

#### 41. Hermann Fischer: Das Problem der Stickstoffbindung (Festlegung des Luftstickstoffs) bei niederen Pflanzen.

(Mitteilung aus der K. Bayr. Teichwirtschaftlichen Versuchsstation in Wielenbach, Abteilung der Biologischen Versuchsstation für Fischerei in München.)  
(Eingegangen am 12. Mai 1917.)

Ueber die inneren Ursachen der Luftstickstoffbindung besteht noch wenig Klarheit. Die heute sicher als stickstoffsammelnd erkannten Organismen sind heterotrophe Schizophyten, also sehr primitive Pflanzen. Es gewinnt den Anschein, daß auch die Fähigkeit der Stickstoffbindung, d. h. der Aufnahme von freiem Luftstickstoff in organische Moleküle eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Erscheinung ist, eine Stickstoffassimilation primitiver Form.

Es deuten viele Erscheinungen darauf hin, daß die Fähigkeit, Luftstickstoff zu binden, Enzymen zukommt, sogenannten *synthetischen Enzymen*<sup>1)</sup>. So könnte man erklären, daß auf ungeeigneten Nährböden die Bakterien bald ihre stickstoffbindende Kraft verlieren. Solange durch die Zelle noch eine Spur des Enzyms auf den neuen Nährboden mitgebracht wird, findet noch Stickstoffbindung statt, und langsam verschwindet mit der Unmöglichkeit, das Enzym neu zu bilden, die stickstoffbindende Kraft der Kulturen.

Wichtiger für das vorliegende Problem wäre es zu wissen, wie die stickstoffbindende Kraft angeregt wird. Einige Beobachtungen beweisen, daß die Stickstoffbakterien, ebenso wie die für den Menschen pathogenen Bakterien ihre ursprüngliche Kraft („Virulenz“) wiederbekommen, wenn man sie durch das Ausgangsmedium wieder hindurchschickt. Worin nun die zweifellos chemischen Eigenschaften des Ausgangsmediums bestehen, welche die Regeneration ermöglichen, darüber bestehen nur Vermutungen.

1) Vgl. J. STOKLASA, Biochemischer Kreislauf des Phosphat-Ions im Boden, Centralbl. f. Bakt. II 1911 Bd. 29 S. 497 ff., und LEONID IWANOFF, ebenda 1909 Bd. 24.

Wenn wir uns aber auf den Standpunkt stellen, daß die Stickstoffbindung auf ein Enzym zurückgeht, so können wir die betreffende Nährbodeneigenschaft in der Fähigkeit zur Unterstützung der Enzyymbildung, also zur Bildung bestimmter Eiweißkörper, suchen. Dafür spricht in der Tat die Summe der Beobachtungen, die über die Beziehungen zwischen stickstoffbindender Kraft der Nährböden zu ihrer chemischen Zusammensetzung vorliegen.

Ueber letztere Frage existiert eine bereits umfangreiche bakteriologische und agrikulturchemische Literatur, die ich in meinem Aufsatz „Ueber die Leistungsfähigkeit luftstickstoffsammelnder Bakterien für die Land- und Teichwirtschaft“ (FÜHLINGS landw. Zeitung 65. Jahrg. 1916 Heft 17/18) zusammengefaßt habe. Bei Bodenbakterien kommt die die Stickstoffbindung erhaltende Kraft, wie die Bodenbakteriologen immer und immer wieder nachgewiesen haben, dem Humusboden, der „Erde“ zu. KRZEMIENIESWSKI (Untersuchungen über *Azotobakter chroococcum*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. XXIII Nr. 6/9 1909 S. 161 ff.) schreibt z. B., daß er durch Impfen von frischer Erde in N-freie Nährlösung *Azotobakter*rohkulturen mit starkem Stickstoffbindungsvermögen erhalten habe, nämlich 8,2–13,8 mg N-Gewinn auf 1 g verbrauchter Kohlenstoffquelle. Ähnliche Resultate wurden erzielt beim Einbringen von *Azotobakter*-reinkultur und pasteurisierter Erde in die Nährlösung (bis 15,8 mg N-Gewinn). Wurde aber die Lösung nur mit Kahmhaut der Rohkultur geimpft, so ergab sich bedeutend niedrigerer Stickstoffzuwachs (bis 8,1 mg N-Gewinn). KRZEMIENIESWSKI schließt daraus, „daß die Gegenwart von Erde in der Kultur einen gewissen fördernden Einfluß auf die Stickstoffbindung seitens der Bakterien ausübt.“ Diese Ansicht wird dadurch bestätigt, daß in *Azotobakter*-Reinkultur überhaupt nur höchstens 2,4 mg Stickstoffgewinn erzielt wurde, während bei Zusatz von pasteurisierter Erde zur Reinkultur der Stickstoffgewinn bis auf 8,2 mg stieg. Durch Zusatz von verschiedenen Humaten (K-Humat, Na-Humat, Ca-Humat) hat nun der zitierte Autor in den Nährlösungen wieder Stickstoffgewinne erzielt, wie sie bereits bei Rohkulturen mit Bodenzusatz erreicht worden waren. Wurde dagegen ein künstliches Humat aus Zucker für die Versuche verwendet, so waren die Stickstoffgewinne wieder sehr geringe (2,9 mg).

Die Bedeutung natürlicher Humusstoffe gegenüber künstlichen ist damit einwandfrei gezeigt. Es bleibt nun noch festzustellen, worin die günstigen Eigenschaften der natürlichen Humusstoffe liegen.

Daß das Humat nicht als Kohlenstoffquelle dienen kann, ist bereits von KRZEMIENIESWSKI festgestellt worden (a. a. O. S. 167). Bei Humatzusatz allein waren die Stickstoffgewinne nur immer sehr gering. Auch die Herkunft der Humate spielt für die Größe der Stickstoffbindung eine Rolle, ebenso wie die Art der Herstellung der Humate. Mit Salzsäure nicht gekochte Humate geben höhere Stickstoffgewinne als mit Salzsäure gekochte Humate.

Wenn nun die Humate den Stickstoffbakterien nicht als Kohlenstoffquelle dienen können, so müssen andere Bestandteile der Humate als Nährquellen in Betracht kommen und zwar solche, die durch kochende Salzsäure in ihrem Nährwert verändert werden. KRZEMIENIESWSKI weist darauf hin, daß bei der Behandlung der Humate mit kochender Salzsäure Stickstoff in Lösung gebracht wird, und der Autor konnte „wirklich ein gewisses Abhängigkeitsverhältnis zwischen der Stickstoffzunahme in den Kulturen und der durch Hydrolyse aus den Humaten abspaltbaren Stickstoffmenge“ konstatieren. Bei den Humaten aus Torf konnte aber dieses Abhängigkeitsverhältnis nicht konstatiert werden, obwohl in die salzsaure Lösung viel Stickstoff überging.

Weiterhin glaubt KRZEMIENIESWSKI dem Humusstickstoff nicht eine eigentlich ernährende Wirkung zusprechen zu dürfen, da ein diesbezüglicher Versuch keinen Verbrauch des Humusstickstoffes aus der Lösung zeigen konnte. So wird also zwar von den Autoren (KRZEMIENIESWSKI, LÖHNIS, HEINZE u. a.) durchweg eine chemische Wirkung des Humus auf die Stickstoffbindung beobachtet, die sich letzten Endes auf die Gegenwart gewisser in kochender Salzsäure löslicher Stickstoffverbindungen zurückführen läßt, da diesen Körpern aber, die offenbar den Eiweißstoffen sehr nahe stehen, als direkte Nährstoffe keine Bedeutung zukommt, so dürfte meiner Annahme nichts im Wege stehen, ihnen nur eine bei der Bildung der hypothetischen stickstoffbindenden Enzyme synthetischer Natur unterstützende („katalytische“) Bedeutung zuzuweisen. Meine Hypothese würde dann eine wesentliche Stütze erhalten, wenn es gelänge, ebenso wie durch das BUCHNER'sche Verfahren zur Gewinnung der Hefenenzyme, auch aus Stickstoffbakterien Enzyme freizumachen<sup>1)</sup>, und mit diesen die Luftstickstoffbindung durchzuführen. Damit würde auch das Problem der Eiweißsynthese in der Natur seiner Lösung nähergeführt.

---

1) STOKLASA (a. a. O. S. 498) beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von *Azotobakter*presssaft, welcher Glukose in Gärung zu setzen vermag.

Die von der K. Teichwirtschaftl. Versuchsstation Wielenbach unter Prof. BRUNO HOFER's Leitung begonnenen Versuche konnten bisher vertieften Einblick geben in die Bodeneigenschaften, welche der Stickstoffbindung günstig sind. Es zeigte sich, daß, wie auch CHRISTENSEN neuerdings erkannte (Studien über den Einfluß der Bodenbeschaffenheit auf das Bakterienleben und den Stoffumsatz im Erdboden — Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 43. Bd. 1915 S. 1 ff.), Basizität eines Bodens noch keineswegs stickstoffbindende Kraft gewährleistet. Ferner konnte ich konstatieren, daß diese durch Humusgehalt bei Basizität ebenfalls noch nicht in allen Fällen eintritt.

Die in folgender Tabelle aufgeführten Versuche nach dem von REMY ausgearbeiteten, von LÖHNIS vervollkommeneten Verfahren der Impfung von 10 g Boden in 1 % Dextroselösung sind von mir in Hinsicht auf bakteriologische Probleme nach mancher Richtung hin modifiziert durchgeführt worden. Die hier einschlägiger Resultate sind aber dadurch nicht berührt worden. Die Versuchsdauer war, wenn nichts anderes bemerkt wurde, jedesmal 3 Wochen, bei Verwendung von 100 ccm Flüssigkeit.

Die Versuche mit 1 % Rohrzuckerbodenextraktlösung wurden deshalb angesetzt, weil in diesen Lösungen mit Reinkulturen von *Bac. asterosporus* (A. M. et. BRED.) sehr deutliche N-Gewinne erzielt werden konnten. Diese Kulturen wurden teils aus Wielenbacher Boden nach einmaligem Sterilisieren von Bodenextrakten auf Bodenextraktagar erhalten, teils in einer Reinkultur durch das Bakteriologische Institut von Král in Wien bezogen. Der *Bac. asterosporus* versetzt Bodenextraktlösungen mit Zuckerzusatz regelmäßig in starke Gärung. Da nun ebenso regelmäßig gleichartige Gärungen bei Teichbodenimpfungen in Zuckerbodenextraktlösungen eintraten, so wurde von uns vermutet, daß *Bac. asterosporus* ein in Teichböden allgemein verbreiteter Organismus sei. Dies ist aber, wie wir aus den mikroskopischen Prüfungen der Aussaaten auf Bodenagarplatten ersahen, nicht der Fall. Es tritt zwar immer Gärung ein. In seltenen Fällen aber eine so starke Stickstoffbindung, wie wir sie beim *Bac. asterosporus* kennen (vgl. G. BREDEMANN, Ber. d. deutsch. botan. Ges. Bd. XXV 1 a 1908 S. 362 und Oes. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. XXII. Bd. 1908—1909 S. 44). In der letztgenannten Arbeit über „Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögen des *Bac. asterosporus* A. M., ausgeführt an 27 Stämmen verschiedener Herkunft, hat BREDEMANN beim *Bacillus asterosporus* Stickstoffgewinne bis 3,0 mg N auf 1 g verbrauchten Zuckers gefunden (a. a. O. S. 83).

I. Versuche in 1 % Dextroslösung + 0,25 %  $K_2HPO_4$  (bei kalkhaltigen Böden 0,25 %  $KH_2PO_4$ ):

Herkunft der Bodenimpfung	Gesamtstickstoff in mg		Humusgehalt	Bemerkungen
	in 10 gr luft-trockenem Boden	N-Gewinn im Mittel		
A. Böden der Versuchssteiche der K. Bayr. Teichwirtsch. Versuchsst. Wielenbach			Mittel der nebeneinanderliegenden Teiche	Benotung d. Organismen-reichtums der Teiche % $P_2O_5$ im Boden im Jahre 1915
Unged. Teich 72	45,00	+ 4,28	1912 7,7 1914 19,6	a) 0,157 % b) 0,158 %
" " 89	49,20	+ 4,65	" "	a) 0,149 % b) 0,149 %
" " 97	53,80	+ 1,80	1914 18,3	a) 0,131 % b) 0,132 %
Ged. Teich 74	47,75	+ 3,09	1912 7,7 1914 19,6	a) 0,171 % b) 0,170 %
" " 73	62,30	+ 2,10	" "	a) 0,208 % b) 0,206 %
" " 90	65,66	+ 4,24	" "	a) 0,238 % b) 0,203 %
" " 92	70,98	+ 5,53	" "	a) 0,206 % b) 0,206 %
B. Verschiedene Böden von 1916				Reich an grünen Pflanzen u. Tieren
1. Schwaltener Teich bei Seeg im Allgäu	27,44	+ 1,99	stark karbonat-haltiger Mergel	in 0,0725 % $P_2O_5$
2. Altteich von Weißig in Sachsen	62,23	+ 1,44	Nur Spuren von Kalk	h faulte nach 4 Wochen nicht aus
3. Großteich von Weißig in Sachsen	98,86	kein N-Gewinn	Spur sauer auf Lackmus	h faulte nach 4 Wochen aus
4. Langerweiher bei Landau a. Isar	25,55	+ 6,72	stark karbonat-haltiger Mergel	
5. Pechteich bei Marienwerder	240,0	kein N-Gewinn	stark karbonat-haltig	
6. Kleinselweher Teublitz i. Oberpf.	137,9	"	kein Kalkkarbonat nachweisbar	ss
7. Großselweher Teublitz i. Oberpf.	33,1	+ 0,48	Spuren von Kalkkarbonat	s
8. Altenstadt a. Iller (Unterer Teich)	61,1	+ 0,96	teilw. sauer, teilw. stark karbonat-haltig	s 0,102 % $P_2O_5$ 1912 kalkreich s 0,171 % $P_2O_5$
9. Beilngries i. Oberpf.	244,0	kein N-Gewinn	stark karbonat-haltig	s 0,259 % $P_2O_5$

II. Weiterhin wurde versucht, die Effekte der Stickstoffbindung zu erhöhen durch Zugabe von 2 % Dextroselösung + 0,05 % Monokaliumphosphat + 0,5 g CaCO<sub>3</sub> auf das Versuchskölbchen gegeben, zu Impfungen von 5 bzw. 10 g Boden.

Herkunft der Bodenimpfung	Gesamtstickstoffmenge in mg		Kohlensaurer Kalk	Humusgehalt	Bemerkungen
	in 10 gr luft-trockenem Boden	Gefunden in 3 Wochen	N-Gewinn im Mittel		
1. Wietenbach Mergelteichboden 1912	49,10	a) 50,82 b) 50,05	+ 1,33	Spuren	m 0,144 % P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
2. Großer Teich in Altenburg 5 gr Boden	24,17	a) 32,13 b) 32,72	auf 10 gr ber. + 8,25 bei 5 gr gef. + 4,13	typischer feiner schwarzer Teichschlamm	Das Wasser ist sehr reich an Stickstoffverb. und Organismen hh
3. Wolfsee im Hienheimer Forst	32,62	a) 34,23 b) 35,21	+ 2,10	humusarmer entkalkter Jurakalkboden	m artenarm!
4. Steinach i. Niederb. Teich I	15,2	a) 17,36 b) 17,36	+ 2,16	deutlich saurer Boden	schwach humus-haltig
5. Dienstwiese Rietschen/Lausitz	54,24	a) 59,01 b) 55,12	+ 2,83	teilweise saurer teilweiser Spur kalkhaltig	schwach humus-haltiger Tonboden
6. Volkach a. Main Neuensee	18,5	a) 28,8 b) 24,57	+ 5,60	sehr kalkreicher Boden	schwach humoser Mergelboden
7. Alteich Weißig i. Sachsen 5 gr Boden	62,23	a) 65,94 b) 64,61	auf 10 gr ber. + 3,04 bei 5 gr gef. + 1,52	nur Spuren von Kalk	stark fettig humoser Boden
8. Pechteich Martenwerder	240,0	a) 243,76 b) 243,88	auf 10 gr ber. + 3,82 bei 5 gr gef + 1,91	stark karbonat-haltig	typisches Wiesenmoor

feinsandige Lehmböden

m

hh

h

ss

III. Versuche in 1 % Rohrzuckerbodenextraktlösung + 1 g Kalk + 0,25 %/100 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:

Herkunft der Bodenimpfung	Gesamtstickstoffmenge in mg		Kohlensaurer Kalk	Humusgehalt	Bemerkungen
	in 10 gr luft-trockenem Boden	Gefunden in 3 Wochen			
1. Schwerterer Teich bei Seeg i. Allgäu	27,44	a) 32,90 b) 32,13	+ 0,89 <sup>1)</sup>	schwach humos	m
2. Kleineselweiher Teublitz i. Oberpf.	137,9	a) 145 b) 142	+ 1,43 <sup>1)</sup>	sandiger Humusboden	s
3. Großeselweiher 1915 Teublitz i. Oberpf.	33,1	a) 36,8 b) 40,4	+ 1,27 <sup>1)</sup>	schwach humoser Boden	s
4. Altenstadt a. Iller (Unterer Teich)	61,1	a) 67,06 b) 65,31	+ 0,87	mooriger Sand	1912 kalkreich s
5. Trachenberg i. Schlesien Sprittokteich	19,22	a) 22,86 b) 23,20	kein N-Gewinn	humusarmer Sandboden	ss
6. Schwarzenbach i. Oberpf.	26,50	a) 28,56 b) 29,92	„	sauer auf Lackmus	ss
7. Beilngries i. Oberpf.	224,0	a) 231,1 b) 226,3	+ 1,03	sandiges Hochmoor	m
8. Wielenbach T. 92	70,98	88,83	+ 13,63	typisches Wiesenmoor humusreicher Mergel	m

1) Nach Abzug von 4,22 mgN aus 100 cem Bodenextraktlösung.

Ich erhielt in der oben beschriebenen Rohrzuckerbodenextrakt-  
 lösung durch Reinkulturen von *Bac. asterosporus* folgende N-Gewinne  
 in mg auf 1 g Rohrzucker:

Herkunft der Kultur	Versuchsdauer	Gefundener Gesamt-N	N-Gewinn
1. Wielenbacher Teich- boden	28. III.—2. V.	5,18	0,96
2. " "		5,75	1,52
3. " "	21. III.—9. V.	6,13	1,91
4. von Král bezogen regeneriert auf Boden- agar	10. III.—2. V.	5,68	1,46
5. " "	"	5,18	0,96
6. Steril		4,20	
7. " "		4,03	
8. " "		4,31	
9. " "		4,10	
10. " "		4,31	
11. " "		4,31	
		Mittel 4,22	

Der *Bac. asterosporus* ist also, wie auch aus meinen Versuchen hervorgeht, ein N-bindender Saprophyt, dessen Auftreten bei den Kölbchenversuchen erwartet werden konnte. Durch Aussaat aus diesen in den obigen Tabellen angeführten Kulturen auf Bodenextraktagar gelang es mir aber niemals, den *Bac. asterosporus* in anderen Böden als im Wielenbacher Teichboden zu finden. Auch BREDEMANN (*Bac. amylobacter* A. M. et Bredemann, Centralbl. f. Bakt. II 23. Bd. 1909 S. 400) konnte zwar den *Bac. amylobacter* in zwei untersuchten Teichböden, nicht aber den *Bac. asterosporus* finden. *Bac. asterosporus* ist also in Teichböden zum mindesten kein massenhaft und allgemein verbreiteter Organismus. Die gleiche Beobachtung konnte ich früher schon für den *Azotobakter chroococcum* machen (Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 46. Bd. 1916 S. 306), der ebenfalls in Teichböden nur vereinzelt gefunden und höchstens in den Anhäufungskulturen angereichert wird.

Auch die Effekte der Stickstoffbindung in den für die Tätigkeit von Saprophyten geeigneten Kulturen sind bei relativ wenigen Teichböden einwandfrei zu beobachten. In vielen Fällen liegt ein anscheinender Stickstoffgewinn durchaus innerhalb der Fehlergrenzen der Stickstoffanalyse, die bei Gesamtstickstoffbestimmungen bekanntlich bei Anwendung der besten Methoden auf etwa 1% der gemessenen Größe festgesetzt sind. Wir haben also bei den drei oben angeführten Versuchsserien sicheren Stickstoffgewinn bei allen Wielenbacher Teichböden, ferner beim Schwaltener, Altteich, Langerweiher, Altenburger, Wolfsee, Steinacher, Rietschener (?), Volkacher Teichboden.

Die Gründe, warum diese Böden Stickstoff sammeln, also in saprophytischer Kultur arbeitende Stickstoffbakterien enthalten, konnten bisher in exakten experimentellen Zahlen nicht klar zur Darstellung gebracht werden. Im allgemeinen kann man sagen, daß Kalkkarbonat führenden Mineralböden diese Eigenschaft zukommt, während sie den sehr kalkreichen Wiesenmoorböden nach den Analysenergebnissen fehlt. Der Humusgehalt eines Bodens ist, selbst wenn dieser absorptiv gesättigt ist, ebenfalls keine Gewähr, daß im Boden Stickstoffbindung durch Saprophyten stattfindet. Dagegen besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Produktionsfähigkeit eines Teiches und der stickstoffbindenden Kraft der Böden, wie ich dies im Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 46. Bd. 1916 S. 317 bereits für die Wielenbacher Teichböden zeigen konnte.

Die Fähigkeit eines Bodens, Protoplasma zu produzieren, ist es also, was seine stickstoffbindende Kraft gewährleistet und umgekehrt. Extrahierbare organische Stoffe, wie sie in den wäßrigen Bodenlösungen enthalten sind, haben, wie auch KRZEMIENIESWSKI (a. a. O. S. 163 Versuch VI) nachwies, für die Hebung der Stickstoffbindung geringeren Einfluß als die nicht wasserlöslichen organischen Bodenanteile.

Nachdem wir nun bei diesen von Prof. HOFER angeregten Versuchen erkannt haben, daß die wirksamen Bodenbestandteile offenbar Stickstoffverbindungen organischer Natur sind (vgl. S. 2 ff.), müssen wir diese Stickstoffverbindungen wohl eher bei den hochmolekularem Eiweiß ähnlichen Körpern suchen, als bei den organischen Stickstoffverbindungen, die niederes Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit besitzen. Eiweißkörper aber produziert in erster Linie die Pflanze auf synthetischem Wege und weiterhin auch das Tier aus der Pflanzennahrung. Alle Beobachtungen führen somit dahin, die im Teiche produzierte gesamte Protoplasmanasse quantitativ zu fassen und in Parallele zur Stickstoffbindung zu setzen. Dies habe ich in den Tabellen (siehe S. 427 ff.) durch eine Benotung versucht. hh bedeutet eine sehr reiche assimilierende Organismenwelt im Teiche, h eine reiche, m eine mittelmäßige, s eine geringe und ss eine sehr geringe. Eine derartige Benotung ist natürlich immer mit Willkürlichkeiten behaftet und es muß für die Zukunft angestrebt werden, einen exakteren Ausdruck des durch Assimilanten gebildeten Protoplasmas zu gewinnen, etwa durch quantitative Chlorophyllbestimmung nach Extraktion der Böden und Abdampfrückstände der Teichwässer mit organischen Lösungsmitteln.

Aus diesen Protoplasmanassen entsteht schließlich auf kalkhaltigen Böden schon in den ersten Stadien der Dissimilation jene

Humusform, die wir als „milden“ Humus bezeichnen, aber chemisch noch nicht genau definieren können. Das Vorhandensein von mildem Humus im Boden ist aber eine sichere Gewähr für seine stickstoffbindende Kraft. Teichböden, bei denen Karbonatgehalt und Organismenreichtum, also die Fähigkeit zur milden Humusbildung, zusammenfallen, sind alle Wielenbacher Böden, mit Ausnahme des Mergelteichbodens.

Sehr gering ist auch die milde Humusschicht im Teiche 97, wie auch bei der geologisch-bodenkundlichen Aufnahme des Wielenbacher Versuchsfeldes durch den K. Geologen Dr. KOEHNE festgestellt wurde. Großen Karbonatgehalt und geringe milde Humusbildung zeigen auch der Schwaltener, Großeselweiher, Altenstadter, Hienheimer Wald, Steinacher und Rietschener Teichboden. Damit zusammen hängt geringe, aber meist gut nachweisbare Stickstoffbindung. Geringen Karbonatgehalt, aber viel milden Humus hat der Weißiger Altteichboden. Hinsichtlich des Kalkgehalts und der Masse an mildem Humus werden die Wielenbacher Böden noch übertroffen von dem Volkacher und Altenburger Teichboden. Auch der Langerweiherboden ist sehr kalkreich, jedoch ist über seine Fähigkeit zur Bildung von mildem Humus mir nichts Näheres bekannt geworden, zumal dieser Teich bisher noch keiner sachgemäßen Düngung unterzogen wurde. Ein Urteil, ob der Teich zur Bildung von mildem Humus neigt und demgemäß produktionskräftig ist, kann natürlich nur dann gewonnen werden, wenn der Teich längere Zeit melioriert worden ist.

Daß bei solchen Meliorierungen die Düngung mit Phosphaten eine große Rolle spielt und die Phosphatwirkung sich auch in einer Erhöhung der stickstoffbindenden Kraft der Böden geltend macht, ist an anserer Stelle eingehend zuerst durch BRUNO HOFER dargestellt worden. (Vgl BRUNO HOFER, Teichdüngungsversuche, Allgemeine Fischereiztg. 1916 Nr. 5, 7, 8 und insbesondere 12); HERM. FISCHER, 1. Beitrag zur Ernährungsphysiologie der Wasserpflanzen, Archiv f. Hydrobiologie und Planktonkunde 1915; 2. Ueber qualitative und quantitative Leistungen stickstoffsammelnder Bakterien im Wasser und im Boden unter Wasserbedeckung) Vorläufige Mitt., Centralbl. f. Bakt. a. a. O.). Wir wissen aus agrikulturchemischen Arbeiten, daß die Phosphatdüngung die Eiweißbildung der Pflanzen befördert, und daß die Wirkung dieser Düngung besonders in der Entwicklung stark eiweißreicher Samen, wie diese den Leguminosen eigen sind, zum Ausdruck kommt. Wir können hierin vielleicht einen Hinweis finden, daß die für die Stickstoffbindung wich-

tigen hochmolekularen Eiweißkörper in der Gruppe der Nukleine und deren Abbauprodukte zu suchen sind<sup>1)</sup>)

Die Bedeutung der Assimilationsprodukte grüner Pflanzen für energische Stickstoffbindung ist aber auch noch auf einem anderen Wege erkannt worden. Die Beobachtung, daß grüne Pflanzen an der Stickstoffbindung beteiligt sind, auch wenn sie nicht wie die Leguminosen, *Alnus*arten und verschiedene Ordnungen tropischer Pflanzen in Knöllchen und gallenartigen Anschwellungen Bakterien enthalten, welche Luftstickstoff binden, war bereits von älteren Forschern wie FRANK, SCHLÖSING und LAURENT, BOUILHAC u. a. gemacht worden (vgl. diesbezügliche Literaturzusammenstellung in LÖHNIS Handbuch der landw. Bakteriologie S. 678 ff.). Sobald aber die fortschreitende Technik der Kultur von Mikroorganismen dieses Problem der Stickstoffbindung der grünen Pflanzen in den Bereich ihrer Forschungen zog, wurde die Zahl der ehemals als stickstoffbindend angesehenen assimilierenden grünen Pflanzen immer kleiner. Reinkulturen derselben konnten in allen Fällen einwandfreier Versuchsanstellung keine Stickstoffbindung zeigen und bei jenen in der Literatur verstreuten Einzelfällen, wo dies heute noch für gewisse Algen und höhere Pflanzen behauptet wird, müßte erst der Beweis einwandfreier Technik erbracht werden.

Die Schwierigkeit, höhere Pflanzen von kleinsten, stickstoffsammelnden Stäbchenbakterien zu trennen, ist oft geradezu unüberwindlich. Sie können auf gewissen Nährböden so zurückgedrängt werden, daß sie selbst bei mikroskopischer Betrachtung nicht mehr in Erscheinung treten. Erst bei Uebertragung der anscheinend rein gezüchteten höheren Pflanze auf einen den Bakterien zusagenden Nährboden, kommt die Verunreinigung wieder zur Erscheinung.

Es ist also, um die Stickstoffbindung einer höheren Pflanze u. d. weiterhin ihre Bedeutung für die Stickstoffbindung der Bakterien exakt zu prüfen, unbedingt eine auf den verschiedensten für Bakterien günstigen Nährböden geprüfte Reinkultur als Ausgangsmaterial notwendig.

OSWALD RICHTER (Sitzungsber. d. kaiserl. Akad. d. Wissensch. in Wien, Math. naturw. Kl. Bd. CXV Abt. I Jan. 1906 S. 52) empfiehlt zur Herstellung von bakterienfreien Reinkulturen autotropher grüner Pflanzen, insbesondere von Einzellalgen, einen gewässerten Agar

---

1) Nach STOKLASA (a. a. O. S. 497) nimmt der Phosphor hauptsächlich an der Konstitution der Nukleoproteide, Phytine und Lezithine teil. Nach seinen Untersuchungen fallen von der Gesamtphosphormenge bei Bakterien 60—80 % auf Nukleoproteide.

mit Mineralsalzzusätzen, der für die Reinzucht nach RICHTER wahrhaft ideale Dienste leistet. Ich habe diesen RICHTER'schen Mineralagar zur Erzielung von Anhäufungskulturen von Einzellalgen und einigen Fadenalgen auch mit Erfolg benutzt. Für die Gewinnung von bakterienfreien Reinkulturen scheint mir aber das genannte Verfahren nicht genügende Sicherheiten zu bieten. Ich hatte deshalb anfangs eine Modifikation versucht, über die ich in den Kryptogamischen Forschungen der K. Bayer. Botanischen Gesellschaft 1916 Nr. 1 S. 28 veröffentlicht habe. Danach würden solche durch wiederholte Aussaat nach mikroskopischer Kontrolle von ansitzenden Bakterienkolonien befreiten Algenkolonien in möglichst zahlreiche Reagenzröhrchen mit M o l i s c h l ö s u n g (Sitzungsber. der K. Akad. d. Wissensch. in Wien, Math. naturw. Kl. Bd. CV I. Abt. 1896) zu impfen sein. Der Lösung sind einige Gramm Rohrzucker und etwas Pepton im Liter zugesetzt. Neuerdings verfuhr ich zur Herstellung einer Chlamydomonadenreinkultur so, daß ich aus den Algen Anhäufungskulturen in dreifacher Verdünnung (1. Verdünnung eine Oese, 2. Verdünnung zwei Oesen, 3. Verdünnung fünf Oesen) Aussaaten auf Bodenextrakt-Dextrose-Salpeteragar anlegte. Sowohl die Algen als die ihnen hartnäckig anhaftenden Stickstoffsammler aus der Pneumoniegruppe kommen auf diesen Nährböden recht gut fort und können besser getrennt werden als auf den farblosen Agarböden. Bei der Isolierung der aus einer anscheinenden Reinkultur auf Mineralagar abgestochenen *Chlamydomonas* gelang es erst in der dritten Verdünnung, unter zahlreichen Bakterienkolonien zwei Algenkulturen zu finden, deren Umgebung sich dauernd so bakterienfrei erwies, daß eine Abimpfung mit der Platiniridiumnadel auf verschiedene Nährböden gewagt werden konnte. Es zeigte sich bei solchen Experimenten sowohl bei *Chlamydomonas (tingens)* nach alter Nomenklatur wie bei *Chlorogonium infusionum*, daß diese Algen sehr wohl auf den verschiedensten Bakteriennährböden wachsen, wenn eben die Konkurrenz der Bakterien fehlt. Das Wachstum beider Formen auf gewöhnlicher Gelatine war mir eine besonders überzeugende Probe der Bakterienfreiheit der von nun an zu weiteren Experimenten verwendeten Kulturen.

Nachdem zur Herstellung von synthetischen Algen-Stickstoffbakterienkulturen die absolute Reinkultur der als „Amme“ für die Bakterien gedachten *Chlamydomonas* geglückt war, ergab sich die weitere Schwierigkeit, jeweils solche Bakterien zur Hand zu haben, die mit den Algen in mineralischer Nährlösung im Sonnenlicht kräftig zusammenwachsen und weiterhin unter solchen Verhältnissen auch wirklich ihre stickstoffbindende Kraft bewahren.

Daß solche Bakterien existieren, ist seit BERTHELOTS und HELL-RIEGEL's ersten Beobachtungen wiederholt von verschiedenen Forschern festgestellt worden (vgl. LÖHNIS Handbuch a. a. O. S. 678). Ich selbst habe diese Formen, die zu den Kurzstäbchen gehören, lange Zeit in Rohkulturen in mineralischer Nährlösung gezüchtet und gefunden, daß durch das Zusammenwirken von Algen und Bakterien auch in fast stickstoff- und kohlehydratfreien mineralischen Nährlösungen<sup>1)</sup> sehr ansehnliche Stickstoffgewinne (bis 78 mg N-Gewinn auf den Liter) erzielt werden können. Ich möchte diese verschiedenen mit Rohkulturen durchgeführten Experimente hier nicht nochmals eingehend schildern und deshalb nur kurz auf meine bereits angeführten Veröffentlichungen im Archiv für Hydrobiologie 1915 und im Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 1916, hinweisen, in denen die Stickstoffbindungsversuche mit Algen-Bakterienrohkulturen näher geschildert sind.

Für das hier aufgeworfene Problem der Stickstoffbindung konnte nur die aus Algen- und Stickstoffbakterienreinkulturen gewonnene Synthese tieferen Aufschluß ergeben. Nach Isolierung der *Chlamydomonas* wurden solche Kulturen am 2. August 1916 in folgender Nährlösung angesetzt:

Serie A:  $22 \times 200 \mu$  in Erlenmayerkölbchen zu  $300 \mu$  Lösung:  
 0,5 g  $KNO_3$  5,0 g  $K_2HPO_4$ , 1,0 g  $MgSO_4$  1,0 g  $CaSO_4$ ,  
 0,5 g NaCl, Spur  $FeCl_3$  auf 5 l destilliertem Wasser.

Serie B:  $12 \times 200 \mu$  in Kölbchen zu  $300 \mu$  Lösung: 5,0 g  $KNO_3$   
 usw. wie Serie A.

Jedes Kölbchen erhielt 0,2 g  $CaCO_3$ .

Nach einem Monat waren alle Kölbchen ergrünt, jedoch nicht ganz gleichmäßig. Es machte sich hier ein Einfluß der Stellung zum Licht, nicht aber ein Einfluß der verschiedenen starken Salpetergaben geltend. Eine Probe auf Bakterienfreiheit ergab in allen untersuchten Fällen völlige Bakterienfreiheit, nur eine Probe erwies sich als infiziert, was sich schon makroskopisch durch die diffuse Trübung der Lösung verriet. Diese Kultur wurde weiterhin als „infiziert“ fortgeführt. Am 16. Oktober war durch häufigen Stellungswechsel der Algenkulturen ein Ausgleich und zugleich ein Maximum des Wachstums zu konstatieren. Die Chlamydomonaden befinden sich in diesen salpeterhaltigen mineralischen Nährlösungen fast durchweg im *Palmellastadium*, vermehren sich also vegetativ. Nur vereinzelt treten Schwärmer mit zwei Cilien auf, die in organischen Nährflüssigkeiten

1) Hergestellt aus Münchener Leitungswasser mit absolut chemisch reinen Salzen.

überwiegen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von G. KLEBS (Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena 1896) gemacht und auf die Begünstigung der vegetativen Vermehrung durch reine mineralische stickstoffhaltige Nährlösungen zurückgeführt.

### Synthese der Chlamydomonaden-Bakterienkulturen.

Am 9. Oktober wurden die voraus beschriebenen Chlamydomonadenkulturen mit folgenden Bakterienstämmen beimpft:

1. *Azotobacter chroococcum* Beij. aus Petersburger Erde, von Král bezogen, auf stickstoffbindende Kraft in 2 % Mannitboden extraktlos geprüft (2,3—6,6 mg N Gewinn pro 100 ccm in 3 Wochen);
2. *Bac. asterosporus* (Haregoff et Bred.), von Král bezogen, auf stickstoffbindende Kraft in 1 % Rohrzuckerbodenextraktlösung geprüft (siehe S. 426);
3. *Bact. lactis aerogenes* (Escherich), von Král bezogen, durch starke Gasbildung auf kohlehydrathaltigen Nährboden und schwache Säurebildung von dem gleichfalls von Král bezogenen *Bac. (?) lactis acidi* (Leichmann) Henneberg — *Streptococcus Güntheri*, der wenig Gas und viel Säure bildet, nach eigener Kontrolle typisch verschieden;
4. Bakterien aus der *Aerobakter*-Gruppe (Beij.), sämtlich unbewegliche Formen:
  - a) Auf Bodenextraktagar kräftig wachsender, auf Gelatine nur im Stichkanal sich entwickelnder, stets in bleibend rein weißen Auflagerungen erscheinender Stamm, wiederholt aus stickstoffsammelnden Algen - Bakterienroh-kulturen rein gezüchtet.
  - b) Auf Bodenextraktagar mäßig wachsender, auf Gelatine auch oberflächlich kräftig wachsender Stamm, der auf Agarnährböden in allmählich sich bräunenden Auflagerungen auftritt und die Gelatine nach einiger Zeit oberflächlich braun färbt. Dieser Stamm besitzt alle charakteristischen Merkmale des *Bact. pneumoniae* (Friedländer) und wurde aus Wielenbacher Teichboden wiederholt reingezüchtet,
  - c) auf Bodenextraktagar mäßig wachsender, auf Gelatine sich ebenso entwickelnder Stamm wie 4 b, der in Gelatine-stichkultur Gasblasen, aber keinen braunen Farbstoff bildet. Dieser Stamm besitzt alle charakteristischen Merkmale des von LÖHNIS (Centralbl. f. Bakt. II. Abt.

14. Bd. 1905 S. 590) als stickstoffsammelnde *Bact. pneumoniae* beschriebenen Bakteriums der *Aerobakter*-Gruppe. Reinzucht wie 4 b.

- d) Ein auf allen Nährböden schwach und uncharakteristisch wachsender Stamm, der aus der S. 435 erwähnten infizierten Kultur isoliert wurde.
- e) *Bact. Furcosum* (Lehm. et Neum.). Auf Bodenextrakt-agar mäßig, anfangs kräftig wachsender, auf Gelatine auch oberflächlich kräftig wachsender, in gelben Auflagerungen erscheinender Stamm. Wurde wiederholt aus Wielenbacher Teichboden und stickstoffsammelnden Algenbakterienrohkulturen reingezüchtet und besitzt alle Eigenschaften des bei LEHMANN und NEUMANN, Grundriß der Bakteriologie S. 354, beschriebenen *Bact. furcosum*. Allerdings fehlt, wie dies auch LÖHNIS für seine stickstoffsammelnden Stämme von *Bact. turcosum* angibt (a. a. O. S. 600) die Gelatineverflüssigung.

5. Bakterien aus der *Radiobakter*-Gruppe (Beij.), sämtlich bewegliche Formen.

Während die Formen aus der *Aerobakter* Gruppe durchweg der lebhaften Eigenbewegung (Schwärmerbildung!) entbehren und auf den Agarnährböden in erhabenen, meist glänzend fettigen und dichten, scharf begrenzten Auflagerungen erscheinen, wurden bei Bakterienzählungen aus Wielenbacher Teichwasser und -boden eine zweite Gruppe von Bakterienkolonien sehr häufig und regelmäßig beobachtet, die in dünnen bläulichen, lappig ausgezogenen Häutchen auf den stickstoffarmen Nährböden erscheinen. Die bläulich irisierenden Farben dieser Kolonien rühren von der Alkalibildung derselben her und damit zusammen hängt eine stets beobachtete Verflüssigung der Gelatinenährböden. Solche Kolonien hat auch bereits LÖHNIS (a. a. O. S. 584) beobachtet und als *Bact. fluorescens* in einem Falle und *Bact. prodigiosum* in zwei Fällen isoliert. Von letzteren Bakterien konnte er Stickstoffbindung nachweisen.

Wir können also die als bläuliche Häutchen auftretenden Kolonien nach den Wielenbacher Beobachtungen (siehe HOFER, Allgem. Fischereiztg. 1916 Nr. 9) sehr wohl als verflüssigende Formen von den nicht verflüssigenden *Aerobakter*stämmen unterscheiden. Nur darüber konnte ich bis jetzt keine Klarheit gewinnen, ob *Bact. Radiobakter* nicht besser in die Fluorescentengruppe als in die Pneumoniegruppe zu stellen ist. Das Auftreten von, wenn auch sehr kleinen, doch meist deutlich schlanken und oft gekrümmten Stäbchen bei

schwach angedeuteter Gallertkapsel, die Verflüssigung der Gelatine, das Wachstum auf Kartoffel in glänzenden, sich allmählich bräunenden Auflagerungen, würde darauf hindeuten. Ueberimpfungen der *Radiobakter*stämme auf Fischagar nach FEHLMANN (Centralbl. f. Bakt. 1 70. Bd. 1913 S. 384) gaben dafür einen überraschenden Anhaltspunkt. Während gleichzeitige Abimpfungen auf Gelatine nicht fluoreszierten, zeigten die Ausstriche auf Fischagar bei allen vier Stämmen kräftiges Wachstum und lebhaftes Fluoreszenz. Ob die verflüssigenden *Radiobakter*stämme weiterhin in die Pneumoniegruppe eingereiht werden dürfen oder ob sie nicht besser nahe zu dem als Wasserbakterium bekannten *Bact. punctatum* gestellt werden, mit dem sie eine überraschende Ähnlichkeit der Kolonieentwicklung auf Gelatineplatten gemeinsam haben, muß noch weiteren Untersuchungen überlassen bleiben. Die Diagnostizierung meiner stets verflüssigenden *Radiobakter*stämme aus Wielenbacher Wasser und Boden geschah durch Abimpfung der oben beschriebenen Kolonien von Mannit oder Dextroseagar auf Gelatine (Gelatinstich) und in Kunzelösung (Gärröhrchen!). Ein älterer Stamm (A) konnte in seinen physiologischen Eigenschaften, von denen Stickstoffbindung und Denitrifikation besonders eingehend studiert wurde, durch Weiterimpfung auf Gelatine oder Kartoffeln in seinem Wachstum und seiner Wirksamkeit erhalten werden. BEIJERINCK rühmt für diesen Zweck besonders die Fleischgelatine (Centralbl. f. Bakt. 9. Bd. 1902), was sich also durch meine Beobachtungen bestätigt. Im Sinne des hier erörterten Problems der Stickstoffbindung ist diese Erscheinung auch wohl begreiflich. Die stickstoffbindenden Bakterien gedeihen soweit ich bisher Beobachtungen machen konnte, sehr wohl auf Nährböden mit hochmolekularen Eiweißkörpern. Es ist ein Irrtum zu glauben, daß sie eiweißarme Kohlehydratnährböden bevorzugen und auf solchen in Reinkultur erscheinen. Deswegen ist ein Zählen von stickstoffsammelnden Bakterien auf stickstoffarmen Nährböden ein durchaus verfehltes Unternehmen. Wenn man dagegen die auf solchen Nährböden keimenden Bakterien als „Oligonitrophile“ bezeichnet, so hat das eine gewisse Berechtigung, da die Entwicklung der Fäulnisbakterien und Schimmelpilze auf solchen Nährböden zurückgedrängt wird, und damit die Oligonitrophilen und Stickstoffsammler ungestörter und in einer für Isolierungszwecke geeigneten Weise vor sich geht.

Einen zweiten Stamm B fand ich unter acht Abimpfungen von anscheinend gleichartigen Kolonien. Eine von diesen Kolonien fluoreszierte schwach und verlor bereits auf der zweiten Gelatineabimpfung diese Eigenschaft. Sechs Kolonien wuchsen auf Gelatine gut unter Verflüssigung, in Kunzelösung mehr oder weniger gut ohne

Denitrifikation. Eine einzige Abimpfung denitrifizierte in Kunzelösung und zeigte sich auch sonst mit Stamm A identisch. In folgender Tabelle ist eine Diagnostik beider Stämme wiedergegeben (siehe Tabelle S. 440).

Durch Vergleich mit der *Aerobakter*gruppe ergeben sich manche typische Unterschiede zwischen *Radiobakter*- und *Aerobakter*gruppe. Dies äußert sich besonders in dem lebhaften Wachstum meiner *Radiobakter*stämmen in Kunzelösung und in Algenbouillon. Dadurch erweist sich der Wielenbacher *Radiobakter* als dissimilierendes Bakterium, das aber unter bestimmten Lebensbedingungen assimilierende und stickstoffbindende Eigenschaften annehmen kann. Es gewinnt gerade diese Form für das hier erörterte Problem der Stickstoffbindung besonderes Interesse, so daß ich mich weiterhin vorwiegend an dieser Stelle mit den physiologischen Leistungen dieser merkwürdigen Bakterien befassen möchte.

Zuvor müssen aber die Angaben über die Gewinnung der Stickstoffbakterienalgen-synthesen noch weiter vervollständigt werden.

Am 9. Oktober 1916 waren die lebhaft ergrünten Chlamydomonadenkulturen mit den auf Seite 437 angegebenen Bakterienformen beimpft worden und am 16. Oktober begannen die Prüfungen auf Vorhandensein und Massenvermehrung der geimpften Bakterien und deren Stickstoffbindung. Dabei konnten vier typische Gruppen ausgeschieden werden.

I. *Azotobakter chroococcum* und *Bac. asterosporus* konnte in keiner Kultur, weder bei mikroskopischer Betrachtung, noch durch Aussaat auf Dextrosebodenextraktagarplatten oder Algenagarplatten<sup>1)</sup> wiedergefunden werden. Die Impfungen waren abgestorben und die betreffenden Kulturen weiterhin steril geblieben, so daß sie als „ungeimpft“ weitergeführt und verwendet werden konnten.

II. *Bact. lactis aerogenes* konnte sowohl durch mikroskopische Kontrolle wie durch Plattenaussaat als schwach entwickelt erkannt werden. Auffallend war, daß die wenigen Kolonien auf den Platten erst nach einer Woche erschienen. Stickstoffbindung konnte nicht nachgewiesen werden.

---

1) Die Herstellung des Algenagar erfolgte in der Weise, daß Fladen von Spirogyren und anderen Fadenalgen aus den Wielenbacher Versuchsteichen mit Münchner Nährlösung mit  $\text{KNO}_3$  ausgekocht und daraus ohne weiteren Zusatz nach bekannter Vorschrift ein Agarnährboden hergestellt wurde. Ueber Herstellung der Münchener Nährlösung vergleiche bei E. HIETNER: Landwirtsch. Jahrbuch für Bayern 1913 Nr. 10. Nährböden ohne Zuckergehalt begünstigen besonders das Wachstum der Wielenbacher *Radiobakter*stämmen, die Eiweißstoffe im Nährboden den Kohlehydraten entschieden vorziehen.

Diagnostik der in mineralischer Nährlösung zusammen  
mit Chlamydomonas Stickstoff sammelnden Radio-  
bakterstämme.

	Stamm A, D	Stamm B, C	Aerobaktergruppe
1. Form u Größe	wie bei LÖHNIS (a. a. O.) S. 590 beschrieben		wie bei LÖHNIS (a. a. O.) unter <i>B. pneumoniae</i> fehlt
2. Beweglichkeit	meist vorhanden, vereinzelte Schwärmer zeigen rasche Bewegungen		
3. Färbbarkeit	gramnegativ in allen Stämmen		wechselnd nach Gram fehlt
4. Sporenbildung	fehlt		
5. Mannitagar	dünne bläulichweiße oft gelpappte Auflagerungen, die bei Weiter- impfung immer schwächer werden		meist kräftige erhabene glasige bis käsige weiche schleimige Auflagerungen
6. Traubenzucker Bodenextrakt- agaristisch . . .	" "		noch besseres, sonst gleichartiges Wachstum wie auf Mannitagar
7. Bodenextrakt- agaristisch . . .	kräftiges, wenn auch wenig aus- gedehntes Wachstum (St. A)		
8. Fleisch gelatine- stich . . . . .	schlauchförmige Verflüssigung anfangs schalenförmig		wechselnd starkes Wachstum ohne Ver- flüssigung
9. Rohrzucker- Kieselplatte . . .	wie auf Mannitagar		wie auf Mannitagar
10. Kartoffel . . .	erhabener glän- zender schließ- lich sich flach ausbreitender u. lebhaft ocker- braun färbender Belag (A)	gelblichweißer später sich bräunender Belag (B)	wechselnd kräftiges Wachstum in erhabenen Auflagerungen
11. Milch . . . . .	kräftiges Wachs- tum. Etwas pep- tonisierend. Ohne Fällung und Gasbildung. Schließlich fein- flockige Ab- scheidung und schleimige Konsistenz		meist kein oder nur sehr schwaches Wachstum ohne Veränderung der Milch
12. Kunzelösung in Gärröhrchen	Wachstum kräftig. Meist nach 3 Tagen beginnende Denitrifi- kation. Schließlich bei 2 cm Gasbildung. Nebenher viel Nitrit und Ammoniak		wechselndes, meist aber sehr schwaches Wachs- tum mit Nitrit, aber geringer Ammoniak- bildung. (Unterscheidung von dem kräftig in Kunze- lösung wachsenden <i>Bact. coli</i> )

	Stamm A, D	Stamm B, C	Aerobaktergruppe
13. Algenbouillon .	kräftiges Oberflächenwachstum in dicken Häuten		schwaches Wachstum
14. Algeagar . .		kräftiges Wachst- tum in schlei- migen bläu- lichen Aufla- gerungen	kräftiges Wachstum in dichten, erhabenen Belägen
15. Symbiosekul- turen in mine- ralischer Nähr- lösung mit Chla- mydomonas .	kräftiges Wachstum, doch mikroskopisch nur durch Trübungen in den Lösungen bemerkt		meist kräftiges Wachstum
16. Wachstum bei 50facher Ver- größerung . .	aufliegende Kolonien gegen den Rand hin heller werdend, unscharf begrenzt, schwach granuliert, Tiefenkolonien bräunlich		immer scharf begrenzt und erhaben
17. Stickstoff- bindung in Kar- toffelwasser .	stark	schwach	nur bei einem Stamm (4d) nachgewiesen

III. Die *Aerobakter*-Gruppe konnte sowohl durch mikroskopische Kontrolle wie durch Plattenaussaat als sicher entwickelt erkannt werden in Gruppe 4 a, 4 d, 4 e. Für 4 a (siehe S. 436) konnte in allen sechs untersuchten Fällen kräftiges Wachstum und massenhafte Vermehrung nachgewiesen werden, ebenso für 4 e (*Bact. furcosum*) in allen fünf untersuchten Fällen. Bei letzterem Bakterium zeigte sich eine auffallende Abschwächung der Farbstoffbildung auf Algen- und Bodenextraktnährböden. Ueber die Stickstoffbindung fehlt noch völlige Klarheit.

IV. Die *Radiobakter*-Gruppe (Stamm A und B) wurde in allen vier durch mikroskopische Prüfung und Plattenaussaat nachgewiesenen Fällen sehr gut entwickelt und massenhaft vermehrt gefunden. Die Stickstoffbindung erwies sich in der Versuchsserie A bei 2,8 mg Salpeter-N schwach, in Versuchsserie B bei 28 mg Salpeter-N unter bestimmten Umständen als sehr stark (siehe Tabellen S. 442 ff.). Ergebnisse der in mineralischer Nährlösung durchgeführten Synthesen von Bakterienreinkulturen mit *Chlamydomonas (tingens)*.

Betrachten wir die Tabellen auf Seite 442 und 443, so finden wir, daß sowohl in Serie A mit 0,1 ‰  $KNO_3$ , wie in Serie B mit 1 ‰  $KNO_3$  mit Ausnahme einiger durch Beimpfung von *B. Radiobakter*



Tabelle Serie A

Bakterien	Kulturdauer	Kultur	Stamm	N <sub>2</sub> -Gefunden	N nach Abzug der bl. Best.	N-Gewinn	NH <sub>3</sub> + Amid N	Nitrat + Nitrit N	Eiweiß-N	Qualitative Prüfungen auf		
										Nitrat	Nitrit	Ammoniak
16. <i>B. Radiobakter</i> + <i>B. lactis aerogenes</i>	22. XII.—14. II.	Ab	B	3,45	ca. 1,0	2,45	0,37	0,42	2,66			
17. <i>B. Radiobakter</i> + <i>B. turcosum</i>	22. XII.—15. II		B	3,66	"	2,66	0,385	0,585	2,695			
18. <i>B. Radiobakter</i>	9. II.—1. III.	Ac	C	3,78	"	2,78	0,42	0,42	2,94			
Serie B.												
1. <i>B. Aerobacter</i> aus Monadenkultur	9. IX.—22. XII.	Bc	4a	26,3	ca. 0,8	25,5	28,0 mg N pro 200 cc = 1 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> KNO <sub>3</sub> -Lösung		3,5			
2. <i>B. turcosum</i>	9. IX.—28. XII.	Bb	4e	26,64	"	25,84	22,94	stark	3,7	stark	ca. 0,1 mgr	
3. <i>B. Radiobakter</i>	30. X.—17. XII.	Ba	A	34,3	0,4	33,9						
4. "	25. XI.—17. XII.	Bb	B	19,6	0,4	19,2	0,40	17,64	9,3	stark	0,17	
5. <i>B. Radiobakter</i> + <i>B. turcosum</i>	30. X.—28. XII.	Bc	B	27,3	ca. 1,0	26,3	0,63	8,54	3,99	stark	0	
6. <i>B. Radiobakter</i>	30. XII.—2. II.	Bb	B	26,6	0,4	26,2						
7. "	30. XII.—2. II.	Ba	B	29,68	0,4	29,28	1,28	—	—	—	—	
8. <i>B. Radiobakter</i> + <i>B. lactis aerogenes</i>	30. XII.—14. II. 9. IX.	Bc	B	13,16	ca. 1,0	12,16						
9. <i>B. Radiobakter</i> + <i>B. lactis aerogenes</i>	30. XII.—2. II. 30. XII.—15. II.	Ba	B	34,30	"	33,35	0,63	22,47	11,2			
10. <i>Aerobakter</i> aus Monadenkultur	6. II.—24. II.	Bb	B	25,20	"	24,20	0,63	20,16	4,41			
+ <i>Aerobakter</i> 4d		Bb	4a	30,20	"	29,20	0,56	25,935	3,71			

entstandener Abweichungen ganz unbeeinflusst von der Höhe der Salpetergabe die Umwandlung von Nitratstickstoff in Eiweißstickstoff 3—4 mg N für den Versuch betrifft. Die geringe Salpetergabe in Serie A stellt also bereits das Optimum der Stickstoffgabe für die Algenentwicklung sicher.

Das Verhalten der meisten Bakterien (*B. Aerobakter, turcosum, lactis aerogenes, lactis acidi*) der Nährlösung und der Algenentwicklung gegenüber läßt sich analytisch, etwa aus der Stickstoffbilanz, nicht differenzieren, nur *B. Radiobakter* zeigt jeweils ein verschiedenes, oft überraschendes Verhalten in der Ausnutzung der Salpetergaben. Aus den später noch eingehender zu besprechenden Analysenergebnissen müssen wir entnehmen, daß *B. Radiobakter* ein denitrifizierender, nitratassimilierender und stickstoffbindender Organismus ist. Erstere Eigenschaft wurde ihm bereits von STOKLASA (Centralbl. f. Bakt. II 21. Bd. 1908 S. 484) zugeschrieben, die beiden anderen Eigenschaften zeigte eingehend LÖHNIS (a. a. O.). In diese physiologischen Eigenschaften unseres Bakteriums konnte insofern tieferer Einblick gewonnen werden, als auch bei neuen Experimenten mit Reinkulturen sich zeigte, daß die Stickstoffentbindung bei Gegenwart von dissimilierbaren organischen Stickstoffverbindungen, Kohlehydraten und Salpeter überwiegend in Erscheinung tritt. So konnte die Denitrifikation durch *Radiobakter*reinkulturen regelmäßig in Algenbouillon und bei wirkungskräftigen Kulturen auch in KUNZELösung (Centralbl. f. Bakt. II 13. Bd.) wahrgenommen werden. Die Denitrifikation konnte bei Versuchen in beiden Nährlösungen regelmäßig durch das vollständige Verschwinden von Nitrat und Nitrit festgestellt werden. Bei den im folgenden angeführten quantitativen Versuchen ließ sich der Nitratverlust auch zahlenmäßig feststellen.

### I. Stickstoffentbindung der Reinkulturen von *B. Radiobakter*.

#### Versuche in Algenbouillon.

(Die Herstellung der Algenbouillon geschah in gleicher Weise, wie dies für die Aufnahme Flüssigkeit des Algenagar angegeben wurde (siehe S. 439 unten). Zum Versuch wurden verwendet 100 ccm Lösung + 0,1 g  $\text{CaCO}_3$ . Die Zahlen bedeuten mg N für den Versuch.

Die Betrachtung der quantitativen Versuche in Algenbouillon zeigen das deutliche Denitrifikationsvermögen des *Radiobakter*-stammes (B). Gegeben wurde in der Lösung 14 mg Nitrat-N pro Liter, also 1,4 mg N auf den Versuch, die durch qualitative Reaktionen mit GRIES'schem Reagenz in der Nitritform nicht einmal in Spuren mehr nachgewiesen werden konnten. Durch die Bakterien-

Bakterium	Versuchsdauer	Blind. Best.	Gesamt- N nach Abzug d. bl. Best.	N-Verlust	NH <sub>3</sub> -N	Amid-N	Nitrat u. Nitrit-N.	Reaktion auf Nitrit mit Gries. Reag.	Eiweiß-N	Gesamt mg N gefunden
1. Ungeimpft . . .	23. V.—26. IX.	0,6	20,29							20,89
2. "	"	"	18,93							19,58
3. <i>B. Radiobakter</i> (B)	"	"	15,99							16,59
4. "	12. XII.—17. I.	2,1	16,03	} 3,5 mg N-Verlust gegenüber dem Mittel von ungedüngt!	4,48	1,75	0,98	} Nitrit nicht nach- weisbar	10,92	18,13
5. " + <i>B. Aerobakter</i> (4a)	"	"	16,27		5,64	1,47	0,98		10,29	18,87
6. <i>B. Aerobakter</i> (4a)	23. 5.—26. IX.	0,6	19,84							
7. "	12. XII.—17. I.	2,1	19,22		4,94	1,40	2,73	ca. 1 mg Nitrit	12,25	21,32
8. <i>B. Thiocostum</i> 4c	23. V.—26. IX.	0,6	19,70							20,30
9. "	12. XII.—12. IV.	2,1	17,92							20,02
10. <i>B. agreste</i> . . .	23. V.—26. IX.	0,6	20,54		3,22	0,98	3,64	"	12,18	21,14
11. <i>B. lactis aerogenes</i>	"	0,6	20,12							20,72
12. <i>B. lactis acidi</i> . . .	"	0,6	20,47							21,07

\* 9

tätigkeit und chemische Reaktionen bei der Sterilisation der Lösung geht nämlich der größte Teil der kleinen Nitratgaben in Nitrit über, als welches er in Kulturen mit nicht denitrifizierenden Bakterien wiedergefunden wird.

### Versuche in Kunzelösung.

Ueber die Stickstoffentbindung des *B. radiobakter* habe ich für die untersuchten Stämme A, B und C nur qualitative Versuche in Kunzelösung angestellt, welche bewiesen, daß zunächst immer energisches Denitrifikationsvermögen vorhanden ist, welches sich aber durch Weiterimpfen auf verschiedenen Nährböden bis zum völligen Verschwinden abschwächen kann. Kunzelösung kann also nicht als besonders geeigneter Nährboden zur Erhaltung des Denitrifikationsvermögens des *Radiobakter* bezeichnet werden. Es denitrifizierte z. B. bei Stamm A die erste Abimpfung noch energisch, die zweite Abimpfung überhaupt nicht mehr. Bei Stamm B, der auf verschiedenen Nährböden (Kunzelösung, Bodenagar, Algenbouillon, Algenagar, Kartoffeln) weiter geimpft worden war, denitrifizierte die erste Abimpfung von den genannten Nährböden in Kunzelösung noch schwach, die zweite nicht mehr. *Radiobakter* (Stamm B) als mineralischer Chlamydomonaden-*Radiobakter*symbiosekultur denitrifizierte in beiden untersuchten Fällen schon bei der ersten Abimpfung in Kunzekultur nicht mehr<sup>1)</sup>. Das Wachstum der Bakterien leidet bei diesen Versuchen in Kunzelösung weit geringere Abschwächung als das Denitrifikationsvermögen.

## II. Stickstoffbindung der Reinkulturen von *Radiobakter*.

Der Nachweis der Stickstoffbindung meiner aus den Wielenbacher Teichwässern und Teichböden gewonnenen Reinkulturen von Kurzstäbchen machte mir im Laufe meiner Arbeit unerwartete Schwierigkeiten. Zahlreiche quantitative Versuche fielen negativ aus, bis ich schließlich über folgende zwei Tatsachen mir klar wurde:

1. Keine morphologische oder physiologische Eigenschaft der stickstoffsammelnden Kurzstäbchen ist entscheidend für sicheres Stickstoffbindungsvermögen. Nur die quantitativ nachgewiesenen Leistungen hinsichtlich Stickstoffbindung können den jeweils untersuchten Stamm als Stickstoffbakterium diagnostizieren.

---

1) Dagegen bleibt in Rohkulturen in gleichartig angesetzter Minerallösung das Denitrifikationsvermögen erhalten, was sich wohl auf die die Bildung des denitrifizierenden Encyms begünstigende Tätigkeit der Begleitbakterien zurückführen läßt.

2. Zum Nachweis der Stickstoffbindung sollten genügend eiweißhaltige, nicht eiweißarme oder gar eiweißfreie Nährflüssigkeiten verwendet werden. Als Nährlösung eignet sich besonders gut mit 0,10 g Dikaliumphosphat pro Liter versetztes Kartoffelwasser. In dieser Nährlösung gelang es mir schließlich, für drei Kreuzstäbchenarten, nämlich für einen auf allen Nährböden sehr schlecht und uncharakteristisch wachsenden *Aerobakter*stamm (4 d), ferner für ein ziegelrotes Kurzstäbchen (*B. Wielenbachense mihi*) und für alle reingezüchteten *Radiobakter*stämme Stickstoffbindung nachzuweisen. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle S. 445 vereinigt.

Bakterium oder Pilz	mg N gefunden	Blinde Bestimmung	Gesamt-N nach Abzug der bl. Best.	N-Gewinn	NH <sub>3</sub> -N + Amid-N	Nitrat + Nitrit	Eiweiß-N
I. Serie.							
1. Ungeimpft . . .	24,94						
2. Ungeimpft . . .	25,43						
	Mittel 25,18						
3. Rosa Hefe . . . ( <i>Torula sanguinea</i> )	24,73						
4. " "	24,87						
5. " "	25,27						
6. " "	24,71						
7. " "	24,50						
8. <i>Radiobakter</i> (B)	—				1,75 (inklusive bl. Bes.		Verloren
9. " (B)	28,19	+ 0,46	27,73	2,55	1,43 (inklusive bl. Best.		26,76
10. <i>Aerobakter</i> (4d)	26,85	+ 0,74	26,11	0,93	5,98   0,77 (inkl bl. Best.)		20,09
II. Serie.							
1. Ungeimpft . . .	38,29				8,54		29,75
2. " . . .	36,96				9,52		27,44
	Mittel 37,62						
3. <i>Radiobakter</i> (B) aus Kunzelösung (dinitrifizierte stark)	40,18			2,56	5,95		34,23
4. <i>Radiobakter</i> (B) aus Kunzelösung (de- nitrifizierte schwach)	39,94			2,32	4,94		35,0
5. <i>Radiobakter</i> (B) aus Milch . . .	39,58			1,96	3,67		35,91
6. <i>Radiobakter</i> (A) aus Gelatine . . .	56,35			18,73	5,04		51,31
7. <i>Radiobakter</i> (D) aus Gelatine . . .	61,84			24,22	7,52		54,32
8. <i>Radiobakter</i> (C) aus Gelatine . . .	38,60			0,98	4,72		33,88
9. <i>Aerobakter</i> (4d) aus Gelatine . . .	40,14			2,52	9,48		30,66
10. Ziegelrotes Kurz- stäbchen ( <i>B. Wielenbachense</i> )	47,04			9,42	8,47		38,57

## Versuche in Kartoffelwasser

Die Versuchsserie in vorstehender Tabelle gibt die Versuchsergebnisse der Kartoffelwasserkulturen wieder. Die Versuchszeit bewegt sich zwischen 14 Tagen und 3 Wochen. Nur die Rosahefe, die auf stickstoffarmen Marmit- und Dextrosenährboden und auf fast stickstofffreien Kieselplatten recht gut wächst, zeigt sich als nicht Luftstickstoff sammelnder Organismus. Das gleiche Resultat wurde bei Versuchen in Rohrzuckersalpeter- und in Bodenlösung erhalten. Die *Radiobakter*stämme konnten sämtlich als stickstoffbindend erkannt werden. Besonders energisch arbeiten Stamm A und D. Für den gleichen Stamm ist hinsichtlich der Stickstoffbindung in Parallelkulturen genügende quantitative Ueberstimmung hinsichtlich der Intensität der Leistung deutlich erkennbar. Dem untersuchten *Aerobakter*stamm (4 d) kommt ein schwaches, aber deutliches N-Bindungsvermögen zu. Das neue rote Bakterium, welches ich als *Bakterium Wielenbachense* (mihi) bezeichnen möchte, hat bei dem einen Versuch ganz reichlich Stickstoff gesammelt. Seine physiologischen Leistungen sollen später noch näher studiert werden.

Nachdem somit über die jeweilige Begünstigung der Denitrifikation wie der Stickstoffbindung bei den *Radiobakter*stämmen Klarheit gewonnen ist, kann an das Verhalten der *Radiobakter*impfungen in den oben (S. 436 ff.) geschilderten Chlamydomonadenkulturen herangegangen werden. Die hier erzielten Resultate waren sehr wechselvolle und können nur so erklärt werden, daß auch in den Parallelkulturen bei rein mineralischer Nährlösung aus bisher noch unbekanntem Gründen bald die Denitrifikation, bald die Nitratassimilation, bald die Stickstoffbindung die Ueberhand gewinnt. Schon in Rohkulturen, welche wie die früher geschilderten Stickstoffbindungsversuche in Münchener Nährlösung mit Wielenbacher Teichboden angesetzt worden waren, beobachtete ich diese merkwürdige Erscheinung. Die gewonnenen Analysenergebnisse zeigen nicht die geringste Regelmäßigkeit in den Parallelen, sondern bald Zu- bald Abnahme im Stickstoffgehalt der Lösung. Es dürfte deshalb zwecklos sein, die große Analysenreihe dieser Versuchsserie hier im einzelnen anzuführen. Dagegen müssen die Analyseergebnisse mit Reinkulturen eingehend geschildert werden, weil sie vielseitigen Einblick in das Problem der Stickstoffbindung zu Zeiten lebhafter Assimilation im Teiche geben.

Wir sehen zwar sowohl in Serie A wie in Serie B, daß wieder nur *Radiobakter* und *Aerobakter* 4 d Stickstoffgewinne ergeben. Diese treten wohl für *Aerobakter* 4 d regelmäßig, nichts aber stets für *Radiobakter* auf. Bei dem Versuch Serie B Nr. 5 haben wir ge-

ringen N-Verlust, wie er durchweg bei den Versuchen in Serie B auftritt, und durch Nitritverflüchtigung unter Einwirkung entstehender Kohlensäure in den Kulturen erklärt werden kann.<sup>1)</sup> Die Eiweißzahl dieses Versuches ist aber abnorm hoch, so daß mit starker Nitrat-assimilation gerechnet werden muß. Dasselbe gilt für Versuch Serie B Nr. 9, bei welchem aber auch noch starke N-Bindung stattgefunden hat. Bei Versuch Serie B Nr. 4 und 8 sind die Stickstoffverluste so groß, daß dieselben nur durch starke Denitrifikation erklärt werden können, worauf auch die niedrige Nitrit- und Nitrat-N-Zahl in Versuch Serie B Nr. 8 hinweist.

Die Stickstoffbindung in den Symbiosekulturen wird vermutlich auch auf die Weise vor sich gegangen sein, daß die Algen den stickstoffsammelnden Bakterien Kohlehydrate und die zur Stickstoffbindung nötigen eiweißartigen Stoffe zur Verfügung stellten. Daß solche vorhanden waren, beweisen die Zahlen für Ammoniak und Amidstickstoff. Da Ammoniak in den Kulturen stets nur in äußerst geringer Menge vorhanden war, ist die Hauptmenge des mit Natronlauge abspaltbaren Stickstoffs auf Körper amidartiger Natur zu setzen.

Auch in den in rein mineralischer Lösung angesetzten Chlamydomonaden-Stickstoffbakterienkulturen glaube ich die Stickstoffbindung auf die Anwesenheit von Stickstoffkörpern eiweißartiger Natur zurückführen zu dürfen, die allerdings in abgebauter Form nur in geringer Menge in die Minerallösungen gelangen. Daher rühren auch anscheinend die geringen Stickstoffgewinne, die in solchen Lösungen mit Bakterienreinkulturen erhalten werden, selbst wenn diese wie *Radiobakter A* stark stickstoffbindende Organismen sind. Sobald wir aber mit Bakterienrohkulturenimpft in *Chlamydomonas*reinkulturen arbeiten, erhalten wir in den gleichen Mineralösungen sehr energische Stickstoffsammlung. Ich habe diesbezügliche Zahlen, die Stickstoffgewinne bis 100 mg N pro Liter Lösung zeigen, bereits im Centralbl. f. Bakt. II. Abt. (a. a. O. S. 309) angegeben. In solchen Rohkulturen arbeiten nun auch dissimilierende, eiweißzerstörende Bakterien. Diese Tatsache läßt sich bei Rohkulturen daraus ersehen, daß nach einiger Zeit die Algen absterben und Ammoniak in den Lösungen stark zunimmt. Für die Stärke der Stickstoffbindung ist diese Erscheinung nicht ungünstig, wie folgende Analysenzahlen beweisen.

---

1) Die Nitritverflüchtigung infolge Austreibung durch die bei der Atmung der Pflanzen entstehende Kohlensäure muß auch daraus geschlossen werden, daß in der Serie B der Rest an Nitratstickstoff, der bei 28 mg Nitrat-N-Zugabe und einem Verbrauch durch Algen und nicht stickstoffsammelnde Bakterien mit 3,5—3,7 mg 24,3—24,5 mg N betragen müßte, in dieser Höhe nicht mehr gefunden wird.

Tabelle.

Serie A. Blinde Best. etwa 0,6 mg N.

Impfung mit *Chlamydomonas* 23. XI. 1915. Impfung mit Bakterien 15. II. 1916. Vereinzelte Kulturen von Bakterien überwuchert und sämtliche Algen zerstört — seit 3. IV. 1916. Zur Analyse angesetzt 6. VII. 1916.

1.  $\frac{1}{2}$  l Minerallösung<sup>1)</sup> mit einer Spur Algen, Nitrat 0, Nitrit sehr stark N gefunden 33,95 mg; N gegeben 7,0 mg; N-Gewinn pro Liter 53,90;

2.  $\frac{1}{2}$  l Minerallösung mit starker Algenentwicklung, Nitrat 0, Nitrit Spur, N gefunden 25,27 mg; N gegeben 7,0 mg; N-Gewinn pro Liter 36,54;

3. 1 l Minerallösung mit geringer Algenentwicklung, Nitrat 0, Nitrit sehr stark, N gefunden 59,43 mg; N gegeben 14,0 mg; N-Gewinn 45,43;

4. 1 l Minerallösung mit starker Algenentwicklung, Nitrat 0, Nitrit Spur, N gefunden 28,07 mg; N gegeben 14,0 mg; N-Gewinn pro Liter 14,07.

Serie B. Blinde Best. etwa 2,0 mg N.

Impfungen wie oben. Zur Analyse angesetzt 22. I. 1917.

1.  $\frac{1}{2}$  l Minerallösung (rein weiß, ohne Spur von Algen), Nitrit sehr stark, Ammoniak sehr stark,

NH <sub>3</sub> -N gefunden	17,43 mg	N gegeben	N-Gewinn pro
Amid-N	„ 0,70 „	7,00 mg	Liter 43,12 mg
Nitrat-N	} „ 1,96 „		
Nitrit			
Nitrit			
Eiweiß-N	„ 8,47 „		

Gesamt N gefunden 28,56 mg

2.  $\frac{1}{2}$  l Minerallösung (mit starker Algenentwicklung) Nitrit 0, Ammoniak Spur,

NH <sub>3</sub> -N gefunden	0,35 mg	N gegeben	N-Gewinn pro
Amid-N	„ 1,47 „	7,00 mg	Liter 51,66 mg
Nitrat	} -N „ 1,01		
Nitrit			
Eiweiß-N	„ 29,99 „		

Gesamt N gefunden 32,83 mg

1) Die hohe blinde Bestimmung entsteht durch Addition der vier Einzelbestimmungen (NH<sub>3</sub>—N, Amid-N, Nitrat und Nitrit N).

3. 1 l Minerallösung (rein weiß, ohne Spur von Algen), Nitrit sehr schwach, Ammoniak sehr stark,

NH <sup>3</sup> -N gefunden	62,65 mg	N gegeben	N-Gewinn pro
Amid-N	„ 1,89 „	14,00 mg	Liter 72,05 mg
Nitrat } -N	„ 1,84 „		
Nitrit }			
Eiweiß-N	„ 19,67 „		
<hr/>			
Gesamt-N gefunden	86,05 mg		

4. 1 l Minerallösung (mit starker Algenentwicklung), Nitrit 0, Ammoniak Spur,

NH <sup>3</sup> -N gefunden	0,42 mg	N gegeben	N-Gewinn pro
Amid-N	„ 1,40 „	14,00 mg;	Liter 31,20 mg
Nitrat } -N	„ 2,52 „		
Nitrit }			
Eiweiß-N	„ 41,86 „		
<hr/>			
Gesamt-N gefunden	45,20 mg		

Das Mittel der Stickstoffgewinne in den 4 analysierten Kulturen mit völliger oder fast völliger Zerstörung der Algen unter Entfärbung der Kultur beträgt 53,62 mg pro Liter, während das Mittel der lebhaft ergrüneten, an Algen reichen Kulturen nur 33,37 mg N beträgt. Ich glaube, daraus den Schluß ziehen zu dürfen, daß auch bei den hinsichtlich ihrer Bakterienzusammensetzung unkontrollierbaren Rohkulturen die Gegenwart von dissimilierenden Ammoniak bildenden Bakterienarten der Stickstoffsammlung günstig ist. Die Dissimilation, die periodisch in den Wielenbacher Teichen eintritt, gewinnt somit für die Energie der Stickstoffbindung auch praktische Bedeutung. Auch in dieser Versuchsserie haben wir wieder den Hinweis darauf, daß die intermediäre Bildung von Abbauprodukten des Eiweißes der Stickstoffbindung günstig ist.

Zum Schluß möchte ich nochmals darauf hinweisen, daß ich die stickstoffbindende Kraft der Bakterien an sich als eine physiologische Leistung des Mikroorganismus ansehe, die mit Hilfe von Enzymen geleistet wird, die in den Zellen aufgespeichert sind. So mag es sich erklären, daß auch auf eiweißarmen und fast eiweißfreien Nährböden die Stickstoffbindung noch einige zeitlang beobachtet wird, wie alle Forscher auf diesem Gebiete festgestellt haben. Ich kann dies für meine *Radiobakter*stämme B und C nur bestätigen. Es wurden mg N gewonnen in 200 n Dextrosebodenlösung:

Bakterien	Gesamt-N in mg	N-Gewinn in mg	Versuchszeit
1. Ungeimpft . . . . .	7,56		
2. „ . . . . .	7,70		
3. <i>B. Aerobakter</i> 4 a (Wielenbach . . . . .	7,42		16. VI.—4. VIII.
4. <i>B. Aerobakter</i> 4 a (Wielenbach) . . . . .	7,38		
5. <i>B. Aerobakter</i> (Posten a. Isar) . . . . .	7,31		11. IX.—2. X.
6. <i>B. Aerobakter</i> (Posten a. Isar) . . . . .	7,17		
7. <i>B. torcosum</i> 4 e (Wielenbach) . . . . .	7,32		16. VI.—4. VIII.
8. <i>B. turcosum</i> (Wielenbach) . . . . .	7,63		
9. <i>B. Radiobakter</i> (B) . .	10,99	2,34	8. II.—1. III.
Es wurden mg N gewonnen in 100 n Dextroselösung von <i>B. Radiobakter</i> (B) . .	5,6	5,1	8. II.—1. III.
	— 0,5 mg Blinde Best.		

Diese Fähigkeit der Stickstoffbindung hört aber bald auf, wenn die Bakterien auf den eiweiß- bzw. an Abbauprodukten des Eiweißes armen Böden weiter geimpft werden. Es ist dies eine bekannte Tatsache. Man sucht in solchen Fällen das verloren gegangene N-Bindungsvermögen durch Bodenpassage der betreffenden Kultur wieder zu regenerieren. Dieses auch von mir (siehe oben) mit Erfolg durchgeführte Verfahren erkläre ich mir innerlich so begründet, daß die N-bindenden Enzyme auf den eiweißarmen Nährböden schließlich in den Zellen der sich fortwährend teilenden Bakterien so verdünnt werden, daß schließlich die stickstoffbindende Kraft versiegt. Im Boden, wie überhaupt in allen eiweißhaltigen Medien, strömen den Zellen wieder zur Enzymbildung geeignete Stoffe in Lösung zu, und mit der erneuten Enzymbildung tritt erneute N-Bindung auf.

Ich habe schließlich noch die Fähigkeit der *Chlamydomonas-Radiobakt*ersymbiosen in 10/100 Salpeterminerallösung (vgl. S. 443 Serie B) darauf geprüft, ob das Zusammenwachsen in sauer und alkalisch gemachten Nährlösungen besonders gefördert oder gestört wird. Man könnte aus den Ergebnissen dieser Versuche Schlüsse auf die Stickstoffbindung in sauren und alkalischen Teichwässern machen. Es wurden deshalb am 22. IX. 1916 je 200 g obiger

Minerallösung<sup>1)</sup> mit je  $2 \times 10$  g  $\frac{1}{27}$  n NaOH,  $2 \times 5$  g  $\frac{1}{27}$  n. NaOH, je zweimal mit 20 g  $\frac{1}{27}$  n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g  $\frac{1}{27}$  n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 5 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und zusammen mit einer unveränderten Lösung mit *Chlamydomonas*reinkultur beimpft. Nach dem Ergrünen der Kulturen wurde am 30. XII. 1916 mit *B. Radiobakter* (B) beimpft.

Am 3. III. 1917 wurden folgende Beobachtungen gemacht:

	Algen- wachstum	Radio- bakter- entwicklung	Reaktion der Lösung
1. 10 g $\frac{1}{27}$ n. NaOH .	sehr stark	sehr schwach entwickelt	neutral bis schwach sauer
2. „ „ „ „	„	„	„
3. 5 g $\frac{1}{27}$ n. „ „	„	schwach ent- wickelt	„
4. „ „ stark	stark	„	„
5. „ 0 sehr stark	sehr stark	„	„
6. 5 g $\frac{1}{27}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . „ „	„	„	„
7. „ „ „ „	„	„	„
8. 10 g $\frac{1}{27}$ n „ stark	stark	sehr schwach entwickelt	„
9. „ „ „ „	„	„	„
10. 20 g $\frac{1}{27}$ n . „ 0	0	0	stark sauer
11. „ „ 0 bis sehr schwach	0 bis sehr schwach	0	„ „

Es war also in der Zeit vom 22. IX. 1916 bis 3. III. 1917 ein völliger Ausgleich der verschieden sauren und alkalischen Lösungen durch die Tätigkeit der beigeimpften Organismen, vorzüglich wohl der Algen eingetreten. Jedoch die stärkste Ansäuerung vermochte die Algen nur in einem Falle in Spuren, die Bakterien überhaupt nicht zur Entwicklung kommen lassen, wie Abimpfungen aus den Kulturen in Gelatine bewiesen. Man sieht aus diesen Versuchen, daß das Aufkommen von säure- und alkaliverzehrenden Organismen, wie es die Chlamydomonaden sind, bis zu einem gewissen Grade geeignet ist, die Lebensbedingungen für stickstoffsammelnde Bakterien zu schaffen. Stickstoffbindung durch Radiobakter (B) konnte allerdings bei dieser Versuchsserie wieder nicht nachgewiesen werden.

Wenn wir nun die Resultate vorliegender Arbeit zusammenfassen, so scheinen mir zwei Tatsachen mit genügendem Beweismaterial belegt zu sein.

1. Die Stickstoffbindung der Teichböden in den üblichen zuckerhaltigen Nährlösungen

1) Zusammensetzung siehe S. 443 Serie A.

kann einen quantitativen Maßstab für die Fruchtbarkeit der betreffenden Teichböden abgeben.

2. Die Energie der Stickstoffbindung in unsren Böden ist abhängig von ihrem Gehalt an Eiweißverbindungen bzw. Abbauprodukten des Eiweißes, welche einen Anteil am Aufbau stickstoffbindender Enzyme zu haben scheinen.

---

## 42. F. Brand: Über Beurteilung des Zellbaues kleiner Algen mit besonderem Hinweise auf *Porphyridium cruentum* Naeg.

(Mit drei Abbildungen im Texte.)

(Eingegangen am 18. Mai 1917.)

---

Mit Recht weist OLTMANN<sup>1)</sup> auf die Schwierigkeiten hin, welche dem Einblick in die Struktur kleiner Algen entgegenstehen; auch ist kaum zu bestreiten, daß verschiedene Autoren auf diesem Gebiete schon Anlaß zu dem Zitat: „Fischen im Trüben“ gegeben haben. Allzu drastisch ist aber wohl der Ausspruch, daß es ein Denkfehler sei, „wenn man sich einbilde, man könne auch kleine Algen stets an dem Bau ihrer Zellen unterscheiden“.

Längere Beschäftigung mit derartigen Organismen hat den Verfasser dieses zu der Ueberzeugung geführt, daß die Frage an sich nicht so hoffnungslos liegt, wie man aus dem dermaligen Zustande der Literatur schließen könnte. Jede einzelne Art wird allerdings nach dem erwähnten Kennzeichen allein kaum jemals zu bestimmen sein, wohl aber werden sich kleinere Gruppen hierdurch sicher umgrenzen lassen, und deren Glieder dann durch Berücksichtigung der physiologischen, biologischen und funktionellen Verhältnisse zu unterscheiden sein. Auf dem bisher üblichen Wege war dieses Ziel allerdings nicht zu erreichen.

In der Regel wurde der Hauptwert auf Kultur und Vorbehandlung mit Chemikalien gelegt. Diese Methoden sind aber hier nicht am Platze, denn die Inhaltsbestandteile solcher Zellen sind oft

---

1) OLTMANN, F., Morphologie usw. der Algen I., S. 169 und II. S. 386.

# 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: 1917

Band/Volume: [35](#)

Autor(en)/Author(s): Fischer Hermann

Artikel/Article: [Das Problem der Stickstoffbindung \(Festlegung des Luftstickstoffs\) bei niederen Pflanzen 423-454](#)