Bios, auksymony, witaminy i kolloidy w świetle badań nad wiązaniem azotu przez *Azotobacter chroococcum* Beij.

(Studien über den Einfluss von Bios, Auximonen, Vitaminen und Kolloiden auf die Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum* Beij.)

Napisali

K. BASSALIK i JANINA NEUGEBAUER.

Z szerzej zakrojonych i od kilku lat przeprowadzanych badań nad *azotobakterem* podajemy poniżej tylko te wyniki, które odnoszą się do zdolności organizmu tego do wiązania azotu w zależności od składu podanej mu pożywki. Kwestję ras biologicznych i innych tutaj poruszać nie będziemy, a wszystkie zamieszczone wyniki odnoszą się do szczepów *A*, *P*₃, *C* lub holenderskiego (*H*), co do których ustalono, że w badanych warunkach zachowują się — co do wiązania azotu — prawie jednakowo.

1. Szkic historyczny zagadnienia.

Niezmiernie ciekawą, nieraz wprost fascynującą jest historia poznawania warunków wiązania azotu przez *azotobaktera*; widzimy w niej rozwój wnikliwej myśli, postęp metod, śmiałe skoki do nowych koncepcyj, to znów nawroty, chaotyczne zawikłania, uwstecznienia. Odkrywca tego organizmu, M. W. Beijerinck, w rok już (1902) po pierwszej swej publikacji, zaprzeczył *azotobakterowi* w czystej hodowli tej zdolności. Z właściwą sobie genialną aczkolwiek nieco chaotyczną ekspansywnością a bystrą pomysłowością podaje bardzo liczne doświadczenia, z których wynika, iż *azotobakter* sam, w czystej hodowli, azotu nie wiąże, a czynić to zdolny jest jedynie w hodowlach mieszanych z innemi towarzyszącemi mu bakterjami, głównie: *Radiobacter*, *Aerobacter*, *Granulobacter* (i *radicola*). Mniema Beije-

rinck, że *azotobakter* korzysta z jakiegoś nieznanego, prawdopodobnie azotowego związku, niezbędnego mu dla rozwoju i czynności wiązania azotu, a wytwarzanego przez te bakterie towarzyszące. Wreszcie, w 6 lat później (1908) podaje, że mannit i cukry nie nadają się jako bezpośrednie źródła energii dla *azotobaktera*, i że zatem w czystej hodowli na cukrach nie wiąże on azotu, natomiast kwasy organiczne, a w szczególności kwas jabłkowy, jako odpowiednie źródła węgla umożliwiają mu tę czynność nawet w czystej hodowli. Coprawda wyniki analityczne nawet najdodatniejsze — przy użyciu 2 g jabłczanu wapnia, w pożywce na wodzie wodociągowej, z dodatkiem ziemi próchnicznej lub 10—20% wody kanałowej wykazały tylko 1.5—1.8 mg związanego azotu, przy zastosowaniu natomiast na takiej samej pożywce, surowych, więc nieczystych hodowli, 1.8—4.7 mg N — nie powinny były skłonić Beijerincka do porzucenia swego poprzedniego jasnego stanowiska, niemniej jednak zachwiały go na niem. Reasumując wyniki prac Beijerincka — mimo pewnego odskoku w ostatniej cyt. pracy — można powiedzieć, że *azotobakter* w czystych hodowlach nie wiąże azotu, a czyni to tylko w obecności innych bakterij, które zdają się mu dostarczać jakiegoś nieznanego w swej naturze chemicznej związku. Ciało to moglibyśmy dla krótkości za Wildier'em nazwać i porównać z „biosem“, jakkolwiek Beijerinck sam nigdy tego porównania nie uczynił.

Beijerinck, już w swej pierwszej pracy (1901), zawiadamiając o odkryciu *azotobaktera*, podaje, że obecność próchnicznej ziemi w pożywce potęguje zdolność *azotobaktera* do wiązania azotu. W następnej (1902) tłumaczy fakt ten obecnością w takiej — w mikroorganizmy niezwykle bogatej — glebie tego właśnie czy tych związków nieznanych a niezbędnych dla *azotobaktera*, a wytworzonych w niej przez bakterie takie jak *Radiobacter* i i. A jednak wbrew własnemu wynikom i bardzo przekonywującym doświadczeniom M. Berthelota (1892) nad znaczeniem próchnicy dla procesu biologicznego wiązania azotu, najwidoczniej pod wpływem licznych prac zwłaszcza niemieckich autorów, dopatruje się przyczyn niezdolności wiązania azotu przez *azotobaktera* w czystej hodowli w nieodpowiednim źródle węgla. Wątek słusznej myśli co do znaczenia próchnicy podejmują już inni. Jako pierwszy, zdaje się, B. Heinze (1904) wypowiada pogląd, że czynnikiem stymulującym wiązanie azotu przez *azotobaktera* są kwasy próchnicowe i CaCO_3 . A również i F. Löhns (1904) zaleca już wówczas używanie wywarów ziemnych. Wreszcie S. Krzemieniewski (1906, 1908) i S. i H. Krzemieniewscy

(1907) sprawę znaczenia próchnicy przedstawiają w niezwykle jasno a systematycznie ujętych doświadczeniach, w których wykazują, wbrew większości autorów niemieckich, że czyste hodowle *azotobaktera* wiążą bez dodatku ziemi próchnicznej lub preparatów próchnicowych (humianów, zwłaszcza sodu), azot tylko w bardzo słabym stopniu; związki zaś próchnicowe, jak to chcieli Stoklasa, Heinze i i., nie działają jako źródła energii dla *azotobaktera*; decydujące te wyniki potwierdził wkrótce N. K. Pillai (1908). Prace Krzemieniewskich miały przedewszystkiem to wielkie znaczenie, że udowodniły raz na zawsze, że *azotobakter* w czystych hodowlach nie wiąże azotu wcale (jak to już twierdził w 1902 Beijerinck) lub bardzo słabo, a czyni to tylko w obecności związków próchnicznych, przyczem naturalne te związki są o wiele czynniejsze niż sztuczne, otrzymywane n. p. z cukru. Nie ulega na podstawie tych prac najmniejszej wątpliwości, że inni badacze, a szczególnie Gerlach i Vogel, operowali, wbrew swoim twierdzeniom, hodowlami nieczystymi.

Odtąd rozpoczyna się okres badań, starających się zanalizować i wytłumaczyć to zagadkowe działanie związków próchnicowych.

Na podstawie precyzyjnych doświadczeń H. Krzemieniewskiej (1908, 1910), zbijających absurdalne na owe nawet czasy twierdzenie Gerlacha i Vogla, Thielego i i. co do zbędności w pożywkach dla *azotobaktera* tak ogólnie jako niezbędnych dla organizmów uznawanych pierwiastków, jak *K*, *Mg* i t. d. a niemożności zastąpienia tych przez inne pokrewne, można było sądzić, iż związki próchnicowe nie działają wskutek zaadsorbowania właśnie tych pierwiastków. Niedodanie bowiem tych pierwiastków w odpowiednich związkach do pożywek, odbijało się fatalnie na rozwoju i działalności *azotobaktera*, mimo że pożywki te zawierały „naturalny” humian sodowy; pozatem wpływ dawkowania tych związków objawiał się nader wyraźnie. Toteż w następstwie Kaserer i Remy i Rösing starali się wytłumaczyć skuteczne działanie związków próchnicowych obecnością w nich tych pierwiastków, których H. Krzemieniewska nie wprowadziła w krąg swych dociekań, a mianowicie *Fe* i i. Kaserer objaśniał działanie próchnicy obecnością w niej glinokrzemianów, fosforanów, związków manganu i żelaza, i podaje nawet receptę na skuteczny preparat, zastępujący próchnicę, a składający się z 2 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ + 0.5 g FeCl_3 , strąconych przez Na_2HPO_4 i „rozpuszczonych” w 3 g K_2SiO_3 , uzupełniony do 1 l i gotowany przy 2 atm., który dodany do 1 litra pożywki z 1 g glikozy, 0.1 g gipsu, 0.1 g MgSO_4 i 0.01 g MnSO_4 (bardzo skoncentrowana pożywka!) daje znakomite wyniki! Remy i Rösing i osta-

tecnie Rösing bardzo stanowczo tłumaczą działanie próchnicy zaadsorbowaniem przez nią żelazem. Żaden jednak z tych badaczy nie przeprowadził wszak niebolesnego dla siebie *experimentum crucis*, spopielając te czynne związki próchnicowe i porównywując ich działanie z działaniem ich popiołu! Natomiast skuteczność przez siebie obranego czynnika demonstrowali na podstawie działania preparatów próchnicznych „oczyszczonych” z czynnika efektywnego i przez regenerowanie skuteczności preparatów po dodaniu znowu badanego czynnika.

W tym stanie rzeczy A. Prażmowski, a nieco później Söhngen w Beijerinckowskim laboratorium, wysuwają tezę, że próchniany (humiany) działają naskutek swego stanu koloidalnego. Prażmowski coprawda działanie próchnicy niecałkowicie sprowadza na jej stan koloidalny, a dowodzi, że i związki zaadsorbowane przez nią działają; wykazuje, że naturalne humiany skutecznie można zastąpić sztucznymi, składającymi się z agaru czy dekstryny, $Fe(OH)_3$ jako „sakcharosolu”, krzemianu sodowego i węgla wapnia lub magnezu; nawet, na podstawie wyników uzyskanych z takim „sztucznym humianem” (p. 903), w którego skład wchodził również i pepton, wnioskuje, że skuteczność naturalnych związków próchnicznych polegać może przede wszystkim i na znajdujących się w niej organicznych a koloidalnych związków azotu (p. 907) — częściowy więc nawrót do poglądów Beijerincka z 1902. Ostatecznie jednak, nie mogąc żadnemu składnikowi swych rozlicznych „sztucznych humianów” ani samemu tylko ich stanowi koloidalnemu przyznać decydującego znaczenia, konkluduje, jak sądzymy nader słusznie, że w próchnicy działa cały kompleks ciał azotowych i bezazotowych organicznych i nieorganicznych, adsorbujących różne składniki mineralne jak zwłaszcza zasady, krzemiany itp. w odpowiednim ilościowym ustosunkowaniu wzajemnem, pozostający w stanie koloidalnym. Söhngen (1913) natomiast uważa, niewątpliwie pod sugestją ówczesnego świetnego rozwoju nauki o koloidach, sam stan koloidalny próchnicy za decydujący, co stara się wykazać nietylko na przykładzie wiązania azotu przez *azotobaktera*, ale również i na innych ważnych procesach mikrobiologicznych. Tłumaczy to działanie koloidów, w szczególności na *azotobaktera*, pochłanianiem przez wielką powierzchnię koloidalnych substancji gazów niezbędnych dla życia *azotobaktera* (tlenu) i dla jego działania (azotu). Tym poglądom, a zwłaszcza Söhngena, przeciwstawiają się Löhnis i Green (1914), nie mogąc im jednakże nic doświadczalnie konkretnego przeciwstawić.

Zaczyna się odtąd pogoń licznych badaczy za jakimś jednym czynnikiem, stymulatorem, działającym w minimalnych dawkach, a powodującym to choć zagadkowe, ale niezaprzeczalnie potężne działanie licznych, naturalnych i sztucznych kolloidów, a związków próchnicowych, jako najwięcej skomplikowanych i zmiennych kolloidów w glebie, w szczególności. Efekt stymulatora w tym wypadku podał już wszak dawno, bo w 1857, genialny Raulin z okazji swych na owe czasy zupełnie bezprzykładnych doświadczeń nad odżywianiem kropidlaka. Umysł biologa, jakby zahipnotyzowany klasyczną regułą metody badań: określenia znaczenia każdego poszczególnego czynnika w naturze i rozmiarze swym przez stopniowe jego wykluczanie, szuka i odkrywa tak łatwo nieraz ten jeden, jedyny czynnik. Staje się nim, np. Mn (Montanari), Cu i CS₂ (Fred), Sr czy Ca (Burk i Lineweaver) to znów U (Kayser, Stoklasa i Penkova), to Ra (Kayser, Stoklasa), to znów Si, Ti, V lub Al, lub ostatnio — *but not least* — Mo (Bortels). Najpoważniej, sądzimy, przedstawiają się z tej dziedziny badania Bortels'a, znane nam jednakże, niestety, z krótkiego referatu. Omówimy je w części doświadczalnej szczegółowiej, ze względu na ich częściową zgodność z naszymi własnymi badaniami, ich podłoże logiczne jak i ich aktualność.

Wkońcu sprowadza się działanie *azotobaktera* na specyficzne, często na temperaturę wrażliwe, organiczne substancje, powiedzmy więc na auximony (Zoon d, nasze własne doświadczenia) wydzielone z roślin lub zwierząt, na witaminy (Itano i inni), specyficzne ciała wydzielane przez niektóre bakterje (my i Kotkówna).

Powyżej przedstawiony stan rzeczy, wiernie, jak sądzimy, oddający w głównych zarysach historję badań nad wiązaniem azotu przez *azotobaktera*, postaramy się w części doświadczalnej choćby krótko krytycznie oświetlić. Niewątpliwem jest, że próby zmierzające do wyjaśnienia jakiegoś zagadnienia, a przeprowadzane na dłuższej przestrzeni czasu, jak nasze, ulegają wahaniom w różnych kierunkach, zależnie od chwilowej aktualności pewnych spostrzeżeń czy nowych koncepcyj. Myśl jednak przewodnia naszych nader licznych doświadczeń nie uległa, mimo długotrwałego jej realizowania, odchyleniom zasadniczym, a wyrazić da się ona w słowach, pojęciach i zagadnieniach: kolloid, stymulator, witamina, auximon i bios.

2. Metodyka badań.

1. Skład pożywki standartowej. Powyżej przedstawiony stan rzeczy narzucał poniekąd sam przez siebie pewną metodykę

pracy. Pożywka, na której miało się hodować *azotobaktera*, powinna być nam w swym składzie analitycznym jaknajkompletniej znana. Duże doświadczenie jednego z nas, zdobyte dawniej w toku pracy nad rozkładem krzemianów, dyktowało jak największą ostrożność i podejrzliwość co do czystości używanych do pożywek chemikalji; to samo ma zastosowanie do naczyń i wody. Z pionierskiej pracy H. Krzemieniewskiej wynikało, że zapotrzebowanie *azotobaktera* na składniki mineralne, poza fosforem, jest bardzo nieduże. Taki stan rzeczy upraszcza zestawienie pożywki o tyle, że przy wystarczającej słabej jej koncentracji niebezpieczeństwo wprowadzenia mimowolnie „zanieczyszczeń — nieraz może bardzo skutecznych — maleje. Po licznych próbach ustaliliśmy jako skład standartowej pożywki mineralnej następujący:

0·02 ⁰ / ₀	CaCO ₃
0·05 ⁰ / ₀	KH ₂ PO ₄
0·02 ⁰ / ₀	MgSO ₄ (+ 7 aq)
0·01 ⁰ / ₀	NaCl
0·001 ⁰ / ₀	Na ₂ SiO ₃
0·0005 ⁰ / ₀	FeCl ₃
0·00001 ⁰ / ₀	MnSO ₄
„	ZnSO ₄
„	Al ₂ (SO ₄) ₂

Coprawda, nie wszystkie poniżej podane doświadczenia były wykonane na tej standartowej pożywce. Przez dłuższy czas używaliśmy zamiast ostatecznie ustalonych 0·02⁰/₀ CaCO₃ i 0·05⁰/₀ KH₂PO₄ — 0·02⁰/₀ CaHPO₄ i 0·02⁰/₀ KH₂PO₄, dawaliśmy początkowo więcej CaCO₃, od 0·2 do 0·1⁰/₀. Rozumie się, że pożywkę rozpuszczalnych soli przygotowywaliśmy w jednym naczyniu dla wszystkich kolb, rozpipetując ją do każdej kolby, CaCO₃ zaś zawsze odważaliśmy dokładnie do każdej kolby oddzielnie.

Duże trudności przedstawiał wybór odpowiedniego źródła węgla dla *azotobaktera*. Z samego początku stosowaliśmy klasyczny mannit. Jednakże cena dostatecznie czystych preparatów uniemożliwiała nam stosowanie jego do masowych naszych hodowli.

Również glikoza, nawet preparowana wedle Soxhleta, zawiera stosunkowo dużo zanieczyszczeń, wprowadzonych mimowolnie przy jej preparowaniu, tak, że ostatecznie postanowiliśmy używać wyłącznie oczyszczonego cukru trzcinowego, jakkolwiek działał on zpośród wszystkich cukrów najslabiej, jak to wykazuje poniższa tabelka (I). 100 cm³ pożywki standartowej zawierało 5 cm³ wywaru ziemnego

i po $\frac{1}{20}$ mol dwucukrów, a po $\frac{1}{10}$ mol glikozy, mannitu, gliceryny i jabłczanu wapnia.

Azotobacter P₃. 27—28° C.

Tabela I.

14 dni (Tage) 30. I. 26.

Źródła C — (Quellen).

$\frac{1}{20}$ mol			$\frac{1}{10}$ mol			
	C. trzcin. (Rohrzucker)	Maltozy (Maltose)	C. mleko- wego (Milchzucker)	Glikozy (Glukose)	Mannit (Mannit)	Gliceryny (Glyzerin)
Przybytek (Gewinn) N mg	3·6 ± 0·12	4·4 ± 0·20	0	3·8 ± 0·16	3·8 ± 0·24	0

Z powyższej tabelki wynika, że cukier trzcinowy, wbrew twierdzeniu Krainskij'a, jest przez *azotobaktera* zużywany, jakkolwiek działa gorzej niż zwykle używany mannit, glikoza, a szczególnie maltoza. Pozatem okazało się, iż laktoza nie nadaje się zupełnie, jak również i gliceryna; odnosi się to coprawda tylko do szczepów *azotobaktera* w tym doświadczeniu użytych: A i P₃.

Ustalając odtąd cukier trzcinowy jako stałe źródło węgla w naszej standartowej pożywce mineralnej, należało określić optymalną jego w pożywce koncentrację. Zbadaliśmy szereg koncentracji od $\frac{1}{80}$ do $\frac{1}{5}$ mol. Im słabsza koncentracja, tem wzrost *azotobaktera* następował szybciej. Jednakże ze względu na stosowany przez nas czas hodowli używaliśmy we wszystkich poniżej przedstawionych doświadczeniach, $\frac{1}{20}$ mol cukru trzcinowego, mimo, że optimum jego leżało raczej przy $\frac{1}{40}$ — $\frac{1}{50}$ mol. Co do jego zanieczyszczeń, to mimo wysokiego stanu „czystości“ były one jednak znaczne. Z 3 porcyj cukru, z których czerpaliśmy w toku poniższych doświadczeń (pierwotny zapas nie starczył na wszystkie doświadczenia), najczystsza zawierała w 100 g 15·65 mg popiołu i 2·63 mg N, najmniej czysta w 100 g 18·6 mg popiołu, względnie 6·07 mg N. Wobec tego wprowadzaliśmy, mimowoli, do każdej kolby w pożywce standartowej w 1·71 g cukru trzcinowego około 0·2 mg popiołu i 0·04 do 0·1 mg azotu. Że zanieczyszczenia te bynajmniej nie są bez znaczenia, wskazuje poniższa tabelka II, w której użyto po 100 cm³ standartowej pożywki na wodzie wodociągowej.

Rozszerzenie powyższego doświadczenia na poprzednio (w tab. I) próbowane cukry użyte w pożywce standartowej bez dodatku wywaru ziemnego, wytłumaczyło nam dobre działanie w poprzednim doświadczeniu maltozy; okazało się, że dodatek popiołu (7·85 mg) z 5-krotnej ilości użytej maltozy podniósł wydajność N do 2·96 mg!

Działanie popiołu sakcharozy (w 100 g = 18·6 mg popiołu).

Wirkung der Saccharoseasche (in 100 g = 18·6 mg Asche).

	Przybytek <i>N</i> (Gewinn) mg
H ₂ O font. + $\frac{1}{40}$ mol Sacch.	0·77 ± 0·16
" " + $\frac{1}{20}$ " "	1·10 ± 0·2
H ₂ O bidest. + $\frac{1}{40}$ mol Sacch.	0·28 ± 0·1
" " " " " " + 9·3 mg popiołu (Asche)	1·85 ± 0·08
" " + $\frac{1}{20}$ mol Sacch.	0·42 ± 0·14
" " " " " " + 9·3 mg popiołu (Asche)	2·10 ± 0·09

2. Woda. Na tem jednakże nie wyczerpuje się niestety lista mimowolnych zanieczyszczeń, wprowadzanych do pożywki standardowej. Woda wodociągowa warszawska zawiera, według licznych naszych określeń, 156 do 192 mg składników mineralnych w 10 l. Używanie więc wody wodociągowej z samego początku było niewskazane, choć w pierwszym okresie naszych doświadczeń, tutaj jednak nie referowanych, używaliśmy niekiedy zamiast wody destylowanej $\frac{2}{3}$ lub $\frac{1}{3}$ wody wodociągowej. Zwykłej wody destylowanej wogóle nie używaliśmy, a tylko po przedestylowaniu jej jedno- lub dwukrotnem ze i do szkła jenańskiego, i zawsze w stanie świeżym. Ale i taka woda bynajmniej nie jest czystą. 1 l w ten sposób destylowanej wody zawierał w najlepszym wypadku 0·11 mg, w najgorszym nawet 1·42 mg popiołu. A zatem, mimo starannego przedestylowania wody i użycia jej w stanie świeżym, wprowadziliśmy mimo-woli do 100 cm³ pożywki standardowej 0·01 do 0·14 mg nieznanych nam zanieczyszczeń! Że i te zanieczyszczenia nie są bynajmniej obojętne, a zwłaszcza zanieczyszczenia mineralne wody destylowanej nawet szczególnie czynne, wykazują rezultaty doświadczenia zestawionego w tabelce III (str. 222).

Najciekawszy z tych rezultatów jest ten, że popiół 10-krotnej ilości dest. wody (w tym wypadku 1·114 mg) działał skuteczniej na wiązanie *N* niż kilkunastokrotna ilość popiołu wody wodociągowej! Obok zanieczyszczeń mineralnych wprowadzamy z wodą destylowaną i zanieczyszczenia organiczne, a szczególnie ciała lotne. Wyników tych doświadczeń narazie tutaj nie podamy, gdyż nie były one dostatecznie jednolite.

3. Szkło. Każde szkło naczyń jest źródłem mimowolnych zanieczyszczeń. Szkło jenajskie jest przy tem P_H , jakie należało w naszych hodowlach stosować, ze wszystkich handlowych szkieł najmniej rozpuszczalne. To też przez dłuższy czas używaliśmy wyłącznie szkła jenajskiego. Ze względów jednak koniecznych oszczędności, wobec tego zwłaszcza że szkło jenajskie niszczy się przy kjeldahleniu znacznie szybciej niż Pyrex, przeszliśmy na wyłączny użytek Pyrexu. Oczywiście, że wszystkie kolby w jednym doświadczeniu były albo z jenajskiego szkła albo z Pyrexu. Pojemność kolb jenajskich wynosiła zawsze 1 l dla 100 cm^3 pożywki, kolb Pyrex 700 cm^3 dla tej samej ilości pożywki.

Zamykaliśmy kolby luźnymi dużymi korkami z waty wełnianej, wyjątkowo z bawełnianej niehygroskopijnej.

4. Temperatura. O ile możliwości stosowaliśmy opt. t^0 28 C; w serjach doświadczeń, składających się nieraz ze 100 i więcej kolb, nie można ich było pomieścić w termostacie, wobec czego umieszczaliśmy je w ciemni, posiadającej, zwłaszcza w zimie, nie bardzo wahającą się temperaturę. Notowano oczywiście codzienne max. i min. t^0 . W tabelkach zawsze podamy t^0 hodowli.

5. Czas trwania hodowli. Ustalenie najodpowiedniejszego czasu trwania hodowli wymagało licznych wstępnych doświadczeń z uwzględnieniem t^0 i koncentracji cukru. Dla obranej ostatecznie koncentracji $\frac{1}{20}$ mol cukru i przy 26—28° C najodpowiedniejszym czasem okazało się 14 dni, zwłaszcza wobec stosowanego przez nas szczepienia możliwie małymi ilościami komórek. O ile nie można było przeprowadzić hodowli w t^0 26—28° C, czas doświadczeń, w zależności od t^0 ciemni, przedłużaliśmy do 3, wyjątkowo nawet do 4 tygodni. Czyniliśmy to w znacznej mierze i przez wzgląd na zawsze opóźniony rozwój *azotobaktera* w pożywce standartowej, gdyż istotnie, w pożywkach sprzyjających rozwojowi *azotobaktera* można było likwidację hodowli przeprowadzać już po 8 dniach, zwłaszcza przy t^0 hodowli optymalnej (więc 26—28 C, wbrew dziwnym twierdzeniom Fetschenki, podającym opt. t^0 dla *azotobaktera* na 16° C).

6. Czystość użytych hodowli. Najpoważniejszym błędem w bardzo licznych pracach nad *azotobakterem* wydaje nam się nieprzestrzeganie przez badających jaknajskrupulatniejszej czystości użytego *azotobaktera*, mimo, że już z pierwszych prac Beijerincka a późniejszych Krzemieniewskich znaczenie czystości hodowli wyłaniało się zupełnie wyraźnie. Popełnianie grzechów co do czystości użytej hodowli jest zrozumiałe, gdyż większość badaczy, zwłaszcza chemicy i rolnicy nie posiadają dostatecznego wykształcenia i doświadczenia mikrobiologicznego. Ten brak „kultury mikrobiologicznej“

Azotobacter A. 28° C. **Tabela III.** 14 dni (Tage). 28. VI. 27.

Działanie wody wodociagowej.
(Wirkung des Leitungswassers).
(1 l = 17·68 mg popiołu — Asche).

H ₂ O bidest. e vitro Jena	H ₂ O font.	H ₂ O bidestillata e vitro Jena					
		1 × ± 17·7 mg popiołu (Asche)	2 × ± 35·4 mg popiołu (Asche)	5 × ± 88·4 mg popiołu (Asche)	10 × ± 176·8 mg popiołu (Asche)	30 × ± 530·5 mg popiołu (Asche)	1.114 mg po- piołu (Asche) ex aq. dest.
0·26 mg N ± 0·0	0·63 ± 0·06	0·64 ± 0·04	1·11 ± 0·08	2·70 ± 0·06	4·40 ± 0·03	2·52 ± 0·42	4·94 ± 0·16

Azotobacter A, C, P₃ 27° C. **Tabela IV.** 14 dni (Tage). 29. III. 28.

Wpływ P_H — (Wirkung).

P _H	4·72	5·14	5·90	6·47	6·91	7·05	7·16	7·26	7·61	8·0	8·21	8·54	8·85	9·21	9·54
Przybytek (Gewinn) N mg	0	0	0	5·48 ± 0·22	5·57 ± 0·35	5·96 ± 0·26	6·24 ± 0·41	5·54 ± 0·32	5·48 ± 0·48	7·9 ± 0·2	9·15 ± 0·42	6·92 ± 0·56	6·52 ± 0·42	4·2 ± 0·3	3·23 ± 0·65

mści się jednak na wynikach prac w jaskrawy sposób. Uzyskanie czystej hodowli *azotobaktera* wymaga często anielskiej cierpliwości i litewskiej uporczywości. Każde zanieczyszczenie hodowli *azotobaktera* na naszej standartowej pożywce objawia się lepszym rozwojem *azotobaktera* i większą ilością związanego azotu, a jedynie charakter zanieczyszczenia decyduje o rozmiarze jego efektu korzystnego. Najpospolitsze zanieczyszczenia *azotobaktera* polegają na naturalnych jego symbiontach, w rodzaju Beijerinckowskich *Radiobacter* i i., przylegających do śluzowych błon jego uporczywie, a te właśnie dają największe efekty, jak to przedstawimy później szczegółowiej.

7. Szczepienie. Szczepienia w tutaj referowanych doświadczeniach dokonywaliśmy zawsze igłą platynową, jakkolwiek zalecałbym raczej używanie kapilar szklanych lub, lepiej, krzemionkowych, przez wzgląd na niewątpliwie szkodliwe działanie oligodynamiczne platyny na przylegające doń bezpośrednio osobniki bakteryjne. Konieczność jednak zaszczepiania dużej ilości kolb zmusiła nas do używania w tych doświadczeniach igły platynowej, gdyż odkażanie kapilar trwa dłużej, a łamie się łatwo.

Przenosiliśmy zawsze — ze świeżych agarowych kultur, możliwie jaknajmniejszą ilość *azotobaktera*, jak wykazały liczenia, po 15 do 40 komórek (oczywiście w próbkach kontrolowanych). Rozwój początkowy *azotobaktera* w nowym środowisku zawsze jest zahamowany, a szczególnie przy szczepieniu małej ilości komórek. Ale wówczas występuje wpływ czynników ułatwiających jego rozwój tem jaskrawiej. Spostrzeżenia bowiem Wildier'a nad „biosem“ u drożdzy mogą być według naszych doświadczeń w całej pełni przeniesione na *azotobaktera* — oczywiście uwzględniając charakter odmiennych jego właściwości fizjologicznych. Poza tem, przez przenoszenie małych ilości komórek unikamy wprowadzenia do badanej hodowli nowej dozy nie dających się skontrolować zanieczyszczeń, jakkolwiek powstaje ryzyko nieprzeniesienia wogóle żadnych zdolnych do rozwoju osobników.

8. Koncentracja H^+ . Niewątpliwie wiele wyników dawniejszych prac wymagałoby korektury ze względu na niemożność dawniej dokładnego kontrolowania P_H użytych pożywek. W początkach naszej pracy mieliśmy sami dużo trudności utrzymania we wszystkich hodowlach jednakowego P_H , i straciliśmy wiele czasu na znalezienie prostego środka, regulującego P_H a nieszkodliwego. Zamiast przedstawiać ciernistą drogę starań o wybuforowanie równomierne pożywek, podamy tylko wynik ostateczny, przedtem jednak przedstawimy w tabl. IV wymagania szczepów przez nas w tych doświadczeniach używanych. Chcąc uchwycić i drobniejsze różnice działania P_H nale-

żało użyć pożywki możliwie sprzyjającej, ale równocześnie zawierającej jaknajmniej substancji buforujących. Osiągnęliśmy to przez dodanie na 100 cm^3 pożywki standartowej, w której CaCO_3 zastąpiliśmy odpowiednią ilością CaSO_4 , po 5 cm^3 bardzo czynnego wywaru ziemnego, zawierającego w tej ilości 1.56 mg substancji mineralnych i 3.39 mg substancji organicznej. Skalę P_H przeprowadziliśmy przy użyciu H_2SO_4 względnie NaOH . Wynik zestawiony w tabl. IV wykazuje, że opt. było przy $P_H 8.21$, a skala P_H , umożliwiająca rozwój i wiązanie azotu, między mniejwięcej 6 a 9.5, co zgodne jest z danymi literatury.

Dodać do powyższych wyników należy, że *azotobakter* sam praktycznie nie zmienia wcale P_H pożywki, w której się rozwija. W naszej pożywce największe odchylenie od P_H początkowego nie przekraczało $P_H 0.10$. Na podstawie powyższego doświadczenia niestosowaliśmy w przyszłości żadnych już regulatorów P_H , gdyż dodanie do naszych pożywek 20 mg — w niektórych wypadkach 10 i nawet 100 mg (zwłaszcza w hodowlach mieszanych) CaCO_3 jaknajdrobniejszego, w dostatecznej mierze utrzymywało P_H pożywek w pobliżu $P_H 8.00$, z małymi wahaniami wwyż i wdół.

9. Oznaczenie azotu. Likwidowanie hodowli odbywało się zawsze przez dodanie do każdej kolby 10 względnie, czasami, 15 cm^3 H_2SO_4 puriss. 1.84. Spalanie, według Kjeldahla, bez dodatku jakichkolwiek katalizatorów przeprowadzaliśmy zawsze w tych samych kolbach, w których odbywały się hodowle. Na podstawie licznych prób uznaliśmy ten sposób za najodpowiedniejszy. Wszelkie przelewanie zawartości hodowli, spłukiwania wówczas niezbędne itd. zawsze prowadzą do utraty choć drobnych ilości mającego być spalaniu podanemu materiału, przez spłukiwania następuje zbyteczne powiększanie ilości płynu i wprowadzanie równocześnie cośkolwiek związków azotu. Kłopotliwe usuwanie nieraz uporczywie przylegającego do ścian kolb śluzu azotobakterowego przy spalaniu w tem samym naczyniu odpada zupełnie. Ślepe oznaczenia N nie wykazywały w użytych odczynnikach go nigdy. Oczywiście, że ten sposób określenia wyników uniemożliwiał całkowicie kontrolę ilości użytego cukru. Jednak, w tych doświadczeniach, które będziemy referowali — byłoby to i nieistotne, tembardziej, że jak stwierdziliśmy w osobnych doświadczeniach, nie ma równoległości między ilością zużytego cukru a ilością związanego azotu, na co zresztą już i P r a z m o w s k i (p. 927) zwrócił uwagę. Poza tem, wielokrotnie, w początkach z pewnem zdziwieniem, stwierdziliśmy, iż nie ma również żadnej ściślejszej zależności między ilością związanego w jakiejś hodowli azotu a bujnością rozwoju ocenianej „na oko” danej hodowli. Zwłaszcza w niektórych pożywkach *azoto-*

bakter rozwijał się „na oko“ niezwykle obficie, przekształcając cały płyn pożywki w gęstą, prawie półstałą śluzową masę, a tymczasem analizy wykazały stosunkowo małe ilości azotu, gdy odwrotnie, kiedy nieraz „na oko“ wegetacji *azotobaktera* bynajmniej nie można było nazwać bujną, hodowla taka zawierała duże ilości azotu.

W następstwie podawać będziemy ilość azotu *netto*, więc zawsze już po odjęciu azotu zawartego w kontrolach. Każdą pożywkę badano zwykle w 4^o, czasem 3 lub 5^o krotnem powtórzeniu, dodając po 3 względnie 2 kontrole (nieszczepione).

Znak — w tabelach oznacza, że doświadczenia nie dokonano lub że przepadło. Tą drogą pragnęliśmy osiągnąć jaknajwiększą pewność wyników.

Sterylizowaliśmy zawsze 3-krotnie przy 100^o C, nigdy w autoklawie.

Przejdziemy teraz do przedstawienia wyników doświadczeń, prze prowadzonych dla wyświetlenia wyłonionych w poprzedzającym szkicu historycznym zagadnień.

3. Doświadczenia i wyniki.

Przystępując do omówienia naszych doświadczeń zaznaczamy, że znacznej części wstępnych doświadczeń, zwłaszcza z lat 1926 i 1927 podawać wogóle nie będziemy, gdyż rezultat ich przedstawiła właściwie już p. F. K o t k ó w n a. Pracując równolegle, doświadczenia jej i nasze różniły się tylko w szczegółach, a nie w ich ułożeniu. P. K o t k ó w n a, zakańczając swą pracę już w lecie 1928, operowała innemi szczepami *azotobaktera*, wyhodowanemi przez nią samą, i używała odmiennych, co do koncentracji zwłaszcza, pożywek, złożonych poza tem z chemikali j innej handlowej jakości; poza tem posługiwała się prawie zawsze wodą wodociągową, podczas gdyś my używali jej raczej wyjątkowo. Wobec tego jej „zasadnicza pożywka“ była znacznie „lepszą“ niż nasza — i, zgodnie z tem, — ilości związanego azotu na jej standartowej pożywce były znacznie większe niż na naszej. Na niej otrzymywaliśmy zwykle, co prawda z innemi szczepami (choć dla porównania zbadaliśmy także i 2 z jej szczepów) 0·14—0·60 mg N, a przy użyciu wody wodociągowej rzadko więcej niż 1 mg, kiedy K o t k ó w n a przy mniejszej koncentracji cukru w jej pożywkach (1^o/_o) otrzymywała ze 100 cm³ pożywki około 2 mg azotu, przekraczając nawet w większości wypadków tą cyfrę znacznie. Za to każdy dodatek do naszej standartowej pożywki objawiał się znacznie jaskrawiej, o ile nie był zupełnie obojętnym dla *azotobaktera*. Tego rodzaju równoległa a w wynikach niezależna praca posiada dużo uroku i wzmacnia poczucie pewności.

1. Ekstrakty ziemne.

Z licznych doświadczeń przeprowadzonych celem zbadania natury czynników gleby działających tak korzystnie na wiązanie azotu przez *azotobaktera*, przytoczymy tu tylko 4, zapomocą których staraliśmy się wyświecić:

- a) wpływ temperatury na skuteczność ekstraktów glebowych,
- b) charakter grupowy, jaknajogólniejszy, tych czynników i
- c) zależność ich „aktywności“ od reakcji w czasie ich ekstrahowania.

a) Wpływ temperatury.

Że dodatek gleby do hodowli *azotobaktera* skuteczniej wpływa na jego działalność niż ekstrakt tej samej gleby, wiadomo od dawna (por. też K o t k ó w n a, p. 58 tabl. XIV). Przyczyną tego zjawiska jest może to, że albo nie wszystkie ciała czynne przeszły z gleby do ekstraktu, należałoby zatem ekstrahowanie gleby wielokrotnie powtarzać, albo że przy temperaturze ekstrahowania ulegają zniszczeniu lub ulatniają się jakieś ciała czynne, lub wreszcie, że pod wpływem temperatury wrzenia wody albo wyższej powstają ciała szkodliwe. Działanie wyższej temperatury przy ekstrahowaniu przez autoklawowanie przy 3 atmosferach przytacza K o t k ó w n a (str. 59, tabl. XV), nie będziemy zatem tutaj reprodukowac naszych wyników, a zaznaczamy tylko, że były one jeszcze jaskrawsze, zapewne dlatego, że autoklawowaliśmy przez 3 h a nie przez 1, jak ona. (Nb.: L ö h n i s w swej recepcie na przyrządzanie ekstraktu glebowego właśnie nakazuje autoklawowanie!). Kwestją nieprzejęcia z gleby do ekstraktu całości czynnych ciał uważamy obecnie już za tak oczywistą, że i wyników odnoszących się do skuteczności kolejnych ekstraktów wodnych tej samej porcji gleby nie podajemy, zaznaczając tylko, że i 10-ty ekstrakt glebowy okazał się jeszcze czynnym jakkolwiek w znacznie słabszym stopniu niż frakcje pierwsze. Wobec powyższego uważamy, że zachowanie stałej proporcji między ilością gleby a ilością użytej do ekstrahowania wody czy jakiegokolwiek innego rozpuszczalnika jest koniecznem; w konsekwencji powyższego używaliśmy zawsze przy przygotowywaniu ekstraktów glebowych 2 części wody destylowanej na 1 część gleby, sącząc do zupełnej klarowności. Poza tem dodajemy, że zawsze, po zalaniu gleby wodą i po silnem jej wstrząśnięciu pozostawialiśmy ją przez 24 h w t⁰ pokojowej, a gotowanie jej lub sączenie bez uprzedniego gotowania („ekstrakt na zimno“) odbywało się dopiero po tych 24 h. Po klarownem odsączeniu ekstraktów przez starannie wymyte sączki określaliśmy P_H ekstraktu.

Poniżej, w tab. VI przedstawimy działanie temperatury 100° C na skuteczność ekstraktów różnych gleb w porównaniu z ekstraktami, które otrzymano tylko „na zimno”. Ilość ciał, które w obu wypadkach przeszły do ekstraktu, podaje tabl. V w ‰ ekstraktów, których użyto po 250 cm³ do tych oznaczeń.

Tabela V.

Wpływ ekstrahowania gleby na gorąco i zimno.
(Wirkung heisser u. kalter Bodenextrahierung)

	Na gorąco (gotow.) heisse E x t r a c t i o n		Na zimno kalte	
	Such. subst. (Trackensubst.) ‰	popiół (Asche) ‰	Such. subst. (Trackensubst.) ‰	popiół (Asche) ‰
1. Ziemia kompostowa (Komposterde)	0·1227	0·0781	0·0762	0·0341
2. Ziemia ogrodowa piaszczysta (Sandige Gartenerde)	0·0678	0·0313	0·0400	0·0210
3. Piaszczysta ubog. ziemia leśna (Armer, hum-sand. Waldboden)	0·1750	0·0400	0·0720	0·0330
4. Gliniasta urodzajna orna (Lehmiger fruchtb. Ackerb.)	0·0298	0·8185	0·0360!	0·0280!
5. Głina garncarska, surowa (Rohr Töpferlehm)	0·0191	0·0161	0·0189	0·0166

Z tab. VI wynika, że ekstrakty użyte wogóle były słabo czynne. Poza tem okazuje się, że ilość substancyj stałych przechodzących z gleby do roztworu, nie jest proporcjonalną do skuteczności ich, a zależną jest przedewszystkiem od natury tych substancyj. Ekstrakt z gleby leśnej, gotowany, zawierał blisko 3 × ilość suchej substancji co ekstrakt gotowany z ziemi ogrodowej, a 6 ×, co ekstrakt gleby gliniastej. Skuteczność zaś jego na wiązanie azotu była słabsza niż ziemi ogrodowej a mniejwięcej tylko równa ekstraktowi z gliny. Jeszcze jaskrawiej objawia się ta dysproporcjonalność przy porównaniu działania urodzajnej gliny i gliny garncarskiej, której ekstrakt wogóle bardzo słabo tylko działał. Z porównania skuteczności ekstraktów „na gorąco” i „na zimno” wynika, że ekstrakty „na zimno” działają, użyte w równej ilości co „na gorąco”, naogół słabiej. Jeżeli jednak działanie ich mierzylibyśmy nie objętością płynu a ilością w nich zawartych substancyj stałych, tak organicznych jak mineralnych, to należy przyznać, że skuteczność ekstraktów „na zimno” jest większa niż „na gorąco”; ekstrakty te bowiem zawierały, z wyjątkiem gliny uprawnej, znacznie mniej stałych substancyj niż ekstrakty

Ekstrakty z różnych gleb. (Extrakte aus verschiedenen Böden).

Przybytek *N* — (Gewinn) mg

Ilości ekstraktów (Extraktmenge)	50 cm ³	25 cm ³	10 cm ³	5 cm ³	H ₂ O font.	H ₂ O dest.
1. Ziemia kompostowa (Komposterde)						
a) gotowana (gekocht)	12·8 ± 0·7	7·4 ± 0·45	4·4 ± 0·36	4·5 ± 0·42	1·14 ± 0·28	0·41 ± 0·12
b) niegotowana (ungekocht)	7·4 ± 0·35	4·9 ± 0·5	4·2 ± 0·3	—	—	—
2. Ziemia ogrodowa (Gartenerde)						
a) gotowana (gekocht)	9·6 ± 1·1	8·2 ± 0·45	6·5 ± 0·26	4·6 ± 0·34	—	—
b) niegotowana (ungekocht)	8·2 ± 0·4	6·3 ± 0·7	—	4·6 ± 0·30	—	—
3. Ziemia leśna uboga (Arme Walderde)						
a) gotowana (gekocht)	5·3 ± 0·65	3·4 ± 0·52	4·0 ± 0·17	2·4 ± 0·19	—	—
b) niegotowana (ungekocht)	7·8 ± 0·36	5·7 ± 0·23	—	—	—	—
4. Ziemia glin. urodz. (Fruchtb. Lehmb.)						
a) gotowana (gekocht)	5·5 ± 0·16	5·7 ± 0·14	—	—	—	—
b) niegotowana (ungekocht)	6·4 ± 0·24	5·9 ± 0·32	4·0 ± 0·28	—	—	—
5. Gлина garncarska (Roher Töpferlehm)						
a) gotowana (gekocht)	1·96 ± 0·14	1·5 ± 0·27	1·43 ± 0·1	1·16 ± 0·1	—	—
b) niegotowana (ungekocht)	2·86 ± 0·16	2·08 ± 0·14	—	1·56 ± 0·08	—	—

„na gorąco“, a mimo to skuteczność ich nie była słabsza w tym samym stosunku.

Większą zawartość stałych substancji w ekstrakcie „na zimno“ z uprawnej gliny tłomaczymy sobie strąceniem przez temperaturę (Hitzeokoagulation) jej kolloidów, głównie nieorganicznych, na co wskazuje również blisko równa zawartość suchej substancji ekstraktów z gliny garncarskiej. Kompost, ziemia ogrodowa i leśna, jako piaszczyste, zawierały natomiast dużo substancji organicznych, co wynika z różnic między ilością całkowitej suchej substancji a ilością popiołów i oddały do wody podczas gotowania więcej swych ciał

stałych niż „na zimno“. Być też może, że wobec temperatury 100° obfitsze składniki organiczne tych gleb działały jako substancje czy koloidy „ochronne“ w stosunku do ciał mineralnych.

Wniosek ogólny dający się wyprowadzić z powyższych doświadczeń jest ten, że temp. wrzącej wody w ciągu 1 h działająca osłabia skuteczność stałych ciał glebowych przechodzących do ekstraktu wodnego a wpływających korzystnie na wiązanie azotu przez *azotobaktera*.

b) Ogólny charakter grupowy ciał glebowych.

a) Zapomocą niniejszego doświadczenia pragnęliśmy rozstrzygnąć kwestję, do jakiej kategorii ciał należą te czynne substancje, znajdujące się w glebie, a zatem, czy są one natury organicznej czy mineralnej, stałe czy lotne, wrażliwe na wyższą temperaturę czy niewrażliwe. W tym celu posługiwaliśmy się ekstraktami z 3 gleb użytych w poprzednim doświadczeniu, a mianowicie: piaszczystej ogrodowej, leśnej i uprawnej gliniastej.

Do doświadczeń użyliśmy: a) ekstraktów „na zimno“ jako takich, b) odpowiadające ilości such. subst. tych ekstraktów odparowanych w próżniowej suszarce przy 46—48°, c) popioły tych ekstraktów, d) destylaty ekstraktów i e) pozostałość podestylacyjną (destylowano przy 100°), wynoszącą mniej więcej $\frac{1}{3}$ objętości destylacji podanego ekstraktu. Wynik doświadczenia zawiera tab. VII.

Z rezultatów tego doświadczenia wynika, że charakter badanych ciał czynnych nie jest jednolity. Naogół największą aktywność wykazały ekstrakty, użyte jako takie. Działanie wszystkich innych postaci ekstraktów było naogół słabsze. Nawet odparowanie do sucha przy dość niskiej temp., bo 46—48°, wpłynęło niekorzystnie, skąd można wnioskować, że przy odparowywaniu do sucha część ciał czynnych uległa zniszczeniu lub się też ulotniła, lub ostatecznie, że powstały ciała hamujące aktywność innych. Za słusznością przypuszczenia, że słabsze działanie suchej substancji spowodowane zostało ulotnieniem się części ciał czynnych przemawia fakt, że wszędzie działały, jakkolwiek bardzo słabo, destylaty ekstraktów i że suma działania destylatów + pozostałości podestylacyjnej przewyższa, choć nieznacznie, działanie odparowanej suchej substancji. Szkoda, że nie poprowadziliśmy destylacji do sucha! Co do popiołów, to wykazały one wszędzie mniej więcej tę samą skuteczność co sucha substancja niespopielona.

Wnioski zatem ogólne, które z powyższego doświadczenia wyprowadzić można, dadzą się streścić następująco:

1. Głównym czynnikiem czynnym w ekstraktach glebowych „na zimno” są składniki mineralne, stałe.

2. Obok nich, w różnym stopniu w zależności od charakteru gleby, występują w ekstraktach glebowych ciała lotne, w większym

Azotobacter P₃, 27° C. **Tabela VII.** 14 dni (Tage). 16. VII. 27.
Ziemia ogrodowa, leśna i urodzajna gliniasta. (Garten- Wald- u. fruchtbarer Lehm Boden).

	Ekstrakt		Sucha subst. ekstraktu (Extraktsubstanz)		Destylat ekstraktu (Extrat-Destillat)		Pozostałość podestylac. (Destillationsrückstand)		Popiół z ekstraktu (Extraktasche)		H ₂ O	
	50 cm ³	10 cm ³	50 cm ³	10 cm ³	50 cm ³	10 cm ³	50 cm ³	10 cm ³	50 cm ³	10 cm ³	font.	dest.
Przybytek N (Gewinn) mg												
1. Ziemia ogrod. (Gartenerde)	8·4 ± 0·42	4·9 ± 0·26	6·3 ± 0·34	4·6 ± 0·18	1·4 ± 0·14	1·2 ± 0·32	5·90 ± 0·26	4·20 ± 0·34	6·5 ± 0·16	4·6 ± 0·22	1·8 ± 0·26	0·52 ± 0
2. Ziemia leśna (Waldboden)	6·5 ± 0·3	5·3 ± 0·4	3·8 ± 0·72	4·3 ± 0·27	0·4 ± 0·2	0·6 ± 0·18	—	4·14 ± 0·26	7·9 ± 0·8	4·9 ± 0·3	—	—
3. Ziemia glin. (Lehm Boden)	7·8 ± 0·32	—	5·8 ± 0·24	5·2 ± 0·44	0·44 ± 0·16	0·42 ± 0·18	6·7 ± 0·65	5·2 ± 0·36	6·8 ± 0·17	5·0 ± 0·23	—	—

odsetku całkowitej „aktywności” w urodzajnej glebie próchnicznej (około 20%) (ziemia ogrodowa), w słabszym stopniu w ubogiej glebie (około 10%) (leśna), a w najsłabszym w glebie gliniastej (około 8%). Lotne te ciała nie są związkami azotu, gdyż objawiłoby się to w kon-

trolach niezaszczepionych, kontrole zaś te wykazały tę samą ilość azotu co pożywka standartowa, mianowicie 0.14 mg.

β) Dla uzupełnienia odpowiedzi na pytanie, czy ciała czynne są wrażliwe na temperaturę wyższą czy nie, na co częściowo odpowiadają doświadczenia zawarte w tab. VIII, wykonano następujące doświadczenie: Ekstrakt „na zimno“ z ziemi ogrodowej rozdzielono na 3 części, z których jedną autoklawowano przy 3 atm. przez 3 h, drugą gotowano na łaźni wodnej przez 1 h, trzecią zaś część przesączono przez świecę Chamberlanda do wysterylizowanego receptora. Te 3 porcje dodano w dwojakiej ilości do pożywek standartowych. Autoklawowany i gotowany ekstrakt sterylizowano po dodaniu do pożywki jak zwykle, chamberlandowany ekstrakt natomiast dodano do uprzednio już wysterylizowanej w kolbach pożywki, a więcej skoncentrowanej odpowiednio do ilości doprowadzonego ekstraktu. Wyniki zestawiono w tab. VIII.

Az. P₃. 27—28° C.

Tabela VIII.

14 dni. 6. II. 29.

Ziemia ogrodowa. — (Gartenerde).
Ekstrakt „na zimno“. — (Kalter Bodenextract).

	50 cm ³ ekstraktu 10 cm ³		H ₂ O dest.
	Przybytek mg N — (Gewinn)		
Niegotowany (Ungekocht)	18.32 ± 0.10	7.27 ± 0.48	0.65 ± 0.17
Gotowany (Gekocht)	7.94 ± 0.05	5.44 ± 0.03	
Autoklawowany (Im Autoclav 3 Atm. 3 h)	0	4.06 ± 0.90	

Z powyższej tab. wynika, że bardzo znaczna część „aktywności“ ekstraktów glebowych polega na substancjach wrażliwych na t⁰. Uchodziło to dotąd naszej uwadze, gdyż normalnie stosuje się sterylizację po dodaniu już do niej ciał badanych na ich skuteczność. Doświadczenie powyższe przeprowadziliśmy raczej *contre coeur*, w imię raz już ustanowionej zasady, a bynajmniej nie w oczekiwaniu takich wyników, zwłaszcza, kiedy z doświadczeń podanych w tab. VII wnioskowaliśmy, że głównymi czynnymi ciałami glebowymi są składniki ich mineralne. Wynik autoklawowania był narazie dla nas również nieoczekiwanym, gdyż przypuszczaliśmy, na podstawie poprzed-

nich doświadczeń, że czynność ciał mineralnych nie ulegnie pod wpływem temperatury stosowanej żadnej zmianie.

Zapewne tak jest i istotnie, a z różnicy szkodliwości autoklawowania ekstraktu w ilości 50 wzgl. 10 cm^3 można wnioskować, że ilość ciał szkodliwych czy trujących, powstałych podczas autoklawowania, była tak wielka, iż zniósła całkowicie korzystne działanie czynnych ciał mineralnych, przy użyciu zaś 10 cm^3 autoklawowanie obniżyło tylko skuteczność ekstraktu, nie niwecząc jej jednak całkowicie.

A zatem: „Aktywność“ gleby polega w znacznej mierze na wartości jej w ciała wrażliwe na temperaturę, a rozpuszczalne w wodzie, w mniejszym zaś stopniu na stałych ciałach mineralnych.

c) Wpływ reakcji płynu ekstrahującego.

W wykonaniu zakreszonego sobie planu doświadczeń przystąpiliśmy do zbadania wpływu reakcji płynu ekstrahującego na czynne ciała glebowe. Wyniki jednak poprzedniego doświadczenia wpłynęły na całkowitą zmianę tak zakresu jak i szczegółów tego planu. Przeprowadziliśmy tylko jedno doświadczenie przy zastosowaniu bardzo łagodnych odchyień ekstrahującej wody od reakcji obojętnej ze względu na przypuszczalny charakter wrażliwych na t^0 ciał. Zakwasiliśmy wodę kwasem siarkowym bardzo słabo, do P_H 5·89 (sama posiadała P_H 6·08) a ługiem sodowym do P_H 7·20 i 8·42. Toteż te tak słabe różnice w reakcji wody ekstrahującej nie odbiły się na ekstraktach prawie zupełnie, gdyż ekstrakty „kwaśny“ i „neutralny“ posiadały P_H 6·56 względnie 6·62, a ekstrakt „alkaliczny“ 7·18. Rozumie się, że ekstrahowaliśmy na zimno i dodawaliśmy do przesterylizowanych pożywek ekstrakty jałowo przesączone przez świece Chamberlanda. Użyto ziemi ogrodowej, tej samej, co w poprzednim doświadczeniu. Wyniki podaje tab. IX (str. 233).

Z powyższej tabelki wynika, że różnice w P_H ekstrahującej wody nie ujawniały się prawie wcale. Z działania różnych ilości ekstraktów możnaby wywnioskować, że w 50 cm^3 zawarta była taka ilość ciał czynnych, które spowodowanego efektu już przez 25 cm^3 więcej nie potęgowały, że natomiast przy dawkowaniu „węższem“, między 5 a 25 cm^3 , byłyby się prawdopodobnie ujawniła pewna proporcjonalność między wysokością dawki ekstraktu, a efektem jej, proporcjonalność, której nie mogliśmy się doszukać w poprzednich doświadczeniach, operując bezwiednie już znacznie zdezaktywowanymi przez temperaturę ekstraktami.

Zreasumowane wyniki powyższych doświadczeń nad działaniem

Azotobacter P. 27° C.**Tabela IX.**

14 dni (Tage). 19. IX. 27.

Ziemia ogrodowa. — (Gartenerde).

Wpływ reakcji podczas ekstrahowania gleby.

(Einfluss der Reaktion während der Bodenextrahierung).

Ilość ekstraktu niegot. (Extractmenge ungekocht)	50 cm ³	25 cm ³	5 cm ³	0 (H ₂ O font.)
	Przybytek N — (Gewinn) mg			
Kwaśny ekstrakt (P _H 5·89) (Saurer Bd-Extract)	18·3±0·41	16·56±0·14	3·7 mg ± 0·22	1·2 ± 0·16
Zasadowy ekstrakt (P _H 8·42) (Alkalischer Bd-Extract)	17·6±0·36	15·90±0·24	4·2 ± 0·28	
Neutralny ekstrakt (P _H 7·20) (Neutraler Bd-Extract)	19·1±0·46	16·32±0·18	4·17 ± 0·21	

gleby na wiązanie azotu przez *azotobaktera* są następujące: Badana przez nas gleba (bo tylko jedną, ogrodową, stosowaliśmy we wszystkich doświadczeniach) działa przez czynniki trójakiego rodzaju: 1) przez ciała wrażliwe na temperaturę, przyczem t° 100° w ciągu 1^h prawdopodobnie nie niszczy ich całkowicie, czyni to atoli t° = 144° C; 2) przez ciała mineralne nietłoczne, nadające ekstraktom gotowanym główną część ich skuteczności, i 3) przez ciała lotne, nadające nawet ekstraktom gotowanym kilka do kilkunastu % ich skuteczności całkowitej.

Wnioski powyższe otwierają nowe a szerokie pole do dalszych badań.

2. Ekstrakty z organizmów.

Stosownie do ogólnego planu naszej pracy, a mianowicie zbadania działania takich czynników jak witaminy, bios i auximony na wiązanie azotu przez *azotobaktera*, przystąpiliśmy do tej grupy czynników.

a) Działanie bakterji „z”,

Z badań Beijerincka wiadomem było, iż *azotobakter* w obecności pewnych bakterji, niezdolnionych do wiązania azotu, wiąże ten pierwiastek w znacznym stopniu. Posiadaliśmy w naszej kolekcji bezsporową bakterję, od której udało nam się uwolnić jeden ze szczepów *azotobaktera* dopiero po długich wysiłkach. Bakterję tę prowadziliśmy pod laboratoryjną nazwą „z”. Również p. K o t k ó w n a posiadała swego „towarzysza”, odmiennego od naszego „z”, który molestał ją przez dobre 2 lata. Postanowiliśmy przeto zbadać wpływ tych

bakteryj na *azotobaktera*. Przeprowadziliśmy równolegle do doświadczeń p. K o t k ó w n y nad jej „towarzyszem“ cały szereg doświadczeń orjentacyjnych nad działaniem bakterji „z“ na *azotobaktera*. Wobec jednak ogłoszonych już wyników p. K o t k ó w n y, zestawionych w jej pracy w tab. XVI – XVIII i XXII, nie podamy naszych wyników z „z“, gdyż nie wyłoniły się żadne zasadnicze lub jakościowe różnice, różnice zaś ilościowe wywołane były niewątpliwie przez odmienny rodzaj pożywek i samych „towarzyszących“ bakteryj.

Z doświadczeń nad znaczeniem bakterji „z“ dla *azotobaktera* podamy tylko jedno, różniące się tem od opublikowanych doświadczeń K o t k ó w n y (p. 66 tab. XXII), że dodano chamberlandowany przesącz do uprzednio już wysterylizowanej pożywki, tak że przesącz ta nie podlegała, jak u K o t k ó w n y, żadnej sterylizacji. 2. V. 1928 zaszczerpiono 1 l H_2O dest. z 10 g cukru trzcinowego i 10 mg $(NH_4)_2 HPO_4$ bakterją „z“ i po 3 dniach, kiedy pożywka silnie zmętniała, przesączono ją przez Chamberlanda i dodano do sterylizowanych pożywek standartowych, odpowiednio do zamierzonej ilości dodatku tej przesączu jałowej, zagęszczonych. Ponieważ bakterja „z“ zakwasiła swą pożywkę dość silnie, dodano uprzednio do każdej kolby po 50 mg $CaCO_3$ celem zneutralizowania kwaśnego przesączu i wyrównania reakcji między grupami o różnej dawce przesączu. Wyniki zawiera tab. X.

Azotobacter A. 26—28° C

Tabela X.

17 dni (Tage). 5. V. 1928.

Wpływ chamberlandowanego przesączu bakterji „z“.
(Einfluss einer kerzenfiltrierten Kultur des *Bact.* „z“.

Ilość przesączu (Menge d. Kerzenfiltrats)	Przybytek mg N — (Gewinn)			
	90 cm ³	50 cm ³	10 cm ³	0
Zaszczepiono: (Beimpft mit)				
1. <i>Azotobakter</i> szczep A Stamm A	18.51 ± 0.46	13.10 ± 0.65	4.85 ± 0.32	1.18 ± 0.07
2. + „towarzysz“ F. Kotek „Genosse“	28.58 ± 0.21	24.45 ± 0.92	6.34 ± 0.08	2.83 ± 0.10
8. + <i>Bact.</i> „z“	2.25 ± 0	1.56 ± 0.04	6.14 ± 0	2.94 ± 0.06

Z danych powyższej tab. (X) wnioskujemy, że bakterja „z“ wytwarza albo z niej powstaje jakieś ciało w bardzo silnym stopniu

stymulując *azotobaktera*; stymulacja ta potęguje się jeszcze w obecności „towarzysza” K o t k ó w n y. Natomiast na *azotobaktera* w obecności „z” ciało to nie wpływa prawie wcale, o ile jest obecne w większej ilości (90 i 50 cm³ na 100). W mniejszych ilościach (10 na 100) natomiast stymuluje *azotobaktera* podobnie jak to czyni w stosunku do samego tylko *azotobaktera* lub znajdującego się wspólnie z „towarzyszem”. Poza tem obecność „z” wpływa w pożywce standardowej tak korzystnie (choć słabo) na *azotobaktera* jak czyni to „towarzysz” K o t k ó w n y. Wyniki te są trudne do wytłumaczenia. W toku dalszych badań sprawa oddziaływania bakterji „z” na *azotobaktera* skomplikowała się do tego stopnia, iż rezygnujemy z przytoczenia tych wyników, których do dziś w zadawalniający sposób interpretować nie potrafimy.

Pragnęlibyśmy tu tylko króciutko wspomnieć, dla zachowania ewentualnego priorytetu, że przesącze chamberlandowanej hodowli tej bakterji na wodzie destylowanej z 1% cukru trzcinowego, 5 mg (NH₄)₂ HPO₄ i 5 mg K₂ HP₄ dawały, poza innymi komplikacjami, nawet po spopieleniu ich wyraźne efekty stymulujące *azotobaktera*, kiedy przesącze o identycznym składzie analitycznym, niezaszczone bakterją „z”, zupełnie żadnych nie wykazywały działań.

Przejdziemy zatem lepiej do zreferowania doświadczeń z ekstraktami drożdży, których wyniki przedstawiają się w interpretacji ich daleko prościej i jaśniej.

b) Działanie ekstraktów drożdżowych.

W grupie tych doświadczeń postępowaliśmy zawsze następująco: 250 gr świeżych drożdży piekarskich zalewaliśmy pod toluolem 2 litrami wody destylowanej, niekiedy słabo zakwaszonej lub zalkalizowanej. Po silnem wstrząśnięciu i wymieszaniu suspensji tej wstawialiśmy ją na 24—48 h do termostatu przy 28° C, poczem sączyliśmy zawsze przez Chamberlanda. Ekstrakty w ten sposób otrzymane dodawaliśmy jako jałowe-niegotowane, gotowane, autoklawowane i spopielaone w różnych ilościach do standardowej pożywki dla *azotobaktera*. Poniższe tab. XII—XV zawierają wyniki.

Do doświadczeń, których wyniki podaje tab. XI, użyto dwu przesączy, *a* i *b*, różniących się między sobą tylko stopniem reakcji. *a* przez zakwaszenie ekstrahującej wody miał P_H 4·85, *b* zaś P_H 8·50.

Powyższe wyniki wykazują, że w drożdżach autolizowanych zawarte są w stosunku do *azotobaktera* wysoce czynne ciała, które przy kwaśnej reakcji są wrażliwsze na działanie temperatury = 100° niż przy reakcji zasadowej; t⁰ 100° C prawie wcale w słabszych

Ilość ekstraktu (Extractmenge)	90%	50%	10%	0 H ₂ O font.
a) P _H 4·85				
1h Gotowany (Gekocht)				
N przybytek (Gewinn) — mg	3·3 ± 0·85	7·6 ± 0·40	5·2 ± 0·60	1·2 ± 0·2
Niegotowany (Ungekocht)				
N przybytek (Gewinn) — mg	16·3 ± 0·84	11·4 ± 0·63	7·2 ± 0·28	
b) P _H 8·50				
1h Gotowany (Gekocht)				
N przybytek (Gewinn) — mg	4·7 ± 0·65	10·9 ± 0·82	10·3 ± 0·45	1·3 ± 0·15
Niegotowany (Ungekocht)				
N przybytek (Gewinn) — mg	13·2 ± 0·26	12·8 ± 0·65	10·0 ± 0·58	

koncentracjach zasadowych ekstraktów nie osłabia skuteczności tych ciał.

Doświadczenie następne wykonano z ekstraktem drożdży otrzymanym przez działanie neutralną wodą destylowaną. P_H ekstraktu Chamberlandowanego = 6·90. Zawartość suchej substancji tego ekstraktu wynosiła 0·129%, popiołu zaś 0·051%. Doświadczenie wykonano z różnemi ilościami ekstraktów w stanie niegotowanym, gotowanym, autoklawowanym i spopielonym. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono w tab. XII (str. 237).

Wyniki powyższe dają w całości obraz podobny, jak wyniki z ekstraktem glebowym, zawarte w tab. VIII. Ekstrakt niegotowany daje, zwłaszcza w większych koncentracjach, znacznie lepsze wyniki niż ekstrakt gotowany, ekstrakt zaś autoklawowany, w dużej koncentracji (90% ekstraktu) działa bardzo szkodliwie, w mniejszych koncentracjach działa jak ekstrakt gotowany. Popiół działa wszędzie tak samo jak ekstrakt gotowany.

Wyprowadzamy z doświadczenia powyższego następujące wnioski:

1) Czynniki, wrażliwy na temperaturę 100° C znajduje się w ekstrakcie w tak nieznacznej ilości, że zwiększanie koncentracji ekstraktu objawiało się zupełnie wyraźnie w przyroście *N* związanego. Jest on zatem bardzo wrażliwy nie tylko na t°, ale zapewne również na drobne

Azotobacter P₃. 27° C.**Tabela XII.**

17 dni (Tage). 12. VI. 28.

Ekstrakt z drożdży. — (Hefenextract).

Ilość ekstraktu (Extractmenge)	90 ⁰ / ₀	50 ⁰ / ₀	25 ⁰ / ₀	5 ⁰ / ₀	0 H ₂ O font.
Niegotowany — (Ungekocht)					
<i>N</i> przybytek (Gewinn) — <i>mg</i>	18.3 ± 0.95	13.7 ± 0.65	7.4 ± 0.50	7.3 ± 0.75	1.3 ± 0.1
1 ^h Gotowany przy 100° C (Gekocht bei)					
<i>N</i> przybytek — (Gewinn) <i>mg</i>	7.9 ± 0.42	8.2 ± 0.36	7.3 ± 0.24	4.4 ± 0.30	
3 ^h Autoklawany przy 144° C (Gekocht bei)					
<i>N</i> przybytek — (Gewinn) <i>mg</i>	0	6.5 ± 0.55	6.9 ± 0.32	4.0 ± 0.24	
Popiół ekstraktowy (Extract- asche) <i>mg</i>	45.9	25.5	12.75	2.55	
<i>N</i> przybytek (Gewinn) — <i>mg</i>	7.4 ± 1.2	6.9 ± 0.16	6.1 ± 0.35	4.9 ± 0.8	

wahania P_H . Niedziałanie jego w grupie kolb z 25 cm^3 ekstraktu tłumaczy sobie bowiem tym faktem, że pożywka w nich, przy określaniu P_H tuż przed ich likwidacją wykazała — z niewiadomych nam przyczyn, najniższe z pośród wszystkich P_H . Kiedy we wszystkich innych kolbach P_H wahało się niewiele wokoło 8.0, w tej grupie wynosiło ono 7.23 do 7.44; bardzo więc być może, że to P_H było już szkodliwe dla czynnika — w tym środowisku — (więc w naszej pożywce sztaendartowej) w jakim się znajdował. 2) Czynnikiem drugim, aktywującym wiązanie *N* przez *azotobaktera*, jest czynnik nielotny, a jak seria z popiołami wykazuje, natury mineralnej. Ilość jego w ekstrakcie użytym była stosunkowo większa, niż czynnika wrażliwego na temperaturę, gdyż różnice działania jego w obrębie bardzo znacznych granic koncentracyjnych (od 5—90 cm^3) wahają się bardzo mało, a od 25 do 90 cm^3 ekstraktu wcale. Znaczy to, że ilość jego, zawarta w 25 cm^3 wystarcza do spowodowania optymalnego jego w warunkach badanych efektu, a dopiero zmniejszenie jego koncentracji 5-krotne (w 5 cm^3 ekstraktu) wyraża się nieznacznym obniżeniem jego działania.

Dalsze badania odsłoniły nam ogromne trudności przy próbach systematycznego przesłedzenia działania ekstraktów z drożdży. Następane poniżej podane doświadczenie przeprowadziliśmy w sposób identyczny, tylko z tą różnicą, że odpadła grupa kolb z ekstraktem autoklawo-

wanym na którego miejsce weszła grupa z suchą substancją ekstraktu odparowanego przy 50° C. Pozatem drożdże piekarskie były poddane autolizie tylko przez 24^h, a nie przez 48^h, jak w doświadczeniu poprzednim. Wynik doświadczenia obrazuje tab. XIII.

Azotobacter A. 27° C.

Tabela XIII.

12 dni (Tage). 6. VII. 28.

Ekstrakty z drożdży. — (Hefenextracte).

	Przybytek <i>N</i> (Gewinn) — mg			
	50 cm ³	25 cm ³	5 cm ³	0
Niegotowany (Ungekocht)	7.96 ± 0.42	7.11 ± 0.21	5.42 ± 0.36	H ₂ O font. 1.07 ± 0.24
1 ^h Gotowany (Gekocht)	3.33 ± 0.82	4.11 ± 0.76	4.24 ± 0.31	H ₂ O dest. 0.32 ± 0.03
Sucha subst. (Extract-Trockensubst.)	2.92 ± 0.40	3.19 ± 0.32	2.99 ± 0.38	
Popiół z ekstraktu (Extractasche)	4.13 ± 0.16	3.91 ± 0.18	2.74 ± 0.16	

Z wyników powyższych wnioskujemy, że 1) autoliza 24-o godzinna daje słabsze wyniki niż autoliza przez 48^h, jak w doświadczeniu poprzednim, gdyż działanie tutaj użytego ekstraktu było słabsze, niż w doświadczeniu poprzednim. Krótsza autoliza obniżyła nie tylko działanie czynnika wrażliwego na t⁰, ale również i czynnika nietłotnego, mineralnego, jakkolwiek obniżenie działania czynnika wrażliwego na t⁰, jest silniejsze niż obniżenie mineralnego. 2) Odparowywanie ekstraktu w suszarce próżniowej przy 50° C działa szkodliwie; tym sposobem otrzymana sucha substancja ekstraktu dała wszędzie gorsze wyniki niż ekstrakt gotowany, i gorsze nawet wyniki, niż jej popiół; nie może to być z powodu ulotnienia się podczas odparowywania jakiegoś aktywnego czynnika lotnego, albowiem popiół działał lepiej, a tylko z powodu powstania jakiejś substancji szkodliwej. W rezultacie i to doświadczenie nakazuje dalsze badanie tych stosunków.

W ostatnim doświadczeniu tej grupy, w tab. XIV przedstawimy wyniki wpływu reakcji wody ekstrahującej. Do suspensji z wodą destylowaną dodawaliśmy kroplami NaOH dla zneutralizowania wzgl. zakwaszenia suspensji, poczem autolizowaliśmy przez 48^h. W tab. XIV podamy wyłącznie wyniki odnoszące się do działania popiołów tych ekstraktów.

Azotobacter A. 26⁰ C.

Tabela XIV.

15 dni (Tage). 26. X. 28

Popioły ekstraktów z drożdży. (Aschen von Hefeextracten).

E k s t r a k t w f 100 cm ³ zawiera popiołu in l (enthält Asche)	N = P _H 7·18 36 mg	A = P _H 8·38 88 mg	K = P _H 6·32 26 mg	H ₂ O font
Dano popiołu (Aschenzusatz) mg	33·0	79·3	23·4	—
N przybytek (Gewinn) mg	10·9 ± 0·64	8·8 ± 0·91	12·2 ± 0·52	0·64 ± 0·16
Popiołu (Aschengabe) — mg	18·0	44·0	13·0	—
N przybytek (Gewinn) mg	4·0 ± 0·14	5·1 ± 0·65	7·8 ± 0·24	— —
Popiołu (Aschengabe) — mg	9·0	22·0	6·5	—
N przybytek (Gewinn) mg	4·2 ± 0·62	5·2 ± 0·41	3·6 ± 0·16	— —
popiołu (Aschengabe) — mg	1·8	4·4	1·3	—
N przybytek (Gewinn) mg	3·1 ± 0·80	2·3 ± 0·17	3·8 ± 0·22	— —

Wniosek ogólny wyprowadzamy z powyższego doświadczenia ten: dodatek ługu sodowego do suspensji drożdży — dla autolizowania ich przy reakcji neutralnej i alkalicznej — odbił się raczej szkodliwie na działaniu popiołów. Przeszło 3-krotna ilość popiołu z ekstraktu zalkalizowanego działała gorzej, niż popiół z ekstraktu kwaśnego (naturalnego), a szkodliwość dodatku Na OH objawiała się na popiołach z tych ekstraktów, użytych w mniejszych koncentracjach, jeszcze szkodliwiej. Należało było raczej próbować ewtl. zwiększenia działania popiołu w ekstraktach przez zakwaszanie autolizowanych drożdży, celem możliwego powiększenia ilości do ekstraktu przechodzących składników popiołowych drożdży. Pozatem bardzo słabo tylko objawia się działanie popiołu w zależności od jego ilości, nawet na popiele z ekstraktu „naturalnego“ (w tab. XV — „kwaśnego“). Ilość związanego N przy 1·3 mg popiołu (z 5 cm³ ekstraktu) jest ta sama co na 6·5 mg (z 25 cm³ ekstraktu), a wzrasta dopiero proporcjonalnie przy następnej dawce (13 mg popiołu z 50 cm³ ekstraktu), z czego wynika, że i działanie popiołu ekstraktów nie jest prostą funkcją a komplikowaną wpływem czynników przez nas jeszcze nie opanowanych. ¹⁾

¹⁾ Niestety, przy likwidacji tego doświadczenia, nie określiliśmy P_H poszczególnych hodowli. Być może, że dodatek 88 mg popiołu (z 90 cm³ ekstraktu zalkali-

Na tem narazie zakończymy referowanie naszych doświadczeń odnoszących się do badania wpływu ekstraktów z drożdży. Wynik ogólny tych doświadczeń jest na ogół ten sam, co doświadczeń z ekstraktami z ziemi ogrodowej. I w nich działają głównie 2 czynniki: jeden wrażliwy na t^0 i drugi nietlotny mineralny.

c) Działanie ekstraktów zwierzęcych.

W tej grupie doświadczeń podamy wyniki tylko jednego doświadczenia, przeprowadzonego z ekstraktami wodnymi i eterowymi kilku organów bydłych, otrzymanych od śp. prof. Szymona Dzierżewskiego w lutym 1927. Dokładnych danych co do sposobu spreparowania tych ekstraktów niestety nie posiadamy. Część ekstraktów wodnych spopieliśmy, a do grupy doświadczeń z ekstraktami eterowymi wprowadziliśmy — dla porównania — oczyszczoną lecytynę. Ekstrakty pochodziły ze śledziony, *ex utero*, *ovario* i *testiculis*. Ekstraktów tych daliśmy po 5 kropli i tyleż popiołu na 100 cm^3 pożywki. Wyniki podaje tab. XV (str. 241).

Wszystkie ekstrakty zawierały więc czynniki aktywujące działalność *azotobaktera*, tak wodne jak eterowe. Działanie wodnych ekstraktów przewyższało działanie eterowych prawie w dwójnasób; zdaje się być pewnem, że działanie to polega prawie wyłącznie na działaniu składników mineralnych, gdyż popioły ekstraktów tych dały wyniki tylko mało słabsze niż ekstrakty wodne; ekstrakty eterowe zaś działały prawdopodobnie tylko dla tego słabiej, że zawierały mniej popiołu. Różnice w działaniu poszczególnych ekstraktów były nieznaczne, a ich działanie, wobec małych dawek, było bardzo znaczne.

Następna tab. XVI (str. 242) zawiera wyniki doświadczenia nad działaniem ekstraktów roślinnych. Podamy tutaj tylko rezultaty osiągnięte z ekstraktami z koleoptil i korzonków pszenicy, żyta i jęczmienia. Postępowaliśmy w ten sposób, że 100 g świeżych koleoptil względnie mniej więcej 2 cm długich korzonków roślin, wykiełkowanych w wodzie destylowanej, rozstarliśmy w misce porcelanowej, dodając stopniowo wody destylowanej (ze szkła, jak zawsze), tak że w całości dodano na 100 g substancji roślinnej świeżej 600 g H_2O . Suspensje przesączyliśmy przez Chamberlanda, część dolali do sterylizowa-

zowanego) działał szkodliwie przez samo nadmierne podwyższenie PH. Że jednak to przypuszczenie nie jest bardzo prawdopodobne, na to wskazywałyby wyniki grupy popiołu z 50 cm^3 ekstraktu, gdzie popiół ekstraktu „neutralnego“, prawie w tej samej ilości co popiół z ekstraktu „kwaśnego“ = naturalnego, działał znacznie słabiej, niż popiół ekstraktu naturalnego.

Azotobacter A i *C.* 26° C.**Tabela XV.**

14 dni (Tage). a) 28. II. 27.

b) 24. VII. 31.

Ekstrakty organów zwierzęcych. (Tierische Organextrakte).

Po 5 kropli (Je 5 Tropfen)	Przybytek <i>N</i> (Gewinn) mg
A. Wodne ekstrakty (H ₂ O — Extracte)	
Śledziona — (Milz)	4.6 ± 0.30
Uterus	4.2 ± 0.24
Ovarium	4.4 ± 0.28
Testes	4.6 ± 0.14
B. Eterowe ekstrakty (Äther-Extracte)	
Śledziona — (Milz)	2.4 ± 0.18
Uterus	2.6 ± 0.22
Ovarium	2.3 ± 0.34
Testes	2.6 ± 0.42
Lecithinum puriss.	2.3 ± 0.36
C. Popioły ekstraktów wodnych (Asche d. H ₂ O — Extracte)	
Śledziona — (Milz)	3.9 ± 0.18
Uterus	4.3 ± 0.28
Ovarium	4.1 ± 0.32
Testes	3.8 ± 0.22
H ₂ O font	1.06 ± 0.14

nych pożywek, część sterylizowaliśmy razem z pożywką, część odparowali w suszarce próżniowej przy 46° C, część spopieliiliśmy. Dla kontroli założyliśmy również hodowle z ekstraktami glebowymi tych gleb, z których pochodziły nasiona użyte do doświadczenia. Ekstraktów dodaliśmy wszędzie po 25 cm³. Tab. XVI zestawia wyniki.

Z cyfr powyższych wynika, że ekstrakty wszystkich w tem doświadczeniu użytych roślin były czynne, najsilniej ekstrakty żyta, najslabiej jęczmienia. Ekstrakty niegotowane były czynniejsze niż ekstrakty gotowane, sucha ich substancja lub popioły. Obraz więc ogólny podobny do tego, jaki wyłaniał się w doświadczeniach nad działaniem ekstraktów glebowych i drożdżowych. Uderza w tych doświadczeniach niezrozumiałe dla nas działanie słabe ekstraktów gotowanych i suchej substancji pszenicy (korzonków), a szkodliwość

Ekstrakty ze zbóż. (Getreideextracte).

	<i>Triticum vulg.</i>		<i>Secale cer.</i>		<i>Hordeum dist.</i>	
	Koleoptile	Korzonki (Wurzelchen)	Koleoptile	Korzonki (Wurzelchen)	Koleoptile	Korzonki (Wurzelchen)
Przybytek N — (Gewinn) mg						
Niegotowany (Ungekocht)	6·2 ± 0·18	5·1 ± 0·19	18·7 ± 0·18	9·6 ± 0·26	—	—
Gotowany (Gekocht)	0	2·2 ± 0·20	11·2 ± 0·05	5·4 ± 0·06	1·1 ± 0·08	2·8 ± 0·10
Sucha subst. (Trockensubst.)	0	2·0 ± 0·20	10·9 ± 0·04	3·0 ± 0·16	1·3 ± 0·10	1·7 ± 0·18
Popiół (Asche)	2·6 ± 0·42	4·2 ± 0·36	12·71 ± 0·16	5·2 ± 0·28	—	3·4 ± 0·17
Odpowiedni ekstrakt ziemi (Entsprechender Bodenextract)	3·9 ± 0·16		6·2 ± 0·24		4·2 ± 0·46	
25 cm ³						
„ 10 cm ³	2·7 ± 0·20		5·1 ± 0·42		3·9 ± 0·17	
Pożywka synt. (Synt. Nährlösung)	0·62 ± 0·0					

działania tych substancji z koleoptil pszenicznych. Hodowle z niegotowanym ekstraktem koleoptil z korzeniami jęczmienia były zanieczyszczone, z popiołem przepadły. Jednak wyniki z jęczmieniem zdawałyby się wskazywać na to, że nie istnieje zależność czynności ekstraktów roślinnych od czynności takich ekstraktów z gleby, na której dane rośliny wyrosły, w odniesieniu do czynnika mineralnego. Jednakże ta sprawa jest wszak, jak zgóry przewidzieć można, tak skomplikowanej natury, że mogłyby wnieść może w te stosunki nieco światła dalsze zgóry uplanowane doświadczenia.

Chcąc terminologicznie sprecyzować nazwę czynników, wrażliwych na temperaturę, a działających w ekstraktach niegotowanych czy to ziemi, drożdży czy roślin, użyliśmy preparatów z naukowo ustaloną nazwą „witamin“. Preparaty te, o nieznanym nam sposobie ich spreparowania, zawdzięczamy uprzejmości p. prof. Lelesza, pracującego wówczas w P. Instytucie Higieny w Warszawie, który

nam tych preparatów łaskawie udzielił w czerwcu 1929. Niech nam wolno będzie na tem miejscu złożyć Mu nasze serdeczne podziękowanie. Preparaty te użyliśmy, z wyjątkiem t. zw. witaminy D, jako niegotowane, t. zn. po przesączeniu przez Chamberlanda dodaliśmy je do uprzednio wysterylizowanych pożywek; część preparatów spopieliiliśmy. Preparat witaminy D, którego nie można było (był w tłuszczu) przesączyć, dodaliśmy do uprzednio wysterylizowanej pożywki, poczem pożywkę tę, po dodaniu tej witaminy D, jeszcze pasteryzowaliśmy przy 65° C czterokrotnie.

Wyniki zestawione są w tab. XVII.

Azotobacter C. 28° C.

Tabela XVII.

14 dni (Tage). 23. VI. 29.

Witaminy. (Vitamine).

Witamina	1 cm ³		0.2 cm ³		1 kropla Tropfen		0
	prepar.	popiół (verascht)	prepar.	popiół (verascht)	prepar.	popiół	
<i>B</i>							
<i>N</i> — przybytek (Gewinn) mg	3.82 ± 0.42	1.8 ± 0.24	5.8 ± 0.64	2.1 ± 0.36	4.3 ± 0.36	2.52 ± 0.12	0.63 ± 0.05
<i>C₁</i>							
<i>N</i> — przybytek (Gewinn) mg	6.6 ± 0.67	3.2 ± 0.70	4.3 ± 0.40	2.9 ± 0.18	4.3 ± 0.28	2.68 ± 0.20	
<i>C₂</i>							
<i>N</i> — przybytek (Gewinn) mg	6.8 ± 0.5	—	10.7 ± 0.36	6.3 ± 0.80	—	4.46 ± 0.45	
<i>D</i>							
<i>N</i> — przybytek (Gewinn) mg	6.1 ± 0.9	—	3.5 ± 0.42	—	—	3.56 ± 0.26	

Widzimy, że wszystkie badane witaminy, B, dwa preparaty witaminy C (*C₁* i *C₂*) i witamina D, były w silnym stopniu czynne, najczynniejsza witamina *C₂*, koloru zielonego, widocznie ekstrakt z jakichś liści. Zważywszy ilości tych preparatów (1 kropla do 1 cm³ na 100 cm³ pożywki), czynność tych preparatów w porównaniu z naszymi ekstraktami z różnych substancyj wzgl. organizmów była bardzo duża. Najciekawszym jest jednak fakt, że czynność preparatów witaminowych — w odniesieniu do *azotobaktera* — polega również na działaniu 2 grup ciał — czynnika prawdopodobnie wrażliwego na t⁰ (u poszczególnych witamin znane, sami nie mogliśmy doświadczenia dla zbadania efektu sterylizowania tych preparatów prze-

prowadzić, nie posiadając ich w dostatecznej ilości) i czynnika mineralnego (popiół). Popioły wszystkich próbowanych witamin były czynne, w wit. C₂ i D (1 kropla!) szczególnie czynne.

Nie odważamy się jednakże wysunąć z powyższych doświadczeń najogólniejszego wniosku, a mianowicie, że działanie witamin (wit. A nie badaliśmy!), wogóle polega na skombinowanym działaniu jakiegoś czynnika mniej lub więcej wrażliwego na temperaturę, prawdopodobnie natury organicznej, i czynnika mineralnego.

Z wyników wszystkich poprzednio zreferowanych doświadczeń można wnioskować, że do działalności (wiązania azotu) *azotobaktera* niezbędne są jakieś czynniki mineralne i czynniki wrażliwe w różnym stopniu na temperaturę, noszące miano *auximonów* (ekstrakty gleby), „Wuchstoffe“ czy „groeastoffen“ w sensie W e n t'a, *bios* (w drożdżach, w sensie Wildier'a) i witaminy (preparaty ich, ekstrakty drożdży, z których zwykle preparuje się witaminę B).

Wobec powyższego stanu rzeczy stanęliśmy przed zadaniem bliższego scharakteryzowania tych dwu działających czynników. Poniżej podamy wynik naszych orjentacyjnych w tej dziedzinie badań, odnoszących się do bliższego poznania czynnika mineralnego, która to kwestja wydaje się narazie łatwiejszą.

Punktem wyjścia do tych badań były wyniki jednego z naszych doświadczeń z roku 1928. Badaliśmy wówczas wpływ węgla krwi i innych koloidalnych substancyj na działanie *azotobaktera*. Wyników tych licznych doświadczeń przytaczać nie będziemy, a tylko te, które uzyskano z węglem krwi, dodawanym w różnych ilościach do hodowli na zwykłej standartowej pożywce dla *azotobaktera* czy to w postaci jak najdrobniej zmielonego czy po spopieleniu go. Węgiel ten zawierał bardzo dużo, bo 18·3% popiołu.

Wyniki przedstawia tab. XVIII (str. 245).

Wynika z tej tabeli, że jedynie aktywnym czynnikiem w węglu krwi jest jego popiół, a nie inne substancje lub sam stan koloidalny. Popiół, zwłaszcza w wyższych dawkach, działał nawet daleko lepiej niż węgiel, a zatem w węglu, może z powodu silnej ich absorpcji, składniki mineralne były częściowo unieruchomione. To doświadczenie zdawało się dawać i odpowiedź na pytanie co do natury chemicznej tego czynnika mineralnego: wszak głównym składnikiem mineralnym krwi jest żelazo, nic więc dziwnego, że wówczas i my byliśmy przekonani, że działającym czynnikiem mineralnym we wszystkich naszych ekstraktach było żelazo. Wszak i z wszystkich dawniejszych prób scharakteryzowania tego czynnika często podawano (zwłaszcza Remy i Rösing, ale i Kaserer i częściowo Praž-

Azotobacter C. 26^o C.**Tabela XVIII.**

14 dni (Tage). 12. XI. 29.

Działanie węgla z krwi i popiołu (18·3^o/_o).
 (Wirkung von Blutkohle u. deren Asche (18·3^o/_o).
 Przybytek *N* — (Gewinn) *mg*

5 <i>mg</i> węgla krwi (Blutkohle)	1·75 ± 0·15
0·91 <i>mg</i> popiołu (Kohlenasche)	2·00 ± 0·10
20 <i>mg</i> węgla krwi (Blutkohle)	2·64 ± 0·36
3·7 <i>mg</i> popiołu (Kohlenasche)	3·86 ± 0·14
100 <i>mg</i> węgla krwi (Blutkohle)	4·60 ± 0·52
18·3 <i>mg</i> popiołu (Kohlenasche)	8·35 ± 0·15
200 <i>mg</i> węgla krwi (Blutkohle)	6·64 ± 0·32
36·5 <i>mg</i> popiołu (Kohlenasche)	11·42 ± 0·14
H ₂ O font.	1·0 ± 0·2
H ₂ O bidest.	0·42 ± 0·08

mowski) (w innym związku i Olsen) Fe jako ten właśnie decydujący składnik próchnicowy. Dla upewnienia się co do słuszności tych poglądów przeprowadziliśmy doświadczenie, którego wyniki zestawiamy w tab. XIX.

Doświadczenie wykonaliśmy w ten sposób, że dodawaliśmy popiół jednego bardzo czynnego ekstraktu glebowego w ilościach odpowiadających 20 i 5 *cm*³ tego ekstraktu z dodatkiem 2 dawek cytrynianu żelaza i bez tych dodatków jak i bez popiołu ekstraktu. Oczekiwaliśmy, że dodatek żelaza w słabszej dawce ekstraktowego popiołu (wiedzieliśmy z wstępnego doświadczenia, iż 5 *cm*³ działa znacznie słabiej niż 20 *cm*³ ekstraktu wzgl. odpowiadającego tym ilościom popiołu) podniesie skutek tej słabszej dawki do skutku dawki wyższej.

Wynik przedstawiony jest w poniższej tab. XIX (str. 246).

Wynik doświadczenia zniweczył całkowicie nasze oczekiwania. Dodatek Fe nie tylko nie podniósł aktywności popiołu ekstraktów —

Wpływ Fe w ekstraktach ziemnych. (Fe-Wirkung in Bodenextracten).

			Przybytek N (Gewinn)mg
20 cm ³	Ekstr. ziemi ogrodowej (popiół) (Gartenerdeextract-Asche)		8.9 ± 0.40
"	"	+ 3.5 mg Fe-citr.	4.6 ± 0.32
"	"	+ 0.7 " " "	5.3 ± 0.21
5 cm ³	"		4.4 ± 0.16
"	"	+ 3.5 " " "	3.1 ± 0.30
"	"	+ 0.7 " " "	3.5 ± 0.24
0	"		0.28 ± 0.08
"	"	+ 3.5 " " "	0.83 ± 0.0
"	"	+ 0.7 " " "	0.66 ± 0.12
"	"	+ 0.5 " FeCl ₃	0.46 ± 0.09

ale je obniżył, i to w obu wypadkach, tak przy 20 jak przy 5 cm³, a samo żelazo działało coprawda w hodowlach bez dodatku popiołu ekstraktu glebowego, ale bardzo słabo. Wobec powyższego wyniku — nie zbici narazie z tropu, jak sądziliśmy dobrego — przeprowadziliśmy cały szereg doświadczeń w przekonaniu, że żelazo jest istotnie tym mineralnym czynnikiem aktywnym, a że negatywne wyniki powyższego doświadczenia wskazują na to, że podaliśmy żelazo w nieodpowiedniej formie. W następstwie więc przeprowadziliśmy dużo doświadczeń z przeróżnemi jego związkami, z różnemi jego solami nieorganicznymi i organicznymi, i z próbkami rud żelaznych różnego pochodzenia. Rezygnując z odtwarzania tych dla nas żałosnych w wynikach swych doświadczeń, wspominamy tylko, iż preparaty różnych soli żelaza były tem czynniejsze, im mniej były czystymi — najskuteczniejsze były dawki rud łąkowych, choć skuteczność ich, mierzona ilością związanego przez hodowle azotu, zrzadka przekraczała w 100 cm³ pożywki 2 mg.

W tym stanie rzeczy powróciliśmy do dawnych koncepcyj Prazmowskiego i Söhnge na, dopatrując się przyczyn działania czynników mineralnych w ich stanie fizycznym, ściślej mówiąc, koloidalnym. Powód tego naszego nawrotu do dawniejszych koncepcyj, w tłumaczeniu mechanizmu działania tych koloidów coprawda dość

mglistych, został spowodowany i tem, że rozpuszczone popioły czynne przeróżnych substancyj znajdowały się niewątpliwie częściowo w stanie koloidalnym, bo dodatki ich do pożywek klarownych wywoływały zawsze pewne, choć nieraz bardzo słabe opalizowanie tych pożywek, a prócz tego z wyników różnych własnych doświadczeń wiedzieliśmy, iż wszystkie koloidey, jakie kiedykolwiek stosowaliśmy, dawały zawsze, aczkolwiek nierówne i nieraz słabe, wyniki pozytywne.

Postanowiliśmy więc pójść w „kierunku koloidalnym“, stawiając doświadczenie dla zbadania działania krzemionki koloidalnej, której preparat jako „Silicagel“ zawdzięczamy łaskawości p. prof. Wojciecha Świątosławskiego, któremu i na tem miejscu zań dziękujemy. Wobec tego, że p. prof. Świątosławski nie mógł nam nic pewnego co do czystości tego preparatu powiedzieć, użyliśmy go w stanie takim, w jakim go otrzymaliśmy i po długotrwałej dializie w H_2O dest. e vitro.

Wynik podaje tab. XX. Jedna grupa, z 1 g krzemionki dializowanej, popsuła się niestety.

Azotobacter C. 27° C.

Tabela XX.

14 dni (Tage). 5. V. 31

Żel krzemionkowy (Silicagel).

Ilość (Menge)	1000 mg	500 mg	100 mg	50 mg	10 mg	4 mg	0
Niedializowany (Undialysiert)							
Przybyło <i>N</i> w mg (Zunahme)	11·24 ± 0·65	5·32 ± 0·00	2·96 ± 0·0	2·82 ± 0·06	0·56 ± 0·05	0·42 ± 0·09	0
Dializowany (Dialysiert)		„	„	„	„		
Przybyło <i>N</i> w mg (Zunahme)	—	0·46 ± 0·08	0·52 ± 0·05	0·56 ± 0·05	0·65 ± 0·06	0·52 ± 0·10	0

Wynik doświadczenia powyższego jest tak wyraźny, że pogrzał definitywnie nasze nadzieje wytłumaczenia, usprawiedliwionego faktami, działania czynnika mineralnego jego stanem koloidalnym. „Silicagel“, surowy, dał dobre wyniki, dializowany żadnych. Przystąpiliśmy w następstwie do systematycznych prób nad działaniem różnych pierwiastków, w różnych ich ilościowych i jakościowych kombinacjach.

W tym stanie badań poznaliśmy — co prawda tylko z referatu dość krótkiego — wyniki badań Bortels'a, który stwierdził, że

molibden jest tym poszukiwanym aktywatorem działalności *azotobaktera*. Natychmiast przystąpiliśmy do sprawdzenia molybdeny. Wyniki tego pierwszego naszego doświadczenia z Mo podajemy poniżej (tab. XXI), bo nie są one zgodne, o ile możemy sądzić z treści referatu, z wynikami Bortels'a.

Molibden użyliśmy w różnych dawkach jako H_2MoO_4 w naszej standartowej pożywce.

Azotobacter C. 28° C.

Tabela XXI.

14 dni (Tage). 7. VII. 31.

Molibden (Molybdän).

Ilość Mo w H_2MoO_4 Menge Mo	1·0 mg	0·5 mg	0·1 mg	0·05 mg	0·01 mg	0·004 mg	0
Przybyło N w mg (Zunahme)	1·59 ± 0·24	1·59 ± 0·05	1·73 ± 0·07	1·89 ± 0·10	1·68 ± 0·28	1·64 ± 0·08	0

Widzimy, że molibden działa niewątpliwie, ale skuteczność jego jest nieduża i w żadnej dawce nie osiąga efektu otrzymywanego z ekstraktami wzgl. z popiołami tych ekstraktów. Pozatem zbadałszy wszystkie jeszcze posiadane popioły ekstraktów używanych w dawniejszych doświadczeniach i kilka ekstraktów jako takich, w różnym stanie ich zagęszczenia, na molibden, z wynikiem *negatywnym*. Czułość stosowanych reakcyj była bardzo wielka, n. p. reakcją etylksantogenianową można wykryć jeszcze 0·04 γ molybdeny. Rozumie się, że przeprowadzaliśmy wszystkie reakcje na kontrolnych roztworach molybdeny o różnej koncentracji. Wobec tego nie możemy uważać molybdeny za *jedyny* czynnik mineralny, od którego obecności wyłącznie zależy działanie ekstraktów gotowanych czy ich popiołów.

Starania nasze wyświetlenia tych zagadnień prowadzimy dalej.

4. Streszczenie wyników.

1. Ekstrakty z gleb, z towarzyszących *azobakterowi* bakterij symbiotycznych, z drożdży, z kiełkujących zbóż i preparaty witaminowe działają w stanie niegotowanym na wiązanie azotu przez *azotobaktera* znacznie silniej niż te same ekstrakty w stanie gotowanym.

2. Czynność tych ekstraktów sprowadza się na 2 lub 3 czynniki: a) czynnik wrażliwy na temperaturę, a więc należący do kategorii ciał zwanych „biosem“, „auximonami“ lub „witaminami“, b) czynnik

mineralny, który częściowo jest prawdopodobnie molybdenem, jak to odkrył Bortels, i c) czynnik lotny (w ekstraktach glebowych), którego natury nie określono.

3. Pozytywne działanie różnych substancyj koloidalnych martwych, a głównie mineralnych, polega nie na ich stanie fizycznym, więc koloidalnym, a na czynniku, który można przez dializę skutecznie usunąć.

Zakład fizjologii roślin Uniw. Warszawskiego.

Spis literatury.

1. Bassalik, K. 1931. Pamiętnik III. Zjazdu bot. Słow. w Warszawie.
2. — i J. Neugebauer, 1930. *Compt. rend. Soc. Sc. et Lettr. Varsovie.*
23. Cl. IV. 108.
3. Beijerinck, M. W. 1901. *Cbl. Bact.* II. 7. 561.
4. — 1908. *Versl. K. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 46.
5. — 1910. *Versl. K. Akad. Wetensch.* 13. 1066.
6. — et van Delden, 1902. *Cbl. Bact.* II. 9. 3.
7. Bortels, H. 1930. *Arch. Mikr.* 1. 332. (ref. *Ber. ges. Biol. B.* 59. 1931. 153).
8. Feigel, Fr. 1931. *Qual. Anal. m. H. v. Tüpfelreakt.* Leipzig.
9. Fred, E. B. et Davenport, A. 1918. *Jour. Agric. Res.* 14. 317.
10. — et Hart, E. B. 1915. *Agr. Exp. Stat. Uniw. Wisconsin, Bull.* 35. 35.
11. Gainey, P. L. et Batchelor, H. W. 1923. *Jour. Agr. Res.* 24. 759.
12. Gerlach et Vogel, 1901. *Cbl. Bact.* II. 8. 669.
13. — 1902. *ib.* 9. 80. 817.
14. — 1903. *ib.* 10. 643.
15. Heinze, B. 1904. *Cbl. Bact.* 12. 61.
16. Hills, T. L. 1918. *Jour. Agr. Res.* 12. 183.
17. Itano, A. 1923. *Jour. Bact.* 8. 483.
18. Kaserer, H. 1911. *Ztschr. landw. Vers. Wes. Öst.* 14.
19. Kayser, E. 1921. *Comp. rend. Acad. Sc. Paris.* 172. 1133.
20. — et Delaval. 1924. *ib.* 179. 111.
21. Kotek, F. 1930. *Compt. rend. Soc. Sc. Lettr. Varsovie.* 23. Cl. IV. 107.
22. — 1931. *Acta Soc. Bot. Pol.* 8. 47.
23. Krainskij, A. 1907. *Cbl. Bact.* II. 20. 725.
24. Krzemieniewska, H. 1908. *Bull. Acad. Sc. Cracovie. B.* 445.
25. — 1910. *ib.* 376.
26. Krzemieniewscy, S. i H. 1906. *ib.* 568.
27. Krzemieniewski, S. 1907. *ib.* 746.
28. — 1908. *ib.* 1022.
29. — 1909. *Cbl. Bact.* II. 23. 161.
30. Löhnis, P. 1904. *Cbl. Bact.* II. 12. 464.
31. — et Green, H. H. 1914. *ib.* 40. 52.
32. — et Pillai, N. K. 1907. *ib.* 781.
33. — et Westermann, T. 1909. *ib.* 22. 234.
34. Meyerhof, O. et Burk, D. 1928. *Ztschr. Phys. Chem. A.* 139. 117.
35. Montanari, C. 1917. *Staz. spez. agr. ital.* 50. 69.

37. Newton Friend, N. 1926. Textb. Inorg. Chem., 7. III. (Reece H. Valance et A. A. Eldridge). London.
38. Olsen, C. 1930. Comp. rend. Lab. Carlsb. 18.
39. Pillai, N. K. 1908. Inaug. Diss. Leipzig.
40. Prażmowski, A. 1912. Bull. int. Acad. Sc. Cracovie. Sc. math. nat. B. 855.
41. Remy, Th. et Rösing, G. 1911. Cbl. Bact. II. 30. 349.
42. Rösing, G. 1912. Cbl. Bact. II. 33.
43. Söhngen, N. L. 1913. Cbl. Bact. II. 38. 621.
44. — 1914. ib. 40. 266.
45. Stoklasa, J. 1913. Comp. rend. Acad. Sc. Paris. 157. 879.
46. Trufaut, G. et Bezssonoff, N. 1926. Comp. rend. Acad. Sc. Paris. 182. 663.
47. Werkman, C. H. 1928. Jour. Bact. 14. 335.
48. Yamagato, U. et Itano, A. 1923. Jour. Bact. 8. 521.
49. Zoond, A. 1926. Brit. Jour. Exp. Biol. 4. 105.

Zusammenfassung.

Die Hauptergebnisse unserer mehrjährigen Untersuchungen über die Natur der die $N =$ Fixierung von *Azotobacter chroococcum* stimulierender Faktoren lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

1) *Azotobacter* wächst nicht und bindet keinen Stickstoff in synthetischen Nährlösungen.

2) Sein Wachstum und Stickstoffbindung wird mächtig angeregt durch ungekochte, also durch Porzellankerzen filtrierte und ungekocht den „Standart-Nährlösungen“ zugesetzte Extracte von Böden, von mit *Azotobacter* vergesellschaftet lebenden sporenlosen Bakterien, von Hefen und durch Extracte aus Pflanzen und tierischen Organen wie auch durch Vitaminpräparate (untersucht wurden Vitamine B, C_1 und C_2 und D).

3) Durch Kochen wird — je nach der Herkunft des Extracts, — eine beträchtlicher, oft mehr als 50% seiner Wirkung betragender Betrag zerstört.

4) Die Wirkung gekochter Extracte beruht hauptsächlich auf der Wirkung der im Extract befindlichen Aschenbestandteile, zum geringen Teil, je nach dem Bodencharakter der daraus gewonnenen Extracte, etwa 7—20%, auf der Wirkung flüchtiger Stoffe unbekannter Natur.

5) Est ist nicht Molybdän allein, das die Wirkung von Extractaschen hervorruft, obzwar Molybdän unzweifelhaft einer der aktivierenden Aschenbestandteile ist, aktiver, als irgend ein anderer von uns versuchter Stoff, falls für sich allein angewendet.

6) Die günstige Wirkung kolloidaler Stoffe in Nährlösungen beruht auf deren „Verunreinigungen“. „Silicagel“ z. b. wirkte undialysiert sehr gut, dialysiert fast gar nicht.

7) Kurz zusammenfassend lässt sich folgendes sagen: Die Wirkung von verschiedenen Extracten beruht einerseits auf Temperaturempfindlichen Stoffen, die man „Bios“, „Auximone“, „Wuchsstoffe“ und „Vitamine“ nennt, anderseits auf mineralischen Stoffen, die in jenen Extracten enthalten sind, und deren einer unzweifelhaft Molybdän ist, wie dies schon von *Bortels* festgestellt worden war.

Unsere Untersuchungen werden fortgesetzt.

Pflanzenphysiologisches Institut d. Universität Warschau.