à 100 cm³ blev sat 2 g pulveriseret Svovl, og 2 250 cm³ Erlenmeyerkolber med denne Blanding »podede« efter Sterilisation i Autoklaven med ca. 2 g Jord. Efter 7—8 Dages Forløb blev Vædsken kendelig uklar og gav en stærk Svovlsyrereaktion; efter 3 Ugers Forløb var dens p_H -Værdi, som oprindeligt var ca. 4.5, sunket til 1.2. Ved Podning med en Platinøskenfuld af Vædsken i frisk, steril Næringsopløsning med Svovl optraadte der efter 5—6 Dages Forløb en karakteristisk, graalig Uklarhed, som blev særdeles stærk efter 12—14 Dage, og ved mikroskopisk Undersøgelse viste Vædsken sig at

¹⁾ Maalt kolorimetrisk; elektrometrisk Maaling med Kinhydronelektroden lod sig ikke udføre paa Grund af Jordens store Indhold af opløselige Jærnforbindelser.

indeholde store Mængder af smaa Stabakterier, som udviste stor Lighed med af *Waksman* og *Joffe* (3) beskrevne *Thiobacillus thiooxidans*. Den lod sig ret let rendyrke paa følgende af *Waksman* (4) angivne Agarsubstrat: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5.0 g; KH_2PO_4 4.0 g; NH_4Cl 0.1 g; MgSO_4 0.1 g; CaCl_2 0.2 g; Agar 20.0 g; destilleret Vand 1 Liter. — Ved Udstrykning af nogle Draaber af den bakterieholdige Vædske paa dette Agarsubstrat fremkommer der efter 5—6 Dags Forløb ganske smaa (ca. 0.5 mm), runde, bleggule, svagt blaaligt fluorescerende Kolonier af den paagældende Bakterie, hvoraf Renkulturer nu kan faas ved Podning enten i den førnævnte Opløsning med Svovl eller i en til Agarsubstratet svarende Natriumtiosulfatopløsning; den kraftigste Vækst indtræder dog i Opløsningen med Svovl. I morfologisk Henseende svarer Bakterien godt til den af *Waksman* og *Joffe* (l. c.) beskrevne: en lille ($0.3-0.5 \times 0.6-1.0 \mu$) ikke sporedannende Stabakterie, der farves ret daarligt med almindelige basiske Anilinfarvestoffer; lidt afvigende er kun den mindre gode Farvelighed og Bevægelsen, som her er ret livlig, medens *Waksman* og *Joffe* angiver, at Bevægeligheden kun er lidet fremtrædende. Ganske overensstemmende med Originalbeskrivelsen er de meget smaa, bleggule Kolonier paa sur Natriumtiosulfat-Agar og den ejendommelige graalige Uklarhed i mineralsk Næringsopløsning med elementært Svovl; men det mest karakteristiske ved denne Bakterie er absolut dens Evne til at leve i rent mineralske Næringsopløsninger af sur Reaktion og ilte elementært Svovl til Svovlsyre, indtil Opløsningens Aciditet er forøget til pH ca. 1.0 — en Brintionkoncentration, som næppe nogen anden Organisme er i Stand til at udholde. Der er da næppe Tvivl om, at det er berettiget at identificere den her fundne Bakterie med *Thiobacillus thiooxidans*.

Som *Waksman*, *Joffe* og *Starkey* (3—5) har vist, er *Thiobacillus thiooxidans* en rent autotrof Organisme, der dækker sit Energiforbrug ved Iltning af elementært Svovl, Tiosulfater og til en vis Grad Svovlbrinte til Svovlsyre; den herved frigjorte Energi anvendes til kemosyntetisk Assimilation af Kuldioxyd; den trives bedst ved en Brintionkoncentration, svarende til pH ca. 2.5—5.0, og den vokser i Almindelighed ikke ved pH -Værdien over ca. 6.0. Dens Forekomst i Jorden angives at være begrænset til specielle Lokaliteter, saaledes Jord omkring Svovlminer og anden Jord, som har været tilført Svovl. I den her omtalte Jord er det ikke sandsynligt, at der har været elementært Svovl til Stede, hvorimod saadan Jord som bekendt ofte indeholder Mineraleet Svovlkis (Pyrit, FeS_2); den store Mængde opløselige Jærnforbindelser i Jorden tyder netop paa, at Svovlsyren er opstaaet ved Iltning af Svovlkis. Det laa derfor nær at undersøge, hvorvidt *Thiobacillus thiooxidans* er i Stand til at ilte Svovlkis til Svovlsyre, hvilket Spørgsmaal saa vidt vides ikke tidligere har været Genstand for Undersøgelse. Der foreligger et enkelt Arbejde af *W. Rudolfs* (2), som viser at den Iltning, som Svovlkis undergaar i fugtig

Jord, fremskyndes betydeligt, naar der til Jorden sættes et bakterieholdigt Udtræk af en Jord, hvori der foregaar biologisk Iltning af Svovl; Forsøg med Renkulturer foretog *Rudolfs* derimod ikke. Med den her isolerede Bakterie foretoges følgende lille Forsøg: Til en Blanding af 100 g Kvartssand + 2 g pulveriseret Svovl resp. 5 g pulveriseret Svovlkis sættes 12 cm³ af følgende Opløsning: KH₂PO₄ 4.0 g; NH₄Cl 0.2 g; MgCl₂ 0.2; CaCl₂ 0.2 g; destilleret Vand 1 Liter. Portioner à 50 fugtigt Sand anbragtes i 100 cm³-Erlenmeyerkolber, lukkede med gennemborede Gummipropper med vatfyldte Glasrør. 4 Kolber med Sand + Svovl og 4 med Sand + Svovlkis steriliseredes ved Opvarmning til 120° i Autoklaven i 1/2 Time; efter Afkøling podedes alle Kolberne med en Platinøskenfuld af en Opløsningskultur af *Thiobacillus thiooxidans*, og umiddelbar efter Podningen steriliseredes Halvdelen af Kolberne paany. De henstilledes derpaa i Termostat ved 25° C., og efter 75 Dages Henstand bestemtes Brintionkoncentrationen og Sulfatindhold i dem alle. Sulfatbestemmelsen foretoges ved at ekstrahere 25 g Sand med 3 × 50 cm³ destilleret Vand, som dekanteredes fra og filtreredes efter 30 Min. Henstand; tilsidst bragtes Sandet over paa Filtreret og vaskedes med destilleret Vand, til dette ikke længere gav Sulfatreaktion. I Filtratet bestemtes Sulfat paa sædvanlig Maade ved Fældning med BaCl₂ i kogende, saltsur Opløsning. Disse Bestemmelser gav følgende Resultat:

Kolbe:	mg SO ₄ — S pr. 50 g Sand	mg S iltet af Bakterierne	PH
Sand + 5 pCt. Svovlkis, podet med } <i>Thiobacillus thiooxidans</i> }	a) 19.6 } b) 18.7 } 19.2	8.6	4.16
do., steriliseret (Kontrol)..... }	a) 10.9 } b) 10.3 } 10.6	—	5.75
Sand + 2 pCt. Svovl, podet med .. } <i>Thiobacillus thiooxidans</i> }	a) 9.7 } b) 9.1 } 9.4	9.4	4.98
do., steriliseret (Kontrol) }	a) (Spor) b) (Spor)	—	6.08

Man ser, at medens Svovlkisen vel iltes rent kemisk i det sterile Sand, fremskyndes Iltningen betydeligt af *Thiobacillus thiooxidans*, der har iltet omtrent lige saa meget Pyrit-Svovl som elementært Svovl, hvilket ikke er undergaaet nogen paavisselig kemisk Iltning (det er tænkeligt, at Jærnet i Svovlkisen katalyserer den rent kemiske Iltningsproces). Der synes efter dette Forsøg at dømme ikke at være Tvivl om, at Svovlkis kan tjene som Energimateriale for *Thiobacillus thiooxidans* og iltes til Svovlsyre og Ferrisulfat, om end de her fundne Sulfatmængder kun er smaa paa Grund af Sandkultureernes mindre gunstige Reaktion, der var foranlediget af et ringe Indhold af Kalciumkarbonat i Sandet.

Til lagttagelse af, hvorledes Svovl og Svovlkis iltes af Raakulturer ved forskellig Reaktion, fremstilles følgende Jordblandinger:

1: let, muldrig Lerjord fra Haven ved Statens Planteavlslaboratorium

a: + 2.0 pCt. Svovl.

b: + 2.0 — Svovlkis.

Reaktion oprindelig: pH 7.66.

2: let Lermuld fra Lyngby Forsøgsstation, pH oprindelig 6.7, tilsat Salt-syre til pH 4.6 — + 2.0 pCt. Svovlkis.

Efter Tilsætning af Vand til ca. 75 pCt. af Vandkapaciteten anbragtes Portioner paa 150 g Jord i Glasskaale, dækkede med Petri-skaale; der podes med et Par Draaber af en Opløsningskultur af *Thiobacillus thiooxidans*, og Skaalene henstilledes i Termostat ved 25° C.; efter 4 Maaneders Henstand fandtes:

I Jorden:	g SO ₄ -S pr. 100 g Jord:	pH:
1 a (Havejord + 2.0 pCt. Svovl)	1.0207	1.61
1 b (do. + 2.0 — Svovlkis)	0.1005	6.09
2 (Sur Lerjord + 2.0 pCt. Svovlkis)	0.4647	ca. 2.1

Som man ser, iltes Svovlkisen særdeles hurtigt i den sure Jord, medens der i den alkaliske Havejord kun sker en forholdsvis svag Iltning, maaske kun rent kemisk ligesom i den sterile Sandkultur. Det elementære Svovl iltes derimod overordentlig hurtigt i den alkaliske Jord, idet det nemlig, som særlig paapeget af *Waksman* (5), kan iltes til Svovlsyre ved alle pH-Værdier mellem ca. 1 og ca. 10 ved Samvirken mellem *Thiobacillus thiooxidans* og en i Jorden almindeligt forekommende Bakterie (af *Waksman* betegnet som *Thiobacillus B*), der nærmest svarer til *Beijerinck's Thiobacillus thioparus*; den er, som paavist af *H. C. Jacobsen* (1), i Stand til at ilte elementært Svovl til Svovlsyre ved neutral og alkalisk Reaktion og kan derved gøre Jorden saa sur, at *Thiobacillus thiooxidans* kan føre Processen videre. At Svovlkis ikke undergaar nogen hurtig Iltning i alkalisk Jord kan maaske føres tilbage til, at denne Svovlforbindelse er utilgængelig for de ved alkalisk Reaktion virksomme svovliltende Bakterier — et Forhold, som nærmere Eksperimenter maa oplyse om. Paa et bestemt Omraade er dette af ikke ringe Interesse: det har i Amerika i ret stor Udstrækning været forsøgt at anvende denne biologiske Svovlsyredannelse til tekniske Formaal, nemlig Fremstillingen af opløselige Fosforsyregødninger ved at kompostere finmalet Raafosfat med Jord og pulveriseret Svovl — en Proces, som vel er teknisk, men ikke økonomisk gennemførlig. Nogle Forsøg af *Rudolfs* (2) paa at erstatte Svovlet med det billigere Svovlkis har ikke givet særlig lovende Resultater, og da de her foretagne Forsøg tyder paa, at Svovlkis kun iltes langsomt ved pH-Værdier mellem 6.0 og 7.6 — netop det Reak-

tionsomraade, hvor Fosfaterne udøver deres stærkeste Stødpudevirkning — synes denne Metode til Fremstilling af opløselige Fosforsyregødninger foreløbig ikke at have store Udsigter for sig.

Litteraturhenvisninger.

1. *H. C. Jacobsen*: Die Oxydation von elementarem Schwefel durch Bakterien. *Folia microbiologica*, Bd. 1, 1912, S. 487.
 2. *W. Rudolfs*: The oxydation of iron pyrites by soil organisms. *Soil Science*, Bd. 14, 1922, S. 135.
 3. *S. A. Waksman og J. S. Joffe*: *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *Journal of Bacteriology*, Bd. 7, 1922, S. 239.
 4. *S. A. Waksman*: A solid medium for the isolation and cultivation of *Thiobacillus thiooxidans*. *Ibidem*, Bd. 7, 1922, S. 605.
 5. *S. A. Waksman*: Bacteria oxidizing sulfur under acid and alkaline conditions. *Ibidem*, Bd. 7, 1922, S. 609.
 6. *S. A. Waksman og R. L. Starkey*: On the growth and respiration of sulfur-oxidizing bacteria. *Journal of General Physiology*, Bd. 5, 1923, S. 285.
-