Über die „Stimulation“ von *Azotobacter* durch Eisen.

K. BASSALIK u. J. NEUGEBAUER.

D. Burk, H. Lineweaver und C. Horner berichten in zwei Publikationen ausführlich über die Natur der Humuswirkung auf das Wachstum von *Azotobacter (vinelandii)*. Danach sehen sie im *Fe*-gehalt verschiedener natürlicher und künstlicher „Humussäuren“ die einzige Ursache der Wachstumsstimulation von *Azotobacter*. Diese Erklärung der Humuswirkung ist nicht neu. Wenn wir Wachstum, Atmung und Stickstoffbindung als physiologisch parallel verlaufende Prozesse betrachten wollten, so haben ja schon lange vorher, besonders Remy und Rösing, z. T. Kaserer und gewissermassen auch Prażmowski, später Kayser u. Delaval wie auch Rippeles postuliert; indirekt, aber besonders scharf, auf Grund seiner Erfahrungen an *Helianthus* und *Lemna polyrhiza*, hat es Olsen ausgedrückt.

Wir haben während unserer mehrjährigen Untersuchungen über die Stimulation der *N*-bindung durch *Azotobacter* auch die *Fe*-Frage eingehender untersucht. Da aber unsere Ergebnisse im allgemeinen — im Sinne einer besonderen „Reizwirkung“ — negativ ausgefallen waren — so haben wir in unserer letzten Publikation diese Frage nicht beliegmässig behandelt mit Ausnahme eines Versuches (S. 246, Tab. XIX). Wir müssen aber jetzt, nach Kenntnismahme der D. Burk'schen u. Mitarbeiter Publikation ausführlicher auf die *Fe*-Frage eingehen. Dies erscheint uns umso nötiger, als die erwähnten Autoren weitreichende Folgerungen aus ihren Experimenten an *Azotobacter* ziehen. Sie folgern aus ihren Versuchen, dass die „Humussäurewirkung“ allein auf ihrem leicht assimilierbaren *Fe*-gehalt beruht, womit sie

- 1) C l a r k' s Befunde an sterilen und nichtsterilen *Lemna*-kulturen,
- 2) die Natur aller wachstumsfördernden resp. regulierenden Stoffe, und
- 3) die günstige Wirkung des Humusgehaltes von Böden auf höhere Landpflanzen erklären.

Die von D. B u r k u. Mitarbeitern angewandte Technik zwecks Feststellung der Wirkung irgendeines wirksamen Faktors, beruhte auf der W a r b u r g' schen Atmungsbestimmungsmethodik und auf Trübungsbestimmungen, ausgeführt mit einem Bausch u. Lomb-Nephelometer, in meist recht kurzdauernden Versuchen. Ohne einstweilen auf die Frage der Zulässigkeit zum erwähnten Zwecke der W a r b u r g' schen eleganten Methodik (Atmung ist doch nicht gleichbedeutend mit Wachstum!) und von nephelometrischen Bestimmungen zwecks Feststellung der Wachstumsgrösse einzugehen, möchten wir hier nur darauf aufmerksam machen, was ja schliesslich jedem *Azotobakterforscher* geläufig ist, dass die Üppigkeit des Wachstums von *Azotobacter* n i c h t parallel mit seiner N-bindung verläuft. Der N-gehalt von *Azotobacter* variiert in s e h r weiten Grenzen, von ca 2 - 15% (G e r l a c h und V o g e l, S t o k l a s a, O m e l j a n s k i und S i e b e r, und demnächst zu publizierende Ergebnisse von J. M a r t y s z e w s k a sowie M. L i n d n e r wie auch A. T r e g e r aus unserem Institut). Wir haben bei unseren Untersuchungen in flüssigen Nährmedien nicht selten *Azotobakterkulturen* getroffen, die geradezu eine feste Gallerte bildeten und verhältnismässig wenig N enthielten und andere, die bei, dem Augenschein nach, schwacher Entwicklung, eine recht bedeutende N-bindung aufwiesen.

Bevor wir nachstehend die Ergebnisse einiger unserer Versuche zwecks Aufklärung der Stimulationswirkung auf *Azotobacter* verschiedener *Fe*-verbindungen vorführen, möchten wir vorausschicken, dass wir die Notwendigkeit von *Fe* für *Azotobacter* als selbstverständlich annahmen. Ausgehend von den Befunden H. K r z e m i e n i e w s k a' s über den Mineralstoffbedarf von *Azotobacter* haben wir mehrere Versuche von verschiedener Zeitdauer ausgeführt, auf Grund welcher wir schliesslich meistens, je nach dem verfolgten Zweck, wie auch zu den unten zitierten Versuchen eine Nährlösung gebrauchten, die pro 1 l doppelt aus Jenaer Glas destilierten Wassers 200 mg CaCO_3 , 200 mg KH_2PO_4 , 50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ aq}$, 50 mg NaCl , 10 mg Na_2SiO_3 , 5 mg FeCl_3 .

und je 1 mg MnSO_4 , ZnSO_4 und $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, neben $\frac{1}{40}$ mol Rohrzucker enthielt. Der *Fe*-gehalt unserer Lösung betrug sonach 1,7 mg pro 1 l.

Die Versuche wurden in 1 l — Kolben aus Jenaer Glas mit je 100 cm³ Nährlösung in dreifacher Wiederholung angesetzt und nach 3-facher Sterilisierung im Dampftopf, mit möglichst geringen Mengen junger Agarkulturen beimpft und in einem Thermostat bei 28° C gehalten. Bis zur Liquidierung wurden sie in Ruhe gelassen, da wir vorher die Erfahrung machten, dass Erschütterung schädlich, manchmal geradezu fatal auf flüssige *Azotobacter*kulturen wirkt (darüber werden wir ein ander Mal ausführliche Belege vorbringen).

Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde — nach Notierung der *Azotobacter*entwicklung nach dem Augenschein — nur der N-gehalt der Kolben, direkt, ohne Umgiessen, mittels der *Kjeldahl*'schen Methode festgestellt. Beimpft wurde in den hier angeführten Versuchen mit *Azotobacter chroococcum* Stamm C, der sich unter den vielen in unserem Institut gezüchteten Stämmen dadurch auszeichnete, dass er zwar kein grosses N-bindungsvermögen besass, aber recht gleichmässig sich stets in allen Parallellkulturen entwickelte u. sozusagen eine stabilisierte Rasse darstellte.

Wir haben im Laufe unserer Untersuchungen es mehrmals probiert, das *W a c h s t u m* vom *Azotobacter* nephelometrisch festzustellen. Unsere Nephelometerbestimmungen gaben aber derartig divergente Resultate, dass wir auf deren Wiedergabe lieber verzichten; erwähnt mag nur werden, dass wir *n i e* in einige Tage alten Kulturen irgendeine Parallelität zwischen Trübungsgrad und N-bindungsbetrag haben feststellen können.

Den Ausgangspunkt der unten tabellarisch zusammengestellten Resultate waren unsere Versuche vom 12 — 26. XI 1928, auf S. 245 unserer letzten Publication angeführt (der Druckfehlerteufel datierte sie 1929!) Die Versuche ergaben, dass Blutkohlen - *a s c h e* höhere N-gewinne ergab als Blutkohle. Wir folgerten daraus, dass der notorisch hohe *Fe*-gehalt der Blutkohle die Ursache der starken N-bindung war, und dass die *v o l l e Fe*-wirkung in der Blutkohle selbst durch zu starke *Fe*-Adsorption nicht genügend hat sich äussern können und erst nach deren Einäscherung voll zum Ausdruck kam. Das Resultat unserer Illusionen inbezug auf die *Fe*-wirkung gibt die Tabelle I in aller Nüchternheit wieder:

TABELLE I.

26°C. 14 Tage. 11. V. 30. Wirkung verschiedener Eisensalze u. s. w. *Azotobacter* — Stamm C. pH 7.68 ± 0,4

Fe-salz resp. Erdex- tract	0	Fe Cl ₃	Fe Cl ₂ 4 aq.	Fe l ₂ 4 aq.	Fe (OH) ₂	Fe SO ₄ 7 aq.	Fe ₂ (SO ₄) ₃ 9 aq.	Fe AsO ₄ 2 aq.	Fe ₃ (PO ₄) ₂ 8 aq.	Fe ₂ (PO ₄) ₂ 4 aq.	Fe CO ₃	K ₄ Fe (CN) ₆ 3 aq.	K ₆ Fe ₂ (CN) ₁₂ reduct.	Fe-acetat	Fe-oxalat	Fe-tartrat	Fe-lactat	Fe-citrat	Fe-NH ₄ -citrat	Fe-saccharat	Hämatin*)	5 cm ³ Erd-extract	Asche davon	20 cm ³ Erd-extract ***)	davon Asche	
1	Fe-menge mg (100cm ³)	0																				?	?	?	?	
2	N-gewinn mg											*	*						*	*	*	*	*	*	*	
		0,18	0,72	0,48	0,56	0,48	0,68	0,96	1,10	0,96	1,10	0,63	0,14	0,14	0,48	0,90	0,83	0,90	1,03	1,03	0,72	1,13	1,68	3,4	1,9	
3	Fe=0 bezogen auf	1,0	4,0	2,66	3,1	2,66	3,77	5,3	6,1	5,3	6,1	3,5	0,77	0,77	3,0	5,0	4,6	5,0	5,7	5,7	4,0	6,3	9,3	18,8	10,6	
4	H-A-ratio bezogen auf mg	0,25	1,0	0,66	0,78	0,66	0,94	1,33	1,53	1,33	1,53	0,88	0,19	0,19	0,66	1,25	1,16	1,25	1,47	1,47	1,0	1,57	2,33	4,72	2,64	
5	Fe-menge mg	0																					?	?	?	?
6	N-gewinn (netto) mg																				*	*	*	*	*	
		0,18	0,72	0,42	0,34	0,34	0,62	1,10	0,68	0,82	0,90	0,70	0	0	0,42	1,0	1,30	0,68	1,30	0,84	1,65	1,30	1,30	—	—	5,33 3,0
7	Fe=0 bezogen auf	1,0	4,0	2,33	1,9	1,9	3,44	6,1	3,8	4,55	5,0	3,9	0	0	2,33	5,55	7,2	3,8	7,2	4,66	9,1	7,2	7,2	—	—	29,6 16,6
8	Fe=0,2 mg	0,25	1,0	0,58	0,47	0,47	0,86	1,53	0,94	1,14	1,25	0,97	0	0	0,58	1,38	1,80	0,94	1,80	1,16	2,28	1,80	1,80	—	—	7,40 4,17

*) nach Abzug des in den Verbindungen enthaltenen N.

**) von Prof. J. Zaleski in „reinstem Zustand“ erhalten; es enthält aber viel Na.

†) „Humic-Acid-ratio“ nach D. Burk = Humuswirkungsgrad.

***) Der Erdextract enthält 0,342 % Trocksbst. u. 0,163 % Asche.

Wir haben in obige Tabelle (I) noch den B u r k ' schen sehr bequemen „Humuswirkungsgrad“ (seine humic acid-ratio) eingeführt, und diesen Wirkungsgrad auf die *N*-bindung, worauf es ja allein ankommt, bezogen. Die Resultate sind sehr klar: eine *Fe*-wirkung macht sich überaus deutlich — gegenüber der *Fe*-„freien“ Kultur — bemerkbar; sie erreicht, bei organischen *Fe*-verbindungen (z. B. Hämatin), mehr als das doppelte der anorganischen Salze; gegenüber dem hier zum Vergleich angewandten Erdextract jedoch (der, verglichen mit vielen anderen Erdextracten sogar z. schwach wirkte) ist sie aber doch 2- bis 4-fach schwächer. Sogar die Erdextractasche wirkte besser. Abgesehen vom Hämatin, dessen *N*-gehalt hätte hemmend wirken können (obwohl Erdextracte ja stets, manchmal sogar einen noch höheren, *N*-gehalt aufweisen), wirkte die Erdextractasche besser als *Fe*-saccharat, die b e s t e der synthetischen, hier angewandten *Fe*-verbindungen. Dabei erreichte die A s c h e n wirkung nur die Hälfte des n i c h t eingeäscherten Bodenextractes!

Zusammenfassend lässt sich aus den Versuchen der I. Tabelle folgern, dass das Eisen für das Leben von *Azotobacter* ein ebenso, wie für alle anderen Organismen, unumgänglich notwendiges Element ist. Es ist dies eine Folgerung, die, auch abgesehen von den glänzenden W a r b u r g ' schen Konzeptionen und Begründungen für jeden Biologen erfahrungsgemäss als selbstverständlich gilt.

Unverkennbar ferner äusserst sich in diesen Versuchen der Einfluss der Bindungsform, in der das Eisen von einem bei einem $\text{pH} = \pm 7,0$ gedeihendem Organismus, wie es *Azotobacter* ist, assimiliert wird; es wirkt wohl als freies Fe^{++} oder Fe^{+++} ion, besser aber dann, wenn es in komplexer Bindung dargeboten wird. Jedoch weichen unsere Zahlen über den Wirkungsgrad komplexer *Fe*-verbindungen weit von den Ergebnissen C. O l s e n ' s für *Lemna* ab, nähern sich aber den Zahlen D. B u r k ' s (vergl. 2, seine Tab. 14 p. 434, wo „synthetische Humussäure IX“ mit 0,84 *Fe* (mg per l) einen Wirkungsgrad von 1.93, dagegen die synt. Humussäure XI mit 0,87 *Fe* einen Wirkungsgrad von 4.10 gegeben hat, also mehr als den doppelten Effect bei gleichem *Fe*-gehalt!). Wir zweifeln nicht, dass die *Fe*-versorgung von *Azotobacter* in künstlichen Kulturen eine noch zu lösende Frage ist, im gleichen Sinne wie für alle Organismen, deren Lebensbestand ein pH verlangt, das höher liegt wie jenes, bei welchem *Fe*-verbindungen in Lösung dissoziieren. Methodisch, werden Versuche zur Lösung

dieser Frage sehr grossen Schwierigkeiten begegnen, besonders darum, weil der *Fe*-bedarf zwecks Aufrechterhaltung eines normalen Metabolismus bei verschiedenen Organismen recht verschiedenen sein mag. Wenden wir uns aber einem aus unserer Tab. I. entnommenem zahlenmässigen Beispiel zu: *Azotobacter* ergab bei 0,2 mg *Fe* als *Acetat* eine *N*-bindung von 0,9 mg; angenommen, dass er 10% *N* in seiner Trockensubstanz enthielt, so betrug diese 9 mg; wenn wir weiter annehmen wollen, was ja experimentellen Daten vielfach entsprechen wird, dass 70% der Trockensubstanz das Körper-Plasma bildete, so enthielte unserer *Azotobacter* in diesem Falle 6,3 mg Plasma. Nach O. W a r b u r g enthält „lebende Substanz“ ca $\frac{1}{1000}\%$ *Fe*. Die *Fe*-menge entspräche darum in unserem Falle 6,3 γ , die also genügen würde, um 9 mg *Azotobacter*-trockensubstanz lebensfähig zu erhalten. In unseren *Fe*-„freien“ Kulturen erhielten wir aber eine netto *N*-bindung von 0,18 mg; der *Azotobacter* würde hier danach den 5-ten Teil von *Fe*-, also ca 1,4 γ *Fe*, enthalten. Würde sonach eine Proportionalität in der *Azotobacter* - Entwicklung resp. *N*-bindung und dem *Fe*-gehalt bestehen, so hätte 0,2 mg *Fe* als *Acetat* die 140-fache *N*-bindung (1,4 : 200 γ) ergeben sollen, nicht aber eine 5-fache, wie im Versuch. Noch schwächer stellt sich die B u r k ' sche, und mutatis mutandis, die C. O l s e n ' sche These im Licht unserer Versuche mit der 5-fach gesteigerten *Fe*-menge dar: die *Fe*-gabe, als *Acetat*, von 1 mg hätte die *N*-bindung von *Azotobacter* 5-fach steigern sollen, während die Steigerung nur ca $\frac{1}{9}$ (1.03 gegen 0,90 mg) gegenüber der 5-fach schwächeren Dose betrug!

Es gibt sonach k e i n e Proportionalität zwischen *Fe*-gabe und *N*-assimilation bei *Azotobacter*, was ja bei den angewandten Konzentrationen auch nie zu erwarten war, auch dann nicht, wenn wir die *Pringsheim'sche* Definition eines mineralischen N ä h r s t o f f e s im Gegensatz zum mineralischen R e i z s t o f f anwenden wollten. Nicht das *Eisen* also trat hier als „limiting factor“ auf.

Bevor wir aber unseren Gedankengang weiter ausspinnen, wenden wir uns den Resultaten zu, die wir hier in Tab. II. zusammenstellen. Wir resümierten, ohne sie zahlenmässig anzuführen, die Resultate der in Tab. II. dargestellten Versuche derart (l. c. p. 246) :, indem wir davon Abstand nehmen, die für uns durch die Resultate traurigen Versuchsergebnisse zahlenmässig zu reproduzieren, bemerken wir nur, dass die verschiedenen *Fe*-präparate umso wirksamer waren, je w e n i g e r s i e r e i n w a r e n ; am wirksamsten waren Wieseneisenerze, obwohl ihre Wirkung selten eine 2

mg — N-bindungsquote überschritt“. Unsere Tab. II gibt die ziffernmässigen Belege und die Begründungen für die zitierten Bemerkungen.

TABELLE II.

28° C, 14 Tage 26. V. 30. *Azotobacter*—Stamm C.
Wirkung verschiedener Fe-quellen (natürliches Wieseneisenerz u. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ + 9 aq

	Fequelle	FeCl_3	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 9aq				Wieseneisenerz* je 3mg					3 mg. Kiefernwaldortstein*	0
							A	B	C	D	E		
1	Fe in mg	0,17	0,2	0,6	1,2	0,60	0,92	0,82	1,12	0,42		0,26	0
2	N—bindung (netto) mg	0,52	0,54	0,73	0,73	0,86	0,68	1,12	0,66	1,46		2,16	0,16
3	H-A „ratio“ bezogen	Fe=0	3,25	3,37	4,56	4,56	5,37	4,25	7,0	4,12	9,12	13,5	1,0
4		Fe = 0,17	1,0	1,04	1,40	1,40	1,76	1,30	2,15	1,27	2,80	4,15	0,31

*) Die Roherze enthielten etwas N, der bei der Berechnung abgezogen wurde

*) H — A — ratio = Humuswirkungsgrad

Die Resultate der obigen Tabelle (II) scheinen unsere vorhin zitierte Schlussfolgerung vollauf zu rechtfertigen. Die Wieseneisenerze A bis E, ebenso wie der Ortstein, wirkten nicht entsprechend ihrem Fe-gehalt. Die beste Wirkung ergab der Ortstein, der nur 8,74 % Fe enthielt: dann folgte Wiesenerz E mit 14,12% Fe, während die höherprozentigen Wiesenerze, wie z. B. D, mit 34,17 % Fe, nur die Wirkung von höheren Gaben an $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ erreichten. Neben Fe enthielten die Erze, nicht von uns quantitativ bestimmte, Mengen von Phosphorsäure und Humussubstanzen, höchstwahrscheinlich auch noch andere Stoffe. Diese, einstweilen unbekannten Stoffe waren es wohl, die für die Wirkung der niedrigprozentigen Eisenerze massgebend gewesen sind.

Wir haben, in unserer schon zitierten Publikation, anfänglich den gleichen Glauben gehegt wie Burk und Mitarbeiter. Die Resultate des auf p. 246 unserer Publikation wiedergegebenen Versuchs klärten uns jedoch über unseren Irrtum auf: Gartenerde-extractasche zeigte einen „Humuswirkungsgrad“ gegenüber der Fe „freien“ Kultur von 31,8, die gleiche Aschenmenge + 0,8 mg Fe als Citrat 16,4 und + 0,16 mg Fe 18,9 gegenüber den gleichen Fe-mengen an Fecitrat, aber ohne Bedenextractasche von 3,0 resp. 2,35 „Humuswirkungsgrad“ und gegenüber 1,64 bei 0,17 mg Fe als FeCl_3 ! Die bessere Eignung von Citrat gegenüber dem

Chlorid ist unverkennbar, aber trotzdem blieb sie weit hinter der Bodenextractaschenwirkung, allein angewandt, zurück.

Auf Grund der in Tab. II wie der hier besprochenen Versuchsergebnisse (in Tab. XIX p. 246 unserer Publikation) kamen wir auf alte Konzeptionen von K a s e r e r, P r a ž m o w s k i und S ö h n g e n zurück (über die Wirkung von Si resp. von Kolloiden überhaupt), und stellten mit einem, damals wegen seiner *Phosphorsäure* - sparenden Wirkung modernem - *Silicagel* Versuche an. Das lösliche *Silicagel*, erhielten wir von Prof. W. Ś w i e t o ś ł a w s k i (Institut f. Physik. Chemie, Polytechn. Warschau), seine genaue analytische Zusammensetzung war uns aber nicht bekannt. Da es schwachgelblich war, vermuteten wir, dass es viel Verunreinigungen enthalte und darum unterwarfen wir es einer gründlichen Dialyse. Die Ergebnisse unserer Versuche mit diesem *Silicagel* stellten wir in Tab. XX, p. 247 unserer Publikation, zusammen. Ihr Ergebnis war überaus eindeutig: während verschiedene Mengen des erwähnten u n d i a l y s i e r t e n *Silicagels* sehr grosse — bei Gaben von 1000 bis 100 mg *Silicagel* fast proportionale — *N*-gewinne ergaben, überstiegen die Ergebnisse mit d i a l y s i e r t e m *Silicagel* wenig diejenigen, die wir mit unserer Standardlösung, die ja stets von vornherein schon 10 mg Na_2SiO_3 per l enthielt und die üblichen Gabe von Fe Cl_3 besass, erzielten. Auf Grund dieser Ergebnisse führten wir in der Folge eine grosse Reihe von Versuchen mit sehr vielen, nicht in „normale“ mineralische Nährlösungen eingehenden chem. Elementen, in den verschiedensten Kombinationen, aus, die wir auch hier noch nicht wiedergeben wollen, da sie — im Ganzen — ziemlich ergebnislos waren und dabei noch anfechtbar wären wegen zu gleichmässiger Dosierung der untersuchten Stoffe. Damals fiel uns nur besonders auf, dass Kombinationen mit *Molybdän* durchwegs bessere Resultate ergaben als *Mo* - freie Lösungen. In diesem Moment wurden wir auf die Ergebnisse B o r t e l ' s aufmerksam gemacht und wir glaubten anfänglich, dass tatsächlich der Clou des Problems im *Mo* liege. Dahin zielende Versuche ergaben wohl (p. 248) Ergebnisse, die besser waren als alle anderen, die wir mit irgendwelchem in unsere Nährlösungen für sich a l l e i n eingeführten Stoffen erhalten haben, jedoch vermochte *Mo*-zusatz n i c h t die Wirkung von Bodenextracten resp. deren Aschen zu erreichen und zu erklären. Wenn B u r k und Mitarbeiter aus ihren Versuchen (5, p. 434, Tab. 14) folgern, dass *Mo* oder andere Stoffe, mit Ausnahme von *Fe*, in ihren Humuspräpa-

raten wirkungslos seien, so übersehen sie leider eine *G r u n d - r e g e l* physiologischer Versuche, und zwar die, dass man zwecks Prüfung der *Wirkung* irgend eines Faktors keinen der in ihrer Bedeutung bekannten Faktoren auslassen darf. Sie versorgten ihre Kulturen mit durchaus unzulänglichen Mengen von Eisen und folgerten daraus die Bedeutungslosigkeit von *Mo* und anderen Stoffen, z. B. *Phosphor*, anstatt *Mo n e b e n Fe*, und zwar im optimalen Ausmass, zu geben! Mit gleichem Erfolg hätten sie die Wirkungslosigkeit von Zucker, unter Auslassung z. B. von *N*, beweisen können!

Wenn wir aber zu den Ergebnissen der hier vorgeführten Tabelle II zurückkehren, so müssen wir konstatieren, dass uns die für *Azotobacter* zugänglichste Bindungsform von *Fe* in künstlichen Nährlösungen unbekannt ist. Er scheint aus *a l l e n Fe*-verbindungen es schöpfen zu können, ein Unterschied macht sich nur quantitativ bemerkbar. Wir führen ihm ja stets, unwillkürlich, mit der Nährlösung als „Verunreinigung“ geringe *Fe*-mengen zu. Dem Massenwirkungsgesetz gemäss werden im Laufe seines Wachstums von ihm weitere *Fe*-mengen, falls wir solche in die Nährlösung wissentlich eingeführt haben, assimiliert, zunächst wohl gleichgültig, in welcher Bindungsform sie vorhanden sind; jedoch die *M e n g e* des derart „mobilisierten“ Eisens mag differieren je nach seiner Bindungsart und kann darum als wachstumsbegrenzender Faktor scharf zum Ausdruck kommen, desto schärfer, je bessere Wachstumsbedingungen der *Azotobacter* in der ihm gebotenen Nährlösung findet. Die zwei arbeitsreichen, hier zitierten Publikationen von *B u r k* und seinen Mitarbeitern hätten einen sehr interessanten und möglicherweise entscheiden den Schritt für unsere Erkenntnis des *Fe*-bedarfs und seiner Assimilierbarkeit durch *Azotobakter* bilden können, wenn sie nicht — zum Schaden der Sache — einseitig auf die Humuswirkung eingestellt worden waren. Die *Fe*-versorgung von *Azotobacter* bleibt — leider — nach wie vor einstweilen noch ungelöst.

DISKUSSION.

Es ist eine allgemein anerkannte Tatsache, dass Bodenzusatz zu synthetischen Nährlösungen für *Azotobacter* dessen *N* - bindungsfähigkeit überaus steigert. Die Ursachen dieser *Wirkung* sind bisher nicht aufgeklärt. Verschiedene Bestandteile des Bodens sind dafür verantwortlich gemacht worden.

Beijerunck, Heinze wie Löhnis erblickten den wirksamen Faktor im Erdboden, dessen Zusatz die N — bindung durch *Azotobacter* in Reinkulturen überhaupt ermöglichte. Krzemienski versuchte darauf die Bodenwirkung zu präzisieren: es sollten, nach ihm die „Humussäuren“ es sein. Aber künstliche Humate wirkten bedeutend schlechter als natürliche; diese aber waren, nach Reinigung mit HCl , fast wirkungslos! Damit begann die Suche nach der Natur des „Humuswirkungsfaktors“. Remy u. Rösing erklärten die Wirkung der Erdextrakte resp. der Humate durch deren Fe — gehalt; Kaserer durch Al — und Fe — Silikate und Phosphate. Rösing (p. 623) gab zu, dass Silikate wohl einige Wirkung ausübten, sprach sie aber dem Al ab. A. Prażmowski versucht mittels zahlreicher Ersatzkolloide, wie z. B. *Dextrin*, *Agar*-und $Fe(OH_3)$ -*Saccharo - Sol*, mit verschiedenen Zusätzen, die Wirkung natürlicher Humate nachzuahmen und zu erklären. Er gelangt zu der Schlussfolgerung, dass die natürlichen Humate dank ihrem kolloidalen Zustand wirken, das aber auch die durch die Sole adsorbierten Stoffe, wie z. B. Fe — und N — verbindungen, nicht belanglos sind. Söhngen schliesslich (im Beijerunck'schen Laboratorium!) führt die ganze Wirkung auf den kolloidalen Zustand der Erdextrakte resp. der Humate zurück. Von nun an wird die Suche nach einem der in den Erdextrakten wirkenden Stoffe eingengt, deren Resultate wir in unserer zit. Publikation, auf S. 217, kurz wiedergaben. Schliesslich scheint es *Mo* zu sein (Bortels), endlich aber wieder Fe (Burk u. Mitarb.)!

Hier möchten wir nur ganz kurz unsere Erfahrungen über die Mo — wirkung, die wir in unserer zit. Publikation (p. 248; Tab. XXI) gaben, ergänzen: Die hier (p. 482) angewandte Nährlösung applizierten wir in 2-fach aus und in Jenaer Glas destilliertem Wasser an, das daraufhin noch in einem völlig aus Quarz bestehendem und mehrfach ausgekochtem Apparat in Quarzgefässe überdestilliert worden war, wobei die *Azotobacter*kulturen gleichfalls in ausgekochten Quarzkolben angesetzt worden waren. Der Wirkungsgrad von *Mo* war in diesen Versuchen nur um 22% höher als in den *Mo*-freien Parallelkulturen, während der Wirkungsgrad von Leitungswasser gleichzeitig 80% betrug. Also *Mo allein* (hier ja neben Fe , Al , Mn , Si und den üblichen mineralischen Bestandteilen angesetzt) war es nicht! Im Zusammenhang damit möchten wir nur erwähnen — was der

eine von uns seit vielen Jahren in seinen Vorlesungen über Pflanzenphysiologie immer wieder betont — dass inbezug auf den Mineralbedarf der Pflanzen der Unterschied zwischen „Nähr“ — und „Reizstoffen“ eine nur und allein *methodische* Angelegenheit ist: wären die mineralischen „Reizstoffe“ ebenso bequem und leicht dosierbar wie die in *gros sen* Mengen benötigten „Nährstoffe“, so existierte eine mineralische „Reizstoff“ — frage überhaupt nicht! Da ausserdem unzweifelhaft die Wirkung irgendeines der mineralischen anerkannten „Nährstoffe“ durch irgend einen anderen *teilweise* „vertretbar“ ist, so existiert kein logisch triftiger Grund um den Gedanken abzulehnen, dass inbezug auf die *teilweise* Vertretbarkeit für „Reizstoffe“ das *gleiche* gilt wie für „Nährstoffe“. Methodisch erschwerend wirkt hierbei noch der Umstand, dass die Pflanze oder die Zelle, wenn es sich um *ein zellige* Organismen handelt, in das neue Nährmedium einen *Vorrat* an lebensnotwendigen Stoffen mitbringt, dessen Menge, besonders wenn es sich um Einzeller handelt, für uns fast unbestimmbar bleibt. Ausserdem braucht ja dieser Vorrat nicht nur im *Plasma* selbst gespeichert zu sein. *Azotobacter* besitzt ja, je nach seinem Entwicklungszustand, mächtige Schleimhüllen, die unzweifelhaft, besonders wegen ihrem Pektincharakter, viel Kationen adsorbieren. *Fe* ist nun besonders leicht adsorbierbar, so dass die in eine frische Kultur mit dem Impfmateri al eingebrachte *Fe*-menge in kurzdauernden Versuchen, wie es die *Burk'schen* waren, für einige Zeit zur Deckung des lebensnotwendigen *Fe*-bedarfs voll ausreichen mag! Um aber auf die *Burk'sche* Erklärung der Wirkung der Humussubstanzen durch ihren *Fe*-gehalt zurück zu kommen, so betrachten wir nur, unvoreingenommen, seine eigenen Ergebnisse: z. B. stellt er einen Humusswirkungsgrad bei seiner künstlichen Humussäure VIII (5, p. 432, Tab. 12), bei einem *Fe* - gehalt von 0,003 mg p. l, von 0,98 (gegenüber der *Fe*-freien Kultur) fest, während die 60-fache Menge nur eine Wirkung von 1,38 besitzt! Ferner, in Tab. 5 (p. 424), hat 0.2 mg *Fe* — *citrat* den Wirkungsgrad von 2.17, dagegen 0,17 mg *Fe* in *natürlicher* „Humussäure“ II, den Wirkungsgrad von 5.79! Ist es trotzdem das *Eisen*, das in der „natürlichen“ (ja schon sehr denaturierten!) Humussäure gewirkt hatte? Man könnte solche Beispiele, bis zur Ermüdung, weiter zitieren. Es kommt aber nur auf *eines* an: *Burk* und Mitarbeiter haben allein die simplizistische Folgerung über die *allein-*

ge *Fe*. — Wirkung der Humuspräparate ziehen können, da sie zu ihrer statistischen Untersuchung nur die *S u m m e n* ihrer sehr auseinanderlaufenden Einzelversuchsergebnisse genommen haben. Es ist ja begreiflich, wenn wir, unserem Herzenswunsch gemäss, vielfältiges physiologisches Geschehen auf *e i n e* einfache mathematische Formel zurückführen oder mit deren Hilfe unsere Probleme lösen wollen. Doch hierbei dürfen wir nicht übersehen, dass uns die Mathematik *n u r* in *q u a n t i t a t i v e n*, nicht dagegen, beim jetzigen Stand der Statistik, in *q u a l i t a t i v e n* Fragen Auskunft und Hilfe gewähren kann. Wir wissen seit langem, und neuerdings durch die Versuche von *M. S e l i n* wie von *M. L e b e n b a u m* und *F. K o t e k*, dass Bodenzusatz zu *Azotobac. er* — oder anderen *N* - binder - Kulturen die *N* - bindung günstiger beeinflusst als ein aus dem gleichen Boden bereiteter wässriger Extract. Wir wissen ferner, dass ein Erdextract günstiger wirkt als die aus der *g l e i c h e n* Bodenmenge dargestellten Humate. Aus unseren, vielfach wiederholten Versuchen, wissen wir, dass (p. 229 u. folg.) *u n g e k o c h t e* Bodenextracte besser wirken als gekochte, dass sogar *D e s t i l l a t e* (p. 230) von ungekochten Extracten noch einige Wirkung aufweisen, die doch *s i c h e r l i c h* *k e i n* *Fe* mehr enthalten! Die Boden — resp. Humuswirkung ist nach allem sonach nicht auf den *Fe* — gehalt allein zurückführbar, auch nicht auf *Mo* oder irgend einen anderen Stoff *a l l e i n* zurückzuführen. Den physiologisch einwandfreiesten Standpunkt hat in dieser Frage, unserem Wissen nach, *M. S c h r ö d e r* eingenommen. Wir kamen — auf Grund unserer anders gestellten Versuche doch zu ähnlichen Ergebnissen in bezug auf die *N* — bindungsstimulation bei *Azotobacter*. Wir möchten hier noch vorwegnehmen, dass wir ähnliche, wenn auch nicht identische, Verhältnisse bei *Lemna* in bezug auf die *Fe* — Wirkung festgestellt haben. Diese Ergebnisse werden demnächst publiziert werden. Hier möchten wir nur, worauf wir später auf Grund von Experimenten, ausführlicher zurückzukommen hoffen, sagen, dass nicht nur *Azotobacter*, aber *a l l e* Organismen, die eine *H* — Konzentration von ungefähr pH 7 oder mehr verlangen, Schwierigkeiten nicht nur in bezug auf die *Fe* — Versorgung, aber vielleicht, in einem noch stärkeren Grade (wegen des bedeutend grösseren Bedarfs), in bezug auf die *P h o s p h o r s ä u r e* haben mögen. Diese letztere Frage wird demnächst von *M. L i n d n e r*, aus unserem Institut, behandelt werden.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. *Fe* ist für *Azotobacter*, wie für alle Organismen, ein lebensnotwendiger Stoff.

2. *Azotobacter*, wie alle Organismen, die eine (H^+) von $pH = 7$ oder mehr verlangen, entnimmt das von ihm benötigte *Fe* leichter kolloidalen und organischen komplexen Verbindungen als anorganischen, dissozierbaren. Quantitativ aber ist dieser Bedarf, besonders auch im Verhältnis zu allen anderen lebensnotwendigen Faktoren, unbekannt.

3. Die günstige „Boden“ — resp. „Humuswirkung“ auf *Azotobacter* und wahrscheinlich auf andere Organismen, ist nur zum Teil auf *Fe* — wirkung zurückführbar, und nicht, wie es Burk und Mitarbeiter wollen, auf *Fe* allein.

Physiologisches Institut d. Univ. Warschau.

LITERATUR.

1. Bassalik, K., Neugebauer, J. Acta Soc. Bot. Pol. 8. 213. 1931.
2. Berthelot, M. Compt. rend. Acad. Sc. Paris. 115. 569. 1892.
3. Blom, J. Centrbl. f. Bact. II. Abt. 84. 60. 1931.
4. Bortels, H. Arch. f. Mikrob. 1. 332. 1930.
5. Burk, D., Lineweaver H., Horner, S. K. Soil Science 33. 413. 1932.
6. — ibid. 455.
7. Heinze, B. Centrbl. f. Bact. II. 10. 671. 1903.
8. — ibid. 12. 61. 1904.
9. — ibid. 30. 349. 1911.
10. Kaserer, H. ibid. 30. 577. 1911.
11. Kotek, T. Acta Soc. Bot. Pol. 8. 47. 1931.
12. Krzemieniewska, H. Bull. internat. Acad. Sc. Cracovie. B. 376. 1910.
13. Krzemieniewski, S. ibid. 1022. 1908.
14. Lebenbaum, M. Acta Soc. Bot. Pol. 9. 207. 1932.
15. Löhnis, F. Centrbl. f. Bact. II. 19. 1906.
16. Löhnis, F., Pillai, N. K. ibid. 20. 781. 1907.
17. Olsen, C. Compt. rend. Lab. Carlsberg. 18. 1930.
18. Prażmowski, A. Bull. internat. Acad. Sc. Cracovie. B. 885. 1912.
19. Remy, T., Rosing, G. Centrbl. Bact. II. 30. 349. 1911.
20. Rippel, A. Med. Klinik. Nr. 20. 1929.
21. Rosing, G. Centrbl. f. Bact. II. 33. 618. 1912.
22. Selim, M. ibid. 83. 310. 1931.
23. Schröder, M. ibid. 75. 1932.
24. Söhnngen, N. L. ibid. 38. 621. 1913.
25. Warburg, O. Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz.