

auch auf die Langlebigkeit der Blätter noch im zweiten Jahre beobachten, wie ich es schon 1901 für *Populus fastigiata* gefunden hatte. Auch *Carpinus Betulus* verhält sich ähnlich, ebenso die meisten anderen Baumarten, mit denen experimentiert wurde. Ich werde auf diese Verhältnisse, welche, wie andere längst bekannte Dinge, das Verhalten der Stöcke usw., auch eine grosse Selbständigkeit des Wurzelsystems unserer Bäume beweisen, was ich hier nur in aller Kürze betonen will, in einer nächsten Publikation näher eingehen.

---

### 5. J. Stoklasa: Über die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch *Azotobacter* und *Radiobacter*.

(Vorläufiger Bericht von JULIUS STOKLASA unter Mitwirkung der Assistenten ADOLF ERNEST, JOHANN TRNKA und EUGEN VÍTEK.)

Eingegangen am 22. Januar 1906.

Während meiner Studien im Laboratorium von M. W. BEIJERINCK in Delft habe ich Gelegenheit gehabt, die Methoden der Isolierung des *Azotobacter chroococcum* und *Radiobacter* aus Ackerboden kennen zu lernen. Ich habe unter Mithilfe meiner Assistenten tatsächlich *Azotobacter chroococcum* und *Radiobacter* in unseren Ackerböden in Böhmen nachgewiesen und mit den frisch isolierten Reinkulturen Versuche behufs Studiums der chemischen Vorgänge, welche sich bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes abspielen, angestellt.

Ich kann erklären, dass diese chemischen Vorgänge sich wirklich mit Leichtigkeit verfolgen lassen, denn durch das grosse Verdienst BEIJERINCK's wurde in *Azotobacter* eine Mikrobenart gefunden, welche sich durch grosse Energie bei der Assimilation des Luftstickstoffes auszeichnet.

Von allen bis jetzt bekannten Bakterienarten, bei welchen die Eigenschaft der Assimilation des Luftstickstoffes konstatiert wurde, hat sich bisher bei *Azotobacter* die grösste Potenz ergeben.

Ich will in dieser Abhandlung nur kurz über die umfangreichen Versuche, welche wir mit *Azotobacter* und *Radiobacter* angestellt haben, referieren.

## I. Stickstoffgewinn mit Reinkulturen von *Azotobacter* und *Radiobacter*.

Die Kultur des *Azotobacter chroococcum* sowie die des *Radiobacter*<sup>1)</sup> im flüssigen Nährboden behufs des Stickstoffgewinnes wurden nach BEIJERINCK's Angaben ausgeführt.

37 grosse ERLLENMEYER-Kolben von 15 cm Bodendurchmesser und 40 cm Höhe wurden mit 250 ccm Nährlösung gefüllt, die eine dünne Schicht im Kolben bildete. Zu diesen Versuchen wurde eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung benutzt:

1000 ccm Moldauwasser,  
20 g Mannit,  
0,5 g Kaliumbiphosphat.

Nach gründlichem Sterilisieren in strömendem Dampf und zwar im Autoklav, wurden am dritten Tage nach der Sterilisation mit einer Platinöse einer frischen *Azotobacter*-Kultur 10 Kolben geimpft. Das Impfungsmaterial wurde von Strichkulturen entnommen, die auf Mannit-Bodenextrakt-Agar angelegt waren. 3 Kolben wurden nochmals sterilisiert und als blinde Kolben für die Analyse benutzt. Weitere 10 Kolben wurden mit Reinkultur von *Radiobacter* geimpft. Die Reinkultur wurde in Mannitnährlösung gezüchtet. Sodann wurden 10 Kolben mit *Azotobacter* und *Radiobacter* geimpft<sup>2)</sup>. 30 geimpfte wurden gemeinsam mit 3 ungeimpften Kolben in die Brutkammer gestellt und bei einer Temperatur von 25° C. 10, 15—20 Tage stehen gelassen.

Bei den ungeimpften Kolben wurde nicht die geringste Trübung wahrgenommen. In den mit *Azotobacter* geimpften Kolben zeigte sich auf der Oberfläche eine charakteristische, perlmutterartig glänzende Membrane, welche durch mikroskopische Untersuchung als Reinkultur von *Azotobacter* festgestellt wurde. Bei allen geimpften Kolben wurde durch die mikroskopische Untersuchung eine ungemein starke Vermehrung der Bakterien beobachtet. Die mit *Radiobacter* geimpften Kolben wiesen kein wesentliches Wachstum der Bakterien auf.

Nach Ablauf der vorerwähnten Zeit wurde die Reinheit der Kulturen geprüft und die chemische Analyse von jedem Kolben separat vorgenommen. Wir haben nur diejenigen Kolben zur chemischen Untersuchung benutzt, in denen wir nur die Reinkulturen entweder von *Azotobacter* oder *Radiobacter* konstatieren konnten. Der Stickstoffgehalt wurde nach KJELDAHL-WILFARTH ermittelt.

1) Eine ausführliche Arbeit über die Isolierung von *Azotobacter* und *Radiobacter* sowie die Kenntnis der Lebensbedingungen dieser Bakterien erscheint im Centralblatt für Bakteriologie, II. Abt.

2) Eine Anzahl dieser Kolben wurde nochmals sterilisiert und als blinde Kolben für die Analyse benutzt, und zwar Kolben mit *Radiobacter* und solche mit *Azotobacter* und *Radiobacter*.

Tabelle I.

Nummer des Versuches	Infektionsmaterial	Anzahl der Kulturtage	Gesamtstickstoffgehalt in <i>mg</i> pro Liter	Stickstoffgehalt der Nährlösung in <i>mg</i> pro Liter vor dem Versuche	Stickstoffgewinn in <i>mg</i> pro Liter
I und II.	<i>Azotobacter-chroococcum</i>	10	79,4 *	4,5	74,9
III.	dito	15	95,1	4,5	90,6
IV.	dito	20	103,0	5,0	98,0
V.	dito	20	129,6	5,0	124,6
VI und VII.	<i>Radiobacter</i>	10	6,7 *	4,5	2,2
VIII und IX.	dito	20	10,1 *	5,0	5,1
X.	<i>Azotobacter</i> und <i>Radiobacter</i>	10	64,4	7,8	56,6
XI und XII.	dito	15	104,2 *	7,8	96,4
XIII.	dito	20	112,0	5,0	107,0

Die mit einem Sternchen (\*) bezeichneten Daten sind Durchschnittszahlen aus zwei Versuchen.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, dass *Azotobacter* in 10 Tagen 75 *mg*, in 15 Tagen 90 *mg* und in 20 Tagen 125 *mg* Stickstoff aus der Luft assimiliert hat. Die Ansicht BELJERINCK's, dass *Radiobacter* Stickstoff in elementarer Form assimiliert, können wir auf Grund unserer eigenen Versuche nicht bestätigen. Ferner können wir uns auch nicht der Ansicht anschliessen, dass *Azotobacter chroococcum* in Synergie mit *Radiobacter* in höherem Grade die Eigenschaft besitze, Stickstoff aus der Luft zu assimilieren, als selbst die Reinkultur von *Azotobacter*.

Wir finden sogar einen geringeren Stickstoffgewinn bei Synergie der genannten Bakterien als bei der Kultur bloss von *Azotobacter chroococcum*. *Radiobacter* erwies sich zur Stickstofffixierung in sehr schwachem Grade befähigt.

Wie wir in anderen speziellen Arbeiten nachweisen, ist *Radiobacter* ein ausgesprochener Denitrifikant. In einer GILTAY-ABERSON'schen Lösung, in der sich anstatt Glukose und Zitronensäure Mannit als Kohlenstoffnährquelle und zwar 20 *g* pro Liter befindet, zersetzt *Radiobacter* die Salpetersäure, und es entweichen 70—79 pCt. freien Stickstoffes binnen 14 Tagen. Dabei waren von dem Gesamtstickstoff der Nährlösung ungefähr 10—18 pCt. in organischer Form vorhanden<sup>1)</sup>. *Radiobacter* ist eine eiweissbildende Mikrobenart, die im-

1) Über die Lebensbedingungen dieser interessanten Mikrobe wird an anderer Stelle ausführlich berichtet.

stande ist, bei Gegenwart von geeigneten Kohlenstoffnährquellen den Nitratstickstoff in unlöslichen Eiweissstickstoff überzuführen<sup>1)</sup>.

Wir haben ähnlich wie mit Mannit auch noch Versuche mit anderen Kohlenstoffnährquellen ausgeführt, zu welchen eine Lösung von folgender Zusammensetzung benutzt wurde:

1000 *ccm* Moldauwasser,  
20 *g* Glukose,  
0,5 *g* Kaliumbiphosphat,  
0,25 *g* Natriumkarbonat.

Für die grossen ERLÉNMEYER-Kolben wurden jedesmal 250 *ccm* Nährlösung verwendet.

Nach gründlicher Sterilisation im Autoklav wurden 15 Kolben geimpft mit Reinkultur von *Azotobacter chroococcum*, und 5 blieben ungeimpft. Sodann wurden die Kolben in der Brutkammer bei 25° C. aufbewahrt.

Aus den in Tabelle II dargestellten Resultaten ist zu ersehen, dass die Glukose sich besser als Kohlenstoffnährquelle für *Azotobacter chroococcum* geeignet hat wie Mannit, natürlich ist es aber nötig, etwas Calciumkarbonat oder Natriumkarbonat zuzusetzen.

Nach 15 Tagen ist in sieben Fällen die Glukose fast verschwunden. Es wurde auch ein grösserer Effekt bei der Assimilation des Luftstickstoffes durch *Azotobacter* konstatiert, wie in Mannitnährlösung. Wir fanden sogar, dass in 15 Tagen 180 *mg* Stickstoff pro Liter Nährlösung aus der Luft assimiliert wurden. Auf 100 *g* Glukose werden 445—1054 *mg* Stickstoff aus der Luft assimiliert oder, um 1000 *mg* Stickstoff durch die Bakterienzelle zu binden, werden 99—224 *g* Glukose in Kohlendioxyd und Wasserstoff bzw. Wasser übergeführt. Im Durchschnitt werden auf 1 *g* Stickstoff 165 *g* Glukose verbraucht. Zum Aufbau der Bakterienkörper ist nur ein geringer Teil derselben erforderlich.

BELJERINCK und VAN DELDEN wiesen ausdrücklich darauf hin, dass es ihnen nicht gelungen sei, die Existenz der löslichen Stickstoffverbindungen festzustellen. Durch unsere Versuche haben wir dies bestätigt gefunden. Wir haben nach 5, 10, 15—20 Kulturtagen den Kolbeninhalt zuerst durch Filterpapier filtriert, sodann die Flüssigkeit durch eine CHAMBERLAND'sche Kerze durchgepresst.

Im Filtrate der CHAMBERLAND'schen Kerze haben wir pro Liter der Lösung 5—7 *mg* Stickstoff gefunden, also dieselbe Stickstoffmenge, welche in der ursprünglichen Nährlösung vorhanden war. In dem Inhalt der Kolben konnten wir weder qualitativ, noch quantitativ

1) Als intermediäres Produkt der Reduktion der Salpetersäure zu elementarem Stickstoff ergibt sich salpetrige Säure.

Tabelle

Infektionsmaterial	Anzahl der Kulturtage	Gesamtstickstoff der Nährlösung vor dem Versuche	Gewicht der Bakterienmasse, getrocknet bei 100° C. zum konstanten Gewicht	Stickstoffgehalt der Bakterienmasse in pCt.	Stickstoff in der Bakterienmasse	Stickstoff im Filtrate <sup>1)</sup>	Gesamtstickstoff
		mg pro Liter			mg pro Liter		
<i>Azotobacter</i> .	15	7,5	341,2	10,67	36,4	28,0	64,4
<i>Azotobacter</i> .	15	7,5	1142,0	10,85	124,0	62,8	186,8
<i>Azotobacter</i> .	15	7,5	810,0	11,2	90,8	63,6	154,4
<i>Azotobacter</i> .	15	7,5	876,0	9,09	79,6	28,0	107,6
<i>Azotobacter</i> .	15	6,7	782,0	9,31	72,8	29,4	102,2
<i>Azotobacter</i> .	15	6,7	804,4	10,58	85,1	25,2	110,3
<i>Azotobacter</i> .	15	6,7	639,6	9,71	62,1	35,0	97,1
<i>Azotobacter</i> .	15	6,7	841,2	9,91	83,4	44,8	128,2
<i>Azotobacter</i> .	15	6,7	894,0	10,05	90,4	63,0	153,4

lösliche Stickstoffverbindungen nachweisen und zwar weder nach fünf, noch selbst nach 20 Kulturtagen.

Die von uns untersuchte Bakterienmasse von *Azotobacter chroococcum* enthielt durchschnittlich:

Gesamtstickstoff . . . . .	10,20 pCt.
Reinasche . . . . .	5,60 „
In der Reinasche sind . . . . .	62,35 „ P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>

vorhanden.

Wir haben die feste Bakterienmasse einer näheren chemischen Untersuchung unterzogen und gefunden, dass der Stickstoff der Bakterienmasse hauptsächlich in Form von Nucleoproteiden und Lecithinen vorhanden war.<sup>2)</sup>

Von grossem Interesse war es, die Menge des Kohlendioxyds zu konstatieren, welche während der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch die Bakterienzelle ausgeatmet wurde. Wir haben zu diesem Versuche Kolben nach FERNBACH, welche einen Durchmesser von 20 cm haben, verwendet. In jedem Kolben waren 500 ccm Nährlösung vorhanden. Das Nährsubstrat war pro Liter Moldauwasser aus aus 20 g Mannit, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,01 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zusammengesetzt.

1) Das Filtrieren wurde durch Papierfilter vorgenommen.

2) Die näheren Daten über den Gehalt von Lecithin, Eiweiss und Nukleïn werden wir nächstens ausführlich mitteilen.

## II.

Gehalt an Glukose in der Nährlösung vor dem Versuche	Gehalt an Glukose nach dem Versuche	Verlust der Glukose	Stickstoffgewinn	Stickstoffgewinn pro 100 g verbrauchter Glukose	Für 1 g assimilierten Luftstickstoff wird Glukose zersetzt
g pro Liter			mg pro Liter		mg pro Liter
19,36	6,58	12,78	56,9	445,2	224,6
19,36	1,56	17,79	179,3	1007,8	99,266
19,36	5,42	13,94	146,9	1053,8	94,900
19,36	1,29	18,0668	100,1	554,1	180,487
19,14	0,16	18,9800	95,5	503,1	198,743
19,14	—	19,14	103,6	541,2	184,750
19,14	—	19,14	90,4	472,3	211,725
19,14	—	19,14	121,5	634,8	157,531
19,14	—	19,14	146,7	766,4	130,470

Die Kolben wurden nach gründlicher Sterilisation am dritten Tage geimpft und zwar mit Reinkultur von *Azotobacter chroococcum*. Nach drei Tagen der Impfung wurde keim-,  $\text{CO}_2$ -,  $\text{N}_2\text{O}_5$ - und  $\text{NH}_3$ -freie Luft durchgeleitet und zwar nur oberhalb der Flüssigkeit.

Die Beschreibungen der Apparate, in welchen die Gärungsversuche ausgeführt wurden, sowie die analytischen Methoden sind ausführlich nicht nur in den Berichten der Deutschen Chemischen Gesellschaft 36, 622 und 4058 (1903), sondern auch in den Arbeiten „Alkoholische Gärung im Tierorganismus und die Isolierung gärungserregender Enzyme aus Tiergeweben“ (Archiv für Physiologie, Bd. 101) und „Über die Isolierung gärungserregender Enzyme aus Kuh- und Frauenmilch“ (Archiv für Hygiene, Bd. 50) enthalten.

Aus Tabelle III ersehen wir, dass entsprechend grosse Mengen von Kohlendioxyd ausgeatmet wurden.

Die grösste Intensität der Atmung wurde vom 4. bis 10. Tage beobachtet. Sodann ist allmählig die Menge des ausgeschiedenen Kohlendioxydes zurückgegangen. Um festzustellen, welche Menge  $\text{CO}_2$  pro Gramm Kultur ausgeatmet wurde, haben wir folgende Methode zum Ausscheiden der Bakterienmasse aus dem Nährsubstrat angewandt: Zuerst wurden von der Lösung des Kolbeninhaltes 50 ccm abgemessen und sodann in dieser Menge die  $\text{CO}_2$  bestimmt. Die übrige Flüssigkeit wurde mit etwas Essigsäure angesäuert, verdünnte Natriumacetatlösung zugesetzt, die Flüssigkeit zum Kochen gebracht und verdünnte

Tabelle III.

Die Menge der ausgeatmeten  $\text{CO}_2$  in Gramm pro Tag bei  $25^\circ \text{C}$ .  
Täglich wurden 20 l  $\text{CO}_2$ -,  $\text{NH}_3$ -,  $\text{N}_2\text{O}_5$ - und keimfreie Luft durch die Kolben oberhalb der Flüssigkeit durchgetrieben.

Datum	I. Kolben <i>g</i>	II. Kolben <i>g</i>	III. Kolben <i>g</i>	IV. Kolben <i>g</i>	V. Kolben <i>g</i>	VI. Kolben <i>g</i>	VII. Kolben <i>g</i>	
1. Tag . . . . .	0,0864	0,1358		0,0148	0,0345	0,0376	0,023	
2. „ . . . . .	0,7578	0,2641		0,4206	0,0103	0,2165	0,2339	
3. „ . . . . .	0,8620	0,6343		0,7424	0,4897	0,5405	0,6746	
4. „ . . . . .	0,9291	1,1689	Wurde keine Luft durchgetrieben.	0,6537	1,1873	0,3825	0,6150	
5. „ . . . . .	1,1018	0,5171		0,4997	0,1447	0,3680	0,2355	
6. „ . . . . .	1,5708	1,4004		0,7143	0,3210	0,3505	0,6330	
7. „ . . . . .	1,1243	0,7486		0,6424	0,4561	0,7180	0,6770	
8. „ . . . . .	1,3089	0,9010		0,8514	0,5544	0,4060	0,3585	
9. „ . . . . .	0,4188	0,9710		1,1495	0,4341	0,2865	0,2197	
10. „ . . . . .	0,1706	0,2660		0,1456	0,4650	0,3240	0,2705	
11. „ . . . . .	0,2361	0,2895		0,2754	0,1323	0,2995	0,2815	
12. „ . . . . .	0,1711	0,2225		0,2907	0,0833	0,2425	0,1675	
13. „ . . . . .	0,1929	0,2078		0,2329	0,0860	0,3660	0,2900	
14. „ . . . . .	0,1653	0,2126		0,1554	0,0724	0,4035	0,0720	
15. „ . . . . .	0,1410	0,2128		0,2306	0,1659	0,3305	0,2365	
16. „ . . . . .	0,2095	0,3557		0,0952	0,1132	0,2216	0,1645	
17. „ . . . . .	0,1264	0,2800		0,0496	0,2980	—	—	
18. „ . . . . .	0,0379	0,2491		0,0496	0,1112	—	—	
Zusammen . . .	9,6107	9,0372		—	7,2138	5,1594	5,4937	5,1527
Menge der $\text{CO}_2$ in der Lösung . . .	0,436	0,397		—	0,3645	0,5273	0,225	0,200
Die Gesamtmenge d. ausgeatmeten $\text{CO}_2$	<b>10,0467</b>	<b>9,4342</b>		—	<b>7,5783</b>	<b>5,6867</b>	<b>5,7187</b>	<b>5,3527</b>

Eisenchloridlösung langsam zugesetzt und zwar so lange, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Die gefällte Bakterienmasse wurde auf einem gewogenen Filter gesammelt und zuerst mit heissem Wasser, sodann mit sehr verdünnter Salzsäure und abermals mit warmem Wasser ausgewaschen, bis keine Eisenreaktion im Filtrate zu konstatieren war. Dann wurde die Bakterienmasse zum konstanten Gewicht getrocknet, gewogen und der Gesamtstickstoff bestimmt.

Wir ermittelten das Gewicht in der Trockensubstanz der Bakterienmasse pro 500 ccm:

vom I. Kolben mit	. . . . .	0,483 g
„ II. „	„ . . . . .	0,405 „
„ III. „	„ . . . . .	0,532 „ <sup>1)</sup>
„ IV. „	„ . . . . .	0,186 „
„ V. „	„ . . . . .	0,330 „
„ VI. „	„ . . . . .	0,410 „
„ VII. „	„ . . . . .	0,305 „

Der Gesamtstickstoffgehalt der Bakterienmasse wurde von 9,8 bis 10,5 konstatiert.

1 g der Bakterienmasse, auf Trockensubstanz berechnet, atmet in 24 Stunden nachstehende Mengen Kohlendioxyd aus:

Beim I. Kolben	. . . . .	1,1546 g CO <sub>2</sub>
„ II. „	„ . . . . .	1,2940 „ „
„ III. „	„ . . . . .	— „ „
„ IV. „	„ . . . . .	2,2634 „ „
„ V. „	„ . . . . .	0,9573 „ „
„ VI. „	„ . . . . .	0,8717 „ „
„ VII. „	„ . . . . .	1,0967 „ „

Durchschnittlich atmet 1 g Bakterienmasse, auf Trockensubstanz berechnet, in 24 Stunden 1,2729 g Kohlendioxyd aus. Diese Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds ist gewiss erstaunlich und stellt die grösste Energie des Atmungsprozesses bei allen von mir beobachteten Bakterien dar.

Wir fanden, dass *Bacterium Hartlebi* ein ausgesprochener Denitrifikant ist und 1 g Bakterienmasse, in Trockensubstanz gerechnet, 0,6 g CO<sub>2</sub> ausatmet. Dieselben Quantitäten von *Clostridium gelatinosum*, einem notorischen Ammonisator, liefern innerhalb derselben Zeit nur 0,48 g CO<sub>2</sub>. Die Atmungsversuche wurden mit beiden obenerwähnten Bakterienarten in GILTAY-ABERSON'scher Lösung ausgeführt.

Behufs Feststellung der Produkte, die durch Abbau des Mannits oder der Glukose unter Einwirkung des *Azotobacter* entstanden sind, wurde in folgender Weise vorgegangen:

Grosse Kolben nach Art jener von FERNBACH, die 40 cm im Durchmesser hatten, enthielten 1 l Nährsubstrat von nachstehender Zusammensetzung: In 1 l Moldauwasser waren 20 g Mannit oder Glukose und 0,5 g Dikaliumphosphat enthalten. Nach gründlicher Sterilisierung wurde die Nährlösung mit *Azotobacter* geimpft und in der Brutkammer bei 25° C. gehalten. Alle 24 Stunden wurden 20 l keim- und CO<sub>2</sub>-, NH<sub>3</sub>- und N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-freie Luft durch die Kolben getrieben. Als die Atmungsenergie des *Azotobacter* ihr Maximum erreichte, somit eine tägliche Kohlendioxydproduktion von etwa 1 g sich ergab (nach sieben

1) Dieser Kolben wurde vollständig in Ruhe gelassen.

Tagen), wurde der Kolbeninhalt der Destillation unterworfen, um die Menge des Alkohols und der flüchtigen sowie nichtflüchtigen Fettsäuren festzustellen<sup>1)</sup>. Die von uns zu dieser Bestimmung angewandten Methoden wurden bereits in den obzitierten Arbeiten über die Isolierung glykolytischer Enzyme aus dem pflanzlichen und tierischen Organismus eingehend beschrieben. Die Bestimmung des Alkohols geschah nach einer besonderen, auf der Oxydation seiner durch Chromsäure zu Aldehyd, Essigsäure und Kohlendioxyd beruhenden Methode<sup>2)</sup>.

Zur Ausscheidung der Buttersäure sowie der Essigsäure benutzten wir das Verhalten ihrer Baryumsalze zum Alkohol, in welchem Baryumacetat beinahe unlöslich ist, während buttersaures Baryum in Lösung bleibt. Die Baryumsalze wurden sodann mit Orthophosphorsäure zersetzt und aus den freien Säuren, und zwar Butter- und Essigsäure, nach der Destillation Silbersalze dargestellt; letztere wurden getrocknet, gewogen und das Silber ausgefällt.

Die Butter- und Essigsäure wurde auch durch fraktionierte Destillation nach der Methode DUCLAUX bestimmt. Zur Bestimmung der Milchsäure wurde die Methode von A. PARTHEIL angewandt.

Aus zwei Untersuchungen ergaben sich nachstehende Abbauprodukte des Mannits. In 1 Liter wurden 402–640 *mg* Alkohol, 248–353 *mg* Milchsäure, ferner 624–700 *mg* Essigsäure und nur in einem Falle 95,6 *mg* Buttersäure gefunden, Bernstein- sowie Ameisensäure wurde nicht konstatiert.

Nach 20 Kulturtagen wurde in dem Kolbeninhalt Alkohol nicht gefunden. Die Menge der Milchsäure betrug 35,3 *mg* und die der Essigsäure 166,6 *mg*. Buttersäure, Bernstein-, sowie Ameisensäure wurde qualitativ überhaupt nicht nachgewiesen. Man hat gefunden, dass der  $\text{CaCO}_3$ -Zusatz zum Nährsubstrat die Mineralisierung der organischen Säuren, welche sich durch Abbau des Mannits oder der Glukose bilden, ungemein leicht ermöglicht.

Durch unsere weiteren Forschungen ist es uns gelungen, den Nachweis zu erbringen, dass der Abbau der Glukose ziemlich ähnlich verläuft, wie bei Mannit. Wir haben nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ Milchsäure, Alkohol und Essigsäure nachgewiesen. Von grossem Interesse ist wohl auch in diesem Falle, dass wir die Bildung von Ameisensäure beobachtet haben.

Die Gase, welche sich bei dem Abbau der Kohlenhydrate bilden,

1) Zu dem Kolbeninhalt wurde Kaliumcarbonat bis zur alkalischen Reaktion zugesetzt und der Alkohol abdestilliert. Nach der Austreibung des Alkohols wurde die Lösung mit Phosphorsäure angesäuert und die flüchtigen Fettsäuren mit Dampf ausgetrieben.

2) Berichte der D. Chem. Ges. XXXVIII. 2. Heft. JULIUS STOKLASA, „Über Kohlenhydratverbrennung im tierischen Organismus.“

sind: Kohlendioxyd und Wasserstoff. Beide diese Gase wurden qualitativ nachgewiesen. Die Entnahme der Gase erfolgte aus einem Gärkolben.

Was die quantitative Analyse der bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes entstehenden Gase betrifft, so verfahren wir bei deren Bestimmung folgendermassen: Kolben von der oben angegebenen Dimension, die 1 l Nährlösung entweder mit Mannit oder mit Glukose (unter Zusatz von Calciumcarbonat) enthielten, wurden nach 24 Stunden einem Strome von 10 l keim-,  $\text{CO}_2$ -,  $\text{NH}_3$ - und  $\text{N}_2\text{O}_5$ -freier Luft ausgesetzt, welche die Oberfläche der im Kolben befindlichen Flüssigkeit bestrich. Die Bestimmung des Kohlendioxydes erfolgte nach den geschilderten Methoden. Sodann wurde das kohlendioxyd- und wasserdampffreie Gas durch einen Verbrennungsofen hindurchgetrieben. Die Einrichtung des letzteren war ganz analog jenem, der bei der elementaren Analyse verwendet wird. Das aus dem Wasserstoff gebildete Wasser wurde in Chlorcalciumröhren absorbiert. Methan wurde nicht konstatiert, seine Abwesenheit wurde in beigeschlossenen GEISSLERschen Apparaten bezw. durch Verbrennung gebildeter  $\text{CO}_2$  mit Kaliumhydrat festgestellt.

Im ersten Falle war nach 14 Tagen, vom Zeitpunkte der Impfung an gerechnet das Resultat die Konstatierung von insgesamt 3131,7 mg  $\text{CO}_2$  und 28 mg Wasserstoff.

Im II. Falle wurden bei der Glukose binnen 15 Tagen 4920 mg  $\text{CO}_2$  und 30 mg Wasserstoff gefunden.

Von dem Wasserstoff entsteht gewiss eine viel grössere Menge als die von uns gefundenen Quantitäten. Der Wasserstoff wird grösstenteils in statu nascendi zu Wasser oxydiert.

Man stelle sich den Mechanismus der Vergärung des Mannits und der Glukose durch *Azotobacter chroococcum* folgendermassen vor:

Durch die glykolytischen Enzyme<sup>1)</sup> bei vollem Sauerstoffzutritt wird Mannit oder Glukose in Milchsäure, Alkohol, Essig- und Ameisensäure gespalten.

Bei dem Abbau der oben erwähnten Kohlenhydrate wird Kohlendioxyd und Wasserstoff gebildet. Die grösste Intensität der Atmung unter allen bis jetzt von uns untersuchten Bakterien konnten wir bei *Azotobacter* konstatieren. Durchschnittlich atmet 1 g Bakterienmasse, auf Trockensubstanz berechnet, binnen 24 Stunden 1,3 g Kohlendioxyd aus.

1) Wir haben tatsächlich die glykolytischen Enzyme in der Bakterienmasse von *Bacterium Hartlebi* isoliert. Siehe „Beiträge zur Erkenntnis des Einflusses verschiedener Kohlenhydrate und organischer Säuren auf die Metamorphose des Nitrats durch Bakterien.“ Centralblatt für Bakteriologie 1905.

Wir können annehmen, dass die Assimilation des elementaren Stickstoffes durch *Azotobacter* mit dem Atmungsprozesse in einem gewissen Zusammenhang steht und dem gebildeten Wasserstoff, von welchem sicherlich eine grosse Menge sich bildet, eine wichtige Rolle bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes zukommt.

Prag, Chem-physiol. Versuchsstat. der k. k. böhm. techn. Hochschule.

## 6. J. Wiesner: Zur Laubfallfrage.

Bemerkungen zu H. DINGLER's Abhandlung: „Versuche und Gedanken zum herbstlichen Laubfall.“

Eingegangen am 23. Januar 1906.

Herr Professor H. DINGLER hat kürzlich in diesen Berichten eine im Untertitel der vorliegenden Schrift genannte Abhandlung veröffentlicht, welche mich, um missverständlichen Auffassungen vorzubeugen, nötigt, die nachfolgenden Zeilen der Öffentlichkeit zu übergeben.

Wenn mein kleiner Aufsatz sich in erster Linie zu einer mir aufgenötigten Abwehr gestaltet, so glaube ich doch auch im nachfolgenden durch den Hinweis auf einige neue Tatsachen und durch einige Bemerkungen allgemeiner Natur einen weiteren, wenn auch sehr bescheidenen Beitrag zur Klärung des Laubfallproblems zu bieten.

Wie Herr Professor DINGLER in einer früheren Schrift<sup>1)</sup> selbst hervorhebt, war ich der erste, welcher die Frage des Laubfalles in umfassender Weise experimentell in Angriff nahm. Es geschah dies, nachdem nicht lange vorher H. VON MOHL dieselbe Frage nach anatomischer Richtung zum ersten Male in gründlichster Weise behandelt hatte. Meine hier in Rede stehende Abhandlung erschien vor 35 Jahren.<sup>2)</sup>

Seit dieser Zeit habe ich keine Gelegenheit verabsäumt, dieses seinem Zustandekommen nach so komplizierte Phänomen immer genauer kennen zu lernen, und namentlich gaben mir meine in den letzten 15 Jahren in allen Zonen der Erde durchgeführten photo-

1) H. DINGLER, Zum herbstlichen Laubfall. Forstwiss. Zentralblatt 1902, p. 195.

2) Untersuchungen über die herbstliche Entlaubung der Holzgewächse. Sitzungsber. der Wiener Kais. Akad. der Wiss. Bd. 64 (1871).

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1906

Band/Volume: [24](#)

Autor(en)/Author(s): Stoklasa Julius

Artikel/Article: [Über die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch Azotobacter und Radiobacter. 22-32](#)