

O stymulującym działaniu szlamu na wiązanie azotu w wodach naturalnych.

La stimulation de la fixation de l'azote libre dans les bassins d'eaux naturels.

Napisał

M. LEBENBAUM

W S T Ę P.

W procesach obiegu materji w wodach naturalnych niewątpliwie jeden z najpoważniejszych czynników stanowią bakterje, (12, 30, 33, 37). Na szczególną uwagę zasługuje grupa bakteryj, wiążących wolny azot rozpuszczony w wodzie (13), dla innych organizmów zupełnie niedostępny. Przez wytworzenie i wprowadzenie związków azotu do obiegu przyczyniają się one do utrzymania równowagi azotowej w danym zbiorniku wody, wyrównując straty azotu, powstałe na skutek działalności bakteryj denitryfikacyjnych. W sprzyjających warunkach mogą bakterje wiążące wolny azot, przyczynić się nawet do wzbogacenia danego zbiornika wody w znaczne ilości azotu. Związany azot zużywają na odbudowę swego białka. Dopiero po ich śmierci, na skutek rozkładu, azot ten staje się dostępny dla innych organizmów.

Do grupy asymilantów wolnego azotu należy zaliczyć przede wszystkim *Azotobaktera* (3), wiążącego azot w warunkach tlenowych oraz *Clostridium Pasteurianum* (9, 54), które wiąże go w warunkach beztlenowych. Poza temi bakterjami w szeregu prac wskazano, iż również niektóre grzybki jak *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Cladosporium herbarum*, *Phoma radidis* *Oxycocci*, zdolne są do wiązania wolnego azotu (48). Dane te, zdaje się, wymagają jednak dokładnego sprawdzenia, ze względu na najzupełniej sprzeczne wyniki, osiągnięte przez różnych autorów przy badaniu zdolności wiązania azotu u identycznych grzybków (45, 46).

Zagadnienie wiązania wolnego azotu przez niektóre niższe glony zostało naogół rozstrzygnięte negatywnie (22, 26). Nieliczne dowody potwierdzające należy raczej przypisać operowaniu materiałem, zanieczyszczonym przez bakterje, wiążące wolny azot.

Rozpowszechnienie tych bakteryj w różnych miejscach morza Północnego i oceanu Indyjskiego stwierdził Keutner (21). Benecke i Keutner (5) stwierdzili również obecność tych bakteryj na niektórych glonach morskich i organizmach fitoplanktonu, zarówno morskiego jak i słodkowodnego. Skłoniło ich to do wyrażenia przypuszczenia o istnieniu stosunku symbiotycznego pomiędzy glonami a powyższymi bakterjami, przyczem glony, wzamian za dostarczone bakterjom węglowodany, otrzymywałyby od nich związki azotowe. Zagadnienie to pozostaje dotąd otwarte wobec braku odpowiednich danych doświadczalnych (31), któreby powyższe przypuszczenia potwierdziły.

Ostatnio znaleziono również *Azotobaktera* i *Clostridium* w jeziorze Genewskim (36) i w ile morza Kaspijskiego (25, 34).

Bliższe badania nad warunkami rozwoju tych bakteryj w wodach słodkich przedsięwzięto na stacji w Wielenbach (12), w związku z doświadczeniami nad nawożeniem stawów rybnych (17, 29, 53, 55). Z osiągniętych dotąd rezultatów wynika, iż przy obecności celulozy oraz zastosowaniu bezazotowych nawozów mineralnych, zwłaszcza związków fosforu, bakterje wiążące azot wolny rozwijają się intensywnie, zwiększając tym zapasy azotu (12).

Zadaniem niniejszej pracy było badanie porównawcze procesu wiązania wolnego azotu w warunkach tlenowych i beztlenowych oraz stwierdzenie jaki wpływ na jego przebieg wywiera szlam, będący podłożem procesów mikrobiologicznych w wodach naturalnych.

BADANIA WSTĘPNE.

Próbki szlamu wydobywano aparatem Apsteina, (Nr. 65 katalogu 7-go f-my W. Schweder, Kiel (—) 50), przenoszono do pracowni w zamkniętych słojach („Weck”), i niezwłocznie szczepiono szlamiem płynne pożywki bezazotowe, rozlewając jednocześnie szalki z agarem bezazotowym. Pożywka bezazotowa składała się z 2% mannitu, 0.02% K_2HPO_4 ,

0.01% $MgSO_4$, 0.01% $CaHPO_4$, agaru dodawano 1.5%. Pozatem rozmieszczano również szlam w szalkach Petriego lub w większych słojach, dodając nieco mannitu. Zwykle w pierwszych kilku dniach przetrzymywano kultury w termostacie przy temperaturze 26°; później zaś po dostatecznym rozwinięciu się bakterij — w temperaturze pokojowej.

W kulturach surowych, szczepionych szlamem torfowym, (ze zbiorników wody stojącej w Drewnicy), spostrzeżono tylko obecność *Azotobaktera*. Bardzo obficie rozwijał się *Azotobakter* w kulturach, szczepionych odwirowanym planktonem z tychże zbiorników wody. Obecności *Clostridium* zarówno przy hodowli w warunkach tlenowych, jakoteż beztlenowych, nie stwierdzono.

W szlamie, zawierającym znaczną ilość składników organicznych, (z fasy Czerniakowskiej), obficie występowało *Clostridium*, natomiast znacznie słabiej — *Azotobakter*.

Obecność zarówno *Azotobaktera* jak i *Clostridium*, na głębokościach 1, 2, i 4 m., stwierdzono w szlamie ze znaczną przewagą składników mineralnych (z jeziora Czerniakowskiego — 19). W kulturach, szczepionych odwirowanym planktonem z tegoż jeziora, rozwinął się obficie *Azotobakter*. W kulturach tych nie zauważono *Clostridium*, nawet przy hodowli w warunkach beztlenowych. Z powyższego szlamu wyizolowano następnie czyste kultury *Azotobaktera* i *Clostridium*.

Oprócz *Azotobaktera* i *Clostridium* pojawiały się częstokroć na pożywkach bezazotowych i inne bakterje, grzybki, czasem cińnice. Jednakże, przy dalszej hodowli na pożywkach bezazotowych lub próbie izolowania, organizmy te albo wcale nie rozwijały się lub też nieznacznie.

DOŚWIADCZENIA ILOŚCIOWE.

Szlam do doświadczeń ilościowych pobierano tylko z jeziora Czerniakowskiego z głębokości 5 m; do wszystkich doświadczeń mniej więcej z tego samego miejsca, (w środku jeziora koło mostu).

Barwa szlamu była ciemno-oliwkowa. Posiadał on charakterystyczny zapach; odrażającego zapachu zgnilizny lub też amonjaku nie stwierdzono. Odczyn wody wyciśniętej ze szlamu był alkaliczny, $pH=8.0$. W pracowni szlam przesiewano przez mosiężne sitko o gęstości oczek 0,5 mm., celem usunięcia musze-

lek, kamyczków i t. p. Zawartość wody w szlamie po przesianiu przez sitko wahała się od 58% do 66%. W szlamie przeważały składniki mineralne. Zawartość substancji organicznych w suchym szlamie wynosiła 5% do 7%. Zawartość azotu — od 0.13% do 0.17%.

Przy próbie oznaczenia ilości bakterij znaleziono, iż na jednakowych pożywkach agarowych bezazotowych, z jednakowej ilości szczepionego szlamu, wyrosło więcej kolonij w warunkach beztlenowych niż w warunkach tlenowych. Z dawki 0.02 g. świeżego szlamu wyrosło, po 5-u dniach przy temperaturze 26°, w warunkach tlenowych 818, a w beztlenowych 1123 kolonij.

Stosowano pożywkę płynną na wodzie wodociągowej lub destylowanej ze szkła, zawierającą 1,8% glukozy, 0.05% K_2HPO_4 z dodatkiem początkowo 0.5% $CaCO_3$ później 1% $CaCO_3$. Odczyn pożywki był słabo alkaliczny $pH < 8$.

Doświadczenia przeprowadzano w kolbach litrowych ze szkła „Pyrex”, zawierających po 200 cm³ powyższej pożywki. Stosowano sterylizację trzykrotną po 20 minut w parze 100°. Kolby przeznaczone dla hodowli w warunkach tlenowych zamykano korkami z waty. Doświadczenia w warunkach beztlenowych nastawiano w kolbach, zamkniętych korkami gumowymi. Przez każdy korek gumowy przeprowadzono dwie rurki szklane zgięte pod kątem prostym. Wszystkie kolby danej serii doświadczeń łączono ze sobą szeregowo, możliwie krótko, przy pomocy grubościennych rurek gumowych. Równoległe kolby poszczególnych doświadczeń oddzielone były od kolb innych doświadczeń filtrami kulkowymi z watą. Korki gumowe, rurki łącznikowe i filtry z watą sterylizowano. Po zaszczepieniu zestawiano razem wszystkie kolby, włączając również do układu manometr rtęciowy, tak skonstruowany, iż jednocześnie służył za wentyl, przez który nadmiar gazów, wytworzonych przy fermentacji, mógł swobodnie uchodzić; stąd ciśnienie wewnątrz kolb było zawsze równe ciśnieniu atmosferycznemu.

Po szczelnem zamknięciu kolb i zalaniu korków i połączeń parafiną, wypompowywano trzykrotnie powietrze, wypełniając każdorazowo kolby azotem z butli. Dla pochłonięcia zanieczyszczeń tlenem przepłukiwano azot w trzech płóczkach z pyrogallem. W odstępach 4-dniowych zmieniano gaz w kolbach. Doświadczenia nastawiano w pokoju, termostacie lub też w pomieszczeniu, w którym przez 12 godzin utrzymywano temperaturę

około 35° ; w następnych godzinach temperatura wyrównywała się z temperaturą pokojową.

W pierwszej serii doświadczeń nastawiono pojedyncze kolby; w następnych seriach zawsze potrójną ilość kolb dla każdego doświadczenia, rzadziej podwójną. Nastawiano również odpowiednio kolby kontrolne, niezaszczepione — zawsze w podwójnej ilości.

Czas doświadczeń wynosił zawsze 21 dni, poczem kolby zalewano 25 cm^3 stężonego H_2SO_4 , zawartość spalano i oznaczano azot metodą Kjeldahla. Otrzymane wyniki netto, po odjęciu azotu kontrol, zestawiono w odpowiednie tabele.

S e r j a I.

Sześć kolb, zawierających po 200 cm^3 pożywki (0.5% CaCO_3) zaszczepiono kolejno świeżym wilgotnym szlaczem, w ilości $1—0.2—0.02—0.01—0.001—0.0001\%$. Ilości szlachu, poczynając od 0.01% , dodawano, pipetując odpowiednią ilość silnie skłóconej zawiesiny szlachu w wodzie sterylizowanej. Równolegle nastawiono taką samą ilość kolb w warunkach beztlenowych, szczepiąc je w ten sam sposób. Kolby trzymano w po koju, w którym temperatura w przeciągu 21 dni wahała się w granicach $19^{\circ}—23^{\circ}$.

W pierwszym tygodniu, na 3-ci dzień od szczepienia zmętniały kultury tlenowe, szczepione dawkami szlachu większymi od 0.02% . W równoległych kulturach beztlenowych zmętnienie nastąpiło z początkiem drugiego tygodnia. W drugim tygodniu rozpoczęło się obfite wydzielanie gazów w obu doświadczeniach. W doświadczeniu tlenowym na powierzchni pożywek utworzył się kożuch, początkowo barwy białej, później żółto-brązowej. Wytworzony kożuch był tem grubszy im większą dawką szlachu zaszczepiono. Zanik kredy był stosunkowo nieznaczny. W doświadczeniu beztlenowym wydzielanie się gazów było tem obfitsze, im większą stosowano dawkę szlachu. Można było odróżnić zapach kwasu masłowego. Po 21 dniach w doświadczeniu beztlenowym kreda znikła zupełnie w kulturach z dawką szlachu 1% lub 0.2% , zaś w pozostałych kolbach znikło około 50% do 75% dodanej kredy. Odczyn pożywek pozbawionych kredy był kwaśny, pozostałych zaś obojętny. Tworzenia się kożucha na powierzchni kultur nie zauważono, natomiast w płynie zwieszały się

białawe obłoczki, a na ściankach kolb rozpostarł się nalot tej samej barwy. W kulturach z dawką szlamu 0.01 — 0.001 — 0.0001% szlamu wytworzył się bardzo słaby nalot.

Przy badaniu mikroskopowym znajdowano w kulturach tlenowych obficie występującego *Azotobakteria* i *Clostridium*, zaś w beztlenowych — samo *Clostridium*. Oczywiście, że w jednych i drugich kulturach ponadto jeszcze liczne pałeczki i spirille.

TABELA I.

Kultury surowe: 21 dni — jours
Cultures impures Tmp. 19° — 23°C

% szlamu szczepionego Encencencées avec % limon	tlenowe aërobies	beztlenowe anaërobies
	mg N — netto gain net en Az	
1	2.02	5.34
0.1	11.20	5.63
0.02	8.86	7.77
0.01	5.51	7.04
0.001	5.38	4.35
0.0001	1.22	4.14

Rozważając dane doświadczenia tlenowego widzimy, że ilość związanego azotu jest tem większa im większą dawką szlamu szczepiono. Natomiast w warunkach beztlenowych maximum wiązania azotu przypada na dawki 0.02 i 0.01%. Zastanawiające były, aż tak znaczne różnice w wiązaniu azotu, w warunkach tlenowych, przy dawkach np. 1% i chociażby 0.01%. W przeciągu 21 dni doświadczenia różnice nie powinny być tak jaskrawe.

Prowadzenie doświadczenia pojedynczą ilością kolb pozwalało przypuszczać, że wyniki dla doświadczenia beztlenowego noszą cechy przypadkowości. Nasunęła się myśl, czy też sam szlam niezależnie od zawartych w nim bakterij nie oddziałuje w jakibądź sposób na skomplikowany proces wiązania azotu w kulturach surowych.. Należało bakterjom dać jednakowe pod tym względem warunki.

Serja II.

W serji tej powtórzono przedewszystkiem doświadczenia serji poprzedniej (Tabl. II — 2, 4). Równocześnie nastawiono zmodyfikowane doświadczenie, w którym dodano do kolb około 1 gr. świeżego szlamu i sterylizowano trzykrotnie wraz z pożywką. Kredy do pożywek dodawano odąd zawsze 1%. Dla doświadczenia beztlenowego nastawiono potrójną ilość kolb. (W tabl. II — 1 podano jedynie średnią wyników oraz wielkość odchylenia). Szczepiono wszystkie kolby równocześnie w sposób podany przy serji I-szej.. Wahania temperatury pokoju wynosiły 15° — 21°.

Już w pierwszym tygodniu w kolbach, zawierających po 1 gr. sterylizowanego szlamu zmętnienie i obfite wytwarzanie się gazów zarówno w kulturach tlenowych jak i beztlenowych rozpoczęło się wcześniej niż w kulturach nie zawierających dodatku szlamu sterylizowanego. W beztlenowych kulturach, zawierających sterylizowany szlam i szczepionych świeżym szlaniem w ilości 1 — 0.1% fermentacja zakończyła się już po upływie tygodnia. W kulturach, szczepionych mniejszymi ilościami szlamu proces fermentacyjny trwał dłużej. Wytwarzająca się piana była tem silniejsza im większą dawką szlamu szczepiono. Fermentacja miała przebieg szybszy i silniejszy niż w kulturach szczepionych temi samymi ilościami szlamu, lecz nie zawierającymi szlamu sterylizowanego. Kultury beztlenowe, bez dodatku szlamu sterylizowanego, zachowały się analogicznie jak w doświadczeniu serji I-szej. Zużycie kredy nie przekroczyło w żadnej kolbie 50%.

W warunkach tlenowych różnice pomiędzy kulturami, zawierającymi szlam sterylizowany, a nie zawierającymi tego dodatku nie zaznaczyły się w tak ostry sposób. W kulturach szczepionych dużą dawką szlamu wytworzył się gruby kożuch brunatny; przy mniejszych dawkach wytworzyła się mleczno-biała błonka lub tylko piana.

Wyróżniała się swym wyglądem tylko jedna kultura, szczepiona dawką 0.02% szlamu do pożywki, nie zawierającej szlamu sterylizowanego. Kultura ta była bardzo silnie zmętniona, bez śladu piany i pokryta słabą błoną barwy żółto - pomarańczowej. Po analizie okazało się, że w kulturze tej otrzymano 30.85 mg związanego azotu (netto). (Tabl. II — 4).

TABELA II.

Kultury surowe:
Cultures impures

21 dni — jours.
Tmp. 15° - 21°C

%	beztlenowe — anaërobies		tlenowe — aërobies	
	sterylizowa- ny szlam	bez steryli- zowanego szlamu	sterylizowa- ny szlam	bez steryli- zowanego szlamu
	avec limon stérilisé	sans limon stérilisé	avec limon stérilisé	sans limon stérilisé
szlamu szczepionego ensemencées avec 0/0 limon	1	2	3	4
	mg N-netto gain net en Az.		mg N-netto gain net en Az.	
1	4.36 + 0.44	4.00	5.81	9.47
0.1	7.99 + 0.48	5.34	7.94	8.22
0.02	9.97 + 0.31	8.36	9.61	30.85
0.01	8.92 + 0.49	4.70	9.73	10.09
0.001	6.73 + 0.18	3.37	6.16	6.42
0.0001	5.59 + 0.74	3.12	5.86	5.54

Dane analityczne niniejszej serii doświadczeń pozwalają stwierdzić tylko, że najsilniejsze wiązanie wolnego azotu ma miejsce przy szczepieniu dawką 0.02% szlamu zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych.

W warunkach beztlenowych uwidoczni się dodatni wpływ sterylizowanych dawek szlamu, (tabl. II — 1, 2). W kulturze tlenowej, zawierającej 1 gr. szlamu związało się 9.47 mg azotu, natomiast przy potrójnej dawce, (1 gr. szlamu sterylizowanego i 2 gr. szlamu szczepionego), przyrost azotu wynosił tylko 5.81 mg. Przyczyną tego może być zbyt duża zawartość azotu w 3 gr. wprowadzonego szlamu (5.2 mg), lub też obecność znacznej ilości bakterij, (w 2-ch gr. szczepionego szlamu), mogących niekorzystnie oddziaływać na organizmy wiążące wolny azot. W pozostałych kulturach tlenowych dawka sterylizowanego szlamu wpływu na ilość związanego azotu nie wywarła.

Wyjątkowo wysoki plon, jak to już wyżej zaznaczono, wykazała kultura z przyrostem 30.85 mg azotu. Ta wysoka wydajność mogła być prosto wynikiem błędu popełnionego podczas analizy, lub też pozostawać w jakimś przyczynowym związku z wystąpieniem żółto-pomarańczowego nalotu. Spostrzeżenia poczynione przy III-ej serii doświadczeń pozwalają jednakże przyjąć to drugie przypuszczenie.

Porównując wyniki otrzymane w rubryce 2 i 4 (tabl. II) z wynikami I-ej serii doświadczeń (tabl. I), widzimy znaczną nie-

zgodność wyników tylko w kulturach tlenowych.. Należy wszakże mieć na uwadze to, iż są to przecież kultury surowe (p. serja III).

Serja III.

Doświadczenia tej serji miały na celu stwierdzenie, jak oddziałują wyciągi wodne ze szlamu na wiązanie azotu w surowych kulturach zarówno tlenowych, jak i beztlenowych.

Przygotowano wyciąg wodny, gotując na łaźni wodnej w przeciągu 3-ch godzin odpowiednie ilości świeżego szlamu i wody wodociągowej w stosunku 1 gr. szlamu na 100 cm³ wody. Po ostudzeniu i przesączeniu, otrzymano zlekka żółtawy przezroczysty płyn o słabym zapachu, którego pH=8.0. Wyciąg ten oznaczono jako 1%. Z wyciągu tego przygotowano też rozcieńczenia dwu- i dziesięciokrotne, a więc odpowiadające wyciągom 0.5% i 0.1%. Otrzymane wyciągi zastosowano bezpośrednio jako rozpuszczalniki do pożywek, zamiast wody wodociągowej. Dla porównania przygotowano również pożywki na zwykłej wodzie wodociągowej.

TABELA III.

Kultury surowe:

Cultures impures

Szczepione 0.02 % szlamu

Ensemencées avec 0.02 % de limon

21 dni—jours

Tmp. 13°—24°C

% wyciągu ze szlamu % d'extract de limon	tlenowe aërobies	beztlenowe anaërobies
	mg N — netto gain net en mg Az.	
1	14.05 6.83 8.57 ± 2.18 4.82	8.86 7.90 7.68 ± 0.75 6.29
0.5	9.75 7.08 7.92 ± 0.73 6.94	8.55 8.28 8.24 ± 0.14 7.88
0.1	8.61 7.41 7.23 ± 0.62 5.67	8.35 7.14 7.46 ± 0.36 6.88
pożywka normalna	16.43 7.59 10.27 ± 2.45 6.79	8.50 7.73 8.12 ± 0.31 ×

× strata wskutek wypadku
perte par accident.

Doświadczenia nastawiono równocześnie w warunkach tlenowych i beztlenowych. Szczepiono kolby dawką 0.02% świeżego szlamu, która to ilość okazała się w poprzedniej serii doświadczeń optymalną. Wahanía temperatury pokoju w przeciągu 21 dni wynosiły 13° — 24°.

Większość kultur zachowała się zgodnie z spostrzeżeniami poprzedniej serii. Różniły się tylko swym wyglądem zewnętrznym kultury, których wyniki zostały w tabeli III-ej podane tłustym drukiem. Powyższe kultury w warunkach beztlenowych pokryte były silną pianą barwy pomarańczowo-ceglastej. Płyn miał barwę zlekką żółtą. Nalot pomarańczowo - ceglasty rozwijał się początkowo z małych ognisk barwy żółtej, rozsianych na powierzchni płynu, by z czasem całkowicie go pokryć. Nalot ten, badany pod imersją, wykazał obecność dużej ilości bardzo drobnych, żółtawych ziarenek, o nieokreślonej postaci. Po odsączeniu płyn pozostawał bezbarwny, na sączku zaś otrzymano osad barwy żółtej, nierozpuszczalny w rozmaitych rozpuszczalnikach organicznych, (eter, eter petrolowy, kw. octowy, benzyna, benzol), jak również i w bardzo silnych kwasach mineralnych (HNO_3 , HCl , H_2SO_4).

Próba izolowania na pożywkach stałych azotowych i bezazotowych nie dała wyniku. Przeszczepienia oczkiem platynowym powyższego nalotu na płynne pożywki bezazotowe, dawały zawsze ten sam efekt jak w kolbach wyjściowych, tylko w warunkach beztlenowych. Wskazywałoby to na mikrobiologiczny charakter zjawiska. Zjawisko tem więcej jest godne uwagi, że dane analityczne wykazały, za wyjątkiem jednej kolby (6.88 mg N w tabl. III), zwiększony plon azotu w tych właśnie kulturach, w których powyższy nalot występował. Zwłaszcza w kulturach tlenowych różnica ta uwydatnia się bardzo jaskrawie. Kozuchy w tych kulturach były b. grube i barwy żółto - pomarańczowej.

Pozatem średnie wyniki doświadczeń uderzają brakiem większych różnic ilościowych w zdolności wiązania azotu w surowych kulturach tlenowych i beztlenowych. Również i wyciąg wodny ze szlamu na wiązanie azotu w kulturach surowych nie wywarł wpływu.

Serja IV.

Doświadczenia tej serii przeprowadzono na czystych kulturach *Azotobakteria* i *Clostridium*. Badano wpływ wyciągu wodnego ze szlamu, szlamu suszonego oraz wyprażonego, a więc pozbawionego składników organicznych.

Wyciąg wodny przygotowano, gotując 3 godz. pod ciśnieniem 2 atm. w autoklawie odpowiednie ilości świeżego szlamu i wody wodociągowej w stosunku 1 gr. szlamu na 100 cm³ wody. Po przesączeniu otrzymany 1% wyciąg częściowo rozcieńczono dwu- i dziesięciokrotnie, otrzymując wyciągi 0.5% i 0.1%.

Suchy szlam otrzymano w ten sposób, iż po przesianiu świeżego szlamu przez sitko, suszono go w temperaturze 103° do stałej wagi, rozcierając następnie dokładnie w moździerzu agatowym, otrzymano jednolity szaro-zielonkawy proszek. Proszek ten dodawano do kolb w ilościach odpowiadających zawartości suchej masy w świeżym szlamie użytym do przygotowania wyciągu wodnego. Tak np. do przygotowania 200 cm³ wyciągu 1% użyto 2 gr. świeżego szlamu, który zawierał suchych składników tylko 0.80 gr. Taką też ilość suchego szlamu dawkowano do kolb, zawierających po 200 cm³ pożywki i znakowanych w tablicy IV jako 1%. Odpowiednio, do innych kolb dodawano suchego szlamu w ilościach dwu- i dziesięciokrotnie mniejszych t. j. 0.40 gr. i 0.08 gr.

Odpowiednie ilości zupełnie suchego szlamu prażono w miseczce porcelanowej przez 3 godziny na silnym ogniu, celem usunięcia składników ogranicznych. Po ostudzeniu powtórnie rozcierano w moździerzu agatowym, otrzymując proszek barwy ceglastej. Wskutek prażenia ubywało 7% wagi. Dlatego też szlam prażony dodawano do odpowiednich kolb w ilościach o 7% mniejszych od dawek suchego szlamu. A mianowicie:

wyciągowi 1 % odpow. suchego szlamu 0.80 gr. prażonego 0.74 gr.

„ „ 0.5 „ „ „ „ 0.40 „ „ „ 0.375 „

„ „ 0.1 „ „ „ „ 0.08 „ „ „ 0.074 „

Szlam suchy lub prażony dodano do kolb, zawierających po 200 cm³ pożywki na wodzie wodociągowej, inne kolby zawierały pożywkę przygotowaną na wyciągach odpowiednich koncentracji, wreszcie dla porównania nastawiono kultury na pożywkach z wodą wodociągową. W doświadczeniu z *Azotobakterem* szczepiono każdą kolbę 1 cm³ płynnej, czystej 2-dniowej kultury, hodowanej w termostacie przy temperaturze 26°. Doświadczenie nastawiono w pokoju, w którym w przeciągu 21 dni temperatura wahała się w granicach 20° — 22°.

Już w pierwszym tygodniu dał się zauważyć znacznie szybszy rozwój kultur *Azotobaktera* w pożywkach, zawierających dodatek szlamu suchego lub prażonego w porównaniu do

kultur na zwykłej pożywce lub też na wyciągu. W drugim tygodniu różnice te były jeszcze bardziej jaskrawe. Pod koniec doświadczenia w kulturach, zawierających dawki szlamu suchego lub prażonego wytworzył się gruby, białawy kożuch, gdzieś gdzie już brunatnawy, przyczem ten grubszy, im większą dawkę szlamu stosowano. Natomiast kultury na pożywkach zwykłych lub z wyciągiem wodnym ze szlamu pokryte były słabą błoną białawą i zmętnienie płynu w porównaniu do poprzednich kolb było niewielkie. Kultury równoległe poszczególnych doświadczeń nie wykazały między sobą różnic w rozwoju. Dane analizy spostrzeżenia te potwierdziły w całej rozciągłości.

TABELA IV

Azotobacter:

21 dni — jours
Tnp. 20° — 22° C

%	0.1	0.5	1
	gain net d'Az. — mg N — netto		
szlam prażony limon incinéré	3.88 3.34 3.43±0.18 3.08	10.59 8.18 8.94±0.66 8.05	17.38 12.45 12.05 12.25±0.17
szlam suchy limon seché	5.45 5.36 5.35±0.05 5.22	8.51 8.51 7.97±0.43 6.90	11.45 10.79 11.01±0.18 10.79
wyciąg ze szlamu extrait de limon	2.08 2.06 1.98±0.07 1.81	2.14 1.88 1.92±0.09 1.74	2.97 2.41 2.46±0.20 2.01
pożywka normalna Mil. nutr nor- male		3.01 2.07 1.94	2.00±0.05

Działanie wyciągu wodnego ze szlamu na wiązanie azotu przez *Azotobaktera* w porównaniu z kulturą na zwykłej pożywce prawie wcale nie zaznaczyło się. Szlam suchy i prażony bardzo silnie zwiększa plon; — przy dawce 1% prawie 6-krotnie. Zmniejszenie dawki szlamu zmniejsza również ilość związanego azotu. Silniej oddziałuje prażony szlam, aczkolwiek przy dawce 1% prawie 6-krotnie. Zmniejszenie dawki szlamu zmniejsza również ilość związanego azotu. Silniej oddziałuje prażony szlam, aczkolwiek przy dawce 0.1% stosunki się odwracają. Wyniki podane tłustym drukiem w tabl. IV odnoszą się do dwóch kultur, których okres wegetacyjny przedłużono do 4-ch tygodni, umieszczając je na 4-ty tydzień do termostatu w temperaturze 26°. Analiza wykazała jeszcze dość znaczny przyrost plonu w porównaniu do równoległych kolb, których okres wegetacyjny trwał tylko 21 dni,

(w temperaturze pokojowej). Dane z tych dwóch kultur nie są objęte przez odpowiednie średnie.

Ogólnie stwierdzić można, że mineralne składniki szlamu przyczyniają się do zwiększenia wiązania azotu przez *Azotobaktera*.

Skład pożywek w doświadczeniu z *Clostridium* był ten sam, jak w doświadczeniu z *Azotobakterem*. Przeprowadzono je w atmosferze beztlenowej. Ponieważ przy hodowli czystych kultur *Clostridium* okazało się, iż optymalną temperaturą jest 30° — 35°, więc doświadczenie zmontowano w pomieszczeniu, w którym w przeciągu 12-u godzin utrzymywano temperaturę około 35°. W następnych 12-u godzinach temperatura w tem pomieszczeniu zrównywała się powoli z temperaturą pokoju. Najniższą temperaturą w 3-tygodniowym okresie tego doświadczenia była temperatura 25°.

Szczepiono pożywki 3 cm³ silnie skłóconej 7-dniowej kultury *Clostridium* na płynnej pożywce bezazotowej. Pod mikroskopem w kulturze tej przeważały formy bezsporowe, częstokroć inwolucyjne, jednakże spotykano również i typowe clostridia ze sporami.

W pierwszym tygodniu nie wykazały kultury prawie żadnego rozwoju. Jedynie w kolbach, zawierających dawki suchego lub prażonego szlamu można było spostrzec na powierzchni, osiadłej na dnie kredy, małe gruzelki, wznoszące się ponad gładką powierzchnią osadu. W niektórych zaś kolbach gładka powierzchnia była pęknięta w kilku miejscach. Dopiero w następnym tygodniu płyn zaczynał mętnieć, ukazywały się pęcherzyki gazu i wytwarzała się piana na powierzchni pożywek. Pianą tą była tem obfitsza im większą dawkę suchego lub prażonego szlamu dana kultura zawierała. Wytwarzania się kożucha nie spotrzeżono. W kulturach, zawierających wyciąg wody, piana pojawiła się dopiero pod koniec doświadczenia. Kultury na zwykłych pożywkach nieznacznie różniły się swym wyglądem od nieszczepionych równoległych kontrol. Przed zalaniem kolb kwasem stwierdzono we wszystkich bez wyjątku zaszczepionych kolbach zapach kwasu masłowego i bardzo silne ześluzowacenie osadu kredowego. Kontrola mikroskopowa dała ten sam obraz jak przy kulturze użytej do szczepienia t. j. obecność przeważającej ilości pałeczek bezsporowych, częstokroć inwolucyjnych oraz typowe clostridia ze sporami.

TABELA V

Clostridium

21 dni — jours

Tnp. 25°-35° C

%	0.1	0.5	1
	mg N-netto Gain net en Az.		
Szlam prażony Limon inciné	2.01 ± 0.12	1.92 ± 0.25	2.51 ± 0.26
szlam suchy Limon séché	3.08 ± 0.13	2.85 ± 0.21	3.86 ± 0.59
wyciąg ze szlamu Extrait de limon	3.36 ± 0.22	2.62 ± 0.32	2.56 ± 0.27
pożywka normalna Mil. nutr. norm.	1.99 ± 0.08		

Analiza nie dała, oczekiwanego na podstawie obserwacji przebiegu wegetacji, wyniku. Kultury z wyciągiem wodnym i suchym szlamiem wykazały nieznaczne tylko zwiększenie plonu azotu ponad wydajność kultur na zwykłej pożywce.

Serja V.

W doświadczeniach dotychczasowych przygotowywano pożywkę na wodzie wodociągowej. Poczynając od tej serii stosowano do doświadczeń tylko wodę destylowaną ze szkła.

Dla zbadania wpływu podanych dawek związków azotowych na proces wiązania azotu przez *Clostridium* nastawiono następujące doświadczenie.

Przygotowano 10% wyciąg z grochu, gotując w parze w ciągu 3-ch godzin odpowiednie ilości grochu i wody destylowanej ze szkła. Po przesączeniu na zimno otrzymano przezroczysty płyn barwy żółtej. Następnie przyrządzono płynne pożywki na wodzie destylowanej ze szkła, zawierające prócz zwykłych składników jeszcze 10% powyższego wyciągu z grochu, następnie 5% oraz 1% tegoż wyciągu, a jednocześnie dla porównania — pożywkę bez dodatku wyciągu z grochu. Pożywki rozlano do odpowiednich kolb, wziętych w ilości potrójnej dla poszczególnych doświadczeń, sterylizowano i szczepiono 1 cm³ płynnej 10-dniowej kultury *Clostridium*.

Ponieważ spostrzeżono, iż wyizolowane *Clostridium* rozwijało się jednakowo w warunkach tlenowych i beztlenowych, nastawiono równolegle dwa doświadczenia; — jedno w warunkach tlenowych drugie zaś — beztlenowych. Wahania temperatury w okresie 3-tygodniowym wynosiły 25° — 35°.

Obraz zewnętrzny rozwoju kultur otrzymano taki jak w poprzednim doświadczeniu. Znaczniejszych różnic pomiędzy kulturami tlenowymi i beztlenowymi nie zauważono. Większa piana wytworzyła się jedynie w tych kulturach, które zawierały 10% i 5% wyciągu z grochu. Kultury na zwykłej pożywce bez dodatku wyciągu z grochu, pozostające w warunkach tlenowych, nie różniły się niczem od sterylizowanych i nieszczepionych kontrolnych kolb.

TABELA VI.

Clostridium

21 dni-jours
Tmp. 25°-35°C

10 %-wyciąg z grochu Extrait de pois à 10%		tlenowe aërobes	beztlenowe anaërobes
g/b	w tem mg. N mg d'Az dans l'ex- trait	mg N netto gain net d'Az	
10	12.48	-0.19±0.10	-0.17±0.06
5	6.74	0.03±0.04	0.67±0.12
1	1.32	2.48±0.15	1.55±0.09
pożywka normalna mil. nutr norm.		0.00±0.00 *0.11±0.05	1.62±0.03

Analiza wykazała, że przy większych dawkach wyciągu, (z zawartością azotu 12.48 mg i 6.74 mg), *Clostridium* przestaje wiązać wolny azot i to zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Przy nieznacznej dawce azotu związanego w wyciągu (1.32 mg N,) więcej wolnego azotu zostaje związane w warunkach tlenowych niż beztlenowych.

W pożywkach bezazotowych wiążą się w czystych kulturach *Clostridium* małe ilości wolnego azotu. Zastanawiającem jest, iż w tychże samych pożywkach w warunkach tlenowych wcale nie stwierdzono wiązania wolnego azotu. Brak wszelkiego zmętnienia i ześluzowacenia kredy wskazywał na to, iż bakterje wcale nie rozwinęły się. Powtórzenie tego doświadczenia dało

prawie ten sam wynik (tabl. VI-*). Mikroskopowo stwierdzono bardzo nieliczne bakterje, pochodzące zapewne od szczepienia.

Serja VI.

Z dwóch doświadczeń tej serji jedno zawierało w pożywce 1% dawkę suchego szlamu (0.80 gr.), drugie zaś zwykłą pożywkę bezazotową. W każdym z tych doświadczeń nastawiono kolby, szczepione: 1-o czystymi kulturami *Azotobaktera* i *Clostridium*, 2-o czystą kulturą *Azotobaktera* i 3-o czystą kulturą *Clostridium*. Szczepiono po 1 cm³ 2-dniowej płynnej kultury *Azotobaktera* i 1 cm³ 10-dniowej płynnej kultury *Clostridium*. Kultury szczepione *Azotobakterem* i *Clostridium* lub wyłącznie *Azotobakterem* hodowano w warunkach tlenowych; kultury *Clostridium* — w atmosferze azotu. Wszystkie kolby umieszczono w termostacie, w którym wahania temperatury w okresie 3-tygodniowym wyniosły 28° — 30°.

Z powodu optymalnej temperatury rozwój bakteryj we wszystkich kolbach rozpoczął się stosunkowo wcześniej. Kultury *Azotobaktera* czyste i zmieszane z *Clostridium* pokryły się już 3-go dnia kożuchem. Kożuch ten był grubszy w kolbach z dodatkiem 1% suchego szlamu niż w równoległych kulturach na zwykłej pożywce. Również kultury czystego *Clostridium* silniej rozwijały się w pożywkach z 1% szlamu.

TABELA VII

Azotobacter + Clostridium 21 dni--jours
Tnp 28°—30°C

Kultury Cultures	1% suchego szlamu 1% de limon seché	bez szlamu
	mg N-netto gain net en Az en mg	
Azotobacter + Clostridium	15,85 ± 0.72	8.15 ± 0.12
Azotobacter	14.13 ± 0.34	4.09 ± 0.47
Clostridium	3.58 ± 0.09	1.92 ± 0.06

Analizy wykazały, iż ilość związanego azotu w kulturach z 1% szlamu była prawie 2-krotnie większa w mieszanej kulturze *Azotobaktera* i *Clostridium*: przeszło 3 razy — w kulturach *Azotobaktera* i blisko dwukrotna w kulturach *Clostridium* w porównaniu do kultur bez szlamu. Szczególnego oddziaływania na siebie *Azotobaktera* i *Clostridium* nie można stwierdzić; jak widzimy, sumy ilości związanego azotu przez czyste kultury *Azotobaktera* i *Clostridium* niewiele się różnią od wyników otrzymanych dla kultur mieszanych i to zarówno przy braku jak i obecności suchego szlamu w kulturach. Potwierdza się silnie stymulujące działanie suchego szlamu na rozwój zwłaszcza *Azotobaktera*, mniej zaś silnie *Clostridium*. Działanie to rozciąga się również na kultury mieszane *Azotobaktera* i *Clostridium*.

Związanie przez czystą kulturę *Azotobaktera* średnio 4.09 mg azotu w zwykłej pożywce w porównaniu do średniej 2.00 mg, otrzymanej w doświadczeniu serii IV (tabl. IV), nie powinno nas dziwić, gdyż utrzymywano przecież w niniejszem doświadczeniu stale temperaturę 28° — 30°, gdy przy tamtem doświadczeniu temperatura nie przekraczała 20° — 22°.

Serja VII.

Serja ta obejmuje doświadczenia nad wpływem szlamu suchego i prażonego, wyciągu wodnego ze szlamu, suchej substancji oraz popiołu tegoż wyciągu na wiązanie azotu przez czyste kultury *Azotobaktera* i *Clostridium*. Suchy i prażony szlam przygotowany jak wyżej. Wyciąg 1% przygotowano, gotując 5-krotnie 100 gr. świeżego szlamu w 2-ch litrach wody destylowanej ze szkła, otrzymując więc łącznie 10 litrów wyciągu. Część wyciągu zastosowano bezpośrednio lub też w rozcieńczeniu dziesięciokrotnem (0.1%) jako rozpuszczalnik do pożywek. Pozostałą część wyciągu odparowano do sucha w temperaturze 70°. Po wysuszeniu do stałej wagi okazało się, iż zawartość otrzymanej suchej substancji (o barwie ceglastej), w przygotowanym wyciągu, wynosiła 0.0057%. Połowę uzyskanej suchej substancji dodano do odpowiednich kolb z pożywką na wodzie destylowanej ze szkła, a mianowicie, do każdej kolby w ilościach odpowiadających zawartości suchej substancji w 200 cm³ wyciągu 1% względnie 0.1%. Drugą połowę suchej substancji, dokładnie wysuszonej, prażono 3 godziny w tyglu kwarcowym; stwierdzono ubytek 25% wagi. Otrzymany w ten sposób popiół z wyciągu (barwy szarej)

dawkowano podobnie jak suchą substancję wyciągu, lecz w ilościach zmniejszonych o 25%, utraconych składników organicznych. Ostatecznie więc kolby zawierały bądź pożywki na 200 cm³ wyciągu 1% lub 0.1%, bądź też w 200 cm³ pożywki normalnej na wodzie destylowanej ze szkła — po 0.80 gr. szlamu suchego, 0.74 gr. szlamu prażonego 0.0114 gr. suchej substancji z wyciągu, 0.0086 gr. popiołu z wyciągu, względnie ilości dziesięciokrotnie mniejsze powyższych składników.

Celem zorientowania się w działaniu większych dawek szlamu dodano do dwóch kolb po 1.48 gr. szlamu prażonego, a więc ilość dwukrotnie większą niż przy 1% (tabl. VIII — 2%). Nastawiono też dwie kolby, zawierające po 0.043 gr. popiołu z wyciągu, t. j. ilość pięciokrotnie przewyższającą dawkę 1% (tabl. VIII — 5%). Wreszcie dla zbadania w jakim stopniu pięciokrotne ekstrahowanie szlamu wodą wpłynęło na działanie samego szlamu, wyprażono pozostały po ekstrahowaniu szlam, dodając go potem do dwóch kolb po 0.74 gr., t. j. w tej samej ilości jak szlam prażony nie ekstrahowany. Nastawiono również kultury na zwykłej pożywce z wodą destylowaną ze szkła.

Doświadczenie dla *Azotobaktera* nastawiono w pokoju przy temperaturze 22° — 26°. Szczepiono 1 cm³ płynnej kultury 2-dniowej.

Szybki rozwój i wytwarzanie się grubego kożucha spostrzeżono w tych kolbach do których dodano szlamu suchego, prażonego, względnie 5% dawkę popiołu z wyciągu. W kulturach, zawierających dziesięciokrotnie mniejsze dawki suchego lub prażonego szlamu, kożuchy były nieco cieńsze. Kultury na wyciągu ze szlamu względnie zawierające suchą substancję i popiół z wyciągu wykazały rozwój o średnim natężeniu; pokryte były cienkim kożuchem i wyglądem zewnętrznym nawzajem od siebie mało się różniły. Natomiast kultury na zwykłej pożywce wykazały mierny wzrost. Zmętnienie było niewielkie, kożuszek nie wytworzył się, jedynie tu i ówdzie unosiły się obłoczki.

Analizy potwierdziły silne oddziaływanie szlamu na *Azotobaktera*, stwierdzone w doświadczeniach serji IV. Prażony szlam oddziałuje silniej niż szlam suchy. Zdwojenie dawki prażonego szlamu ponad 1% daje tak niewielki efekt, iż można przypuszczać, że dawka 1% zawiera dostateczną ilość składników stymulujących. Oprzeć się można w tem przypuszczeniu jeszcze i na tym fakcie, że szlam prażony ekstrahowany okazał się w swem działaniu niemniej silnym niż szlam, który ekstrahowaniu

TABELA VIII

Azotobacter

21 dni — *jours*
Tnp. 22° — 26°C

%	0.1	1	2	5
	mg N-netto gain net d'Az en mg			
szlam prażony limon inciné	7.36 $\pm$ 0.35	11.49 $\pm$ 0.29	12.97 $\pm$ 0.13	
szlam prażony eks- trahowany extrait de limon inciné		10.90 $\pm$ 1.38		
szlam suchy limon séché	7.13 $\pm$ 0.11	8.21 $\pm$ 0.29		
wyciąg ze szlamu extrait de limon	4.27 $\pm$ 0.18	3.96 $\pm$ 0.08		
sucha substancja wyciągu substance sèche de l'ex- trait	3.80 $\pm$ 0.10	4.69 $\pm$ 0.06		
popiół wyciągu Cendre de l'extrait	3.34 $\pm$ 0.15	4.55 $\pm$ 0.06		12.40 $\pm$ 0.00
pożywka normalna Mil. nutr. norm.	1.94 $\pm$ 0.03			

nie podlegał. A więc pięciokrotne ekstrahowanie wodą w temperaturze 100° nie zdołało z niego wylugować takich ilości składników stymulujących, aby zmniejszenie się ich zawartości w szlamie mogło odbić się ujemnie na rozwoju *Azotobaktera*. Zresztą w kulturach z wysokimi dawkami szlamu czynnikiem ograniczającym dalszy rozwój był brak cukru, wskutek spożycia przez bakterje. Wobec tego i zdwojenie dawki szlamu, mimo nadmiaru czynników stymulujących efektu dać nie mogło.

Dziesięciokrotne zmniejszenie dawki prażonego i suchego szlamu spowodowało zmniejszenie plonu. Sucha substancja lub popiół z wyciągu, w ilościach równoważnych ich zawartości w 200 cm³ 1% wyciągu wodnego, oddziałują prawie jednakowo. Dziesięciokrotne zmniejszenie dawek obniża plon nieznacznie tylko przy suchej substancji i popiele z wyciągu.

Uderzającym w tem doświadczeniu jest wysoki plon otrzymany przy dodaniu do kultur popiołu z wyciągu w ilości 0.043 gr. („5%”), a więc przekraczającej rozpuszczalność tego popiołu

w wodzie przy temperaturze 100°. Przy tej dawce plon prawie 3-krotnie przewyższył wynik otrzymany z ilością popiołu 0.0086 gr. (1%), i ponadto dorównał wynikom otrzymanym przy kulturach, zawierających aż 0.74 gr. i 1.48 gr. prażonego szlamu!

Stąd możemy wywnioskować, iż stymulujące działanie na wzrost *Azotobaktera* wywierają składniki (składnik ?!) mineralne, znajdujące się w szlamie, które trudno rozpuszczają się w wodzie. To stymulujące działanie uwidocznia się tem jaskrawiej, skoro porównamy otrzymane wyniki z nieznacznym plonem w kulturach na zwykłej pożywce.

Porównując wyniki niniejszego doświadczenia z wynikami uzyskanymi w doświadczeniu serji IV, spostrzegamy, iż wyciąg wodny ze szlamu przygotowany w autoklawie pod ciśnieniem 2 atm. utracił swe własności stymulujące.

W identycznym doświadczeniu z *Clostridium* pominięto kolby z ekstrahowanym prażonym szlaniem; szczepiono 3 cm³ płynnej 10-dniowej kultury. Wahanie temperatury wyniosły 21° — 36°.

TABELA IX

Clostridium

21 dni — jours
Tmp. 21° — 36° C

%	0.1	1	2	5
	mg N-netto gain net d'Az en mg			
szlam prażony limon incinéré	2.48 ± 0.13	3.58 ± 0.29	2.74 ± 0.07	
szlam suchy limon séché	2.79 ± 0.21	3.86 ± 0.29		
wyciąg ze szlamu extrait de limon	1.95 ± 0.11	3.64 ± 0.22		
sucha substancja wyciągu Substance sèche de l'extrait	2.24 ± 0.11	3.03 ± 0.30		
popiół wyciągu Cendre de l'extrait	1.91 ± 0.07	3.63 ± 0.33		4.06 ± 0.23
pożywka normalna Mil. nutr. norm.	1.63 ± 0.08			

Analiza wykazała zwiększone wiązanie azotu w kulturach: z dodatkiem suchego lub prażonego szlamu, na 1% wyciągu wodnym, z suchą substancją lub popiołem z wyciągu.

W kulturach na zwykłej pożywce przyrost azotu wynosił średnio 1.63 mg., natomiast kultury, zawierające wymienione substancje w ilości odpowiadającej 1% wykazały plon 2-krotnie większy. Dziesięciokrotne zmniejszenie dawek obniżało wydajność. Suchy lub prażony szlam, wyciąg wodny, sucha substancja i popiół z wyciągu oddziałują w jednakowym stopniu na wiązanie azotu przez *Clostridium*. Zwiększona dawka popiołu z wyciągu (0.043 gr.—„5%”) wpływa na zwiększenie plonu, natomiast zdwojenie dawki prażonego szlamu nieznacznie plon obniżyło.

A więc i w kulturach *Clostridium* czynnikiem stymulującym, zawartym w szlamie, okazał się popiół z wyciągu t. zn. składnik: mineralne szlamu rozpuszczalne w wodzie. To stymulujące działanie na *Clostridium* jest jednakże o wiele słabsze, niż w doświadczeniach z *Azotobakteren*.

OMÓWIENIE.

Jeśli porównamy otrzymane wyniki z danymi literatury, należy przedewszystkiem podkreślić trudność otrzymania przejrzystych rezultatów z kulturami surowymi, z czym i w innych pracach spotykano się (3, 4, 5, 21). Wprawdzie z oznak zewnętrznych widoczny był sprzyjający wpływ szlamu na rozwój kultur, jednakże ilościowe wyniki nie potwierdzały tych spostrzeżeń. Występują bowiem w kulturach surowych nadzwyczaj skomplikowane i dotąd mało zbadane zjawiska wzajemnego oddziaływania bakterij na siebie.

W doświadczeniach serji II i III spostrzegliśmy, jak czynnik o charakterze niewątpliwie mikrobiologicznym (ceglasto-pomarańczowy nalot) wpływał sprzyjająco na wiązanie wolnego azotu w surowych kulturach. W dwóch kulturach tlenowych działanie to wyraziło się nawet w prawie 2-krotnem zwiększeniu plonu (14.05 i 16.43 mg. — tabl. III). Najprawdopodobniej natrafiliśmy tu na jakiś organizm beztlenowy oddziałujący dodatnio na wiązanie wolnego azotu przez *Clostridium*, a szczególnie *Azotobaktera*.

Beijerinck i van Delden (4) stwierdzili istnienie stosunków symbiotycznych pomiędzy *Azotobakteren* a bakterjami sporowymi gatunku *Granulobacter* i niesporowymi gatunkami *Aërobacter aërogenes* oraz *Bacillus radiobacter*. Ostatnio również Selim (47) wykazał zwiększenie się plonu azotu w kulturach *Azotobaktera* z *B. aërogenes* i *B. radiobacter*. Dodatni

wpływ produktów autolizy symbionta na wiązanie azotu przez *Azotobaktera* stwierdzili prof. B a s s a l i k i p. N e u g e b a u e r (2). Również działa dodatnio na *Azotobaktera* przesącz z kultur jego towarzysza, jak skonstatowała p. K o t e k (24).

Wyniki ujęte w tablicy III-ej uderzają brakiem większych różnic w ilości związanego azotu pomiędzy kulturami tlenowymi i beztlenowymi. T r u f f a u t i B e z s o n o f f (51), którzy podobny wynik otrzymali, skłonni są nawet przypisywać bakterjom beztlenowym przewagę w procesie wiązania wolnego azotu w glebie. Albowiem, skutkiem znacznego spożycia tlenu przez inne bakterje, warunki byłyby pomyślniejsze dla działalności bakterij wiążących wolny azot w nieobecności tlenu.

Czyste kultury *Azotobaktera* i *Clostridium*, na zwykłych pożywkach, w porównaniu do kultur surowych, związały niewielkie ilości azotu; gdy dla *Azotobaktera* ilość związanego azotu wynosiła przeciętnie 2 mg, zaś dla *Clostridium* 1,9 — 1,6 mg, to w surowych kulturach na takich samych pożywkach plon był 4-krotnie wyższy, (w tlenowych — 10.27 mg, w beztlenowych 8.12 mg, p. tabl. III). Ze zjawiskiem tem, stpostrzeżonem jeszcze przez B e i j e r i n c k a (3), spotykali się wielokrotnie i inni badacze. B e i j e r i n c k stwierdził również, iż dodanie nieznacznej ilości pasteuryzowanej ziemi do zwykłych pożywek mineralnych wpływa sprzyjająco na rozwój *Azotobaktera*. To sprzyjające działanie objaśniał B e i j e r i n c k dobozem odpowiedniego zespołu bakterij symbiotycznych i usunięciem przez pasteuryzację bakterij silnie zakwaszających środowisko.

Badania K r z e m i e n i e w s k i e g o (27) wykazały, iż dodatni wpływ ziemi na *Azotobaktera* odnieść należy do zawartej w niej próchnicy. Badania te stały się punktem wyjścia licznych poszukiwań celem bliższego poznania nieznanego czynnika, potęgującego wiązanie azotu przez *Azotobaktera*. Należy bowiem nadmienić, iż próchnica jest substancją dotąd chemicznie niezdefiniowaną (40). Dodatni wpływ mógłby być spowodowany, bądź przez jej skład chemiczny, bądź też przez jej fizykochemiczne właściwości, jako koloidu (15). K r z e m i e n i e w s k i (27) stwierdził, że związki próchnicowe nie były dla *Azotobaktera* źródłem węgla lub azotu. Sztuczne substancje próchnicowe, otrzymane z cukru, nie dały takiego efektu jak związki naturalne. Według P r a ż m o w s k i e g o (38), występowałyby obok próchnicy zaadsorbowane różne nieorganiczne i organiczne substancje koloidalne.

Z substancyj nieorganicznych na uwagę zasługiwałyby szczególnie związki żelaza. Dodatkowo działanie żelaza na wiązanie azotu przez *Azotobaktera* stwierdzili P r a ż m o w s k i (38) oraz R e m y i R ö s i n g (42). O l s e n (35) stwierdził dodatni wpływ cytrynianu żelaza na rozwój *Lemny* i przypuszcza, że żelazo oddziałuje nie w postaci jonu, jak mniema B l o m (6), lecz wchodziłoby w skład jonu kompleksowego w związkach organicznych. Zagadnienie dodatniego oddziaływania mineralnych składników gleby na wiązanie azotu, przez *Azotobaktera*, skomplikowało się o tyle, iż w chwili obecnej mamy szereg sprzecznych wyników, na podstawie których autorzy wskazują na związki glinu, krzemu, manganu, (38, 42, 51), wapnia, strontu (11) bądź molibdenu (7), jako domniemane stymulatory.

Niemniej skomplikowanie przedstawia się sprawa składników organicznych. B o t t o m l e y (35) otrzymał z torfu pewne substancje organiczne, które w minimalnych ilościach oddziaływały dodatnio na rozwój roślin. Substancje te nazwał „auximonomi”, rozumiejąc pod tą nazwą dodatkowe czynniki wzrostowe, któreby odpowiadały witaminom w świecie zwierząt. Jednakże inni (35, 43) badacze negują istnienie i niezbędnosć „auximonomów”.

Mniej badaną była kwestja korzystnego oddziaływania czynników stymulujących na *Clostridium*, które naogół (9) przestaje wiązać wolny azot w obecności dostatecznych ilości odpowiednich związków azotowych, jak to widzieliśmy przy doświadczeniu z wyciągiem z grochu (p. tabl. VI). Natomiast małe dawki (1.32 mg) związków azotowych nie hamują wiązania wolnego azotu (według W i n o g r a d s k i e g o (54) nawet sprzyjają); w warunkach tlenowych spotkaliśmy się nawet z nieznacznym zwiększeniem plonu (tabl. VI). Na pożywkach bezazotowych w warunkach tlenowych *Clostridium* zupełnie nie rozwinęło się. Fakt ten dałoby się najprościej wytłumaczyć przyjmując, iż kultury były zanieczyszczone. Albowiem W i n o g r a d s k y (54) twierdzi, iż *Clostridium* rozwijać się może w warunkach tlenowych tylko w obecności innych bakterij aerobowych. Nierozwinięcie się kultur tlenowych, pozbawionych związków azotowych możnaby wówczas wyjaśnić, uniemożliwieniem rozwoju powyższych bakterij aerobowych, któreby zużywając dla siebie tlen, wytworzyć mogły odpowiednie warunki dla *Clostridium*. Jest to tem bardziej możliwe, gdy weźmiemy pod uwagę trudności związane z rozpoznaniem czystości kultur *Clostridium*, które jest bardzo skłonne do

wytwarzania form inwolucyjnych (9). Można by też upatrywać, w braku początkowych dawek związków azotowych, przyczynę degeneracji czystych kultur *Clostridium* na pożywkach bezazotowych, doprowadzającej do utraty zdolności wiązania wolnego azotu (54).

W związku z tem *P r i n g s h e i m* (39) i *B r e d e m a n n* (8, 9) stwierdzili, iż t. zw. pasaże, polegające na przeszczepieniu *Clostridium* na pewien okres czasu do sterylizowanej ziemi, regenerują jego zdolność wiązania azotu. *L a n t s c h* (28) przypuszcza, iż substancje koloidalne przyspieszają kiełkowanie spor *Clostridium*. Zwraca też *L a n t s c h* (28, 29) uwagę na znaczną zawartość koloidów w szlamie.. W kulturach mieszaniny *Azotobaktera* i *Clostridium* otrzymał *L a n t s c h* (29) największy plon na pożywkach, zawierających dodatek szlamu. Gdy w kulturach, zawierających 6 gr. ziemi ornej w 300 cm³ pożywki mannitowej związało się 11.4 mg. azotu, to przy dodaniu 6 gr. szlamu przyrost osiągnął 18.5 mg. wobec 7.6 mg. na zwykłej pożywce (29 p. 411). Różnice te objaśnia *L a n t s c h* mniejszą zawartością koloidów w ziemi ornej w porównaniu do szlamu.

Z doświadczeń moich wynika, iż stymulujące działanie szlamu na wiązanie azotu przez *Azotobaktera* i *Clostridium* przypisać można składnikom mineralnym rozpuszczalnym w wodzie. Jak stwierdził *p r o f. B a s s a l i k* (1), składniki popiołowe wyciągu wodnego z ziemi również stymulują wiązanie azotu przez *Azotobaktera*. Należy wziąć pod uwagę fakt, iż preparaty próchnicowe zawierają zawsze dość znaczne ilości domieszek mineralnych (powyżej 7%) (40 p. 160) oraz stwierdzone przez *R e m y' g o i R ö s i n g a* (42) osłabienie działania próchnicy po ekstrakowaniu jej kwasem solnym. Gdyby nawet próchnica, po wyprażeniu t. j. całkowitem usunięciu substancyj organicznych, własności swe zachowała, to jednakże zagadnienie czynników stymulujących nie byłoby jeszcze uproszczone ze względu na ilość możliwych kombinacji. Nie mamy bowiem dostatecznych podstaw, pozwalających przypisać własności stymulujące wyłącznie jednemu składnikowi.

STRESZCZENIE WYNIKÓW.

1. Stwierdzono obecność *Azotobaktera* i *Clostridium* w szlamie rozmaitych zbiorników wody. W planktonie zauważono tylko obecność *Azotobaktera*.

2. Daje się zauważyć sprzyjający wpływ dodatku sterylizowanego szlamu na rozwój kultur tlenowych i beztlenowych w pożywkach bezazotowych, szczepionych świeżym szlamem. Jednakże rezultaty analiz na azot wyraźnie tego nie odzwierciedlają. Największy plon w kulturach surowych otrzymuje się przy szczepieniu pożywek dawką 0.02% świeżego szlamu. Wyciąg wodny ze szlamu nie wpływa na wiązanie azotu w surowych kulturach.

3. Ilość związanego azotu w surowych kulturach tlenowych i beztlenowych jest prawie jednakowa. W niektórych tych kulturach zauważono występowanie pewnego czynnika o charakterze mikrobiologicznym (pomarańczowo - ceglasty nalot), w obecności którego zwiększała się ilość związanego azotu, szczególnie w kulturach tlenowych.

4. Dodanie do pożywek bezazotowych odpowiednich ilości suszonego lub prażonego szlamu powoduje silniejszy rozwój i zwiększenie wiązania wolnego azotu w czystych kulturach *Azotobaktera* i *Clostridium*. W kulturach *Azotobaktera* to stymulujące działanie szlamu objawia się w silniejszym stopniu niż u *Clostridium*.

5. Wyciąg wodny (1%) ze szlamu działa również stymulująco, w słabszym jednak stopniu niż odpowiadające mu ilości suchego lub prażonego szlamu. Przygotowany w autoklawie traci on swe własności stymulujące.

6. Sucha substancja i popiół z wyciągu wodnego ze szlamu działają stymulująco na wiązanie azotu przez *Azotobaktera* i *Clostridium*. Przy odpowiednim dawkowaniu można osiągnąć efekt równy działaniu suchego lub prażonego szlamu.

7. Wpływ stymulujący szlamu na wiązanie wolnego azotu przez *Azotobaktera* i *Clostridium* możemy przypisać składnikom mineralnym, słabo w wodzie rozpuszczalnym.

8. Działanie stymulujące szlamu rozciąga się również na mieszane kultury *Azotobaktera* i *Clostridium*.

9. W obecności dostatecznej ilości odpowiednich związków azotowych *Clostridium* przestaje wiązać wolny azot.

Pracę niniejszą wykonano w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego. Kierownikowi Zakładu Panu Prof. Dr. Kazimierzowi Bassalikowi składam serdeczne podziękowanie za cenne wskazówki, rady i wszelką pomoc udzieloną mi podczas pracy.

L I T E R A T U R A.

1. Bassalik K. Bios, witaminy i auximony w świetle badań nad Azotobakterem. (Ref. III. Zjazd Bot. Słow., Warszawa 1931).
2. Bassalik K. i J. Neugebauer. Wpływ różnych czynników na działanie Azotobacter chroococcum. Sprawozd. Tow. Nauk Warsz. Wydz. IV. R. XXIII p. 108, 1930.
3. Beijerinck M. W. Ueber oligonitrophile Mikroben. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. VII, 1901.
4. Beijerinck M. W. u. A. van Delden. Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. IX. p. 3, 1902.
5. Benecke W. u. J. Keutner. Über stickstoffbindende Bakterien aus der Ostsee. — Ber. d. deutsch. Bot. Gesell. B. XXI p. 333, 1903.
6. Bloom J. Ein Versuch, die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des molekularen Stickstoffs durch Mikroorganismen zu erklären. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. 84 p. 60, 1931.
7. Bortels H. Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. — Arch. f. Mikrobiol. Vol. I, 1930. (Ref. Ergebn. d. ges. Physiol.).
8. Bredemann G. Die Regeneration des Stickstoffbindungsvermögen der Bakterien. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. XXIII, 1909.
9. Bredemann G. Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. XXIII, 1909.
10. Brenchley W. E. Inorganic plant poisons and stimulants. — Cambridge, University Press, 1927.
11. Burk D. and Lineweaver H. The influence of calcium and strontium upon the catalysis of nitrogen fixation by Azotobacter. Arch. f. Mikrob. Vol. 2 p. 155, 1931. (Ref. Bot. Ztbl. B. 19).
12. Demoll R. Teichdüngung. — Schweizerbart, Stuttgart 1925.
13. Domogalla B. P., Juday C. and Peterson W. H. The forms of nitrogen found in certain lake waters. — Journ. Biol. Chem. Vol. LXIII p. 269, 1925.
14. Dzierżbicki A. Kilka spostrzeżeń nad wpływem związków próchnicowych na rozwój drożdży i fermentację alkoholową. — Bull. Int. d. l'Acad. Sc. Crac. Kl. B. p. 651, 1909.
15. Ehrenberg P. Die Bodenkolloide, III Aufl. — Steinkopf, Dresden — Leipzig 1922.
16. Fischer H. Das Problem der Stickstoffbindung bei niederen Pflanzen. — Ber. d. deut. Bot. Gesell. B. XXXV p. 423, 1917.

17. Fischer H. Über die Einwirkung saurer Humusstoffe auf die biologischen Vorgänge im Boden und im Wasser. — Ctbl. f. Bakt. B. 54 p. 481, 1921.
18. Gerlach u. Vogel. Weitere Versuche mit stickstoffbindenden Bakterien. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. IX p. 80, 817, 1902.
19. Gumiński R., Jasińska M., Kobendza R. Jeziorko Czerniakowskie. — Kolo Geograf. Warszawa 1925.
20. Iwasaki K. Weitere Untersuchungen ueber die Fixation des Luftstickstoffs durch Azotobakter. — Bioch. Ztschr. B. 226 H. 1—3, 1930.
21. Keutner J. Über das Vorkommen und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien im Meere. — Wiss. Meeresuntersuchungen, N. F., B. 8 p. 27, 1905.
22. Kossowitsch P. Untersuchungen über die Frage, ob die Algen freien Stickstoff fixieren. — Bot. Ztg. Jhrg. 52 p. 97, 1894.
23. Kostytschew S., Ryskaltschuk A., Schwesowa O. Untersuchungen über Azotobakter agile. — Ztschr. f. phys. Chemie. B. 154 p. 1, 1926.
24. Koteck F. Wpływ symbionta na zdolności wiązania azotu przez Azotobakter chroococcum Beij. — Sprawozd. Tow. Nauk. Warsz. Wydz. IV. R. XXIII p. 107, 1930 i Acta Soc. Bot. Pol. Vol. VIII, p. 47, 1931.
25. Kowalowa A. J. Azotobakter w ile Kaspiskowo moria. — Izw. Azerbajdżan. Gosud. Uniw., T. 9 p. 24, 1930.
26. Krüger W. u. Schneidewind W. Sind niedere chlorophyllgrüne Algen imstande, den freien Stickstoff der Atmosphäre zu assimilieren. Ref. Ctbl. f. Bakt. II Abt. Bd. VII p. 149, 1901.
27. Krzemieniewski S. Untersuchungen über Azotobakter chroococcum. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. XXIII p. 161, 1909.
28. Lantsch K. Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann und seine Beziehung zu den Kolloiden. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. Bd. 54 p. 1, 1921.
29. Lantsch K. Der Boden der Wielenbacher Teiche. (Kolloidgehalt, Bakterientätigkeit). — Arch. f. Hydrobiol. Bd. XV p. 406, 1925.
30. Lenz F. Einführung in die Biologie der Süßwasserseen. — Springer, Berlin 1928.
31. Lipman C. B. and L. J. H. Teakle. Symbiosis between Chlorella sp. and Azotobacter chroococcum and nitrogen fixation. — Journ. gen. Physiol. Vol. VII p. 509, 1925.
32. Meyerhof O. and Burk D. Über die Fixation des Luftstickstoffs durch Azotobakter. — Ztschr. f. physikal. Chemie. Abt. A., Bd. 139, 1928.
33. Naumann E. Einführung in die Bodenkunde der Seen. — Schweizerbart, Stuttgart 1930.
34. Nersesjan A. Anaerobnyje azotoswojaszczyje bakterji w ile Kaspiskowo moria. — Izw. Azerbajdżan. Gosud. Uniw. T. 9 p. 39, Baku 1930.
35. Olsen C. On the influence of humus substances on the growth of green plants in water culture. — Compt Rend. Lab. Carlsberg, Vol. 18, 1930.

36. P a l m a n s L. Note sur une azotobactérie trouvée dans le Lac de Genève. — Bull. Soc. Bot. Genève Vol. XVIII p. 161, 1926.
37. P e r f i l i e w B. W. Zur Mikrobiologie der Bodenablagerungen. — Atti Congr. Intern. Limnol. p. 107, Roma 1929.
38. P r a ž m o w s k i A. Studja nad Azotobakterem. — Bull. Int. l'Acad. Sc. Cracov. Ser. B. p. 87, 885, 1912.
39. P r i n g s h e i m H. Ueber die Verwendung von Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. Bd. XXIII p. 306, 1909.
40. R a m a n n E. Bodenkunde. — Springer, Berlin 1911.
41. R e i n k e J. Symbiose von Volvox und Azotobakter. — Ber. d. deut. Bot. Gesell. B. 21 p. 481, 1903.
42. R e m y Th. u. R ö s i n g G. Über die biologische Reizwirkung natürlicher Humusstoffe. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. Bd. 30 p. 349, 1911.
43. S a e g e r A. The growth of duckweeds in mineral nutrient solutions with and without organic extract. — Journ. gen. Physiol. Vol. VII p. 517, 1925.
44. S c h m i d t E. W. Torf als Energiequelle für stickstoffassimilierende Bakterien. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. B. 52 p. 281, 1920—21.
45. S c h o b e r B. Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*. — Jhrb. f. wiss. Bot., Bd. 72, 1930.
46. S c h r ö d e r M. Zur Frage der Assimilation des Luftstickstoffes durch *Aspergillus niger*. — Jhrb. f. wiss. Bot., Bd. 75, 1931.
47. S e l i m M. Nitrogen-Fixing Bacteria in Soils. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. Bd. 83, 1931.
48. S e n n G. Die Assimilation des molekularen Stickstoffs der Luft durch niedere Pflanzen. — Verhandl. Schweiz. Natur. Gesell., p. 69, 1927.
49. S k i n n e r C. E. An explanation of the action of the so called accessory substances in the association of Azotobakter and cellulose decomposing organisms. — Journ. of Bact. Vol. XIX, 1930.
50. S t e i n e r G. Untersuchungsverfahren und Hilfsmittel zur Erforschung der Lebewelt der Gewässer. — Franck'sche Vrlg. Stuttgart 1919.
51. T r u f f a u t G. et B e z s s o n o f f N. Influence de l'Aluminium métallique sur l'activité des bactéries fixatrices d'azote. La Science du Sol. Vol. V. p. 20, 1926.
52. T r u f f a u t G. et B e z s s o n o f f N. Sur la prédominance de l'activité des fixateurs anaérobies d'azote dans le sol. — Ibid.
53. W a l t e r E. Einführung in die Teichdüngung. — Fischerei Ztg., Bd. 25, 1922.
54. W i n o g r a d s k y S. *Clostridium Pastorianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. — Ctbl. f. Bakt. II Abt. Bd. IX, 1902.
55. Z e h m e n v. Das Stickstoffproblem bei der Teichdüngung. — Fischerei Ztg. Bd. 25, 1922.

R É S U M É.

La fixation de l'azote libre par les microbes, dans les bassins d'eau naturels (étangs, marécages) étant fort peu étudiée, on a essayé de déterminer le rôle qui revient à *Azotobacter* et à *Clostridium* dans ce processus.

L'influence stimulante des extraits de terre sur l'assimilation de l'azote atmosphérique par *Azotobacter* en milieu artificiel est généralement connue. Il semblait intéressant de constater si le limon prélevé du fond des eaux aurait la même influence. Les conditions d'aération du sol arrable et du limon étant essentiellement différentes, le limon pourrait être dépourvu du facteur qui détermine la stimulation.

1. On a trouvé dans chaque échantillon de limon l'*Azotobacter* et *Clostridium* prélevé au fond des bassins d'eau naturels, par contre le plancton contenait l'*Azotobacter* seulement.

2. Deux séries parallèles de cultures aérobies et anaérobies en milieu nutritif liquide dépourvu d'azote étaient ensemencées avec de petites quantités de limon frais. On obtenait le meilleur développement en ensemençant avec 0,02% de limon. L'addition de quantités variables de limon stérilisé à ces cultures impures avait une influence favorable sur leur développement, sans toutefois augmenter de manière appréciable la fixation de l'azote. L'extrait aqueux de limon n'exerce aucune influence sur l'assimilation de l'azote dans les cultures i m p u r e s. (Tab. II, III).

3. Les cultures impures aérobies et anaérobies assimilent des quantités d'azote à peu près égales. Dans quelques cultures, une membrane de couleur orangée se formait à la surface du liquide nutritif; dans ces cultures la quantité d'azote assimilé, était beaucoup plus considérable. (Tab. III). Le microbe qui détermine probablement la formation de cette membrane n'a pu être isolé.

4. Les cultures pures d'*Azotobacter* et de *Clostridium* dans les milieux de cultures employés (sans addition de limon) et dans les conditions données d'aération pour *Azotobacter* et d'anaérobie pour *Clostridium*, assimilent des quantités à peu près égales d'azote. (Tab. IV, V). Il semblerait donc, que la fixation de l'azote par *Clostridium* peut, dans certaines conditions être beaucoup plus importante qu'on ne l'admet généralement.

5. L'addition de quantités appropriées de limon séché et stérilisé aux cultures pures d'*Azotobacter* et de *Clostridium* augmente considérablement la fixation de l'azote. Il est à remarquer, que

cette stimulation est beaucoup plus importante pour *Azotobacter* que pour *Clostridium*. (Tab. IV, V).

6. L'addition de quantités équivalentes de limon incinéré stimule l'assimilation de l'azote par *Azotobacter* et *Clostridium* au même degré que l'addition du limon séché. On considère comme équivalente p. ex. à 1 gr. de limon séché, la quantité de substance minérale obtenue par incinération de 1 gr. de limon. Puisque la destruction de la substance organique du limon ne diminue pas son action stimulante, il est évident, que ce sont ses composants minéraux, qui constituent l'agent de la stimulation. (Tab. IV, V).

7. L'extrait aqueux du limon (préparé au bain - marie) stimule aussi l'assimilation de l'azote par *Azotobacter* et *Clostridium* mais en quantité équivalente à un degré moindre que le limon séché ou incinéré (l'extrait de 1 gr. de limon considéré comme équivalent à 1 gr. de limon). L'extrait aqueux du limon préparé sous pression dans l'autoclave, perd toutes ses qualités stimulantes. (Tab. IV, V).

8. Le résidu sec de l'extrait de limon et le résidu incinéré agissent sur la fixation de l'azote tout comme l'extrait lui-même. En augmentant les doses du résidu sec ou incinéré ajoutées au milieu de culture on peut obtenir un effet égal à celui du limon séché ou incinéré. Ce dernier fait est à remarquer, il prouve que la différence entre l'action du limon et de son extrait est purement quantitative, déterminée par la faible solubilité de l'agent stimulant. (Tab. VIII, IX).

9. L'assimilation de l'azote dans les cultures mixtes de *Clostridium* et d'*Azotobacter*, ou ces deux microbes vivent en association est influencée par l'addition de limon de même manière, que dans les cultures pures. (Tab. VII).

10. En présence de quantités suffisantes de substances organiques azotées, la fixation de l'azote par *Clostridium* est tout à fait arrêtée.

11. Les données expérimentales citées nous permettent de conclure, que les composants minéraux du limon sont le facteur qui stimule la fixation de l'azote libre par les microbes.

Institut de physiologie végétale de l'Université de Varsovie.