Wpływ symbionta na zdolność wiązania azotu przez *Azotobacter chroococcum* Beij.

(L'action du symbionte sur le pouvoir fixateur de l'azote
par l'*Azotobacter chroococcum* Beij.).

Napisała

FELICJA KOTKÓWNA.

Jednym z najbardziej żywotnych problemów ludzkości jest problem zdobycia niezbędnych związków azotu. Najpotężniejszym i niewyczerpanym źródłem azotu jest azot molekularny, którego jest w powietrzu około 78⁰/₀. To też bardzo żywym zagadnieniem techniki nowoczesnej jest zdobycie możliwości taniego i racjonalnego wykorzystania azotu molekularnego. Kühn (9, p. 420) na podstawie obliczeń statystycznych z doświadczeń poletkowych dowiódł, że prócz azotu, który ziemia pobiera z powietrza w postaci amoniaku i tlenków azotu, otrzymuje jeszcze 32·87 funtów azotu na morgę z nieznanego źródła. Jakież jest to nieznane źródło? Ostatnie dziesiątki lat ubiegłego stulecia poświęcili badacze rozwiązaniu tego zagadnienia.

Epokowym stał się rok 1901, kiedy to Beijerinck (1) znalazł najenergiczniejszego ze znanych dotąd niesymbiontycznych asymilatorów wolnego azotu. Nazwał go *Azotobacter*; w późniejszej pracy w zależności od odmian nazwał: czerniejącą *chroococcum*, żółto-brązową *vitreum*, ruchliwą *agile*. Praca o azotobakterze stała się pobudką do szeregu nowych badań. Pierwszym punktem spornym stała się kwestja współżycia azotobaktera z innymi bakteriami, żyjącymi w glebie, bądź to zdolnymi, lub niezdolnymi do samodzielnego wiązania azotu. Beijerinck i van Delden (2) twierdzili, że *Azotobacter* w płynnych pożywkach wiąże tak nieznaczne ilości azotu, że nie można na tem opierać poglądu, jakoby był on zdolny do wiązania azotu. Największą zdobycz azotu znajdował w kulturach azotobaktera, zakażanych symbiontem. Jako symbiontów azotobaktera po-

dają Beijerinck i van Delden (2) bakterje sporowe rodzaju *Granulobacter*, bezsporne *Aërobacter* oraz jako stałe towarzyszące, a mało znany *Bacillus Radiobacter*. Wszystkie badane gatunki rodzaju *Granulobacter* posiadają same przez się zdolność asymilacji wolnego azotu, a przy współżyciu z azotobakterem potęgują tą jego zdolność.

Freudenreich (3) znalazł w 250 cm³ pożywki (2% mannitu) po 9 tygodniach w czystych kulturach azotobaktera przyrostu 2·9 mg azotu, zaś w zakażanych jeszcze innemi bakterjami 20 mg azotu. Równocześnie Gerlach i Vogel (4) znaleźli w przeciwieństwie do Beijerincka (1), że azotobakter sam wiąże więcej azotu, niż w kulturach mieszanych. Stoklasa (12) stwierdza, że azotobakter sam wiąże nieznaczne ilości azotu, a współżycząc z radiobakterem w przeciągu 10 dni związał 124·5 mg azotu. Löhnis i Pillai (10) twierdzą, że w pewnej porze roku, mianowicie latem, azotobakter sam wiąże więcej azotu, albowiem bakterje grupy *Pneumoniae* wytwarzają kwas, który działa szkodliwie na azotobaktera. Kwestja ta została więc sporną. Drugą kwestją trudną do rozwiązania okazał się skład najodpowiedniejszej dla azotobaktera pożywki. Przy doborze pożywki dla azotobaktera różni badacze zmieniają to jedną, to drugą składową część jej, a szczególnie źródło węgla. Gerlach i Vogel (4) uważają cukier gronowy za najodpowiedniejsze źródło węgla dla azotobaktera. Stoklasa (12) zaś ksylozę i arabinozę, Koch (6) podaje 5% manitu, Krzemiewska (7) uważa, że dla najekonomiczniejszego wykorzystania pożywki przez azotobaktera najodpowiedniejszym jest jeden procent glukozy. Ostatnio przytoczeni badacze twierdzą, że dodatek próchnicy działa silnie pobudzająco na azotobaktera. Starali się więc wytłumaczyć, na czym to polega. Już Beijerinck i van Delden (2) zauważyli, że dodatek ziemi wysterylizowanej do pożywek mineralnych znacznie zwiększa wiązanie azotu przez azotobaktera. Twierdzili oni, że ziemia przysparza azotobakterowi azotu, podnosząc tem jego żywotność. Stoklasa (12) zaś twierdzi, że obecność furfuroidów w ziemi służy dla azotobaktera za źródło węgla. Heinze (5) uważa, że próchnica nie bezpośrednio, lecz pośrednio, to znaczy, przez swe produkty rozkładu działa jako źródło węgla dla azotobaktera. Krzemieniewski (8) twierdzi, że próchnica sama przez się nie dostarcza azotobakterowi żadnych związków niezbędnych do życia; jej działanie jest li tylko katalityczne. Söhlgen (11) twierdzi również, że wpływ ziemi na wzmożoną asymilację azotu przez azotobaktera nie polega na tem, że ziemia dostarczałaby związków organicznych lub nieorganicznych; działanie ziemi redu-

kuje się li tylko do tego, że ziemia jako kompleks kolloidów umożliwia szybszą absorbcję tlenu i azotu. Twierdzenie to coraz bardziej się umacnia. Teoria katalitycznego działania ziemi jest bardzo słuszną, nie można jednak orzec, że li tylko na tem polega działanie próchnicy. Możliwe jest bowiem, że ziemia dostarcza azotobakterowi azotu, lecz nie wiemy w jakiej postaci. Znane jest nam tylko, że związki azotu znajdują się w próchnicy przeważnie w postaci związków nierozpuszczalnych. Co się tyczy kwestji obecności azotu w pożywkach dla azotobaktera, to i tu spotykamy się ze zdaniami sprzecznymi. Wielu badaczy twierdzi, że początkowe słabe dawki azotu wpływają dodatnio na wzmożoną asymilację azotu przez azotobaktera.

Beijerinck (1) uważa, że czyste kultury azotobaktera rosną w płynnych pożywkach daleko szybciej przy dodatku drobnych dawek związków azotowych, szczególnie azotanów. Znalazł on np. bardzo intensywny rozwój przy dodatku 0.1% azotanu potasu; sole amonowe zaś są trudniej przyswajane, a jeszcze trudniej pepton. Wszystkie jednak działają mniej lub więcej dodatnio. Gerlach i Vogel (4) natomiast podają, że azotobakter w pożywkach bogatych w związany azot nie rośnie.

Dzierzbicki również twierdzi, że azotobakter w obecności związków azotu nie wiąże molekularnego, wobec czego uważa, że nawożenie azotowe osłabia działanie azotobaktera w glebach uprawnych.

Zadaniem niniejszej pracy głównie było wyświeetlenie wyżej poruszonych zagadnień.

Doświadczenia własne.

W poniższem zestawieniu podano szereg doświadczeń, wykonanych nad azotobakterem. Wszystkie doświadczenia dadzą się ująć w trzy wytyczne punkty, które zkolei dzielą się na podrzędne:

I. Wiązanie azotu przez azotobaktera w zależności od warunków:

- a) czasu,
- b) koncentracji cukru,
- c) obecności ziemi (ewentualnie wywaru z ziemi) w pożywce.

II. Wpływ początkowych dawek azotu (w postaci fosforanu amonu) na wiązanie azotu przez azotobaktera:

- a) pożywka mierzalna,
- b) pożywka mineralna i ziemia.

III. Wpływ współżycia azotobaktera z innymi bakterjami na wiązanie azotu przez azotobaktera:

a) samodzielnie niewiążące azotu:

1. „Towarzysz“,
2. *Coli* z jelit ludzkich,
3. *Coli* z wody,
4. *Mesentericus*,
5. *Aërogenes*;

b) wiążące azot przy współżyciu z motylkowemi:

1. *Radicicola (Lupini lutei)*,
2. *Radicicola (Caraganae)*,
3. *Radicicola (Trifolii)*;

c) wiążące samodzielnie azot:

1. Zdegenerowana forma radiobaktera (Beijerinck).

Metodyka.

Metodyka badań była wszędzie jednakowa. Do każdej kolby dawano następującą pożywkę:

100 cm^3 H_2O wodociągowej
 1·7 gr cukru trzcinowego
 0·1 gr $CaCO_3$
 0·1 gr $K^2H PO_4$
 0·05 gr NaCl
 0·05 gr $MgSO_4$

ślady Fe, Mn i Zn.

Pożywki te sterylizowano przez 3 dni podrząd po 20 minut w temp. 100° C. Zakażano trzy-dniowemi kulturami azotobaktera z agaru mannitowego. Kolby trzymano zawsze w termostacie w temp. 26—27° C. Azot określano metodą Kjeldahl'a. Przed spalaniem kontrolowano zawartość każdej kolby mikroskopowo, aby się przekonać, czy nie jest zakażona innemi bakterjami. Nastawiano zwykle do każdego doświadczenia podwójną ilość kolb, by uniknąć błędów. Ziemię używano kompostową. Jako stałą pożywkę dla azotobaktera używano następującą:

2 $\%$ mannitu
 2 $\%$ agaru
 0·1 $\%$ K_2HPO_4
 0·1 $\%$ $CaCO_3$

na 100 cm^3 H_2O . Próbowki trzymano zwykle w temperaturze pokojowej.

Zachowanie się w hodowlach i wygląd azotobaktera, użytego do doświadczeń.

Do doświadczeń użyto kilka ras azotobaktera, które się różniły między sobą specyficznie pod względem morfologicznym. Np. jedna rasa, którą wielokrotnie przeszczepiano w okresie dwuletnim, nigdy nie bronzowała. Inna rasa, która odróżniała się szybkim i doskonałym rozwojem po przeszczepieniu na skośny agar mannitowy, była białą, po kilku dniach (w temp. pokojowej, jak również w termostacie przy 26° — 27° C) bronzowała i stopniowo przechodziła w barwę czarną. Z pomiędzy innych ras ta wyróżniała się swoim charakterystycznym wzrostem, tworzyła grube pokłady bakterji w postaci warkoczy. Inna rasa, pochodząca z Holandji, przechodziła tylko krótkie stadium koloru białego i odrazu czerniała. Rosła ona również bardzo charakterystycznie: powierzchnia skośnego agaru mannitowego pokrywała się małymi, grozdkowatymi, płaskimi kolonijkami.

Löhnis i Pillai twierdzą, że zupełnie czyste kultury azotobaktera nie czernieją. Na zabarwienie, twierdzą oni, wpływa grzybek *Dematium pullulans*, który rosnąc na agarze mannitowym, szybko zmienia kolor od brązowego do czarnego. Opierając się na niżej przytoczonych doświadczeniach, stwierdzono, że zabarwienie azotobaktera nie zależy od obecności żadnego grzybka, a jest jedynie charakterystyczną cechą rasową.

I. Wiązanie azotu przez azotobaktera w zależności od warunków.

Wyodrębniano azotobaktera metodą kultur elektywnych w kolbach Erlenmayera z następującą pożywką:

100 cm^3 wody wodociągowej
2 gr manitu
0.1 K_2HPO_4
0.05 gr $CaCO_3$.

Zakażano niewielką ilością ziemi ogrodowej. Kolby wstawiano do do termostatu w temp. 27° C. Po 2—3 dniach, gdy utworzył się na powierzchni pożywki kożuszek, przeszczepiano do erlenmayerki z wyżej wymienioną pożywką jedno oczko. Późem wstawiano erlenmayerkę do termostatu (temp. 27° C). Po 3—4 dniach utworzył się na powierzchni pożywki ciemny, śluzowaty, zwarty kożuch. Badania mikroskopowe kożuszka wykazały: drobne, nieruchliwe pałeczki oraz dość duże owalne bakterje. Te ostatnie, jak je Beijerinck nazwał

Azotobacter, występują w postaci diplokoków. Z pożywki płynnej przeszczepiano na szalki Petriego z taką samą pożywką mannitową, zestaloną agarą. Po 2-ch dniach wyróżniano na szalkach następujące typy kolonii: małe, okrągłe o brzegach równych, przezroczyste, i dość duże matowe szaro-żółte, o brzegach nierównych, ziarniste, ułożone warstwami nierównomiernie. Pierwsze są to kolonie drobnej pałeczki, drugie azotobaktera. Obserwacja mikroskopowa wykazała, że kolonie azotobaktera bywają prawie zawsze zanieczyszczone małymi pałeczkami. Pałeczki te dają się z łatwością wyizolować. Trudniejszym zadaniem okazało się wyizolowanie czystej kultury azotobaktera, albowiem w wydzielonym przezeń śluzie znajdowała się zawsze owa pałeczka, jak ją nazywać będziemy — „towarzysz”. Czyste kultury azotobaktera otrzymano z kultur jednodniowych, na których nie utworzył się jeszcze kożuszek. Na szalkach Petri'ego z agarą mannitową otrzymano typowe kolonie azotobaktera duże, szaro-żółtawe, ziarniste, ułożone fałdami koncentrycznie.

Zaznaczyć należy, że kolonie zanieczyszczone „towarzyszem” różnią się od czystych kolonii azotobaktera. Pierwsze są raczej gładkie i silnie śluzowate, drugie — fałdowane i raczej suche.

Przeszczepione na agar skośny mannitowy tworzyły grube pokłady bakterij, ułożone w postaci warkoczy. Niektóre po kilkunastu dniach zaczęły brązowieć, aż wreszcie stawały się czarne. Jest to rasa nazwana przez Beijerincka: *Azotobacter chroococcum*. Inna rasa, wyizolowana równocześnie z tejże samej ziemi, nigdy nie brązowieła. Mając dwie rasy azotobaktera zajęto się kwestią wiązania azotu przez nie. Czyżby te dwie różniące się między sobą zewnętrznie rasy różniły się również zdolnością wiązania azotu?

Pożywki przygotowane w wyżej podany sposób zakażono: 2 kolby azotobakterem *chrooc.*, 2 kolby azotobakterem jasnym, 2 kolby z pożywką zostały niezakażone, jako kontrole. Kolby pozostawały przez 10 dni w termostacie (27° C). W kolbach zakażonych azotobakterem *chrooc.* rozwój był dobry. Śluzowaty, gruby kożuszek utworzył się na powierzchni pożywki. W kolbach zakażonych rasą jasną rozwój był daleko słabszy. Jak widzimy z tabl. I, azotobakter *chrooc.* wiąże na jeden gram cukru trzcinowego w okresie 10-dniowym o 0·85 mg. N więcej, niż rasa nieciemniejąca. Co powoduje tę różnicę?

Już przy nastawianiu surowych kultur zauważono, że w kulturach, które dłużej stały, tworzył się grubszy kożuszek, co wskazuje na lepszy rozwój azotobaktera. Wraz zaś z wzmożonym rozwojem powiększa się ilość związanego azotu. Pożywka zwykła z 1% cukru trzcinowego (wyniki por. tab. I).

Tabela I.

R a s a	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
<i>Azotob. chrooc.</i> (czerniejąca)	0·5	3·1 3·3	2·6 2·8	100
<i>Azotob. jasny</i>	0·5	2·3 2·5	1·8 2	69·2

Tabela II.

Czas trwania doświadczenia	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
7 dni	0·5	1·9	1·4	100
14 „	0·5	2·9	2·4	171·5
21 „	0·5	3·2	2·7	190·2
28 „	0·5	3·3	2·8	200

Jak się okazuje wraz z trwaniem doświadczenia wzrasta ilość mg związanego azotu, ale tylko do pewnej granicy — dopóty, dopóki źródło C nie zostaje zupełnie wyczerpane. To też widzimy, że w pierwszych 7-miu dniach azotobakter związała 1·4 mg N, w następnych 7-miu tylko 1 mg N, w późniejszym okresie 7-dniowym już tylko 0·3 mg N, aż wreszcie po 28-miu dniach, czyli po 4-tym okresie 7-dniowym ilość związanego azotu jest już bardzo nieznaczna, 0·1 mg N.

Że to stopniowe znaczne obniżanie się ilości związanego azotu jest spowodowane wyczerpaniem się cukru w pożywce, świadczy o tem następne doświadczenie (tabela III), w którym zastosowano dwie różne koncentracje cukru przy równem trwaniu doświadczenia (28 dni).

Tabela III.

Ilość cukru w ‰	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
1	0·5	3·2	2·7	100
2	0·53	4·9	4·37	162

Z pierwszego doświadczenia widzimy, że azotobakter w pierwszych dniach wiąże więcej N, niż w następnych. W pierwszych

7-miu dniach na 1 gr cukru związał 1·4 mg wolnego azotu, w późniejszych już tylko nieznaczne ilości.

Z drugiego doświadczenia widzimy, że wyższa koncentracja cukru przy dłuższym trwaniu doświadczenia wpływa dodatnio na wiązanie azotu. Aby się przekonać, jaką jest optymalna ilość cukru w danym okresie, wykonano następujące doświadczenie, które trwało 20 dni.

Tabela IV.

Ilość cukru w ‰	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
1	0·7	3	2·3	100
2	0·73	4·46	4·73	205·5
4	0·8	3·78	2·98	129
6	0·85	3·64	2·79	121·3

Jak wynika z tego doświadczenia, najbardziej sprzyjającą koncentracją dla wiązania azotu przez azotobaktera w okresie 20-dniowym jest 2‰ cukru. Zaznaczyć jednak należy, że wzmożone wiązanie azotu jest nie tylko zależne od koncentracji cukru, lecz również od czasu trwania doświadczenia, co wynika z tabeli V, gdzie przy 2‰ cukru jedno doświadczenie przerwano po 20 dniach, drugie dopiero po 28 dniach.

Tabela V.

Czas trwania doświadczenia	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
20 dni	0·73	5·46	4·73	100
28 „	0·73	6·48	5·75	121·5

Z tabeli tej widzimy, że przy wyższej koncentracji cukru (2‰) okres 28-dniowy jest bardziej sprzyjającym dla dobrego rozwoju azotobaktera, niż 20-dniowy, czyli że w okresie 20 dniowym w danych warunkach azotobakter nie wyczerpał jeszcze wszystkiego cukru.

Jak już wielu badaczy zauważyło, na wiązanie azotu przez azotobaktera wywiera obecność ziemi w pożywce ogromny wpływ. W pożywce bez ziemi rozwija się azotobakter słabo i powoli. Przyrost azotu jest bardzo mały. W pożywce z ziemią rozwój jest szybki, przyrost azotu bardzo znaczny. Do 100 cm³ zwykłej pożywki dodawano

1 gr ziemi kompostowej, którą sterylizowano 3-krotnie wraz z pożywką.
Ilość cukru 2⁰/₀.

Tabela VI.

Czas trwania doświadczenia	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ⁰ / ₀
7 dni	8·68	13·3	4·62	100
10 "	8·68	17·5	8·82	190·9
14 "	8·68	19·6	10·92	236
28 "	8·68	16·38	9·7	209·5

Dla porównania wpływu ziemi weźmiemy np. okres 28-dniowy.

Tabela VII.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ⁰ / ₀
Bez ziemi	0·73	5·47	4·74	100
2 gr ziemi kompostowej	9·59	35·44	25·84	545·2

W tych samych warunkach azotobakter w obecności ziemi wiąże o 445⁰/₀ więcej, niż bez ziemi. Ziemia więc, jakkolwiek wyjałowiona przez sterylizację (3 dni z rzędu po 30 min. w temp. 100⁰ C), a zatem nie zawierająca mikroorganizmów, któreby potęgowały wiązanie azotu przez azotobaktera, jak tłumaczyli to zjawisko Beijerinck i van Delden, zawiera coś, co wpływa ogromnie na dobry rozwój azotobaktera i tem samem na wzmożone wiązanie wolnego azotu.

Lecz czyż zwiększona ilość ziemi wzmacnia wiązanie azotu? Przy zwiększonych ilościach ziemi daje się zauważyć to samo zjawisko, co przy wyższych koncentracjach cukru; i tutaj objawia się pewne optimum, poza którym wyższa koncentracja działa raczej ujemnie, jak to wynika z następnego doświadczenia, przedstawionego w tabeli VIII. Czas doświadczenia: 10 dni. Pożywka zawierała ¹/₂₀ mola cukru trzcinowego.

Tabela VIII.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Bez ziemi	0·65	3·9	2·25	100
0·1 gr ziemi	3·6	7·5	3·9	173·3
0·5 " "	9	14·5	5·5	244
1 " "	11·2	19·6	8·4	373
3 " "	15·16	25·6	10·4	464
5 " "	28·37	34·37	6·0	266

II. Wpływ początkowych dawek N.

Jak już wyżej wspomniano, ziemia zawiera jakiś składnik, który znacznie potęguje rozwój azotobaktera. Lecz coż to jest za czynnik? Czyżby zapas związków azotowych, znajdujących się w ziemi? W 2-ch gramach ziemi kompostowej, którą brano do tego doświadczenia, było 122 mg N. Czy początkowe dawki związków azotu mogą wpłynąć dodatnio na wiązanie azotu przez azotobaktera. Aby się przekonać, dodawano do 100 cm³ pożywki płynnej, zwykłej, $\frac{1}{20}$ mola cukru trz., bez ziemi, jak również do tejże pożywki z ziemią różne ilości azotu w postaci fosforanu amonu. Doświadczenie trwało 10 dni.

Tabela IX.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Bez azotu	0·6	3·1	2·5	100
N 0·12 mg	0·72	3·18	2·46	98·4
N 0·6 "	1·09	2·1	1·01	40·4
N 1·2 "	1·58	2·1	0·6	24
N 6·0 "	6·2	6·2	0	—
N 12·0 "	12·3	12·35	0	—

Do następnego doświadczenia, które trwało 10 dni, brano zwykłą pożywkę, dodając 2 gr ziemi kompostowej i różne ilości azotu (tab. X).

Początkowe zatem dawki N zarówno w pożywce bez jak i z ziemią hamują wiązanie azotu przez azotobaktera. Większe dawki, 12 i 6 mg, paraliżują nawet rozwój azotobaktera. Związki azotowe w tej więc postaci działają bezsprzecznie ujemnie, co obrazuje niżej przy-

Tabela X.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Bez dodatku N . . .	10·02	29·04	19·02	100
N 0·12 mg	10·5	19·5	9·45	49·3
N 0·6 „				
N 1·2 „	11·1	13·4	3·3	17·3
N 6·0 „	17·0	17·76	0·76	4·1
N 12·0 „	21·49	21·5	—	—

toczona tabela (XI). Czas trwania doświadczenia: 10 dni. Skład pożywki: zwykła z 2 gr ziemi. Te 2 gr ziemi zawierały 12 mg N. Druga więc grupa kolb zawierała w każdej prócz 12 mg N w postaci nieznanego związku azotu z gleby, jeszcze 12 mg N w postaci fosforanu amonu.

Tabela XI.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Bez N	12·2	34·3	22·1	100
12 mg N	21·49	21·5	—	—

Ziemia działa więc dodatnio na wiązanie azotu przez azotobaktera nie przez swe związki azotowe, a dzięki nieznanym bliżej składnikom. Nietylko sama ziemia działa pobudzająco, ale nawet wyciąg z ziemi. Aby się o tem przekonać, brano wyciąg z ziemi próchnicznej: 150 gr ziemi gotowano na wolnym ogniu z 300 cm³ wody wodociągowej przez kilka godzin. Gdy woda zbronzowiła, przesączano ją kilkakrotnie przez watę szklaną, dopóki nie otrzymano zupełnie klarownej przesączy. Otrzymano 125 cm³ wywaru, który dodawano w ilości 10 cm³, 5 cm³ i 1 cm³ do 50 cm³ pożywki o podwójnej koncentracji, dopełniając do 100 cm³ wodą wodociągową. Doświadczenie trwało 14 dni. Pożywka zwykła z 1‰ cukru trzcinowego.

Jak widzimy z tabl. XII, wyciąg z ziemi wywiera dobry wpływ na wiązanie azotu przez azotobaktera. Wyższe koncentracje wywaru wzmagają wiązanie N, ale, jak zobaczymy z tablicy XIII, 10 cm³ wywaru stanowią już optymalną jego ilość; wywar w większych ilo-

Tabela XII.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Bez wywaru . .	0·56	3·01	2·45	100
1 cm ³ „ . .	0·7	3·64	2·94	120
5 cm ³ „ . .	1·68	5·88	4·2	171·5
10 cm ³ „ . .	3·08	8·26	5·18	211·5

ściach działa szkodliwie. Czas trwania doświadczenia: 14 dni. Do pożywki zwykłej dodano różne ilości wywaru.

Tabela XIII.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
10 cm ³ wywaru . .	3·08	8·45	5·4	100
15 cm ³ „ . .	4	8·9	4·9	90·7
25 cm ³ „ . .	5·8	9·2	3·4	63

Z tablicy XII wynika, że w pożywce bez wywaru azotobakter wiąże 2·45 mg azotu, zaś w pożywce z 10 cm³ wywaru wiąże 5·18 mg, czyli przyrost N związanego przez azotobaktera w obecności wyciągu na 1 gr cukru wynosi 2·73 mg. Stąd wniosek, że wpływ wyciągu jest bardzo znaczny. Działanie wywaru jest jednak nieznaczne w porównaniu z działaniem ziemi.

W poniższym doświadczeniu (tabela XIV) użyto wywar i samą ziemię w tych samych proporcjach, tj. 1 cm³ wywaru otrzymanego z 1·4 gr ziemi. Doświadczenie trwało 14 dni.

Tabela XIV.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
1 cm ³ wywaru . .	0·7	3·64	2·9	100
1·4 gr ziemi . . .	7·7	13·72	6·02	204·7

Widzimy więc, że różnica jest bardzo wielka; na 1 gr cukru trzcinowego azotobakter w obecności ziemi związał o 3·08 mg N więcej. Stąd wniosek, że do wywaru nie przeszły z ziemi wszystkie

czynniki, powodujące intensywniejsze wiązanie azotu przez azotobaktera. Czy działanie wyższej temperatury wzmogłoby przejście tych czynnych składników do wywaru? Wygotowano tą samą, jak poprzednio ziemię, czterokrotną dodając ilość wody wodociągowej, lecz miast gotować na wolnym ogniu, gotowano godzinę w autoklawie pod ciśnieniem trzech atmosfer. Doświadczenie trwało 14 dni. Pożywka zwykła.

Tabela XV.

Skład pożywki	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
5 cm ³ wywaru . .	1.1	3.2	2.1	100
10 cm ³ „ . .	2	4.9	2.9	138

Doświadczenie to dowodzi, że wysoka temperatura wpływa raczej ujemnie. Wywar pod wpływem wysokiej temperatury uległ zmianie. Czynniki, działające pobudzająco na azotobaktera, straciły na swej mocy. Ilość związanego N wynosiła tutaj tylko połowę na wywarze nieautoklawowanym (por. tabl. XII).

III. Współżycie azotobaktera z innymi bakteriami.

Już Beijerinck zauważył w swoich doświadczeniach, że wielki wpływ na wiązanie azotu przez azotobaktera wywiera obecność innych bakterij. Przedewszystkiem zwrócono uwagę na pałeczkę, wyizolowaną z kolonij azotobaktera, stale towarzyszącą jemu. Zanim przystąpiono do doświadczeń, starano się określić tę bakterję.

Cechy jej są ujęte w poniższem krótkim zestawieniu, w porównaniu z cechami najwięcej do niej zbliżonych bakterij.

	Rozmiar	Ruchliwość	Barwienie	Temperatura	Żelatyna	Pept. Agar.
„Tow.“	Dług. 1.9—2 μ szer. 0.5—0.7 μ	Ruchliwy.	Barwi się dobrze wszystkimi barwnikami. Gram — negatywny.	Rośnie dobrze w temp. pokojowej (16° C.) również przy 46° C. Optimum 37° C.	Wzrost dobry wzdłuż nakłucia. Tworzy dużo gazu już po 24 godz. Żelatyny nie rozrzedza.	Wzrost dość dobry. Pęcherzyki gazu wzdłuż nakłucia w temp. pokoj. po 24 g.
Coli	Dług. 1—2 μ szer. 0.5 μ	Ruchliwy.	Barwi się dobrze. Gram — negatywny.	Rośnie dobrze w temp. pokojowej również przy 46° C. Optimum 37° C.	Wzrost bujny, szybki. Tworzy gaz. Żelatyny nie rozrzedza.	Rośnie dość dobrze. Nieprzeźroczyste. Gazu nie tworzy.
Aërog.	Dług. 1—2 μ szer. 0.4—0.6 μ	Nieruchliwy.	Gram — negat. Barwi się dość dobrze.	Rośnie dobrze w temp. pokojowej. Optimum 37° C.	Wzrost bardzo dobry. Gaz. Żelatyny nie rozrzedza.	Rośnie dobrze wzdłuż nakłucia igłą. Gazu nie tworzy.

Rozwój na cukrach.

	Levuloza	Glukoza	Galaktoza	Maltoza	Laktoza	Sakcharoza	Arabinoza	Ksyloza
„Tow.“	++	++	++	++	+	++	—	+-
Coli	+	++	++	++	++	++	—	—
Aërog.	+	++	++	+	—	+	—	—

Rozwój na alkoholach.

	Mannit	Duleyt	Sorbit	Gliceryna
„Tow.“	++	+	—	+
Coli	++	+-	+-	+
Aërog.	+	+	—	—

	Kartofel	Jajko	Woda pept.	Mleko
„Tow.“	Rozwój dobry. Szaro żółte, groszkowate kolonie, mocno przylegające do podłoża.	Rozwój niezły. Kolonja gładka biała, wzdłuż śladu po igle.	Rozwój bardzo dobry. Kłaczkowaty osad na dnie kolbki.	Rozwój bardzo powolny. Ścina mleko w temp. 22° po długim czasie.
Coli	Rozwój dobry. Szaro brązowe kolonie często z polyskiem. Po pewnym czasie bronzowieje kartofel dookoła kolonji.		Rozwój dobry. Osad kłaczkowaty. Zapach H ₂ S.	Koagulacja mleka następuje dość szybko w temp. 37°.
Aërog.	Rozwój dobry. Kolonie szare, groszkowate.		Rozwój dobry. Osad kłaczkowaty.	Ścina mleko w temp. pokojowej

	Eykman	Voges-Proskauer	Endo	Drigalski
„Tow.“	+	—	Kolonje o polysku metalicznym.	Kolonje czerwono zabarwione.
Coli (z jelit ludzkich)	+	—	„	„
Aërog.	+-	—	Kolonje białe, brak polysku.	Kolonje zabarwione na niebiesko.

	Mc. Conkey	Czerwień metyl.	Amoniak z H ₂ O pept.	Tworzenie indolu 37° C temp. 46° C	
„Tow.“	Silna ferment, czerwone zabarwienie.		+	++	++
Coli (z jelit ludzkich)	„		+	+	++
Aërog.	Fermentacja, czerwone zabarwienie.		+-	++	+=

Znaczenie znaków: ++ Rozwój b. dobry. + Rozwój dobry. +- Rozwój niezły. += Rozwój słaby. — Niema rozwoju.

Jak widzimy z powyższego zestawienia pałeczka owa należy do bardzo rozpowszechnionej grupy bakterij *Coli-Aërogenes*. Ryc. 15 podaje jej obraz fotograficzny; hodowla 3-dniowa, gencjana fioletowa.

Ryc. 18 (pow. 1×1024).

Zasadniczą i bodajże jedyną cechą różniącą ją od tej grupy jest to, że przy współżyciu z azotobakterem wpływa na zwiększenie wiązania azotu przez azotobaktera. Nie ulega wątpliwości, że „towarzysz” korzysta ze związków azotu, które mu dostarcza azotobakter, sam bowiem azotu nie wiąże. Celem poznania znaczenia „towarzysza” dla azotobaktera wykonano następujące doświadczenia, których rezultaty zestawione są w tab. XVI—XIX. Pożywka zwykła z 1% cukru.

Tabela XVI.

Czas trwania doświad.	Materiał zaszczipiony	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg			
			brutto	netto	w ‰	
7 dni	Azotob. chrooc.	0·7	2·66	1·96	100	100
„	Azotob. chrooc.	„	3·22	2·52	128·4	128·4
14 dni	+ „Towarzysz”	„	2·94	2·24	100	—
„	Azotob. chrooc.	„	3·5	2·8	125	142·6
28 dni	+ „Towarzysz”	„	3·5	2·8	100	—
„	Azotob. chrooc.	„	4·06	3·36	120	171·4
„	+ „Towarzysz”	„				

W kilkakrotnie powtarzanych doświadczeniach okazało się, że obecność „towarzysza“ w zwykłych pożywkach wpływa pobudzająco na wiązanie azotu przez azotobaktera. Wpływ dodatni „towarzysza“ maleje wraz z wzrostem koncentracji cukru (tab. XVII). Doświadczenie to trwało 20 dni.

Tabela XVII.

Ilość użytego cukru	Materiał zaszczepiony	Ilość N w mg w kon- trolu	Ilość N związanego w mg			
			brutto	netto	w ‰	
1 ‰	Azotob. chrooc.	0·7	3	3·3	100	100
„	Azotob. chrooc. + „Towarzysz“	„	7	6·3	274	274
2 ‰	Azotob. chrooc.	0·73	5·46	4·73	100	—
„	Azotob. chrooc. + „Towarzysz“	„	6·9	6·2	131	270
4 ‰	Azotob. chrooc.	0·8	3·78	2·9	100	—
„	Azotob. chrooc. + „Towarzysz“	„	2·7	1·9	6·55	82·6

W pożywce z 4 ‰ cukru trzcinowego obecność „towarzysza“ staje się szkodliwą. Takie same zjawisko daje się zaobserwować w pożywkach z ziemią, gdzie obecność „towarzysza“ wpływa na wiązanie azotu przez azotobaktera również szkodliwie.

Tabela XVIII.

Czas trwania doświad.	Skład pożywki	Materiał zaszczepiony	Ilość N w mg w kon- trolu	Ilość N związanego w mg			
				brutto	netto	w ‰	
14 dni	1 ‰ cukru	Azotob. chooc.	8·68	19·6	10·92	100	100
„	+ 1 ‰ ziemi	Azotob. chooc. + „Towarzysz“	8·68	16·8	8·12	74·36	74·36
28 dni	2 ‰ cukru	Azotob. chooc.	12·2	35·4	23·2	100	212·4
„	+ 2 ‰ ziemi	Azotob. chooc. + „Towarzysz“	12·2	34·02	21·8	93·9	200

Zjawisko współżycia „towarzysza“ z azotobakterem jest bardzo ciekawe, szczególnie ze względu na to, że doświadczenia (tab. XIX) które wykonano z kilkoma bakteriami, należącymi do tejże grupy

Coli-Aërogenes, wykazały działanie ich najzupełniej ujemne. Czas trwania doświadczenia 14 dni. Pożywka zwykła z 1% cukru trzcinowego.

Tabela XIX.

Materiał zaszczepiony	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Azotob. chrooc. . . .	0·5	3·5	3·0	100
Azotob. + Towarzysz .	„	4·2	3·7	123·3
Azotob. + Coli a . . . (z wody)	„	2·8	2·3	76·6
Azotob. + Coli b . . .	„	2·7	2·2	73·3
„ „ c . . .	„	2·5	2·0	66·6
Azotob. + Coli d . . . (jelita ludzkie)	„	1·96	1·46	48·6
Azotob. + Coli e . . .	„	2·2	1·7	56·6
Azotob. + Aërog . . .	„	2·5	2·0	66·6
Azotob. + Mesentericus	„	2·6	2·1	70·0

To samo zjawisko, które widzimy przy współżyciu azotobaktera z „towarzyszem“, daje się zauważyć, gdy azotobakter żyje z bakteriami wiążącymi azot w symbiozie z motylkowymi, jak to wynika z tab. XX. Czas trwania doświadczenia 10 dni. Pożywka z 1% cukru trzcinowego.

Tabela XX.

Materiał zaszczepiony	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Azotob. chrooc. . . .	0·56	3·4	2·8	100
Azotob. chrooc. + Radic. (Lupini)	„	4·6	4·04	144·3
Azotob. + Radic. (Ca- raganae)	„	4·6	3·5	125
Azotob. chrooc. + Radic. (Trifolii)	„	4·9	4·34	155

Dla uzupełnienia obrazu, wyświetlającego rolę bakterij współżyjących z azotobakterem, wykonano następujące doświadczenie z jedną bakterją, samodzielnie wiążącą azot. Bakterję tę wyizolowano przypadkowo podczas izolacji azotobaktera. Na szalkach z agarem mannitowym spotykają się bardzo często małe, okrągłe, kropliste,

przezroczyste kolonie, które trudno odróżnić od agaru. Mikroskopowo są to małe, cienkie, nieruchliwe pałeczki. Wobec tego, że pałeczki tej nie znano (Beijerinck li tylko wspomina krótko o podobnej, nazywając ją zdegenerowaną formą radiobaktera) i nigdzie nie znaleziono jej opisu, przeto przytoczono w niżej podanej tabelce niektóre z jej cech.

Rozmiar	Barwienie	Ruchliwość	Agar mannit.	Agar pept.	Kartofel
dług. 0·6—0·9 μ szer. 0·1—0·2 μ	Gram negat. Barwi się dobrze wszystkimi barwnikami.	Nieruchliwa.	Rośnie bardzo dobrze. Pas przezroczysty, z polyskiem o brzegach równych wzdłuż śladu po igle.	Rośnie bardzo dobrze. Pokrywa całą powierzchnię agaru. Brzegi równe. Przezroczysta.	Wzrost bardzo dobry. Kolonia o powierzchni gładkiej z polyskiem. Szarawo-brązowa.
Marchew	Mleko	Bób	Seradella	Jajko	Żelatyna
Rośnie bardzo słabo	Peptonizuje po 3-ch dniach.	Rośnie słabo.	Wzrost nieco lepszy niż na bobie.	Rozwój dobry. Kolonia biała z polyskiem.	Rozwój powolny. Nie rozpuszcza. Brzegi nierówne w kształcie lekkiego wyzębienia
H ₂ O pept.	Cukier mlek.	Głukoza	Sakcharoza	Gliceryna	Mannit.
Zmętnienie. Kożuszek w postaci obłoczka.	Rozwój słaby.	Rozwój słaby. Gazu nie tworzy. Lekki kożuszek.	Rozwój niezły. Zmętnienie. Kłaczki.	Słaby rozwój. Lekki kożuszek.	Rozwój dobry; zmętnienie; kożuch kłaczkowy.

Wobec tego, że pałeczka ta posiada zdolność pobierania wolnego azotu, czego dowodem jest dobry wzrost na pożywkach bezazotowych, należało przekonać się, jak wpływa, współzyskując z azotobakterem, na wiązanie azotu przez tego ostatniego.

Pożywkę zwykłą z $\frac{1}{20}$ mol. cukru trzcinowego zakażano:

Doświadczenie trwało 10 dni.

Tabela XXI.

Materiał zaszczepiony	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
		brutto	netto	w ‰
Azotob. chrooc. . . .	0·65	3·9	2·25	100
Pałeczka (Radiobakter.)	„	2·3	1·65	73·3
Azotob. + Pałeczka Radiobakter.)	„	5·26	4·47	198·6

Z doświadczenia tego można wyciągnąć dwa wnioski: azotobakter chrooc. jest energiczniejszym asymilantem wolnego azotu niż owa pałeczka. Obie bakterie współżyjąc wiążą tyle azotu, jakgdyby każda z nich żyła oddzielnie.

Cały szereg wykonanych doświadczeń z innymi bakteriami współżyjącymi z azotobakterem wykazał, że „towarzysz” należy do tych nielicznych bakterij, które wzmagają wiązanie azotu przez azotobaktera, podczas kiedy on sam do wiązania azotu nie jest zdolny. Nietylko współżyjąc z „towarzyszem”, azotobakter wiąże więcej azotu, ale nawet po dodaniu do pożywki zwykłej przesączu z hodowli „towarzysza”; i wówczas ilość związanego azotu przez azotobaktera wzrasta. Zanim przygotowano pożywkę dla „towarzysza”, wypróbowano jakie jest najodpowiedniejsze dlań źródło azotu. Ilość azotu wszędzie była jednakowa + H_2O wodociągowa + 1% sakcharozy.

Źródła N	R o z w ó j
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Rozwój silny. Kozuch kłaczkowaty. Silne zmętnienie.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Rozwój dobry, słabszy niż w fosf. Kozuch lekki.
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	Rozwój dość dobry, słabszy niż w SO_4 .
NH_4NO_3	Rozwój niezły, słabszy niż w Cl. Ślady osadu.
NaNO_3	Rozwój najslabszy. Lekkie zmętnienie. Barwa żółtawa.
NaNO_2	Rozwój lepszy niż w NO_3 . Osad kłaczkowaty. Barwa żółtawa.
Woda Pept.	Rozwój b. dobry. Białý, kłaczkowaty osad po 19 godzinach.

Jak widzimy z tej tabeli, najsilniejszy rozwój jest na fosforanie amonu. Odpowiednio do tego przygotowano następującą pożywkę:

400 cm^3 H_2O wodociąg.

4 gr cukru trzc.

0.04 gr fosforanu amonu.

Zakażono „towarzyszem” z kultury 2-dniowej. Kolby wstawiono do termostatu (28° C.) na 3 dni. Po trzech dniach, gdy pożywka silnie zmętniała i pojawiły się pęcherzyki gazu, przesączono przez świecę Chamberland’a. Przesącz dodawano w różnych ilościach do 50 cm^3 pożywki o podwójnej koncentracji, dopełniając wodą wodociągową do 100 cm^3 .

Tabela XXII.

Skład pożywki	Materiał zaszczip.	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
			brutto	netto	w ‰
Bez przesączy	Azotob. chrooc.	0·5	2·5	2·0	100
" "	Azotob. chrooc.				
	+ „Towarzysz“	0·5	3·78	3·28	164
25 cm ³ przesączy	Azotob. chrooc.	0·72	4·76	4·04	202
50 cm ³ "	" "	0·98	6·58	5·6	280

Jak widzimy z powyższej tabeli, wyciąg w silnym stopniu wzmaga wiązanie azotu przez azotobaktera. Wydaje się to tem dziwniejszem, albowiem azotobakter rozwija się dobrze w środowisku alkalicznem, a „towarzysz“ pożywkę silnie zakwasza.

Pożywkę o składzie: 100 cm³ wody wodociąg.

0·25 gr peptonu

0·1 gr K₂HPO₄

0·05 gr MgSO₄

1 gr glukozy

zakażano świeżą kulturą „towarzysza“, umieszczano w termostacie w temp. 37° C. Po czterech dniach, kiedy fermentacja była zakończona, zbadano stężenie wodoru-jonów, które wynosiło: P_h = 3·56.

Czas trwania doświadczenia — 10 dni. Pożywka z 1‰ cukru trzcinowego.

Działanie przesączu z hodowli „towarzysza“ jest specyficzne, gdyż przesącze innych bakterij działania nie wykazują, czego dowodem rezultaty doświadczenia, przedstawionego w tab. XXIII.

Przesącz z hodowli *B. mesentericus*.

Tabela XXIII.

Skład pożywki	Materiał zaszczip.	Ilość N w mg w kontroli	Ilość N związanego w mg		
			brutto	netto	w ‰
Bez przesączy	Azotob. chrooc.	0·5	2·5	2·0	100
" "	Azotob. chrooc.				
	+ Mesentericus	0·5	2·38	1·88	94
25 cm ³ przesączy	Azotob. chrooc.	0·63	1·96	0·73	36·5
50 cm ³ "	" "	0·84	2·8	1·96	98

Zakończenie.

Powyższa praca miała za zadanie wyjaśnienie niektórych spornych spraw w dziedzinie wiązania azotu przez azotobaktera, a przede wszystkim zagadnienie, które zostało postawione przez samego Beijerincka, odkrywcę azotobaktera: czy azotobakter sam przez się wiąże azot, jak to twierdził w pierwszej swej pracy, czy czyni to tylko w obecności innych bakterij symbiotycznych, jak sprawę tę rozstrzygnął w drugiej pracy?

Z rezultatów wykonanych doświadczeń wynika, że zdolność wiązania azotu przez samego azotobaktera — w warunkach, w jakich te doświadczenia były przeprowadzone — jest bezsprzeczna, jakkolwiek stopień tej zdolności jest różny i występuje jako cecha rasowa. Jest możliwe, że azotobakter po dłuższej hodowli sztucznej tą specyficzną zdolność zupełnie traci; w doświadczeniach tutaj podanych stwierdzić tego jednak nie było można.

Zdolność wiązania azotu przez azotobaktera można jednakże spęgać przez doszczepienie do hodowli azotobaktera bakterji, która bardzo często „zanieczyszcza“ kolonie azotobaktera i z trudem daje się od azotobaktera oddzielić; bakterja ta nie daje się zidentyfikować z Beijerincka *Radiobacterem*, nie jest również identyczną z Heinzeego *B. molestus*. Sama przez się niezdolna do wiązania azotu, potęguje zdolność tę azotobaktera przez swą obecność w jego hodowlach, posiada zatem znaczenie symbionta. Inne bakterje, niezdolne do wiązania azotu, tego znaczenia dla azotobaktera zupełnie nie posiadają. Znaczenie to symbionta występuje tylko w pewnych warunkach: przy zwiększonej koncentracji cukru obecność jego staje się raczej szkodliwą dla procesu wiązania azotu. Być może, iż spowodowane to jest zbyt dużą koncentracją wytwarzanego przezeń kwasu, hamującą rozwój azotobaktera. Obecność ziemi próchnicznej lub wywaru z niej w hodowlach azotobaktera, jak to bardzo dokładnie ustalił już S. Krzemieniewski, wzmacnia potężnie wiązanie azotu. Wówczas jednak „towarzysz“ niema żadnego znaczenia, a raczej obecność jego staje się szkodliwą, ilość bowiem w tych warunkach przez azotobaktera związanego azotu staje się mniejszą, niż w nieobecności „towarzysza“. Ciało, działające pobudzająco na azotobaktera, a wytwarzane przez „towarzysza“, przechodzi do przesączu, jak wynika z doświadczeń, przeprowadzanych z dodatkiem do hodowli azotobaktera przesączonych przez świecę porcelanową płynów, w których rozwijał się uprzednio „towarzysz“. Przesącze te były starannie kontrolowane i nie zawierały komórek bakteryjnych, jak również ho-

dowla azotobaktera na pożywkach z dodatkiem tych przesączy pozostawała zupełnie czystą.

Inna, a dawna już kwestja sporna, tutaj opracowana, odnosi się do wpływu związków azotu na proces wiązania azotu molekularnego. Be i Jerinck uważał obecność małych dawek związków azotowych za konieczną, Gerlach i Vogel natomiast twierdzili, że wiązanie azotu w pożywkach, zawierających związki azotowe, wogóle nie następuje. Jak wynika wyraźnie z przytoczonych doświadczeń, w których użyto fosforanu amonu w 5 dawkach, od 0·12 mg do 12 mg N na 100 cm³ pożywki, hamujący wpływ na wiązanie azotu objawił się już przy najniższej dawce (por. tabl. IX), występując ze zwiększającą się koncentracją coraz silniej; przy dawce 6 mg N wiązanie azotu już całkowicie było zahamowane, a przy dawce 12 mg nawet rozwój azotobaktera był słabszy, niż w pożywce bezazotowej. Identyczne wyniki dała serja z dodatkiem ziemi kompostowej, zawierającej 0·50% N. Tutaj hamujący wpływ fosforanu amonu wystąpił nawet silniej, niż w doświadczeniu bez dodatku ziemi, gdyż obecność tylko 0·12 mg N amonowego w pożywce obniżyła ilość związanego azotu już o połowę. Nie jest coprawda wykluczone, że inne związki azotowe nie wpływają tak ujemnie na azotobaktera, jak użyty w tych doświadczeniach fosforan amonowy, gdyż inaczej azotobakter w ziemiach uprawnych, nawożonych łatwo rozpuszczalnymi związkami azotowymi nie miałby żadnego znaczenia, na co zresztą zwracał uwagę już Dzierzbicki. Kwestja ta wymaga jednakże jeszcze wszechstronnego zbadania.

Na zakończenie należy mi jeszcze zaznaczyć, że nigdy w czystych hodowlach w żadnych warunkach, w wielomiesięcznych nieraz hodowlach agarowych ziemnych lub innych nie dało się zauważyć u azotobaktera przetrwalników (*endospor*), o czym wszak jako pierwsi wspominają Heinze, a po nim Prażmowski. Może zatem tylko pewne rasy azotobaktera wytwarzają przetrwalniki lub zdolność ta występuje tylko w pewnych szczególnych, eksperymentalnie nie opanowanych jeszcze warunkach.

Streszczenie wyników.

1. Z ras, któremi posługiwano się podczas doświadczeń, rasa czerniejąca wiązała w tych samych warunkach więcej azotu, niż biała.

2. W pierwszych dniach wiąże azotobakter więcej azotu, niż w następnych. W pierwszych 7-miu dniach związał na 1 gr cukru trzcinowego 1·4 mg azotu, a po 28-miu dniach, czyli w czwartym okresie 7-dniowym, tylko 0·1 mg.

3. Wyższa koncentracja cukru działa sprzyjająco na wiązanie azotu przez azotobaktera. Najodpowiedniejszą koncentracją jest 2% cukru trzcinowego (w okresie 28-dniowym).

4. Ziemia w znacznym stopniu wpływa na spotęgowanie wiązania azotu przez azotobaktera:

a) w okresie 10-dniowym 3 gr ziemi są optymalną ilością.

Wyższe koncentracje działają odwrotnie proporcjonalnie.

b) wywar z ziemi wywiera dodatni wpływ na wiązanie N przez azotobaktera.

Optymalną ilością w okresie 12-dniowym na 100 cm³ pożywki jest 10 cm³ wywaru.

c) działanie ziemi próchnicznej *in substantia* znacznie przewyższa działanie wywaru.

d) wywar pod wpływem wysokiej temperatury (145° C) ulega zmianie; czynniki pobudzające zdolność wiązania azotu przez azotobaktera tracą na swej mocy.

5. Początkowe dawki azotu (w postaci fosforanu amonu) dodane czy to do pożywki z ziemią lub bez hamują wiązanie azotu.

Większe dawki w ilości 6 mg i 12 mg N na 100 cm³ pożywki paraliżują azotobaktera.

6. Obecność „towarzysza“ w pożywkach zwykłych z azotobakterem wpływa podwyższająco na ilość związanego N przez azotobaktera.

7. Obecność „towarzysza“ w pożywkach z dodatkiem ziemi lub przy wyższej koncentracji cukru wpływa ujemnie na wiązanie N przez azotobaktera.

8. Azotobakter wspólnie z innymi bakteriami grupy *Coli-Aërogenes* wiąże mniej azotu, niż sam. Natomiast w obecności *Bact. radi-cicola* wiąże więcej azotu, niż sam.

9. Przesącz bezkomórkowa hodowli „towarzysza“ w silnym stopniu pobudza zdolność do wiązania azotu przez azotobaktera.

10. Taką przesącz hodowli *B. mesentericus* działa ujemnie na wiązanie azotu przez azotobaktera.

Praca niniejsza była wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniw. Warszawskiego; kierownikowi Zakładu tego, p. prof. drowi Kazimierzowi Bassalikowi składam i na tem miejscu moje podziękowanie za ofiarną pomoc i wskazówki. Część diagnostyczną, odnoszącą się do porównania „towarzysza“ z radiobakterem i różnymi rasami grupy *Coli-Aërogenes*, wykonałam w zimie 1928/29 w Zakładzie

Mikrobjologicznym w Wageningen. Kierownikowi tegoż Zakładu, panu prof. drowi Söhngenowi składam i na tem miejscu podziękowanie za gościnę i pomoc.

Zakład Fizjologii Roślin Uniw. Warszawskiego.

Literatura.

1. Beijerinck. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 7. (1901).
2. Beijerinck und van Delden. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 9. (1902).
3. Freudenreich. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 10. (1903).
4. Gerlach und Vogel. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 10. (1903).
5. Heinze, B. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 26. (1910).
6. Koch, A. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 31. (1911).
7. Krzemieniewska, H. Bulletin de l'Academie des Sciences de Cracovie. (1910).
8. Krzemieniewski, S. Bulletin de l'Academie des Sciences de Cracovie. (1908).
9. Kühn. Frühlingslandwirtschaft. Zeitung. (1901).
10. Löhnis i Pillai. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 20. (1908).
11. Söhngen. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 38. (1913).
12. Stoklasa, J. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 21. (1908).

Résumé.

Dans le présent travail on a étudié l'influence de différents facteurs sur la fixation de l'azote par l'*Azotobacter* et surtout l'action de la symbiose. On a obtenu des résultats suivants:

1. Dans les premiers jours l'*Azotobacter* fixe plus d'azote que dans les jours suivants. Dans les premiers sept jours il a fixé — en cultures absolument pures — pour 1 gr de saccharose 1.4 mg d'azote et après 28 jours seulement 0.1 mg.

2. Une concentration supérieure de saccharose a une influence favorable sur la fixation d'azote. La plus favorable c'est la concentration de 2% de saccharose pour un délai de 28 jours.

3. Pour un délai de dix jours l'addition de 3 grammes de sol à 100 cm³ de solution nutritive est la quantité la plus favorable. L'augmentation de cette quantité a, au contraire, une influence de plus en plus défavorable. Le sol en substance agit beaucoup plus favorablement que son extrait aqueux.

4. L'azote, en forme de (NH₄)₂HPO₄ ajouté, au commencement, au milieu nutritif (avec ou sans sol) empêche la fixation de l'azote.

5. La présence du symbionte de l'*Azotobacter* dans le milieu nutritif simple, ensemble avec l'*Azotobacter*, augmente la quantité d'azote

fixé par celui-ci, mais devient nuisible dans les milieux avec une plus grande concentration de saccharose (4%).

6. Dans un milieu nutritif, dans lequel on a ajouté du sol, la présence du symbionte a une influence négative sur la fixation de l'azote.

7. L'*Azotobacter* en présence des bactéries du groupe *Coli-Aërogenes* (on a étudié 5 races de *Coli*, *Aërogenes* et *mesentericus*) fixe moins d'azote qu'en étant seul.

8. En présence du *Radicalola* (du *Lupinus*, *Trifolium* et *Caragana*) l'*Azotobacter* fixe plus d'azote qu'en étant seul.

Institut de physiologie végétale de l'univ. de Varsovie.