

Wpływ wyciągów z gleby na rozwój *Azotobacter chroococcum* Beij.

(*Influence of soil extracts on the growth of Azotobacter chroococcum Beij.*)

OLGA KOSTECKA

(wpłynęło 14. XI. 1949).

W doświadczeniach polowych przeprowadzonych w końcu XIX w. stwierdzono, że można przez szereg lat uprawiać na polu rośliny i zbierać ustalony na pewnym poziomie plon, bez nawożenia gleby związkami azotowymi. Dowodziło to, że w glebie odbywa się jakiś proces, który wyrównuje azot zabrany jej z plonem. W i n o g r a d s k y przypuszczając, że jest to proces biologiczny poszukiwał bakteryj, zakażając ziemią pożywkę nie zawierającą azotu. W tych warunkach otrzymał on kulturę bakteryj zdolnych do rozwoju w obecności wolnego azotu powietrza, jako jedyne go źródła, lecz rozwijających się tylko wtedy, gdy z otoczenia ich wykluczono tlen. Ponieważ zaś uprawna, przewiewna gleba nie stanowi dogodnego podłoża dla bakterii beztlenowych, należało się spodziewać, że mogą znajdować się w niej bakterie wiążące wolny azot w obecności tlenu.

W roku 1901 B e i j e r i n c k ³ zakażając ziemią pożywkę mineralną z mannitem jako źródłem węgla, a nie zawierającą azotu, otrzymał kulturę, w której różnorodne bakterie tworzyły gruby kożuch z czasem silnie brunatniejący. W kulturze tej stwierdził on przybytek azotu, a następnie wyosobnił z niej bakterię wiążącą wolny azot. Bakteria ta daje na pożywce zestalonej agarem kolonie bezbarwne, półprzeźroczyste, które z czasem przybierają brunatne zabarwienie, stąd nazwa *Azotobacter chroococcum*. Odkrycie azotobactera wzbudziło duże zainteresowanie, gdyż wiązanie wolnego

azotu w jego kulturach było wydatniejsze niż w kulturach bakterij beztlenowych, lecz równocześnie bardzo nierównomierne tak, że nawet Beijerinck w następnej swej publikacji⁴ zwątpił, czy rzeczywiście azotobakter wiąże azot samodzielnie, a to dlatego, bo występowały duże różnice w przybytkach azotu między kulturami czystymi a zanieczyszczonymi. W czystych kulturach azotobaktera przybytki azotu były małe, większe w kulturach surowych, a największe w obecności drobnych ilości ziemi, na co jednak Beijerinck nie zwrócił uwagi. Pewne światło na warunki w jakich odbywa się wiązanie azotu rzuciły badania Krzemieniewskiego¹⁹ wykazujące, że *Azotobacter chroococcum* wiąże wolny azot samodzielnie w obecności małych ilości ziemi lub tylko jej próchnicy. Działanie zaś próchnicy zależne jest od jej pochodzenia. Otrzymana bowiem z różnych gleb, w różnym stopniu działa dodatnio, a również nie bez wpływu jest jej ilość w kulturze.

Z dalszych badań Krzemieniewskiego¹⁹ okazało się, że próchnica nie jest dla azotobaktera ani źródłem azotu, ani źródłem węgla. Nie jest także, jak to wykazała Krzemieniewska¹⁸ źródłem zasadniczych składników mineralnych. Mianowicie azotobakter rozwija się w pożywce z próchnicą tylko wtedy, gdy obok niej znajdują się sole wapnia, magnezu, kwasu fosforowego i siarkowego, a także i potasu wbrew twierdzeniu Gerlach'a i Vogla¹³.

Stwierdzenie faktu, że próchnica wywiera tak wybitny wpływ na rozwój azotobaktera, stało się punktem zwrotnym w badaniach nad procesem wiązania azotu, a głównym ich celem staje się wyjaśnienie mechanizmu działania związków próchnicznych. Badania prowadzono w dwu kierunkach i wypowiadano różne poglądy.

Kasereer¹⁴ tłumaczy aktywność próchnicy obecnością w niej żelaza, glinu, manganu, krzemianów i fosforanów. Remy i Rössing²⁴ stwierdzają, że żelazo jest konieczne dla rozwoju azotobaktera, do czego okazuje się najbardziej odpowiedni wodorotlenek żelaza w alkalicznym roztworze cukru trzcinowego. Inne związki żelaza z wyjątkiem jego połączeń z kwasem krzemowym i wapniem, są mniej korzystne dla procesu wiązania azotu.

Przypisywanie tak wybitnego znaczenia żelazu znalazło potwierdzenie w doświadczeniach Rössinga²⁷ wykazujących osłabienie działania próchnicy przez jej gotowanie z kwasem solnym, przy czym ulega zmniejszeniu ilość związanego w niej żelaza. 0,1 g próchnicy surowej wprowadzonej do pożywki zawierającej 1,84 mg Fe_2O_3 , dało przybytek azotu wynoszący 9,5 mg azotu związanego;

natomiast 0,1 g próchnicy, wytrawianej na zimno kwasem solnym, a zawierającej 0,5 mg Fe_2O_3 daje tylko 7,8 mg przybytku azotu, zaś próchnica, która gotowana z kwasem solnym zawierała jeszcze 0,22 mg Fe_2O_3 , dawała przybytek azotu, który równał się 0,72 mg. Ten związek między ilością żelaza w próchnicy a wiązaniem azotu przez azotobaktera pozwala R ö s i n g o w i przyjąć, że jest ono czynnikiem warunkującym aktywność próchnicy i przychyła się on do poglądów B o n n e m a, że żelazo odgrywa rolę pośrednika przeprowadzającego azot z powietrza w azotyny, a te dopiero są przerabiane przez bakterie. Poza tym towarzyszące zawsze żelazu domieszki kwasu krzemowego i glinu, mogą wywierać pewne dodatnie działanie na rozwój azotobaktera, lecz zawsze słabsze niż żelazo.

Już K r z e m i e n i e w s k i a następnie D o j a r e n k o i R e i n i t z e r¹⁰ przeprowadzali doświadczenia z próchnicą traktowaną kwasem solnym i stwierdzili osłabienie jej aktywności, nie biorąc jednak pod uwagę żelaza, przypisywali je szkodliwemu działaniu kwasu solnego na związki azotowe próchnicy, których azot częściowo przechodził do kwasu.

Burk, L i n e w e a w e r i H o r n e r¹², którzy przeprowadzali doświadczenia z *Azotobacter Vinelandi*, wiązali również znaczenie próchnicy z zawartością w niej żelaza.

Dalej B a s s a l i k i N e u g e b a u e r¹² stwierdzają, że żelazo jest koniecznym pierwiastkiem dla rozwoju azotobaktera, przy czym pobiera on łatwiej żelazo ze związków w stanie koloidalnym lub ze związków organicznych, niż z rozpuszczalnych soli mineralnych. Badacze ci wyciągają stąd wniosek, że korzystne działanie próchnicy jest tylko częściowo zależne od obecności w niej żelaza i przypuszczają możliwość wpływu substancji z kategorii biosów. Wobec tego stosują oni do kultur dodatek wyciągów z drożdży, co daje dobre wyniki w wypadku, gdy wyciąg nie był gotowany. Wyciągi ogrzewane działały znacznie słabiej. Czynnymi okazały się również wyciągi z organów zwierzęcych, z pochwki liściowej pszenicy, jęczmienia i żyta, przy czym te ostatnie działały najkorzystniej. Także dodatki witamin B, C₁ a szczególnie C₂ miały wpływ dodatni.

P r a ż m o w s k i^{22, 23} a następnie S ö h n g e n²⁹ przypisują znaczenie próchnicy jej stanowi koloidalnemu. Pierwszy z nich stara się zastąpić próchniany naturalne sztucznymi składającymi się z agaru, wodorotlenku żelazowego, krzemianu sodowego, węglanu wapnia lub magnezu i peptonu. P r a ż m o w s k i na podstawie swoich doświadczeń dochodzi do wniosku, że nie czyste kol-

loidy, lecz absorbowane przez nie, w odpowiednim stosunku, składniki mineralne, a także związki azotowe organiczne i nieorganiczne wywierają wpływ korzystny na wiązanie azotu przez azotobaktera. Inaczej objaśnia działanie kolloidów *S ö h n g e n*²⁹, który twierdzi, że wielka powierzchnia substancji kolloidalnych pochłania tlen i azot ułatwiając w ten sposób azotobakterowi ich pobranie. Za korzystnym wpływem wzmożonego dostępu tlenu przemawiają doświadczenia z paskami bibuły częściowo zanurzonymi w pożywce. Azotobakter najsilniej rozwijał się na bibule w części wystawionej nad powierzchnię płynu. Wiadomo, że azotobakter nie korzysta z bibuły jako źródła węgla, mogła więc ona działać tylko przez ułatwienie dostępu tlenu.

Na skutek coraz liczniejszych doświadczeń wykazujących dodatni wpływ mikroelementów na rozwój roślin wyższych, szereg badaczy próbuje aktywować przyswajanie wolnego azotu przez dodatek do kultur azotobaktera soli różnych metali. *F r e d* dodaje CuSO_4 , *V o i q u* sole baru, *C o l l e y* sole kadmu, niklu, miedzi i cynku, nie zawsze jednak z wynikiem dodatnim, często wprost z ujemnym np. z miedzią w pożywce płynnej.

Z pośród badaczy pierwszy *B o r t e l s*⁶ spopielił próchnicę i wykazał, że popiół jej dodany do pożywki, działa tylko nieco słabiej niż sama próchnica, czyli że czynnik aktywny w próchnicy jest składnikiem mineralnym. *B o r t e l s*^{6 7 8} być może pod wpływem metody *H a b e r a*, w której molibden jest stosowany jako katalizator redukcji azotu, dodaje do kultur azotobaktera molibdenu i stwierdza jego wpływ dodatni.

Podobnie jak molibden, lecz słabiej, działa wolfram i wanad. To odkrycie *B o r t e l s a* nadało nowy kierunek badaniom nad wiązaniem azotu przez azotobaktera. Cały szereg badaczy stosuje teraz podane przez *B o r t e l s a* pierwiastki, lecz nie zawsze z jednakowym wynikiem. *B a s s a l i k* i *N e u g e b a u e r* przyznają, że w małych ilościach molibden działa korzystnie lecz nie tak dobrze jak wyciągi i ich popioły z substancji pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Dodatni rezultat po dodaniu molibdenu otrzymała *B i r h - H i r s c h f e l d*⁵, gdzie przyrost azotu w kulturach z dodatkiem 0,001—0,01% Mo dorównywał przyrostowi azotu w kulturach z wyciągami z ziemi.

Następnie *M a t y l d a S c h r ö d e r*²⁸ wykazała, że dodatek molibdenu do pożywki z wodą wodociągową zwiększa dziesięciokrotnie, a z wodą destylowaną tylko trzykrotnie wiązanie azotu przez azotobaktera. *S c h r ö d e r* zaleca dodawać do pożywki

z wodą destylowaną żelazo, cynk, miedź, krzem i wanad przy czym ostatnie dwa pierwiastki można, wedle niej, zastąpić wodą wodociągową. R i p p e l zwraca uwagę, że działanie molibdenu ujawnia się wyraźnie dopiero wobec dużych dawek żelaza. W jego doświadczeniach (²⁵, ²⁶), dodatnie działanie molibdenu wobec małych ilości żelaza nie było wyraźne.

Pewne wyjaśnienie przyczyny sprzecznych w wielu razach wyników doświadczeń z molibdenem dały doświadczenia K r z e m i e n i e w s k i e g o i K o v a t s a ²⁰ oraz K o v a t s a ¹⁵ wykazujące, że dodatnie działanie próchnicy można zastąpić przez jednoczesny dodatek molibdenu i żelaza w odpowiednich ilościach. Żaden z tych składników nie działa samodzielnie. Próchnica zwykle zawiera dostateczne ilości żelaza, zaś próchnicom działającym słabo brak jest molibdenu lub innego podobnie działającego pierwiastka. Dodatek molibdenu wzmacnia wpływ słabo działającej próchnicy. Próchnica działająca słabiej z powodu wygotowania z kwasem solnym traci część żelaza, — przez jego dodatek można przywrócić próchnicy jej aktywność.

Stwierdzenie, że czynnikami aktywnymi w próchnicy są mikroelementy jeszcze nie rozwiązywało całkowicie zagadnienia wpływu ziemi na rozwój azotobaktera. Popioły z próchnicy były zawsze mniej czynne niż sama ziemia lub jej próchnica, a także doświadczenia przeprowadzone z wyciągami z gleby wykazywały, że oprócz składników mineralnych odgrywają rolę jeszcze inne czynniki. Wyniki doświadczeń z wyciągami z ziemi otrzymane przez różnych badaczy nie są zupełnie zgodne.

W doświadczeniach K o t k ó w n y ¹⁶ ¹⁷ wyciąg otrzymany w autoklawie pod ciśnieniem trzech atmosfer w ciągu trzech godzin działał słabiej niż wyciąg przygotowany przez kilkunastogodzinne gotowanie na wolnym ogniu. Wynikało z tego, że pod wpływem wysokiej temperatury czynniki działające pobudzająco na rozwój azotobaktera straciły częściowo swą aktywność.

Następnie B a s s a l i k i N e u g e b a u e r ² podają, że ekstrakty z gleby, bakterij, drożdży, kielkujących zbóż i organizmów zwierzęcych tracą częściowo swą aktywność pod wpływem ogrzewania. Z porównania ekstraktów glebowych otrzymanych w temperaturze pokojowej „na zimno” a przesączonych przez świecę C h a m b e r l a n d a oraz wyciągów gotowanych i autoklawowanych wynikało, że aktywność ich jest zależna nie tylko od ilości zawartej w nich suchej masy, ale i od jej jakości. Ogrzewanie ekstraktu otrzymanego „na zimno” do 100°C przez 1 godzinę i przez

3 godziny w temperaturze 144 °C wpływa osłabiająco na jego działanie. Większe ilości wyciągu autoklawowanego w 144 °C, jak wykazują zestawienia wyników (¹, str. 231), zupełnie uniemożliwiają rozwój azotobaktera. Stąd autorzy ci wnioskuje, że w wyższej temperaturze powstają jakieś substancje trujące. Według nich dodatni wpływ wyciągów glebowych jest zależny od dwóch lub trzech czynników. Jednym z nich miałby być składnik wyciągu wrażliwy na temperaturę, a więc o charakterze związków z grupy biosów, drugim mikroelement mineralny, a trzecim nieznany czynnik lotny.

Wbrew powyżej przytoczonym poglądom K r z e m i e n i e w s k i, L ö h n i s oraz B i r c h - H i r s c h f e l d zalecają sporządzanie wyciągów z gleby w temperaturze powyżej 100 °C. K r z e m i e n i e w s k i¹⁰ otrzymuje wyciąg wodny w autoklawie przez 1,5 godziny pod ciśnieniem 1 atmosfery. Podobnie L ö h n i s i P i l a i²¹. B i r c h - H i r s c h f e l d⁵ do swoich doświadczeń używa wyciągów glebowych otrzymanych pod ciśnieniem 1,5 atmosfery i otrzymuje dobre wiązanie azotu (12 mg związanego azotu na 1 g glukozy).

Wobec tego, że wyniki doświadczeń przeprowadzonych z ekstraktami, otrzymanymi różnymi metodami a także z różnych gleb, nie zawsze nadają się do ścisłego porównania należało przeprowadzić doświadczenia z wyciągami otrzymanymi w różny sposób, lecz z jednej i tej samej ziemi. Doświadczenia te zostały wykonane a rezultaty podane są poniżej.

Do doświadczeń tych używano stale ziemi pochodzącej z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Lwowskiego.

Ziemię tę, uprzednio wysuszoną na powietrzu i przesianą przez 2 mm sito przechowywano w większej ilości w chłodnej piwnicy. Ponieważ przy sporządzaniu wyciągu zachowywano stale stosunek 1 części suchej masy ziemi na 2 części wody destylowanej, dlatego co pewien czas oznaczano w tej ziemi ilość zawartej wody przez suszenie do stałej wagi w temperaturze 105 °C.

Wyciągi w temperaturze pokojowej otrzymywano mieszając ziemię z wodą w ciągu 24 godzin. Następnie po odstaniu przez następnych 24 godzin sączono czterokrotnie przez ten sam lejek aż do otrzymania zupełnie klarownego przesączu.

Ekstrahowanie na gorąco odbywało się przez gotowanie 1 godzinę w temperaturze 100 °C, lub 1 godzinę w autoklawie w temperaturze 130 °C. Kolbę z ziemią i wodą ważono, a po ogrzaniu dopełniano do pierwotnej wagi i wyciąg sączono przez bibułę. Ponieważ wiązanie azotu na wyciągach sączonych przez bibułę i oczyszczają-

nych przez wirowanie nie wykazywały różnic, dlatego do późniejszych doświadczeń używano stale wyciągów oczyszczanych z części mechanicznych na wirówce elektrycznej.

Wyciągi otrzymane w różnej temperaturze były różnie zabarwione. Ekstrakty otrzymane w temperaturze 130°C miały kolor intensywnie brązowy, wpadający w czerwony. Ekstrakty w 100°C były koloru mocnej herbaty. Natomiast ekstrakty otrzymane w temperaturze pokojowej były barwy słomkowej. Obserwowano stale zmętnienie wyciągu klarownego po jego ponownym ogrzaniu przy sterylizacji. Kwasowość stwierdzano aparatem foliowym W u l f f a. pH wyciągu ze 130°C wahało się od 7,1—7,3. Wyciąg z temperatury 100°C miał pH od 7—7,2. Wyciąg z temperatury pokojowej stale wykazywał pH 7,1.

Kultury zestawiano po 12—18 w kolbach na 250 ccm ze szkła jenajskiego, o płaskim dnie (średnica 8,5 cm). Kolby zamykano korkami z waty bawełnianej. Do kultur używano pożywki o następującym składzie: na 100 ccm wody destylowanej 10 g glukozy, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,25 g $MgSO_4$, 0,015 g $Fe_2(SO_4)_3$ aq. Do pożywki dodawano zawsze 10 ccm oraz odpowiednią ilość wyciągu. Kultury zestawiano z 50 lub 60 ccm płynu dodając do każdej kolby 0,025 g $CaCO_3$. W wypadku, gdy nie dodawano 50 ccm wyciągu, wówczas ekstrakt uzupełniano do określonej objętości wodą destylowaną.

Pożywkę sterylizowano w parze po 20 minut przez 3 dni. Szczepiono kultury stale jednym i tym samym uszkiem platynowym z trzydniowej kultury azotobaktera, wyrosłej świeżo na pożywce agarowej z mannitem, starając się o możliwie jednakową ilość wprowadzonego materiału. Azotobakter używany do szczepień był wyosobniony z ziemi ogrodowej, z której wygotowywano wyciągi. Przed szczepieniem pożywek i po skończonym doświadczeniu badano czystość kultury azotobaktera w preparatach utrwalonych i barwionych barwikiem G i e m z y lub błękitem metylenowym. Kultury trzymano w termostacie w temperaturze 27—29 °C. Zakończenie doświadczenia następowało przez dodatek 1 ccm kwasu siarkowego stężonego. Zawartość azotu oznaczano metodą K j e l d a h l a. Przyrost azotu w kulturze, będący zarazem miarą rozwoju azotobaktera, obliczano odejmując od znalezionej ilości azotu w kulturze ilość azotu wprowadzonego z pożywką, ekstraktem lub ziemią.

Dla stwierdzenia stopnia aktywności używanej do doświadczeń ziemi i dla uzyskania podstawy do porównania działania w różny sposób przygotowanych wyciągów, zestawiono doświadczenie I z różnymi ilościami ziemi wprowadzonymi do 50 ccm pożywki. Do kultur

dodano suchej masy ziemi, której ilość oznaczono przez suszenie do stałej wagi w temperaturze 105° C. Zawierała ona 0,65% azotu. W 10 ccm pożywki było 0,3 mg azotu. Zestawienie danych podaje Tablica I.

T A B L I C A I.

Ilość suchej masy ziemi dodana do pożywki: (Quantities of dry matter of the soil added to the medium)	N wprowadzony do kultury w mg: (N added to the culture in mg)	N całkowity w mg: (Total N in mg)	Ilość związanego N w mg: (Quantity of fixed N in mg)
0,25 g	1,92	4,76	2,84
		4,48	2,56
0,50 g	3,55	6,86	3,31
		7,84	4,29
1,00 g	6,80	11,20	4,40
		12,32	5,52
1,50 g	10,05	17,08	7,03
		17,64	7,59 *
2,00 g	13,30	21,16	7,86
		20,40	7,10
3,00 g	19,80	27,18	7,38
		26,45	6,65
4,00 g	26,00	32,76	6,76
		33,32	7,32
5,00 g	32,80	40,70	7,90
		40,04	7,24

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 28°C. (5-day experiment. Temp. 28°C).

Jak wynika z tego doświadczenia już 2 g ziemi (suchej masy) powoduje optymalny dla danej gleby rozwój azotobaktera, a wraz z nim maksymalne wiązanie azotu. Po 5 dniach w kulturach z 2 g ziemi znaleziono przybytek azotu średnio z dwu kultur wynoszący 7,48 mg. Dalsze zwiększenie ilości ziemi do 3, 4 i 5 g nie wywarło już wpływu. Odpowiednie średnie przybytki azotu wynosiły: 7,01, 7,04 i 7,57 mg.

Przed przystąpieniem do doświadczeń z wyciągami należało jeszcze stwierdzić, czy wyciągi nie zawierają substancji mogących służyć dla azotobaktera jako źródło węgla, a także, czy nie zawierają one czasem dostatecznej ilości soli mineralnych, co czyniłoby ich dodatek w pożywce zbytecznym. Zestawiono więc w tym celu doświadczenie II używając dwu wyciągów: otrzymamy w 100° C i w 130° C. (Tablica II).

TABLICA II.

Wyciąg (Soil extract)	otrzymamy przy 100° C (received at 100° C)	otrzymany przy 130° C (received at 130° C)
	Przybytek N w mg: (N increase in mg)	
bez dodatku (No substances added)	0,4	1,1
	0,5	0,5
	0,7	0,8
z dodatkiem glukozy (Glucose added)	4,3	5,9
	4,7	7,2
	3,0	6,8
z dodatkiem pożywki całkowitej (Full medium added)	7,2	8,9
	6,8	9,2
	7,0	9,0

Doświadczenie trwało 6 dni. Temperatura 28° C. (6-day experiment. Temp. 28° C).

Jak z tego zestawienia widać rozwój azotobaktera na samym wyciągu był jednakowy i słaby, przeciętnie 0,5 i 0,8 mg. tzn., że wyciągi nie zawierają żadnych związków w dostatecznej ilości, z których mógłby on korzystać. Dodatek glukozy podniósł wiązanie azotu w wyciągu z temperatury 100° C do 755%, a wyciągu z 130° C 828%, w porównaniu z wiązaniem azotu w kulturach z samym wyciągiem, Dalsze podniesienie wiązania azotu przez dodatek do wyciągów składników mineralnych w pożywce wskazuje, że i składniki mineralne w wyciągach nie znajdują się w dostatecznej ilości.

Niedostatek składników mineralnych w wyciągu z temperatury 100° C był większy, przyrost azotu w stosunku do kultur z glukozą wzrósł o 75%, gdy przyrost w kulturach z wyciągiem z temperatury 130° C podniósł się tylko o 42%, czyli wyciąg ten zawierał stosunkowo więcej składników mineralnych niż wyciąg w 100° C. Zatem wyciągi z gleby podobnie jak wyciągi próchnianów, co wykazywały liczy-

TABLICA III.

		Wyciąg otrzymany w temperaturze: (Soil extract received:)									
		pokoowej (at room temperature)			przy (at) 100° C			przy (at) 130° C			
Ilość ccm wyciągu (Quantity of soil extract in ccm)	N wprowadzony do kultur w mg (N added to the culture in mg)	Całkowity N w mg (Total N in mg)	Przybytki N w mg (Quantity of fixed N in mg)	N wprowadzony do kultur w mg (N added to the culture in mg)	Całkowity N w mg (Total N in mg)	Przybytki N w mg (Quantity of fixed N in mg)	N wprowadzony do kultur w mg (N added to the culture in mg)	Całkowity N w mg (Total N in mg)	Przybytki N w mg (Quantity of fixed N in mg)		
4	0,98	1,58	0,60	1,10	2,21	1,11	1,32	3,32	2,00		
6	1,13	1,93	0,80	1,31	2,91	1,60	1,64	3,77	2,13		
8	1,28	2,38	1,10	1,52	3,74	2,22	1,96	4,26	2,30		
10	1,43	2,63	1,20	1,73	4,75	3,02	2,28	5,18	2,90		
20	2,18	3,98	1,80	2,78	5,98	3,20	3,88	9,78	5,90		
40	3,68	6,88	3,20	4,88	10,78	5,90	7,08	14,88	7,80		

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 29° C. (5-day experiment. Temp. 29° C).

ne doświadczenia różnych badaczy (¹⁸, ¹⁹), nie mogą być dla azotobaktera źródłem węgla ani dostatecznym źródłem zwykłych składników mineralnych.

Doświadczenie III miało cel podwójny: chodziło mianowicie o to, jakie ilości wyciągu należy dodać do pożywki aby otrzymać maksymalne wiązanie azotu i jak działają wyciągi w zależności od temperatury, w której zostały sporządzone? (Tab. III).

Do pożywki dodano wyciągi w ilościach odpowiadających różnym ilościom suchej masy ziemi. Ze sposobu przygotowania wyciągów wynikało, że na 1 g suchej ziemi przypadało 2 ccm wyciągu. Użyto więc najmniejszą ilość wyciągu tj. 4 ccm odpowiadającą 2 g ziemi, a więc ilość wywołującą maksymalne wiązanie azotu.

Już wygląd kultur wskazywał na to, że wyciągi działają różnie. Na wyciągach przygotowanych w temperaturze pokojowej rozwój był słabszy, kożuch na powierzchni pożywki powstawał późno, w kulturach na wyciągach przygotowanych na gorąco kożuchy pojawiły się po 3 dniach i następnie brązowiały.

Doświadczenie to pozwoliło stwierdzić, że wyciągi z ziemi bez względu na temperaturę w jakiej zostały przygotowane, działają na wiązanie azotu słabiej niż ziemia, z której pochodzą. Wyciągi przygotowane w wyższej temperaturze działają korzystniej na rozwój azotobaktera aniżeli wyciągi przygotowane w temperaturze pokojowej. Wyciąg otrzymany w temperaturze 130° C w ilości 40 ccm, co odpowiada 20 g ziemi, spowodował wiązanie azotu równe wiązaniu w obecności 2 g ziemi (Tab. I). We wszystkich innych kulturach wiązanie azotu było słabsze. Jeśli przyjąć za 100% największy przybytek azotu otrzymamy przy 40 ccm wyciągu przygotowanego w temperaturze 130° C, to przy tych samych ilościach wyciągów przyrosty wynosiły: przy wyciągu otrzymanym w temperaturze pokojowej 41%, a w temperaturze 100° C 75,6%.

Bardzo słaba aktywność wyciągu przygotowanego w temperaturze pokojowej nasuwała pewną wątpliwość, czy nie działa na niego szkodliwie sterylizacja. Niejednokrotnie bowiem stwierdzono ujemny wpływ ogrzewania pożywek, nawet czysto mineralnych, na wartość ich dla organizmów. R u h l a n d objaśniał to tym, że przy sterylizacji następuje zalkalizowanie pożywki, na skutek utraty CO₂, co pociąga za sobą wytrącenie żelaza z pożywki. Taka pożywka staje się mniej odpowiednią dla bakterij wodorowych i żelazistych (L i e s k e). Należało się zatem przekonać, czy sterylizacja pożywki wpływa na rozwój azotobaktera i w związku z tym wykonano doświadczenie IV. Przygotowano więc wyciąg w temperaturze pokojo-

wej, dodano do niego na każde 50 ccm po 10 ccm pięciokrotnie skoncentrowanej pożywki i rozlano do kolb po 60 ccm. Trzy z nich poddano sterylizacji w temperaturze 100° C, trzy wyjałowiono sącąc przez świece C h a m b e r l a n d a.

T A B L I C A I V .

	Przybytek N w mg — (<i>N increase in mg</i>)	
	Sterylizowany w 100° C (<i>Sterilized at 100° C</i>)	Sączone przez świece Chamberlanda (<i>Filtrated by means of Chamberland's candle</i>)
Pożywka z dodatkiem wyciągu otrzymanego w temperaturze poko- jowej.	2,9	3,2
(<i>Medium with addition of soil extract obtained at room temp.</i>)	3,1	3,3
	3,3	3,2

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 29° C. (*5-day experiment. Temp. 29° C.*)

Jak wynika z oznaczenia azotu w kulturach (Tab. IV), nie można stwierdzić różnicy między kulturami sterylizowanymi w temperaturze 100° C a wyjałowionymi z ominięciem podwyższonej temperatury. Sterylizacja zatem nie wywiera wpływu obniżającego wartość wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej.

Natomiast z doświadczeń Bassalika i Neugebauer wynikało, że w wyciągu otrzymanym w temperaturze pokojowej „na zimno” poddanemu wpływowi ogrzewania w ciągu trzech godzin w autoklawie przy 3 atmosferach (144° C) powstają jakieś substancje działające szkodliwie, które przy większej ilości wyciągu tzn. 50 ccm znoszą całkowicie korzystny wpływ ekstraktu. Ogrzewanie wyciągu przez 1 godzinę osłabia co prawda jego działanie ale w znacznie mniejszym stopniu.

Wobec tego, że jak wynika z naszego doświadczenia, sterylizacja wyciągu przygotowanego w temperaturze pokojowej nie wywarła szkodliwego wpływu na aktywność wyciągu, należało się przekonać, czy nie ulega zmianie wyciąg ogrzewany przez dłuższy czas w temperaturze wyższej. Zestawiono więc doświadczenie V, poddając część wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej działaniu temperatury 100° C przez 1 godzinę. Drugą część ogrzewano w autoklawie przez godzinę w temperaturze 130° C. Trzecią wyjałowiono sącąc przez świece C h a m b e r l a n d a.

TABLICA V.

50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej (50 ccm of soil extract obtained at room temp.)	Sączony przez świecę Chamberlanda (Filtrated by means of Chamberland's candle)	Ogrzewany 1 godzinę w temperaturze 100° C (Heated during 1 hour at 100° C)	Ogrzewany 1 godzinę w temperaturze 130° C (Heated during 1 hour at 130° C)
Przybytek N w mg (N increase in mg)	3,35 ± 0,25	3,05 ± 0,15	2,95 ± 0,15

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 28° C. (5-day experiment. Temp. 28° C).

Jak zwykle użyto do doświadczeń po 50 ccm wyciągu, zestawiając po trzy kultury z każdym ekstraktem. Wyciąg sączony przez świecę Chamberlanda dodano do wyjałowionej pożywki, inne kultury sterylizowano jak zawsze trzy razy w parze. Średni przyrost azotu w wyciągu nieogrzewanym wynosił 3,35 mg w ogrzewanym do 100° C — 3,05 mg, zaś ogrzewany do 130° C — 2,95 mg.

Wobec nieznacznej różnicy na korzyść kultur na wyciągach nieogrzewanych zestawiono następne, podobnie jak poprzednie, VI doświadczenie lecz przedłużono czas ogrzewania do trzech godzin, spodziewając się, że w tych warunkach mogą nastąpić większe różnice. Po 6 dniach oznaczono azot związany (Tab. VI).

TABLICA VI.

50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej (50 ccm of soil extract obtained at room temp.)	Sączony przez świecę Chamberlanda (Filtrated by means of Chamberland's candle)	Ogrzewany 3 godziny w temperaturze 100° C (Heated during 3 hours at 100° C)	Ogrzewany 3 godziny w temperaturze 130° C (Heated during 3 hours at 130° C)
Przybytek N w mg (N increase in mg)	3,8 ± 0,4	4,05 ± 0,35	3,9 ± 0,5

Doświadczenie trwało 6 dni. Temp. 28—29° C. (6-day experiment. Temp. 28—29° C).

Jak widać wiązanie azotu we wszystkich kulturach było jednokowe. Średnie wynoszą: 3,8, 4,05 i 3,8 mg. Spodziewana różnica nie wystąpiła, co wskazuje na to, że pod wpływem działania wyższej

temperatury i to przez czas dłuższy w naszym doświadczeniu nie powstały substancje szkodliwe, a substancje czynne nie uległy zmianie. Można więc wyciągi otrzymane w temperaturze pokojowej sterylizować w 100° C i działanie ich porównywać z działaniem wyciągów z temperatury wyższej.

Wpływ próchnicy, a także składników mineralnych ujawnia się nie tylko przez zwiększenie przybytków azotu, lecz także przez bardziej ekonomiczne zużycie źródła węgla.

Dla stwierdzenia, czy sposób przyrządzania wyciągów i pod tym względem wywiera swój wpływ, zestawiono doświadczenie VII, w którym obok przybytków azotu oznaczono użytą glukozę (Tabela VII).

T A B L I C A VII.

Pożywka z dodatkiem (<i>Medium with addition</i>)	N w mg w kulturach nie zaszczipionych, kontrolnych (<i>N amount in mg in non-inoculated control cultures</i>)	Przybytek N w mg (<i>N increase in mg</i>)	Zużycie cukru w mg (<i>Sugar consumption in mg</i>)	Przybytek N na 1 g glukozy (<i>N increase per 1 g of glucose</i>)
50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej (<i>of 50 ccm of soil extract obtained at room temp.</i>)	3,9	2,4 2,9 2,6	406 460 433	5,91 6,30 6,10
50 ccm wyciągu otrzymanego przy temperaturze 100° C (<i>of 50 ccm of soil extract obtained at 100° C</i>)	6,0	6,53 7,20 6,90	663 712 766	9,80 10,10 9,00
50 ccm wyciągu otrzymanego przy temperaturze 130° C (<i>of 50 ccm of soil extract obtained at 130° C</i>)	8,1	9,50 10,2 8,3	931 850 805	10,2 12,0 10,3

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 29° C. (*5-day experiment. Temp. 29° C.*)

Jak z tablicy widać, nie tylko przybytek azotu w wyciągach otrzymanych w wyższej temperaturze był większy, ale i zużycie glukozy było ekonomiczniejsze. Jeśli przyjąć za 100 związany azot i zużytą glukozę w kulturach z wyciągiem najslabiej działającym, to w kulturach z wyciągiem przygotowanym w 100° C wiązanie azotu wzrosło do 232% a zużycie glukozy tylko do 164%. Jeszcze korzystniej wypadło ono w kulturach z wyciągiem otrzymanym w 130° C. Przyrost azotu wzrósł do 313%, zużycie glukozy do 199%. Przytoczone doświadczenia wykazują zatem jasno, że ekstrahując przy wyższej temperaturze można z ziemi wyciągnąć więcej substancji pobudzającej rozwój azotobaktera.

Wobec doświadczenia wykazującego w wyciągach brak odpowiedniego dla azotobaktera źródła węgla i niedostatecznej ilości zwykłych składników mineralnych (Tab. II), tylko substancjom czynnym należy przypisać dodatni wpływ wyciągów. Najkorzystniejszy okazał się wyciąg otrzymany w autoklawie w temperaturze 130° C.

Istnieją w literaturze spostrzeżenia, że na aktywność ekstraktów glebowych ma wpływ odczyn płynu ekstrahującego. B o r t e l s^o wykazuje, że popioły z ekstraktów alkalicznych działają lepiej niż popioły z ekstraktów kwaśnych. Spostrzeżenia te skłoniły go do wniosku, że substancje czynne w wyciągach glebowych rozpuszczają się w płynach alkalicznych.

B a s s a l i k i N e u g e b a u e r¹ porównywali również ekstrakty kwaśne, obojętne i alkaliczne z gleby lecz nie stwierdzili różnicy ich działania, ponieważ płyny, jak sami zaznaczają, użyte do ekstrahowania gleby miały nieznaczące odchylenie od reakcji obojętnej.

Do wszystkich podanych przeze mnie dotychczas doświadczeń był używany wyciąg sporządzony z wodą destylowaną. Do dwu następnych doświadczeń użyto roztworu o różnej kwasowości.

Użyto mianowicie wyciągów otrzymanych z 300 g ziemi słabym H_2SO_4 lub $NaOH$, poczynając od 1/200 n. płynu. Musiano kilkakrotnie sporządzać wyciągi zasadami i kwasami ażeby otrzymać stosowne wyciągi o odpowiednim odczynie. Kwasy i zasady dodane do ziemi po godzinie gotowania ulegały neutralizacji. Po licznych dopiero próbach otrzymano $pH = 8,1$ dla wyciągu alkalicznego, dla wyciągu kwaśnego 6,9 oraz wyciąg obojętny o $pH = 7,1$. Wyciąg alkaliczny doprowadzono 1/10 n. H_2SO_4 do $pH = 7,1$, również wyciąg kwaśny doprowadzono do $pH = 7,2$ przy pomocy 1/10 n. $NaOH$. Do kultur

(Tab. VIII) używano po 50 ccm w ten sposób zobojętnionego wyciągu, oraz do każdej kultury, jak zawsze, dodano 10 ccm pięciokrotnie stężonej pożywki zasadniczej.

TABLICA VIII.

Pożywka z dodatkiem (Medium with addition of)	50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze 100° C przy pomocy roztworu: (50 ccm of soil extract received at 100°C by means of:)		
	obojętnego (neutral solution)	alkalicznego (alkaline solution)	kwaśnego (acid solution)
Przybytek N w mg	6,2	6,9	3,3
(N increase in mg)	6,4	8,3	4,7

Doświadczenie trwało 7 dni. Temperatura 28° C. (7-day experiment. Temp. 28° C).

Porównując działanie wyciągów sporządzonych płynem obojętnym, słabo alkalicznym i słabo kwaśnym stwierdza się najlepsze wiązanie azotu na wyciągu alkalicznym. I tu również aktywność wyciągu nie objawia się zbyt, zwłaszcza między obojętnym a alkalicznym, gdyż płyny użyte do ekstrahowania ulegały zobojętnieniu już w czasie gotowania.

Wobec braku wyraźnej różnicy pomiędzy wyciągiem obojętnym a alkalicznym zestawiono podobne doświadczenie (Tab. IX) lecz z wyciągami otrzymanymi w silniejszych roztworach kwasu siarkowego i wodorotlenku sodu. Wyciąg sporządzano w temperaturze 100° C. Po licznych próbach otrzymano po 1 godzinie gotowania wyciąg alkaliczny, którego pH = 9,2 oraz wyciąg kwaśny o pH = 4,2. Takie same wyciągi sporządzano w temperaturze 130° C. Wyciąg alkaliczny przy pomocy kwasu podobnie jak w poprzednim doświadczeniu sprowadzono do pH = 7,3, wyciąg kwaśny zaś sprowadzono do pH = 7,2. W ten sposób zobojętnionych wyciągów użyto do kultur w ilości po 50 ccm.

W trzecim dniu doświadczenia można już było zauważyć znacznie lepszy rozwój na pożywce z wyciągiem alkalicznym. W czwartym dniu powstał już gruby kożuch, który w szóstym dniu był zupełnie brązowy. Na wyciągu kwaśnym rozwój był bardzo słaby i do końca kożuch ledwie się zaznaczył. Zestawienie ilości związanego azotu na wyciągu otrzymanym w 100° C i w 130° C płynem obojętnym, alkalicznym i kwaśnym podaje tablica IX. Po 7 dniach azotobakter przyswoił na wyciągu obojętnym otrzymanym w 100° C średnio

T A B L I C A IX.

Pożywka z dodatkiem (Medium with addition of)	Przybytki azotu w mg otrzymane w roztworze: (N increase in mg obtained in solution:)		
	obojętnym (neutral)	alkalicznym (alkaline)	kwaśnym (acid)
50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze 100° C	6,8	9,2	1,6
(50 ccm of soil extract received at 100° C)	6,2	10,3	1,8
	6,7	10,6	1,7
50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze 130° C	8,8	11,6	3,4
(50 ccm of soil extract received at 130° C)	8,9	11,2	2,7
	9,2	10,9	3,2

Doświadczenie trwało 7 dni. Temperatura 28° C. (7-day experiment. Temp. 28° C).

6,56 mg N, alkalicznym 10,03 mg, kwaśnym zaś 1,7 mg. Taki sam wyciąg otrzymany w 130° C umożliwił azotobakterowi przyswoić średnio na wyciągu obojętnym 8,96 mg N, alkalicznym 11,23 mg, kwaśnym zaś 3,1 mg.

Z doświadczenia tego widać, że znaczenie odczynu płynu ekstrahującego występuje wyraźnie. Wyciąg alkaliczny jest bez porównania aktywniejszy niż wyciąg kwaśny. Płynem alkalicznym zatem daje się wyciągnąć z gleby więcej ciał aktywnych. Taki wynik doświadczenia ma swoje uzasadnienie w tym, że kwasy próchniczne pod wpływem zasad tworzą rozpuszczalne próchniany, mogące ulec wypłókanii, natomiast działaniem płynu kwaśnego wytrąca się z ziemi kwasy próchniczne w wodzie nierozpuszczalne. Większą aktywność wyciągów alkalicznych można wiązać z większą ilością rozpuszczonych w nich substancji próchnicznych.

Ażeby przekonać się, czy czynnik pobudzający rozwój azotobaktera można oddzielić z wyekstrahowanych substancji, zastosowano dializę umieszczając wyciąg w rurach celofanowych w wodzie wodociągowej w ciągu 2 i 4 dni. W drugim podobnym doświadczeniu dializowano wyciąg w dializatorze elektrycznym przez 8 godzin. W czasie dializy, roztwory pierwotnie zupełnie czyste, mętniały, przy czym zmętnienie było największe w wyciągu przygotowanym w temperaturze 130° C.

TABLICA X.

Pożywka z dodatkiem 50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze (<i>Medium with addition of 50 ccm of soil extract received at</i>)	Przybytki N w mg: (<i>N increase in mg:</i>)		
	w ekstrakcie niedializowanym (<i>in nondialized soil extract</i>)	w ekstrakcie dializowanym 2 dni (<i>in 2-day dialized soil extract</i>)	w ekstrakcie dializowanym 4 dni (<i>in 4-day dialized soil extract</i>)
pokojoyej (<i>room temp.</i>)	2,85 $\pm 0,55$	1,5 $\pm 0,2$	1,7 $\pm 0,1$
100° C	8,0 $\pm 0,8$	4,6 $\pm 1,1$	3,7 $\pm 0,5$
130° C	9,9 $\pm 0,3$	6,85 $\pm 1,85$	4,65 $\pm 0,45$

Doświadczenie trwało 6 dni. Temp. 28—29°C. (*6-day experiment. Temp. 28—29°C.*)

TABLICA XI.

Pożywka z dodatkiem 50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze (<i>Medium with addition of 50 ccm of soil extract received at</i>)	Przybytki N w mg: (<i>N increase in mg:</i>)	
	w ekstrakcie niedializowanym (<i>in nondialized soil extract</i>)	w ekstrakcie dializo- wanym elektrycznie (<i>in soil extract dialized electrically</i>)
pokojoyej (<i>room temp.</i>)	3,0 $\pm 0,2$	2,65 $\pm 0,15$
100° C	7,25 $\pm 0,35$	5,9 $\pm 0,4$
130° C	9,5 $\pm 0,6$	6,7 $\pm 1,1$

Doświadczenie trwało 6 dni. Temp. 28—29°C. (*6-day experiment. Temp. 28—29°C.*)

Z tablic X i XI wyraźnie widać, że dializowanie w znacznym stopniu zmniejsza aktywność ekstraktów glebowych i to zarówno otrzymanych w temperaturze pokojowej jak i w temperaturze wyższej. Te doświadczenia były zgodne z obserwacjami Birch-Hirschfeld, która również znajduje osłabienie wyciągów dializowanych, gdy chodzi o wiązanie azotu przez azotobaktera. Birch-Hirschfeld próbowała również wydzielić z ekstraktu czynnik aktywny przez roz-

puszczenie go w alkoholu, eterze lub acetonie. Składnik ten okazał się nierozpuszczalny w tych odczynnikach.

Z przytoczonych doświadczeń wynika, że najkorzystniej na rozwój azotobaktera, a tym samym na przybytki azotu w kulturach jego, wpływają wyciągi otrzymane w wyższej temperaturze. Wyciągi te były zawsze silniej niż inne zabarwione na kolor brązowy, co wskazywało na zawartość w nich substancji próchnicznych. Wiadomo, że sama próchnica działa pobudzająco na rozwój azotobaktera, a jak wykazał B o r t e l s^o, przez zawartość czynnych składników mineralnych, w jakiś sposób z nią związanych. Przez dializę wyciągi znacznie traciły na swej aktywności, można więc przypuszczać, że nastąpiło to przez częściową utratę czynnego składnika mineralnego. Nasunęło się zatem pytanie, czy przez dializę można go usunąć także z samej próchnicy.

Chcąc na to pytanie odpowiedzieć wykonano następujące doświadczenie.

Z ziemi, której używano do wszystkich doświadczeń, sporządzono roztwór czystego próchnianu sodu. Jedną porcję w ilości 600 ccm użyto do oznaczenia suchej masy. Drugą taką samą ilość poddano dializie elektrycznej. W czasie dializy wytrąciła się z roztworu próchnianu pewna ilość substancji, którą zebrano na sączku i wysuszono do stałej wagi. Przesącz, znacznie jaśniejszy niż pierwotny roztwór użyty do dializy, odparowano na łaźni i wysuszono do stałej wagi w eksykatorze próżniowym, gdyż otrzymana substancja bardzo słabo lecz wyraźnie chłonęła wodę.

Z 600 ccm roztworu próchnicy uzyskano 5,52 g suchej masy. Z 600 ccm roztworu dializowanego otrzymano: 2,52 g osadu, powstałego w roztworze w czasie dializy i 2,23 g substancji pozostałej w roztworze, a zatem 45,6% suchej masy przeszło do osadu, 40,4% pozostało w roztworze a 13,9% oddializowało się.

Na 50 ccm wody destylowanej i 10 ccm skoncentrowanej pożywki dano do jednych kolb 0,1 g próchnianu, do innych 0,1 g suchej masy osadu powstałego przy dializie względnie też samą ilość suchej substancji pozostałej w roztworze (Tab. XII).

Jak widać z przytoczonych cyfr, osad powstały podczas dializy działał prawie tak samo jak sama próchnica, a było mniej związanego azotu zaledwie o 4,5%. Sucha masa pozostała w roztworze działała 31% słabiej niż próchnian, przy czym również zużycie glukozy było mniej ekonomiczne. Przy 0,1 g osadu otrzymano na 1 g glukozy 10,85 mg związanego azotu, przy 0,1 g substancji pozostałej w roztworze współczynnik ekonomiczny wynosił 8,7. W porów-

TABLICA XII.

Pożywka bez Fe (Medium without Fe)	N przyswojony w mg (N increase in mg)	Współczynnik ekonomiczny (Economic coefficient)
z dodatkiem 0,1 g próchnianu sodu (with addition of 0,1 g of natrium humine)	9,0 9,1	11,3 10,7
z dodatkiem 0,1 g osadu powstałego przy dializie (with addition of 0,1 g of deposit obtained at dialysis)	8,9 8,4	11,4 10,3
z dodatkiem 0,1 g pozostałości w roztworze (with addition of 0,1 g of remainder in solution)	6,2 6,3	8,6 8,8

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 28° C. (5-day experiment. Temp. 28° C).

naniu z wyciągami z ziemi, dializa oddziaływała na próchnian w znacznie słabszym stopniu. Można więc przyjąć, że czynnik aktywny w ziemi jest ściśle związany z substancjami próchnicznymi i nie łatwo jest go od nich odłączyć, kiedy dopiero wyciągi przygotowane przy 130° C działały tak samo jak próchnian (doświadczenie III) i dały podobny współczynnik ekonomiczny równy 10,8.

W czasie dializy substancje próchniczne uległy częściowemu wytrąceniu, a otrzymany osad skupił w sobie większą część czynnika aktywnego. W kulturach z dodatkiem 0,1 g substancji wytrąconych z roztworu, przybytek azotu wynosił 95,5% azotu związanego w kolbach z 0,1 g próchnianu, podczas gdy w kulturach z substancją pozostałą w roztworze 69,0%.

Dializa zatem tylko w bardzo nieznacznym stopniu osłabia działanie próchnicy.

Chcąc nieco bliżej poznać działanie substancji wyekstrahowanych z gleby wyciągi odparowano na łaźni wodnej i wysuszono w eksykatorze próżniowym do stałej wagi. Substancję tak wysuszoną przechowywano stale w eksykatorze, gdyż chłonęła wodę. Najwięcej suchej masy zawierał wyciąg otrzymany w 130° C. W jego 10 ccm było 40 mg suchej masy, w tej samej ilości wyciągu otrzyma-

nego w temperaturze 100° C było 31 mg, a w wyciągu otrzymanym w temperaturze pokojowej było 24 mg suchej substancji. Co do zawartości azotu różnice były nieznaczne. Sucha masa wyciągu z temperatury 130° C miała 3,85% azotu, z temperatury 100° C — 3,79%, a z temperatury pokojowej 3,04%.

Dla porównania działania wyciągów i otrzymanych z nich suchych substancji zestawiono doświadczenie (Tab. XIII) dając do jednych kolb 50 ccm odpowiedniego wyciągu i 10 ccm skoncentrowanej pożywki, do innych zaś ilości suchej masy odpowiadające 50 ccm wyciągu 50 ccm wody destylowanej i 10 ccm pożywki.

TABLICA XIII.

Pożywka + (Medium +)	Wyciąg otrzymany w temperaturze: (Soil extract received at:)					
	pokojowej (room temp.)		(at) 100° C		(at) 130° C	
	wyciąg (extract)	120 mg su- chej masy (120 mg of dry matter)	wyciąg (extract)	155 mg su- chej masy (155 mg of dry matter)	wyciąg (extract)	200 mg su- chej masy (200 mg of dry matter)
Przybytki N w mg (N increase in mg)	3,33 ± 0,4	2,74 ± 0,8	6,83 ± 0,4	5,6 ± 0,3	8,78 ± 0,5	6,88 ± 0,4

Doświadczenie trwało 6 dni. Temperatura 28° C. (6-day experiment. Temp. 28° C).

Z powyższego zestawienia widać, że odparowanie wyciągu wyraźnie osłabiło wpływ zawartej w nich suchej substancji pobudzającej rozwój azotobaktera. Największe straty poniosła sucha substancja z wyciągu zwykle najsilniej działającego, otrzymanego w temperaturze 130° C. Wiązanie azotu osłabiło tu o 21,7%, zaś dwa pozostałe wyciągi straciły na swej aktywności 18 i 17,7%.

Następne doświadczenie (Tab. XIV), zestawiono dodając do kultur równych ilości suchych substancji wyciągów otrzymanych w różnych temperaturach.

Porównując ze sobą otrzymane wyniki wiązania azotu widać, że przyrosty azotu są najlepsze w obecności ekstraktu w 130° C.

Przyjmując przybytek azotu w obecności suchej masy wyciągu w temperaturze pokojowej za 100% to przy tej samej ilości suchej masy ekstrahowanej w temperaturze 100° otrzymamy 150,5% związanego azotu, zaś przy suchej masie wyciągu ze 130° C 172,5%. Jeśli

T A B L I C A XIV.

	Pożywka z dodatkiem 200 mg suchej substancji wyciągu otrzymanego (Medium with addition of 200 mg of dry matter of the soil extract obtained at)		
	w temperaturze pokojowej (room temp.)	przy 100° C (at 100° C)	przy 130° C (at 130° C)
Przybytek N w mg (N increase in mg)	3,5	6,4	7,2
	4,2	6,2	6,8
	4,5	5,7	6,7
	3,8	5,8	6,9

Doświadczenie trwało 6 dni. Temperatura 28° C. (6-day experiment. Temp. 28° C).

porównamy dane z tablicy XIII i XIV to widzimy, że na rozwój azotobaktera wpłynęło tylko zwiększenie suchej masy pochodzącej z wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej. Zwiększenie ilości suchej masy wyciągu otrzymanego przy 100° C pozostało bez efektu.

T A B L I C A XV.

50 ccm	Wyciąg w tempe- raturze pokojowej (Soil extract obtained at room temperature)	Przy (at) 100° C	Przy (at) 130° C	Przybytek N w mg na pożywce bez dodatku ekstraktu glebowego (N increase in mg in medium without soil extract)
	Przybytek N w mg—(N increase in mg)			
wyciągu (of the soil extract)	3,2	7,3	9,8	0,7
	3,0	7,0	9,0	0,8
	3,3	6,9	8,8	0,9
	2,9	6,8	8,9	
podestylatu (remainder after distillation)	3,2	6,3	6,8	
	2,9	6,0	6,7	
	2,5	6,0	6,9	
	2,9	6,5	6,8	
destylatu (distillate)	0,9	0,8	0,8	
	0,8	0,7	0,9	
	0,9	0,6	0,7	

Doświadczenie trwało 6 dni. Temperatura 29° C. (6-day experiment. Temp. 29° C).

Zmniejszenie się aktywności substancji znajdującej się w wyciągach przez ich odparowanie może być spowodowane albo utratą jakiejś substancji lotnej albo zmianą stanu fizycznego jakiegoś składnika czynnego. Dla stwierdzenia, czy w wyciągach znajduje się jakaś substancja lotna mająca wpływ na rozwój azotobaktera, destylowano wyciągi i porównywano działanie destylatów i podestylatów z działaniem wyciągów (Tab. XV).

Jak widać z tej tablicy destylaty nie wywarły żadnego wpływu na wiązanie azotu, rozwój w kulturach z ich dodatkiem był taki sam jak w samej pożywce. Stosowano również destylaty z wyciągów zakwaszonych i zalkalizowanych i okazały się one bez znaczenia. Natomiast podestylaty działały, ale słabiej niż wyciągi, przy czym najwięcej, bo 25,4%, stracił na wartości podestylat z wyciągu najczynniejszego otrzymanego w temperaturze 130° C. Podestylat z wyciągu przygotowanego w temperaturze 100° C utracił 11,4% swej aktywności, a działanie podestylatu wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej obniżyło się najmniej, bo tylko o 7,4%.

Na podstawie tego doświadczenia można stwierdzić, że między substancjami czynnymi nie znajdują się żadne związki lotne, lecz niemniej sam proces destylacji, podobnie jak wysuszenie, wpływa ujemnie. Wskazuje to, że w wyciągach, przynajmniej częściowo, czynną jest substancja ulegająca w czasie tych zabiegów zmianom pokojowej obniżyło się najmniej, bo tylko o 7,4%.

Jak z powyższego widać wysuszenie i oddestylowanie tylko częściowo niszczyło działanie substancji decydujących o rozwoju azotobaktera, co nasuwa przypuszczenie, że w wyciągach znajduje się nie jeden czynnik lecz co najmniej dwa. Obniżenie aktywności przez dializę może wskazywać na obecność aktywnego czynnika mineralnego, obniżenie jej przez wysuszenie pozwala się dopatrywać czynnika organicznego ulegającego obezwładnieniu przez zmianę stanu fizycznego. Dla rozstrzygnięcia tego zagadnienia zestawiono doświadczenie (Tab. XVI), w którym porównano działanie wyciągu przygotowanego w temperaturze 130° C, jego suchej masy i jego popiołu w ilościach odpowiadających 50 ccm wyciągu, a więc 200 mg suchej masy i 42 mg popiołu z niej otrzymanego.

Z doświadczenia tego widzimy, że wpływ popiołu był słabszy niż wyciągu i suchej masy. Przyjmując przyrost azotu w kulturach z wyciągiem za 100 to ilość związanego azotu przez dodatek suchej masy wyrazi się 75,3%, a w obecności popiołu 52,5%. To doświadczenie wykazuje wyraźnie, że obok substancji nieorganicznych czyn-

T A B L I C A X V I.

Pożywka + (Medium +)	Wyciąg otrzy- many w tempe- raturze 130° C (Soil extract received at 130° C) 50 ccm	200 mg suchej substancji wyciągu przy 130° C (200 mg of dry matter of the soil extract obtained at 130° C)	42 mg popiołu z 200 mg suchej substancji przy 130° C (42 mg of ash received from 200 mg of dry matter of the soil extract at 130° C)
Przybytki N w mg (N increase in mg)	9,4 8,2 9,0 9,2 9,0	7,1 5,8 6,8 6,9 7,0	4,7 4,2 5,0 4,9 4,7

Doświadczenie trwało 6 dni. Temperatura 29° C. (6-day experiment. Temp. 29° C).

nych w wyciągach znajdują się jakieś związki organiczne dodatnio wpływające na rozwój i wiązanie azotu przez azotobaktera.

Ten wynik doświadczenia jest zgodny z doświadczeniami przeprowadzonymi z próchnicą i jej popiołami. Zarówno Bortels jak i Kovats stwierdzili, że próchnica była bardziej czynna niż jej popiół, a więc i w próchnicy odgrywały pewną rolę substancje organiczne.

Od czasu prac Bortelsa wiadomem było, że dodatni wpływ ziemi lub próchnicy w kulturach azotobaktera można w dużej mierze zastąpić dodatkiem do pożywki soli molibdenu, wanadu lub wolframu. Jak się później okazało (Bortels, Rippel, Krzemieniewski-Kovats oraz Kovats) pierwiastki te działają tylko wtedy skutecznie, gdy obok nich znajduje się w pożywce dostateczna ilość żelaza.

Wpływ dodatków naszej ziemi, a co za tym idzie i jej wyciągów używanych do kultur był stosunkowo słabszy niż ziemi i wyciągów stosowanych przez innych badaczy jak np. Bassalika i Neugebauer. Można zatem przypuszczać, że słabe ich działanie powoduje brak w naszej ziemi żelaza lub molibdenu, czy innego składnika mineralnego, działającego podobnie.

Dla przekonania się o słuszności tego przypuszczenia zestawiono doświadczenie następujące (Tab. XVII). Do 50 ccm wyciągów z różnych temperatur dodano do jednych żelazo w ilości 0,0015 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ do innych 0,005 g Na_2MoO_4 .

TABLICA XVII.

Pożywka bez Fe (Medium without Fe)	bez dodatku (No substance added)	z dodatkiem 0,0015 g Fe ₂ (SO ₄) ₃ (with addition of 0,0015 g of Fe ₂ (SO ₄) ₃)	z dodatkiem 0,005 g Na ₂ MoO ₄ (with addition of 0,005 g of Na ₂ MoO ₄)
Przybytek N w mg — (N increase in mg)			
z dodatkiem 50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze pokojowej (with addition of 50 ccm of soil extract obtained at room temp.)	2,9	2,7	3,7
	3,4	3,0	3,9
	2,9	3,9	2,8
	3,2	3,2	2,6
z dodatkiem 50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze 100° C (with addition of 50 ccm of soil extract obtained at 100° C)	7,2	7,4	10,1
	6,8	6,3	9,4
	7,2	7,2	8,6
	6,5	7,4	8,9
z dodatkiem 50 ccm wyciągu otrzymanego w temperaturze 130° C (with addition of 50 ccm of soil extract obtained at 130° C)	9,2	9,7	13,9
	8,7	8,9	14,2
	8,9	9,2	13,0
	9,1	9,3	12,6

Doświadczenie trwało 7 dni. Temp. 24—25°C. (7-day experiment. Temp. 24—25°C).

Z powyższego zestawienia wyników widać, że dodatek żelaza, a także molibdenu, do wyciągu przygotowanego w temperaturze pokojowej nie wywarł wpływu. Średnie przybytki azotu z trzech kultur z wyciągu z dodatkiem żelaza i dodatkiem molibdenu wynosiły: 3,1, 3,2 i 3,2 mg. Na wyciąg otrzymany w temperaturze 100°C dodatnio wpłynął dodatek molibdenu, bo przybytek azotu wzrósł o 33,6% w porównaniu z przybytkiem azotu w samym wyciągu. Żelazo nie wywarło wpływu, gdyż średni przyrost azotu z 4 kultur z żelazem wynosił 7,1 mg a średnia z kultur z samego wyciągu 6,9 mg. Podobnie reagował wyciąg otrzymany w temperaturze 130° C. Dodatek molibdenu podniósł jego aktywność o 49,6%, dodatek zaś żelaza o 3,3%. Dodatek molibdenu wywarł następnie korzystny wpływ na wyciągi przygotowane w wyższej temperaturze lecz nie zmienił zachodzących między nimi różnic. Przybytki azotu były większe w wyciągu przygotowanym w temperaturze 130° C i aktywowane przez molibden wynosiły średnio z czterech kultur 13,42 mg, podczas gdy

w tych samych warunkach wyciąg pochodzący z temperatury 100° C dał średnio przybytek azotu 9,25 mg. W tym wyciągu zatem ujawnił się brak żelaza, którego wystarczyło na rozwój w samym wyciągu, lecz zabrakło, gdy rozwój azotobaktera był pobudzony przez molibden. Brak jakiegokolwiek efektu zarówno z dodatkiem żelaza jak i molibdenu w kulturach z wyciągiem przygotowanym w temperaturze pokojowej, świadczy że czynne składniki mineralne znajdowały się w tak drobnej ilości, że nie pozwoliły na silniejszy rozwój azotobaktera. Ujawnił się także niedostatek żelaza, o czym świadczy to, że dodatek molibdenu nie wywarł żadnego wpływu. Za pomocą wody w zwykłej temperaturze odbiera się ziemi tylko bardzo nieznaczną część substancji czynnych niewystarczających dla utrzymania pełnego rozwoju azotobaktera.

T A B Ł I C A XVIII.

Ilość suchej masy wyciągu otrzymanego w temperaturze 130° C (Quantity of dry matter of the soil extract obtained at 130° C)	Pożywka z dodatkiem 0,0015 g $Fe_2(SO_4)_3$ (Medium with addition of 0,0015 g of $Fe_2(SO_4)_3$)	Pożywka z dodatkiem 0,005 g Na_2MoO_4 (Medium with addition of 0,005 g of Na_2MoO_4)	Pożywka z dodatkiem 0,005 g Na_2MoO_4 i 0,0015 g $Fe_2(SO_4)_3$ (Medium with addition of 0,005 g Na_2MoO_4 and 0,0015 g $Fe_2(SO_4)_3$)
	Przybytki N w mg — (N increase in mg)		
20 mg	1,4	1,4	15,5
	2,0	1,7	15,7
40 mg	2,1	2,6	16,9
	2,6	2,5	15,6
80 mg	2,9	3,9	17,0
	3,7	4,0	16,7
100 mg	5,2	5,9	16,9
	4,2	6,2	17,8
200 mg	6,8	9,2	17,2
	7,1	9,1	16,0
bez dodatku suchej masy wyciągu (No substance added)	0,56	0,7	15,7

Doświadczenie trwało 6 dni. Temperatura 28° C. (6-day experiment. Temp. 28° C).

Chcąc dalej stwierdzić przy jakiej ilości suchej substancji wyciągu wystąpi brak żelaza względnie brak drugiego czynnego składnika, a także czy objawi się jej wpływ na kultury zawierające optymalną ilość żelaza i molibdenu w pożywce, co pozwoliłoby wnioskować o znaczeniu substancji organicznej w nim się znajdującej, zestawiono następujące doświadczenie (Tab. XVIII).

Do kultur użyto suchej substancji od 20—200 mg pochodzącej z wyciągu sporządzonego w temperaturze 130° C dodając do jednych kultur żelazo 0,0015 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, do drugich molibden 0,005 g Na_2MoO_4 i do trzecich żelazo i molibden.

Dodatek samego żelaza i samego molibdenu w kulturach z 20, 40, 80 mg suchej substancji nie wpłynął na rozwój azotobaktera. Pewien nieznaczny, korzystny wpływ molibdenu zaznaczył się w kulturach ze 100 mg suchej substancji, w wyraźny zaś sposób, bo wynoszący 31,6% w kulturach z 200 mg suchej substancji. W obecności dodanego razem molibdenu i żelaza wiązanie azotu wzrosło bardzo nieznacznie, a znaczenie suchej masy ujawniło się tylko bardzo słabo. W porównaniu z pożywką bez dodatku suchej masy wyciągu było związanego azotu średnio 15,7 mg, tyleż było w pożywce z 20 mg suchej masy (15,6). Przy większych ilościach suchej masy w pożywce wiązanie azotu wahało się od 16—17,8 mg.

Jak wynika z doświadczeń z wyciągami żelazo i molibden, czy też jakiś analogicznie działający składnik mineralny, bardzo trudno daje się z ziemi wyplukać. Dopiero w temperaturze 130° C otrzymano wyciąg działający tak, jak dziesięciokrotna ilość ziemi wywołująca optymalny dla niej rozwój azotobaktera, a z nim i wiązanie azotu. Wiadomo, że dodatek próchnicy działa tak samo jak dodatek ziemi, z nią więc wydostają się z ziemi składniki czynne. Należało zatem przekonać się w jakim stopniu czynna jest próchnica otrzymana z tej samej ziemi co i wyciągi, o ile z niej przez dializę dają się oddzielić czynne składniki, oraz czy przez dodatek żelaza lub molibdenu można jej wpływ wzmocnić, tak jak daje się podnieść działanie wyciągów.

Chcąc i na to pytanie znaleźć odpowiedź postąpiono w następujący sposób. Przez działanie kwasu solnego a następnie wodorotlenku sodu uzyskano z 1000 g ziemi 1200 ccm roztworu próchnianu sodu. Kwasem strącono kwasy próchniczne a następnie przeprowadzono je ponownie w próchnian sodowy, otrzymując 1200 ccm roztworu. 600 ccm poddano dializie. W czasie dializy z roztworu wytrącił się osad w takiej ilości, że można go było zebrać oddzielnie. Ponieważ nie można było porównywać wyciągu dializo-

wanego z niedializowanym wobec strącania się wyciągu, przeto roztwory odparowano, wysuszono i użyto do kultur równych ilości (Tab. XIX), po 100 mg wysuszonego próchnianu i 100 mg wysuszonego osadu powstałego w czasie dializy.

T A B L I C A XIX.

Pożywka z dodatkiem (<i>Medium with addition of</i>)	bez dodatku (<i>no substance added</i>)	z dodatkiem 0,0015 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (<i>with addition of 0,0015 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$</i>)	z dodatkiem 0,005 g Na_2MoO_4 (<i>with addition of 0,005 g Na_2MoO_4</i>)
	Przybytek N w mg — (<i>N increase in mg</i>)		
0,1 g próchnianu sodu (<i>0,1 g of sodium humine</i>)	9,3	9,6	16,0
	9,6	9,0	15,5
0,1 g osadu powsta- łego przy dializie próchnianu (<i>0,1 g of deposit obtained at dialysis of sodium humine</i>)	8,8	8,9	17,7
	8,2	9,0	17,4

Doświadczenie trwało 5 dni. Temperatura 28° C. (*5-day experiment. Temp. 28° C.*)

Jak widać z tej tablicy w kulturach z próchnicą przybytki azotu, średnio 9,45 mg, były prawie takie same jak w poprzednich kulturach z najlepiej działającym wyciągiem sporządzonym w temperaturze 130° C. Dodatek żelaza nie wpłynął dodatnio ani w kulturach z próchnicą ani z osadem powstałym przy dializie. Dodatek molibdenu podniósł wyraźnie rozwój azotobaktera, przy próchnicy do 166,6%, przy osadzie do 206%. Wskazuje to na to, że z próchnicą zabiera się z ziemi żelazo, nie oddzielające się od niej przez dializę. Wzrost wiązania azotu wskutek dodatku molibdenu pozwala przyjąć, że żelaza tego jest w niej więcej niż w najlepszym wyciągu, dlatego azotobakter w kulturze z próchnicą wobec molibdenu osiąga swój maksymalny rozwój.

STRESZCZENIE

Zestawiając wyniki z przeprowadzonych powyżej doświadczeń można stwierdzić, że wyosobnienie z gleby czynników działających dodatnio, a właściwie koniecznych dla rozwoju azotobaktera, jest trudne. Bardzo drobna tylko ich część przechodzi do roztworu spo-

rządzanego w temperaturze pokojowej, więcej znajduje się ich w wyciągach otrzymanych w temperaturze 100° i 130° C. Wyciągi przygotowane w temperaturze 130° C działają słabiej niż ziemia, dopiero wyciąg z 20 g ziemi działa tak samo jak 2 g ziemi. Prawie bez wartości był wyciąg przygotowany przy kwaśnym odczynie roztworu, wyciągi obojętne miały aktywność pośrednią. W przeciwieństwie do tego wyciągi alkaliczne były najczynniejsze ze wszystkich dotychczas otrzymanych roztworów, a powodem tego było jednoczesne przeprowadzenie do tych wyciągów znacznej ilości próchnianów. Substancje próchnicze gleby, jak to wielokrotnie stwierdzano, działają tak samo jak sama ziemia, z nimi więc wyosabnia się z gleby substancje czynne w ilości wystarczającej do wywołania bujnego rozwoju azotobaktera.

Wyciągi dializowane i otrzymane z wyciągów suche substancje nie przechodzące bez reszty do roztworu, działały słabiej niż odpowiadające im wyciągi, lecz silniej niż otrzymane z nich popioły. Słabsze działanie suchej substancji wyciągów możnaby może przypisać szkodziwemu wpływowi zmiany stanu fizycznego. Osłabienie wyciągu spowodowane przez dializę należy przypisać ubytkowi jakiegoś składnika mineralnego. Że o wartości wyciągów decyduje zawartość w nich czynnych składników mineralnych świadczy to, że popioły są czynne i że wyciąg z gleby można poprawić dodatkiem molibdenu.

Jak wiadomo obecność żelaza i molibdenu w pożywce bez ekstraktu glebowego jest koniecznym warunkiem rozwoju azotobaktera, przy czym molibden można zastąpić wanadem lub wolframem, a może także jakimś innym pierwiastkiem działającym podobnie.

Używane do doświadczeń wyciągi, niezależnie od temperatury, w której je sporządzono, nie zmieniły stopnia aktywności przez dodatek do nich żelaza. Dodatek zaś molibdenu wpłynął korzystnie na wyciągi przygotowane w temperaturze 100° i 130° C. Na wyciąg otrzymany w temperaturze pokojowej ani dodatek żelaza ani molibdenu nie wpłynął dodatnio. We wszystkich tych kulturach przybytki azotu były jednakowo małe. Dodatek molibdenu spowodował podniesienie ilości wiązanego azotu w kulturach z temperatury 100° C o 36,6%, a w kulturach z wyciągiem z temperatury 130° C o 49,6%. Świadczy to o tym, że ilość żelaza w tych wyciągach była dostateczna, natomiast zbyt mała ilość drugiego czynnego składnika nie pozwoliła na osiągnięcie lepszego rozwoju azotobaktera. Takie same wyniki dało doświadczenie z różnymi ilościami suchej substancji z wyciągu najczynniejszego sporządzonego w temperaturze 130° C. Dodatek żelaza i molibdenu całkowicie wyrównał wiązanie azotu w kulturach

z różnymi ilościami suchej substancji wyciągu tak, że jej wpływ tylko bardzo słabo się zaznaczył. Aktywność próchnianu sodowego otrzymanego z tej samej ziemi również nie uległa zmianie po dodaniu żelaza, ale bardzo silnie zareagowała na dodatek molibdenu. Można więc przypuścić, że żelazo było w próchnicy w dostatecznej ilości, brakowało w niej tylko drugiego składnika. Wobec tego, że próchniany działały jak ziemia należy przyjąć, że również w samej ziemi były tylko małe ilości substancji czynnych.

Z Zakładu Fizjologii Roślin im. Emila Godlewskiego
Uniwersytetu i Politechniki we Wrocławiu.

L I T E R A T U R A.

1. Bassalik K. i Neugebauer J. 1931. Acta Soc. Bot. Poloniae, 8.: 213—251.
2. Bassalik K. i Neugebauer J. 1933. Acta Soc. Bot. Poloniae, 10: 481—493.
3. Beijerinck M. W. 1901. Zentralbl. f. Bakt. II., 7: 561—582.
4. Beijerinck und van Delden A. 1902. Zentralbl. f. Bakt. II., 9: 3—43.
5. Birch-Hirschfeld L. 1931. Arch. f. Mikrobiol., 3: 341—361.
6. Bortels H. 1930. Arch. f. Mikrobiol., 1: 333—342.
7. Bortels H. 1933. Zentralbl. f. Bakt. II, 87: 476—477.
8. Bortels H. 1936. Zentralbl. f. Bakt. II, 95: 193—218.
9. Bortels H. 1937. Zentralbl. f. Bakt. II, 97: 250.
10. Bortels H. 1937. Arch. f. Mikrobiol., 8: 1—12.
11. Bortels H. 1937. Arch. f. Mikrobiol., 8: 13—26.
12. Burk D., Lineweaver H. and Horner K. 1932. Soil. Sc., 33: 413.
13. Gerlach M. und Vogel J. 1902. Zentralbl. f. Bakt. II, 8: 669—681.
14. Kaserer H. 1910. Ber. der Deutsch. Bot. Ges., 28: 208—212.
15. Kovats J. 1938. Bull. de l'Acad. Pol. de Sc. Cracovie, 91—112.
16. Kotek F. 1930. Comp. rend. Soc. Sc. Lettr. Varsovie, 23, IV.
17. Kotek F. 1931. Acta Soc. Bot. Poloniae, 8: 47—71.
18. Krzemieniowska H. 1910. Bull. de l'Acad. Pol. de Sc. Cracovie.
19. Krzemieniowski S. 1908. Roczn. Nauk Rolniczych, 4: 1—116.
20. Krzemieniowski S. i Kovats J. 1936. Bull. de l'Acad. Pol. de Sc. Cracovie, 169—195.
21. Löhnis P. und Pilai N. K. 1907. Zentralbl. f. Bakt. II, 19: 87—96.
22. Prażmowski A. 1912. Bull. de l'Acad. Pol. de Sc. Cracovie, 87—174.
23. Prażmowski A. 1912. Bull. de l'Acad. Pol. de Sc. Cracovie, 855—950.
24. Remy Th. und Rösing G. 1911. Zentralbl. f. Bakt. II, 30: 349—384.
25. Rippel A. 1936. Arch. f. Mikrobiol., 7: 210—234.
26. Rippel A. 1936. Arch. f. Mikrobiol., 7: 590—597.
27. Rösing G. 1912. Zentralbl. f. Bakt. II, 33: 618—623.
28. Schröder M. 1932. Zentralbl. f. Bakt. II, 85: 177—211.
29. Söhnngen N. L. 1913. Zentralbl. f. Bakt. II, 38: 621—647.

S U M M A R Y.

Since the results of experiments concerning the nitrogen fixation of *Azotobacter chroococcum* Beij. in soil extracts obtained by means of various methods are not exactly comparable, experiments were carried out by the writer with the extracts received in various ways from the soil sample.

The results are as follows:

1. Water soil-extract contains neither sufficient mineral compounds suitable for the growth of *Azotobacter* nor organic ones. *Azotobacter* grew in such extract only in the case when mineral salts and glucose (as carbon source) were added (Table II).

2. Extract obtained at 130° C has been proved to be the most active; that received at room temperature — the least active. The sugar consumption by *Azotobacter* was also less economic in the extract made at the room temperature than in that prepared at the higher one (Table VII).

3. Sterilization did not change the activity of soil extracts made at room temperature. Quantities of nitrogen fixed were nearly the same in all the three kinds of extracts received at the room temperature: sterilized without heating, sterilized at 100° C, and heated during longer time at 130° C (Table V and VI).

4. Soil extracts received by means of acid solution are little active; their positive influence on the nitrogen fixation of *Azotobacter* is less than that of water extracts (Table VIII and IX).

5. The most active were alkaline extracts, most probably due to passing into them of considerable amounts of humines marked by brown colour of the extract (Table VIII and IX).

6. Dialysis resulted in diminishing of activity of soil-extracts received both at room temperature and at a higher one (Table X and XI). Then, a factor stimulating the growth of *Azotobacter* can be partially removed from the extracts by means of dialysis.

7. A comparison of the activity of the soil extracts received at various temperatures with that of the corresponding amount of their dry matter showed that dry matter is always less active than the corresponding extract (Table XIII). The greatest losses had the dry matter of the most active extract obtained at 130° C.

8. No active gas substances have been found in soil extracts. Distillates have been proved inactive. Remainders after distillation had a positive influence on the nitrogen fixation of *Azotobacter* but less than that of corresponding extracts.

9. Ash of the extract obtained at 130° C was less active than the corresponding amount of the dry matter of this extract (Table XVI).

10. Iron added to water extracts had no influence on the growth of *Azotobacter*, independently on the temperature at which these extracts were obtained. A positive influence of molybdenum was greater in extracts received at 100°C and 130°C. This fact would allow to infer that these extracts contained a sufficient iron quantity. A positive influence of molybdenum on the nitrogen fixation was not found in extracts obtained at room temperature.

11. Only a part of the substance influencing the growth of *Azotobacter* can be extracted from the soil by means of water at 100° C and 130° C. Iron undergoes extraction easier than molybdenum and other similarly acting elements. These elements can be separated from the soil together with humus substances in sufficient quantities to secure a good growth of *Azotobacter* and its nitrogen fixation at an economic consumption of glucose.

*From the E. Godlewski Laboratory of Plant Physiology of the University
in Wrocław.*