

4 P 192
N° 8—10 B1 OCTOBRE—DÉCEMBRE

1936

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES

SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (I)

CRACOVIE
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ
1937



Publié, par l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres, sous la direction
de **M. S. Maziarski**, Secrétaire de la Classe des Sciences Mathématiques et
Naturelles (Cracovie, Institut d'Histologie de l'Université, rue Wielopole 15).

Nakładem Polskiej Akademii Umiejętności.
Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego pod zarządem Józefa Filipowskiego,

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (I)

ANNÉE 1936

CRACOVIE
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ
1937

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADEMIE POLONAISE
DES SCIENCES ET DES LETTRES
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES
(SÉRIE A: SCIENCES NATURELLES (I))

ANNEE 1930

CRACOVIE
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITE

Table des matières.

	Page
M. Gatty-Kostyal et J. Tesarz: L'acide nucléique de l'érgot de seigle (II ^e partie)	1
B. Hryniewiecki et W. Kurtz: La répartition des cônes siliceux dans les cellules des Cypéracées et leur corrélation (Planches 1—2) .	33
H. Meremiński: Über Embryosackentwicklung bei <i>Begonia incana</i> Lindl. (Ein Beitrag zur Embryologie der Gattung <i>Begonia</i>) (Planches 3—7)	53
W. Zabłocka: Untersuchungen über die Mykorrhiza bei der Gattung <i>Viola</i> (Planche 8—9)	93
Th. Lityński: Recherches sur le dosage du phosphore nucléique dans les graines de féverole (<i>Vicia faba minor</i>)	103
K. Ruppert: Zur Blattmorphologie von <i>Philodendron squamiferum</i> (Planche 10)	131
W. Vorbrodt: Essai d'employer de l'eau oxygénée concentrée pour doser les composants minéraux des substances végétales et animales	139
J. Dyakowska: Researches on the rapidity of the falling down of pollen of some trees (Planche 11)	155
S. Krzemieniewski und J. Kovats: Über den Einfluß von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch <i>Azotobacter chroococcum</i> Beij.	169

Table des matières.

187 M. Gatzert-Kowal et E. Tassart: L'acide nucléique de l'épave de soie
(II partie)

188 B. Hryciak et W. Kuznetz: La régulation des zones allèles dans
les cellules des Oxytricha et leur corrélation (I partie)

189 E. Kozłowski: Über die Entwicklung der Oxytricha
nach dem Prinzip der Homöostase der Oxytricha (I partei)
(I partie)

190 W. Kozłowski: Untersuchungen über die Entwicklung der Oxytricha
nach dem Prinzip der Homöostase der Oxytricha (II partei)
(II partie)

191 T. Kozłowski: Recherches sur la biologie de l'épave de soie
(I partie)

192 M. Kozłowski: Recherches sur la biologie de l'épave de soie
(II partie)

193 W. Kozłowski: Recherches sur la biologie de l'épave de soie
(III partie)

194 J. Kozłowski: Recherches sur la biologie de l'épave de soie
(IV partie)

195 M. Kozłowski: Recherches sur la biologie de l'épave de soie
(V partie)

196 M. Kozłowski: Recherches sur la biologie de l'épave de soie
(VI partie)

*Badania nad szybkością opadania pyłku niektórych drzew.
Researches on the rapidity of the falling down of pollen
of some trees.*

Mémoire

de M^{lle} **J. DYAKOWSKA,**

présenté le 7 décembre 1936, par M. Wł. Szafer m. t.

(Planche 11).

The time, during which the pollen of wind pollinated trees can soar in the air, has a certain signification in the researches when the method of pollen analysis is used because the greater the duration of the time, the farther may the pollen be spread from the tree from which it is derived.

The rapidity with which the pollen falls down, has occupied some scientists. Schmidt (4) mentions it occasionally, in his paper on the spreading of the seeds and of the pollen by the wind. Knoll (3) has given the experimentally calculated data on the falling down of the pollen of some trees.

In the Botanical Institute of the Jagellonian University in Cracow, researches were carried out during the last three years on the rapidity of the falling down of the pollen of 18 trees of the country. In this paper, I wish to present the results of those researches.

Method used for the Researches

The method used by me for investigating the rapidity with which the pollen falls down is the one indicated by Prof. W. Szafer and it is as follows. As an apparatus for the measurements, a tin tube, 2 m height and 12 cm in diameter was employed (Fig. 1).

An aperture was cut out at the bottom of the tube and through it a slide was shoved in. A glass-globe was placed on the top of the tube. That part of the glass-globe which was in contact with the tube, was smeared with vaseline so as to obtain better compactness and to diminish the circulation of the air in the tube,

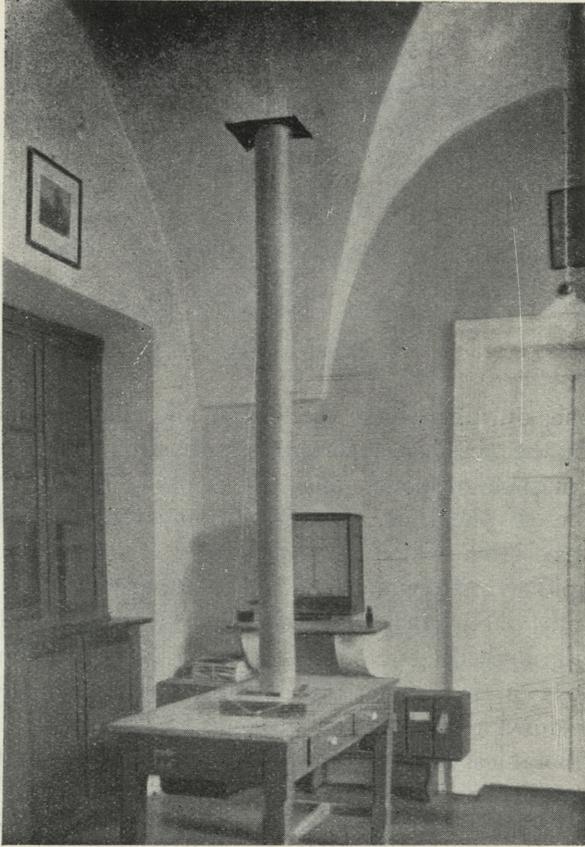


Fig. 1.

during the time while the pollen [was falling down. Thus, the possibility of carrying out the researches in more or less motionless air was obtained and this is of principal importance for the whole problem of the rapidity of the falling down.

The researches themselves on the falling down had the following course. A more or less similar quantity of the examined pollen,

was placed in the glass tube, bent at right angle. Then, it was blown in, with the aid of a small rubber pump, into the glass-globe, taken out of the tube and kept near by, on the level of the top of the tube. The globe, with the dispersed pollen, was rapidly put on the top of the tube and after 10 seconds, the first slide, smeared with glicerine-gelatine, was shoved in the apperture at the base of the tube. Subsequently, every ten seconds the slides were changed. The numbered slides, taken out of the tube and containing the pollen grains in the gelatine, were covered with a cover glass.

Such a method of research required the help of several people. This aid I obtained from the co-workers at the Botanical Institute and I wish to take the priveledge for thanking them for their service.

The pollen for the researches was obtained, either directly by pouring it out from the flowers in the Botanical garden of the Jagellonian University (hazel, birch, pine (*Pinus montana*), or small branches cut from the tree were kept in the laboratory till the male catkins developed and then the pollen was poured out of them. Afterwards, that pollen was sifted through a silk, plancton net in order to remove the bracts and other impurities.

A great difficulty was encountered in pouring out a sufficient quantity of pollen from flowers, pollinated by insects, e. g. the lime-tree, the willow. The same is true for the ash-tree which develops small quantities of pollen.

As a rule, I examined the falling down of the pollen a few hours after pouring them out from the flowers. In a few cases that time was prolonged to several hours and in the case of the *Pinus cembra* it lasted even a few days for I received the pollen itself from the Tatras.

The material for the researches was obtained from the Botanical garden in Cracow and from the vicinities close to that city, only the pollen of the Cembra pine, the fir and the spruce have been sent to me from the Tatra forests. First of all, those trees have been examined, whose pollen appears often in the peat but for comparison the pollen, found very rarely in peat, has been examined also e. g. (the larch, the ash-tree, the yew), finally, the pollen not preserved at all in the peat (poplar).

The falling down of the pollen was observed during 410 seconds for every tree, therefore, each time 40 slides were obtained.

Every slide contained the pollen which has fallen down during the 10 seconds.

In order to obtain a greater accuracy in the results, I have examined the falling down of each species three times. The ash-tree is an exception because there was great difficulty encountered in obtaining a greater quantity of pollen and as a result it has been examined only once, while the lime-tree, the poplar, the willow and the yew-tree were examined twice.

The material obtained of the falling down, has been counted subsequently under the microscope and constantly the same surface of the slide was examined. I have employed a Zeiss microscope, objective C, ocular 4. I have counted by means of a cross-table, constantly observing the same surfaces namely 6 girdles of the cover glass 18×18 mm.

During the course of my work, it became evident that the accepted method is not suitable for the fir and the spruce because their large and heavy pollen grains fall down in totality, during the first 10 seconds. Therefore, in order to examine the falling down, it has been necessary to act somewhat differently. Twenty slides have been shoved under the lower end of the tube. These slides were arranged on a long paper band at an equal distance from one another. They were passed under the lower end of the tube so that each, of them has been kept under it for approximately 2 seconds. In such a manner, I have succeeded to catch the whole falling down in the course of 40 seconds. Since, by such a short staying of the slide inside the tube, a rather small quantity of pollen grains have fallen on its surface, I have been obliged by the counting, to increase the examined field, namely I have counted the fallen grains on 18 girdles of the cover glass, 18×18 mm.

The Results

Rapidity of the Falling Down

The results of the calculations are presented on Tables I and II, and in the diagrams (Pl. 11). On the Tables, the falling down of the pollen of each species of trees is divided into classes, corresponding to the microscopic slides, therefore, containing the falling down during each of the 10 seconds. On the left side of

the Table, are presented the rapidities of the falling down of the pollen in each of the classes. I have accepted, that the pollen in the slide, which was lying in the apparatus, viz. between the 10th and the 20th second, passed the 2 m way (length of the tube), during 15 seconds, therefore, with the rapidity of 13.33 cm/seconds. Thus, I have calculated the average rapidity in each class. The number of pollen grains in each class is the average of the number of measurements made.

From the series, thus arisen, we see for each of the species, the time in which the first grain of pollen has attained the bottom of the tube for measurements, the time in which their greatest quantity fell, finally the end of the falling down. As the end of the falling down, the class in which the total number appeared for the last time, was accepted. I have deviated from that principle, relatively, to the fir and the larch, on account of the short time of the falling down of their pollen. In most cases, small quantities of pollen can be found on the slides also after that accepted limited number. If the average of the number of the pollen grains would be taken after that limited number, a fraction or zero would be obtained. Such an interrupted falling down lasts sometimes, as it has been stated in the case of the hazel, very long, much longer than 410 seconds. I think, that these are the pollen grains, which have adhered to the wall of the tube and of the glass-globe, and which later have been torn off by slight shocks, that cannot to be avoided in the laboratory. Therefore, they are of no importance upon the totality of the falling down and that is why I have not taken them into consideration in the Table.

The numeric material of the Table has been employed to draw the diagram. In order to represent graphically and to compare the diagrams of particular species, the quantity of individuals, in particular classes, is represented in percentages of the sum of the totality of the falling down. Each column in the diagram expresses the falling down in the course of 10 seconds.

In the Table as well as in the diagram, the species are ranged in series, according to the time of the maximal falling down.

The diagrams show more clearly the differences in the falling down of the different species than the Table. It is readily seen

TABLE I

Seconds	Rapidity of the falling in cm/seconds	Larix polonica 3*	Carpinus betulus 3	Fagus silvatica 3	Fraxinus 1	Pinus cembra 3	Quercus robur 3	Pinus silvestris 3	Betula 3	Alnus glutinosa 3	Populus 2	Corulus avellana 3	Pinus montana 3	Ulmus glabra 5	Tilia cordata 2	Taxus baccata 2	Salix caprea 2
10	13.33		95.6	2.6	2.0	0.0	0.6	0.3	1.0	2.0	37.0	0.6	0.0	0.2	0.5	0.0	13.5
20	8.00	1.3	226.0	97.6	1.0	16.0	8.3	15.0	8.6	0.6	44.0	3.3	6.6	5.6	7.0	0.0	39.0
30	5.71	0.3	394.0	321.4	2.0	128.0	96.0	73.0	36.3	8.6	89.0	20.0	14.3	63.2	18.5	9.0	60.0
40	4.44	0.3	159.3	49.0	18.0	213.6	192.0	156.0	248.6	65.0	205.5	54.3	80.6	153.2	27.5	22.5	78.5
50	3.64	0.3	19.3	6.6	2.0	133.0	196.6	641.0	1105.3	1202.6	764.5	1188.0	114.6	246.6	64.0	105.5	158.5
60	3.08		6.0	3.3	1.0	35.3	142.3	217.0	862.0	1006.0	1102.0	1368.0	206.6	347.8	192.5	278.5	175.5
70	2.67		2.0	2.0		10.0	40.6	58.5	504.0	840.3	578.5	674.0	133.0	233.0	94.5	424.5	239.5
80	2.35		1.0			8.5	13.3	16.6	397.6	546.0	238.5	495.6	47.0	100.8	54.5	524.5	1350.0
90	2.11		1.0			1.3	7.3	14.6	216.3	387.6	52.0	597.6	15.3	57.6	4.5	373.5	1123.0
100	1.90					2.0	5.0	6.6	170.6	228.0	32.5	222.6	9.3	20.2	2.0	233.5	695.5
110	1.74					1.0	2.6	2.6	176.0	107.0	17.5	48.0	3.0	15.2	1.0	194.5	687.5
120	1.60					2.0	1.3	2.0	115.3	59.3	1.5	33.3	4.0	6.4		103.5	421.0
130	1.48						1.3	2.3	82.0	45.3	6.5	12.3	8.0	5.0		60.0	246.5
140	1.38						1.0	3.3	46.0	42.6	3.0	4.3	3.6	4.3		29.5	167.5
150	1.29							3.6	24.6	35.0	1.0	6.0	1.6	1.3		23.0	146.0
160	1.21							1.0	11.3	40.6	1.0	6.6		1.0		13.0	76.5
170	1.14							2.3	13.0	17.6	1.0	7.6		3.3		3.0	58.5
180	1.08							2.6	9.6	15.0		6.3		1.0		5.0	39.5
190																	

that not only is the time of the maximal falling down important, but also the height of the curve, its length and shape.

TABLE II.

Time in seconds	Rapidity of the falling down in cm/seconds.	Abies pectinata	Picea excelsa
	200.00	2.3	0.0
2	66.67	0.6	0.0
4	40.00	0.0	0.0
6	28.57	2.6	0.0
8	22.22	1.3	0.0
10	18.18	1.6	0.0
12	15.38	2.3	0.3
14	13.33	4.0	0.3
16	11.76	2.0	0.3
18	10.53	1.0	1.6
20	9.52	1.0	4.3
22	8.70	0.6	7.6
24	8.00	0.3	8.6
26	7.41	0.0	13.6
28	6.90	0.0	30.3
30	6.45	0.6	22.6
32	6.06	0.0	15.0
34	5.71	0.0	15.0
36	5.41	0.3	5.0
38	5.13	0.0	4.5
40			

If we compare, for inst. the curve of the falling down of the pollen of the Scots pine, the oak (*Quercus robur*), the alder (*Alnus glutinosa*) and the birch, whose maximum of the falling down, occurs between the 50th and the 60th second, we shall see at once, that the pollen of the oak will fall down the most rapidly, and that consequently, it has the slightest chance of being transported to the greatest distance, since, the curve of its falling down has its left side high and an insignificant stretch.

The pollen of the Scots pine soars in the air a little longer than the oak. That can be seen in the greater stretch of the curve and in its somewhat unsymmetrical shape, the right side of the curve being higher. The pollen of the birch soars in the air a little longer, than the Scots pine, therefore, the curve of its falling down has a stretch still more distinct and the preponderance of its right side over the left one, is very distinct. Finally, the alder has the greatest stretch of all these curves and the left side of that curve is quite flat. As a result, it is certain that its pollen soars in the air an especially long time.

The same consideration may be undertaken for each of the groups, ranged relatively to the tops of the curve of the falling down.

For each of the examined species, I have calculated the average rapidity of the falling down.

The ranging of trees, according to the average rapidity of the falling down, results in a somewhat different series, than the ranging, according to the tops of the curve of the falling down, which is easily understood. The averages of the rapidity of the falling down are presented in the second column of Table III.

In column I, the average sizes of the pollen grains are presented. I have calculated each of them, by 100 measurements (except the horn-beam 150, the ash-tree 60). For the measurements of the size, I have used the slide which contained the maximal number of pollen grains. I have given for two trees, the result calculated by others, viz. the average size of the pollen of *Tilia cordata*, derived from the work of J. Trela (6), and that of the birch, out of the work of M^{rs} Jentys-Szafer (2). I have given for the birch, the average size of *B. verrucosa* and *B. pubescens*, because, I have employed a mixed pollen for the falling down.

In case of the pollen grains, being more or less round, or at least round in one of their surfaces, I have measured the diameter; in the case of elongated grains — the great axis (*Coniferae*).

Comparing the average size with the average rapidity, the importance of the air sacks as flying apparatus is readily seen, as for example, in the pollen grains of some Gymnosperms. Their pollen falls down less rapidly than other pollen grains which are much smaller but which do not have these air sacks.

The comparison of the rapidities of the falling down with the average size of the pollen, without the flying apparatus,

shows the dependence of the rapidity upon the size, however, not so absolutely as it might seem. Thus, the pollen of the beech has a smaller, average rapidity than that of the horn-beam, although its average diameter is more or less 3μ , greater than the above one. *Ulmus glabra* and *Tilia cordata* fall down with the same, average rapidity, although the pollen of *T. cordata* is, at an average 4μ greater.

TABLE III.

	I Average size in μ	II Average rapidity of the falling down in cm/seconds	III Average limit of the spreading in km
<i>Abies pectinata</i> .	143.1	38.71	0.7
<i>Larix polonica</i> .	71.8	12.29	6.7
<i>Picea excelsa</i> . .	102.3	6.84	21.6
<i>Carpinus betulus</i>	35.4	6.79	22.1
<i>Fagus silvatica</i> .	38.4	6.03	27.7
<i>Fraxinus</i> . . .	38.0	5.21	37.5
<i>Pinus cembra</i> . .	76.2	4.46	51.2
<i>Quercus robur</i> .	27.7	3.96	64.9
<i>Pinus silvestris</i> .	59.9	3.69	74.7
<i>Populus</i>	25.4	3.39	88.6
<i>Ulmus glabra</i> . .	26.9	3.24	97.1
<i>Tilia cordata</i> . .	31.25	3.24	97.1
<i>Pinus montana</i> .	66.6	3.21	98.8
<i>Betula verrucosa</i>	24.5	2.94	117.7
<i>pubescens</i>	27.5		
<i>Corylus avellana</i>	24.2	2.90	121.0
<i>Alnus glutinosa</i> .	24.6	2.77	132.3
<i>Taxus baccata</i>	25.2	2.30	181.2
<i>Salix caprea</i> . .	17.2	2.16	218.1

Undoubtedly, besides all the possible differences in the weight, shape plays an important part here (the lime-tree has a lence shaped — the elm has a more or less round pollen), and also the sculpture of the exine.

Also, among the pollen provided with flying apparatuses, differences appear in the rapidity of the falling down and these,

are not parallel with the differences in the average size of the pollen. If we compare the three species of Pine (*Pinus*), then we see, that the greatest pollen of the Cembra pine falls down most rapidly; the second in the order, is the Scots pine, while the *Pinus montana* falls down most slowly in spite of its pollen being in average greater by 6.7μ in the long axis, than the pollen of the Scots pine. Evidently, this is influenced by the proportion which exist between the size of the pollen grains and the air sacks.

In order to define that relation more accurately, I have drawn with a projective apparatus of the same power, 100 pollen grains of the three, above mentioned species.

I have measured on the drawings, with the help of the planimeter, the surfaces of the grains, without aerial sacks, also the surfaces of the sacks. From the data, obtained in that way, I have calculated for each species the average surface of the grains of pollen, and the average surface of the sacks. It is true, that the obtained ciphers do not represent the real surfaces, but only those of the optical section, however, their mutual relation must be proportional to the relations of the real areas.

	average area of pollen grains without sacks	average area of the sacks
<i>Pinus cembra</i>	18.57	23.62
<i>Pinus montana</i>	12.9	13.03
<i>Pinus silvestris</i>	12.42	11.75

The comparison of those averages makes it is clear why the pollen of *Pinus montana* falls down more slowly, than that of *Pinus silvestris*, although it is larger.

The average surface of the pollen of the fir and the spruce calculated in the same manner, only by employing other powers, are presented as follows:

	average area of pollen grains without sacks	average area of the sacks
<i>Abies pectinata</i>	14.23	14.295
<i>Picea excelsa</i>	11.69	10.84

Experiment on the Calculation of the Average Limit of the Spreading of the Pollen

The question, how far the wind may convey the pollen, has a great significance in pollen analysis, because it decides to a certain extent, what percentage of the pollen, not derived from the immediate surrounding of the examined sediment, shall be found in the pollen spectrum.

W. Schmidt, in the above mentioned paper (4), presents the manner by which one can calculate the average spreading of the seeds of the spores and of the pollen by the wind. The knowledge of the rapidity of the falling down in the immobile air, is necessary in the calculation. The equation for the calculation of the distance of the flight (Flugweite) is as follows:

$$F = \frac{v}{c^2} \cdot \frac{A}{\rho} \cdot \eta$$

where v is the rapidity of the wind (as the average of its rapidity, he accepts 10 m/seconds),

c = the rapidity of the falling down in immobile air,

A is the so called, diffusion of the thorough mixing (die Grösse des Austausches), which the author accepts as 20,

ρ = the thickness of the air = 1.293×10^{-3} ,

η is the quantity which is dependent upon the percent of the whole (seeds, spores) carried by the wind whose distance of flight we wish to calculate. For one percentage $\eta = 1.645$.

Schmidt considers as the average limit of the spreading that distance, which has been attained by 1% of the general sum of the seeds, relatively of the spores, or of the pollen. He states that the seeds relatively the spores are seldom carried a twofold distance greater than the average limit and to find them beyond this distance is almost impossible.

Accepting the data of Schmidt, and the average rapidity of the falling down obtained from my experiments, I have calculated the average limit of the spreading for 18 examined species. The average limit of the spreading is also presented in Knoll's paper. Knoll has calculated it for 7 species of trees, among which, 4 species are to be found also in my calculations.

The results of the calculations are presented on the 3rd column of Table III.

The data, obtained in that manner, explain to a certain degree the problem, how far from the geographical area of the given species, the pollen may be transported. That may be significant for historical considerations, based on pollen analysis. However, the theoretical calculation of the average limit of the spreading of the pollen, is possible only approximately, because, the real state is dependent on a series of different variable factors, above all, on the strength of the wind. The strength is accepted, as 10 m/second, but, if during the blooming time of the given species, the wind is stronger, then, the pollen will fly away farther. The direction of the wind is also important, because, if, during the blooming time, the wind blows in the direction inward to the geographical area, beyond that area, then, no pollen grain shall be found.

The value A , accepted in the calculation, as equal to 20, is also important. Because, according to Schmidt, it is not constant, but oscillates, depending on the time of the day and on the strength of the wind. The height of the earth, whence the pollen begins its flight, is also not deprived of significance. That height has not been considered in the calculation. Knoll considers that height, as most important. The absolute quantity of the pollen, obtaining the average limit of the spreading, depends on the general quantity of pollen, transported by the wind, which is dependent once more on the strength of the pollination of the given species. It is farther influenced by the fact, whether the pollen comes from isolated trees, or from forests. The pollen, derived from the forest trees will undoubtedly fall down more rapidly, than the pollen of isolated trees, for it meets obstacles in its flight. Finally, a great influence is exerted by the rain which falls at the blooming time because it strikes down the whole pollen to the earth.

If we pay attention to all these factors, we may accept, that the average limit of spreading will be in reality somewhat smaller than it results from the calculations.

However, even such a theoretical limit of spreading might become the base for certain meditations on the geographical area of trees in past times.

I think that the following consideration might be applied here. We shall examine the samples of the surface of the peat-

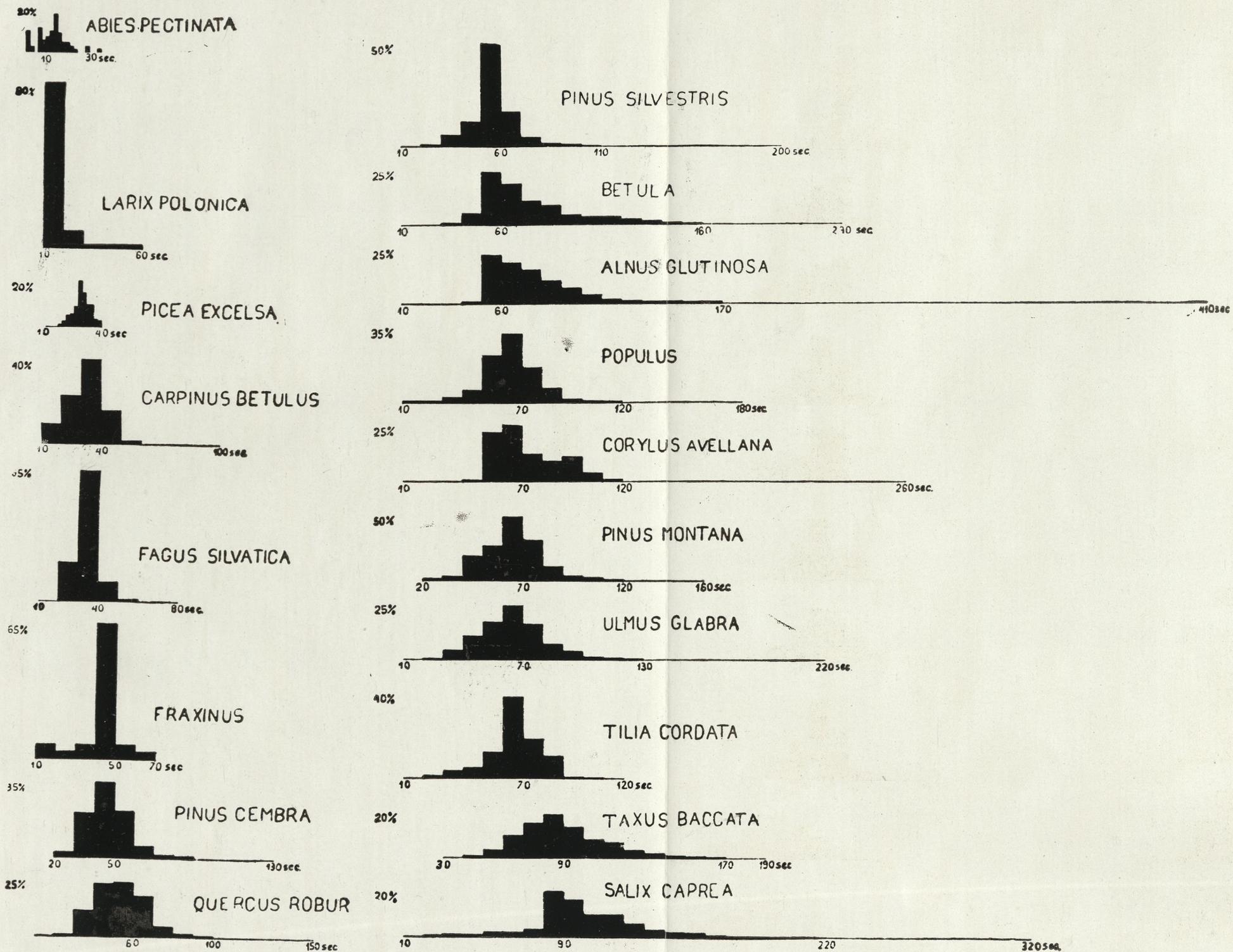
bogs, situated at the distance of about 27 km from the geographical area of the beech, and we shall see what percentage of the pollen of the beech is to be found there; or we shall examine the pollen precipitation, caught in different stations, at the distance of 27 km from the present limit of the geographical area of the beech. Then, we shall be able to calculate the average, to-day's percentage of the beech, in the pollen spectra, distant from the limit of the geographical area by the distance, equal to the average limit of the spreading of the pollen of the beech.

The isopoles of that percentage, drawn on the map of a passed period, will enable marking out approximately the ancient limit of the geographical area of the beech.

From the Botanical Institute of the Jagellonian University in Cracow.

Literature

- 1) F. Firbas: Über die Bestimmung der Walddichte und der Vegetation waldloser Gebiete mit Hilfe der Pollenanalyse. *Planta*. 22. Bd. 1 H. 1934. — 2) J. Jentys-Szafer: La structure des membranes du pollen de *Corylus*, de *Myrica* et des espèces européennes de *Betula* et leur détermination à l'état fossile. *Bull. Acad. Polon.* 1928. — 3) F. Knoll: Über die Fernverbreitung des Blütenstaubes durch den Wind. *Forschng. u. Fortschr.* 8. 1932. — 4) W. Schmidt: Die Verbreitung von Samen und Blütenstaub durch die Luftbewegung. *Oesterr. Bot. Zeitschr.* 67. 1918. — 5) Wl. Szafer: The significance of isopollen lines for the investigation of the geographical distribution of trees in the post-glacial period. *Bull. Acad. Polon.* 1935. — 6) J. Trela: Zur Morphologie der Pollenkörner der einheimischen *Tilia*-Arten. *Bull. Acad. Polon.* 1928.



J. Dyakowska del.

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

ARISTOTELIANA

*Wpływ żelaza i molibdenu na wiązanie azotu przez
Azotobacter chroococcum Beij. — Über den Einfluß von
Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch
Azotobacter chroococcum Beij.*

Mémoire

de MM. S. KRZEMIENIEWSKI m. c. et J. KOVATS,

présenté le 7 décembre 1936, par M. S. Krzemieniewski m. c.

I.

Die Stickstoffbindung von *Azotobacter* wird durch natürlichen Humus höchst günstig beeinflusst. Der Humus stellt dabei für *Azotobacter* weder eine C- noch eine N-Quelle dar (14). Nachforschungen, ob er ihn etwa mit Mineralsalzen versorgt, führten zu negativen Resultaten. Es wurde nämlich bewiesen, daß er keine Quelle der zu seiner Entwicklung unentbehrlichen Mineralnährstoffe bildet. Allein in Bezug auf das Eisen mußte die Frage offen gelassen werden (13). Einerseits schien ein vollständiges Ausschließen des Eisens von der Nährlösung nicht möglich zu sein, andererseits war es stets im Humus enthalten.

Seit der Feststellung dieser Tatsachen hat die Frage nach der Bedeutung und Rolle der Humusstoffe in der N-Bindung durch *Azotobacter*, sowie in anderen biologischen Prozessen an Interesse nicht verloren.

Von den zahlreichen neueren Arbeiten, die diese Probleme behandeln, ist besonders die Abhandlung von H. Bortels (5) von Bedeutung. Bortels erbrachte den Nachweis, daß in den *Azotobacter*-Kulturen Erdextraktasche gleich Humus wirken kann und daß Molybdänverbindungen vom gleichen Einflusse sind.

In seinen Untersuchungen scheint Bortels von der Tatsache ausgegangen zu sein, daß bei chemischtechnischer Stick-

stoffbindung nach der Methode von Haber Molybdän sich als einer der besten Katalysatoren erwiesen hat. Indessen ist Bortels der Frage nach der Bedeutung des Eisens nicht nachgegangen, er hat aber festgestellt, daß die Entwicklung von *Azotobacter*, wenn auch in geringerem Maße, auch durch Wolfram gefördert wird. Später hat derselbe Autor die Erfahrung gemacht, daß auch Vanadium in gleichem Sinne wirken kann und dem Molybdän fast nicht nachsteht (6), was auch von K. Konishi und T. Tsuge (12) bestätigt wurde.

Das Vorkommen des Molybdäns in Humusstoffen wurde von Bortels nicht nachgewiesen, er hält es aber für wahrscheinlich, daß dem so ist. Diese Annahme hat an Wahrscheinlichkeit zugenommen seit den Arbeiten von H. Ter Meulen (15), der nachgewiesen hat, daß Mo im Boden und in der Asche vieler Pflanzen feststellbar ist. Meulen berechnet die Menge des Mo in 1 kg Kulturboden auf 0.1 bis 0.22 mg. Anderen Arbeiten zufolge scheint ein allgemeines Vorkommen des Mo in verschiedenen Bodenarten in Frage gestellt. Sein Einfluß auf *Azotobacter* macht sich aber doch deutlich bemerkbar in den Versuchen von C. B. Van Niel (16). Van Niel hat gefunden, daß in Fällen, in welchen ein Aufzüchten von *Azotobacter* aus einer Bodenart nicht glücken wollte, der Zusatz einer geringen Menge von Mo zu einem positiven Erfolge verhelfen kann.

Der Einfluß der Humusasche und des Molybdäns auf *Azotobacter* bildet den Gegenstand mehrerer Arbeiten, die letzters erschienen sind. Sie führten aber nicht immer zu vollkommen übereinstimmenden Ergebnissen.

Einen günstigen Einfluß der Humusasche, sowie der Asche mehrerer anderer Stoffe pflanzlicher und tierischer Herkunft, haben K. Bassalik und J. Neugebauer (1, 2) feststellen können. Die Verfasser finden aber, daß ungekochte Bodenextrakte bessere Erfolge zeitigen, was ihrer Ansicht zufolge darauf hindeutet, daß im Humus außer Mineralbestandteilen auch organische Verbindungen wirksam sind, die die N-Bindung begünstigen. Dieses Problem lassen wir aber indessen beiseite.

Ähnliche und sogar bessere Ergebnisse mit der Humusasche hatte L. Birch-Hirschfeld (3). Negative Resultate sind dagegen von K. Iwasaki (10) angegeben worden, sie haben aber bisher keine Bestätigung erfahren.

K. Bassalik und J. Neugebauer (1, 2) bestätigen auch das günstige Einwirken des Mo auf *Azotobacter*. Sie finden aber, daß dieser Stoff von geringer Wirkung ist, jedenfalls soll sein Einfluß demjenigen der Humusstoffe nicht gleichkommen. Es kam vor, daß ein Mo-Zusatz von geringerer Wirkung war als das Leitungswasser. Die Autoren sind nicht geneigt Mo als den alleinigen Mineralstoff anzusehen, der die Bedeutung des Humus für *Azotobacter* bestimmt. Diese Ansicht wird später noch deutlicher ausgesprochen in den Worten: »Mo allein (hier neben Fe, Al, Mn, Si und den üblichen mineralischen Bestandteilen angesetzt) war es nicht« (2).

Gute Ergebnisse hat Birch-Hirschfeld (3) mit Mo, ähnlich wie mit Humusasche erzielt. In ihren Versuchen wurde Mo, als Na_2MoO_4 verabreicht, seinem Wirken nach dem Humus gleichwertig. Ein Zusatz von Mo zu einer bereits Humus enthaltenden Nährlösung förderte die N-Bindung nicht weiter.

A. J. Kluyver und W. J. van Reenen (11) haben auf Grund ihrer Versuche mit *Azotobacter agilis* und *A. vinelandii* den günstigen Einfluß des Mo vollauf bestätigen können.

M. Schröder (21) faßt die Ergebnisse ihrer Arbeit, soweit sie sich auf die Wirkung des Mo beziehen, folgendermaßen zusammen: »ohne Mo vermag *Azotobacter* weder in Leitungswasser noch in destilliertem Wasser zu gedeihen« (S. 205).

Es ist von Bedeutung, einige Ergebnisse dieser Arbeit des näheren zu erörtern. In ihren ersten Versuchen stellte die Verfasserin fest, daß die N-Bindung von *Azotobacter* in Nährlösungen mit Leitungswasser durch Mo sehr günstig beeinflusst wird, sehr wenig dagegen in Nährlösungen mit destilliertem Wasser. Um denjenigen Bestandteil des Leitungswassers, der die N-Bindung fördert, ausfindig zu machen, stellte sie einen anderen Versuch an, in dem eine Nährlösung mit destilliertem Wasser verwendet wurde, dem außer den gewöhnlichen Bestandteilen und außer Mo und W noch Zn, Cu und Si zugesetzt wurde. In diesem Versuche erfolgte die N-Bindung im Vergleiche mit dem ersten Versuche mit destilliertem Wasser sichtlich besser, W war dagegen in den Versuchen mit Leitungswasser vollkommen überflüssig.

Neuerdings kommt A. Rippel (18) zu dem Schlusse, daß Mo von geringer Wirkung ist und der Nährlösung zugesetzte geringe Agarmengen nicht ersetzen kann.

Die Frage, ob die Wirkungsweise des Mo und des Humus auf einer Beschleunigung der Entwicklung des *Azotobacters* beruht, oder ob Mo die N-Bindung selbst unmittelbar beeinflusst, wollen wir nicht näher erörtern (3, 7). Es scheint, daß vor allem entschieden werden müßte, aus welchen Gründen die Mo-Wirkung sich so verschiedenartig kundgibt, da manchmal ein Mo-Zusatz in Nährlösung mit destilliertem Wasser die N-Bindung fördert, manchmal aber nur in Nährlösung mit Leitungswasser.

Nachfolgende Untersuchungen, ausgeführt im Biologisch-Botanischen Institut der Jan Kazimierz Universität Lwów, haben den Zweck, zur Klärung dieser Frage beizutragen.

Es wurde erstrebt:

- 1) noch einmal festzustellen, inwieweit Humusasche die Humusstoffe ersetzen kann und
- 2) die Bedingungen zu ermitteln, unter denen der Einfluß des Mo der Wirkung des Humus auf die N-Bindung gleichkommen kann.

II.

Als Standardnährlösung wurde die 2% Glukoselösung benutzt. Dieselbe enthielt in 100 ccm Leitungswasser 0.1 g K_2HPO_4 und 0.01 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. *Azotobacter chroococcum* wurde aus Gartenerde isoliert, aus demselben Boden wurde auch Humus gewonnen als Natriumhumat nach der von Krzemieniewski angegebenen Vorschrift (17). Die Kulturen wurden für gewöhnlich in je 100 ccm Nährlösung in Kolben aus Jenaer 20-Glas mit flachem Boden von 11.5 cm Durchmesser angelegt. Die Nährlösungen wurden dreimal im Wasserdampf sterilisiert. Kultiviert wurde im Brutschrank immer bei 26 bis 28°C.

Versuch 1.

Es wurden drei Versuchsserien angelegt. Als Nährmedium diente die Stammlösung mit Leitungswasser und Glukose: A) ohne Humat, B) mit 0.2% Natriumhumat und C) mit 0.023 g der aus 0.2 g Natriumhumat gewonnenen Asche. Zu manchen Kolben wurde $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ oder beides zusammen hinzugesetzt.

Neben Stickstoffgewinnen wurde auch der Verbrauch von Glukose bestimmt. Die Kulturen verblieben 7 Tage im Brutschrank bei 28°C. In der Tabelle werden sowohl die Stickstoff-

gewinne auf 100 ccm Nährlösung wie auch auf 1 g verbrauchter Glukose angegeben.

Versuchsserie A. Nährlösung ohne Natriumhumat und ohne Humusasche (Tab. I).

TABELLE I.

	Nährlösung ohne Natriumhumat und ohne Humatasche	N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g verbrauchter Glukose in mg
1.	Ohne Zusatz	1.32	4.71
		1.60	5.67
		1.10	4.60
		1.18	5.28
2.	Mit 0.0001 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.67	4.51
		1.60	4.42
		1.15	5.13
		1.05	5.04
3.	Mit 0.0005 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.99	5.12
		1.70	4.57
		1.50	4.72
		1.30	4.39
4.	Mit 0.0001 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0.0005 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.32	5.62
		1.45	5.68
		1.60	4.34
		1.70	4.62

Ergebnis: Ohne Humat erfolgte die Entwicklung des *Azotobacter* sehr schwach, die Stickstoffgewinne waren gering. Die Glukose war nur teilweise verbraucht. Auf ein Gramm verbrauchter Glukose entfallen kaum 5 mg N. Ein Einfluß von Mo oder W war keineswegs sichtbar.

Versuchsserie B. Nährlösung mit 0.2% Natriumhumat. (Tab. II).

Ergebnis: Nach Zusatz von Natriumhumat wurden beträchtliche Mengen von Stickstoff gebunden, bis 15 mg auf 1 g Glukose. Die Glukose war binnen 7 Tagen vollkommen verbraucht. Molybdän und Wolfram waren ohne merklichen Einfluß auf die Stickstoffbindung.

TABELLE II.

	Nährlösung mit Natriumhumat	N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g verbrauchter Glukose in mg
1.	Ohne Zusatz	25·28 25·10 22·67 22·97	14·58 14·48 12·61 12·95
2.	Mit 0·0001 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24·72 25·15 24·16 23·88	14·26 14·50 13·62 13·49
3.	Mit 0·0005 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26·68 — 24·89 24·44	15·39 — 14·03 13·78
4.	Mit 0·0001 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0·0005 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	27·10 27·53 25·30 24·86	15·05 15·87 14·60 13·70

Aus beiden Versuchsserien folgt, daß die N-Bindung durch *Azotobacter* in einer humusfreien Nährlösung nur in geringem Maße erfolgt (1·1—1·6 mg auf je 100 ccm einer 2% Glukoselösung), sehr stark dagegen nach Humuszusatz (22·7—25·3 mg auf 100 ccm Nährlösung). Es ist daraus ersichtlich, daß sowohl der zu den Versuchen verwendete *Azotobacter*-Stamm wie auch das Humuspräparat für die weiteren Versuche recht geeignet sind, da die festzustellenden Differenzen der Stickstoffzunahmen jegliche Fehlergrenzen überschreiten, ein Umstand der von Wichtigkeit zu sein scheint.

Versuchsserie C. Nährlösung mit einem Zusatz von 0·023% der aus Natriumhumat gewonnenen Asche, gleich 0·2 g Natriumhumat (Tab. III).

Ergebnis: Die Stickstoffgewinne waren nach Zusatz von Humusasche nahezu so groß, wie bei Zusatz von Natriumhumat selbst (ca 15 mg N auf 1 g Glukose). Die Glukose wurde fast

vollständig verbraucht. Molybdän und Wolfram blieben aber in Kulturen mit Humusasche wirkungslos, ebenso wie dies bei Kulturen mit Humat der Fall war.

TABELLE III.

	Nährlösung mit Humatasche	N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1g verbrauchter Glukose in mg
1.	Ohne Zusatz	23·92 24·14 23·15 23·36	14·80 14·86 14·19 14·23
2	Mit 0·0001 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23·05 24·14 23·22 23·72	14·56 14·88 14·05 14·32
3.	Mit 0·0005 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25·75 25·62 23·08 23·22	16·19 16·13 13·93 14·06
4.	Mit 0·0001 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0·0005 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22·00 23·58 23·01 22·30	12·54 14·94 13·95 13·57

Zusammenfassend ließe sich sagen, daß die Wirkung der Humusasche derjenigen der Humate gleichkommt. Molybdän und Wolfram hatten keinen merklichen Einfluß auf die N-Bindung. Daß sie gleichzeitig mit Humat oder Humusasche zugesetzt wirkungslos blieben, ist nicht neu (3). Bemerkenswert ist aber der Umstand, daß auch in Kulturen, die der Humusstoffe und deren Aschenteile entbehrten, von einem die N-Bindung förderndem Einflusse des Mo und W nichts zu merken war, was den Ergebnissen der von Bortels ausgeführten Untersuchungen keineswegs entspricht.

Die verwendete Nährlösung war zwar von derjenigen Bortels ein wenig verschieden, indem ihr weder CaCO_3 , noch Fe

zugesetzt wurde, doch schien dies nicht notwendig zu sein, da zur Herstellung der Nährlösung Leitungswasser verwendet wurde, wogegen Bortels zu der seinigen sich des destillierten Wassers bediente. Jedenfalls schien es angezeigt zu sein, die Wirkung von CaCO_3 und Fe des näheren zu prüfen. Andererseits mußte versucht werden, ob sich mit Mo in Mannit-Nährlösung nicht bessere Ergebnisse erzielen lassen, da Bortels Mannit-Lösungen benutzte und der Verdacht nahe lag, daß Glukose ihrer größeren Verunreinigung wegen die Wirkung des Molybdäns irgendwie beeinträchtigt.

Versuch 2.

In dem Bestreben einen etwaigen Einfluß des CaCO_3 und des Fe auf die N-Bindung zu ermitteln, wurde der Leitungswasser enthaltenden Stammlösung 0.5% CaCO_3 und 0.002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ aq. zugesetzt. Natriumhumat und Glukose wurden in diesem sowie in den nachfolgenden Versuchen in denselben Mengen be-

TABELLE IV.

	Nährlösung mit Leitungswasser + $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ und CaCO_3	N-Gewinn auf 100 ccm in mg
1.	Ohne Zusatz	2.38 2.64
2.	+ 0.2% Na-Humat	27.88 26.72
3.	+ 0.0001% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24.70 25.20
4.	+ 0.001% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26.60 24.64
5.	+ 0.01% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23.44 23.16
6.	+ 0.0005% $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.22 6.72

nutzt, wie dies in den oben angeführten der Fall war. Zu den Kulturen wurden diesmal nur je 50 ccm Nährlösung verwendet. Sie verblieben im Brutschrank bei 28°C 10 Tage lang. Der Übersichtlichkeit wegen beziehen sich die in Tabelle IV angegebenen N-Gewinne wie immer auf je 100 ccm Nährlösung.

Das Ergebnis dieses Versuches scheint von Bedeutung zu sein. Ein Zusatz von CaCO_3 und Fe (Reihe 1) zur Nährlösung übte fast keine Wirkung aus, ein Zusatz von Humus (neben Ca und Fe) kam wie gewöhnlich in einer Steigerung der N-Bindung zum Ausdruck (Reihe 2), das wichtigste aber ist, daß ein Zusatz von verschiedenen Mo-Mengen jetzt die gleiche Wirkung wie Humus hervorrief, wogegen W von geringem Einflusse war. Die die N-Bindung fördernde Wirkung des Mo trat also erst nach CaCO_3 - und Fe-Zusatz in Erscheinung, obwohl das zu den Versuchen verwandte Leitungswasser diese Stoffe von vornherein enthielt.

Im folgenden Versuch stellten wir uns die Aufgabe dieses Ergebnis nachzuprüfen.

Versuch 3.

Glukose-Nährlösung mit Leitungswasser wie in den früheren Versuchen mit 0.5% CaCO_3 und 0.002% $\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$ neben den üblichen Bestandteilen der Stammlösung. Der Nährlösung wurden verschiedene Mengen von $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sowie von $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zugefügt. Zu Vergleichszwecken wurden gleichzeitig Kulturen mit 0.2% Na-Humat, aber ohne Ca, Fe und Mo angelegt. Die Kulturen mit je 100 ccm Nährlösung wurden 10 Tage lang im Brutschrank bei 28°C gehalten. (Tab. V).

Der Versuch bestätigte die früheren Ergebnisse. In einer Nährlösung mit Leitungswasser und Glukose nebst Fe- und CaCO_3 -Zusatz wird die N-Bindung durch Mo stark gefördert und entspricht fast den Werten, die in Kulturen mit Na-Humat vorkommen. Sie wird auch durch W-Zusatz gesteigert, wenn auch in sichtlich geringerem Grade.

Einer größeren Menge des der Nährlösung hinzugefügten Mo entspricht eine bis zu einer gewissen Grenze fortschreitende Steigerung der N-Bindung, was auch in Kulturen mit W bemerkt wurde. Das Optimum der N-Bindung entfällt in diesen Versuchen

TABELLE V.

1.	Nährlösung mit CaCO ₃ und Fe ₂ (SO ₄) ₃ , sowie mit Mo oder W in ‰:	N-Gewinn		N-Gewinn	
		Mit Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		Mit Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	
		auf 100 ccm in mg	auf 1 g ver- brauchter Glukose in mg	auf 100 ccm in mg	auf 1 g ver- brauchter Glukose in mg
	+ 0 00001‰	17·83 16·90	9·93 9·65	4·02 5·00	4·34 4·43
	+ 0·0001‰	21·94 21·80	11·86 11·83	5·14 4·82	4·55 4·19
	+ 0·001‰	21·88 22·89	11·52 12·38	14·66 13·12	8·14 7·61
	+ 0·01‰	23·62 23·69	12·77 12·81	17·18 17·04	9·28 9·15
	+ 0·1‰	23·20 23·35	12·55 12·63	9·20 8·72	5·67 5·75
	+ 0·5‰	20·89 21·80	11·30 11·79	— —	— —
		N-Gewinn			
		auf 100 ccm in mg		auf 1 g verbrauchter Glukose in mg	
2.	Nährlösung mit 0·2‰ Natriumhu- mat ohne Ca, Fe und Mo	25·20 25·45		13·61 13·75	
3.	Nährlösung mit Leitungswasser und K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , ohne Zu- gabe von Fe, Ca, Mo und Na-Humat	2·34 2·50		4·29 4·89	

auf 0·01‰—0·1‰ Na₂MoO₄·2H₂O sowie auf 0·01‰ Na₂WO₄·2H₂O.
Bei 0·5‰ Mo wird die N-Bindung sichtlich schwächer, bei W-
Zusatz sogar schon bei 0·1‰.

Den Schwankungen der N-Bindung entsprechend, erfahren auch die Mengen des auf 1 g verbrauchter Glukose entfallenden Stickstoffmengen eine Änderung. Der beste Ertrag bei Mo-Zusatz betrug 12·79 mg N auf 1 g Glukose, bei Humus-Zusatz 13·68 mg, dagegen nur 9·21 mg, wenn Wolfram vorkam.

Eine genauere Bestimmung der Rolle des hinzugefügten Fe sowie Ca blieb einem weiteren Versuch vorbehalten.

Versuch 4.

Dieser Versuch besteht aus zwei Kulturserien, wobei das eine Mal Mannit (2%), das andere Mal Glukose (2%) als Kohlenstoffquelle zur Verwendung kamen. Dieses Unterschiedes ungeachtet, waren die Nährlösungen in beiden Versuchsserien die gleichen. Den einzelnen Kulturen wurden bald 0·2% Na-Humat, bald 0·002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$, 0·5% CaCO_3 und 0·002% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ zugesetzt. Zu den Kulturen der Mannit-Serie wurden je 50 ccm, zu den der Glukose-Reihe je 100 ccm Nährlösung verwendet. Alle Kulturen verblieben 10 Tage lang im Brutschrank bei 28°C. Die in Tabelle VI angeführten N-Gewinne beziehen sich auf 100 ccm Nährlösung.

Ein Vergleich der in den Reihen 3 und 5 angegebenen Zahlen ergibt, daß das dem Leitungswasser zugesetzte CaCO_3 an und für sich auf die N-Bindung keine Wirkung auszuüben vermag. Das Leitungswasser von Lwów enthält übrigens verhältnismäßig viel CaCO_3 . Aus Rubrik 1 und 2 ist ersichtlich, daß auch gleichzeitig erfolgende Zusätze von CaCO_3 und $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$ wirkungslos waren. Die Rubrik von 2 bis 5 zeigt, daß Mo zwar eine bedeutende Steigerung der N-Bindung bewirken kann, daß diese aber nicht immer erfolgt. Die Zahlen der Rubrik 4 und 5 beweisen nämlich klar und deutlich, daß ein günstiger Einfluß des Mo sich nur dann geltend macht, wenn der Nährlösung gleichzeitig Fe zugeführt wird. Die Reihe 6 ergibt, daß W in seiner Wirkung dem Mo nicht gleichkommt, ein Umstand, der schon wiederholt angeführt wurde. Aus den Rubriken 7 und 8 ist schließlich nochmals ersichtlich, daß Mo neben Na-Humat keine weitere Steigerung der N-Bindung bewirkt. Bei Fe-Zusatz wiesen die Kulturen, die Na-Humat, aber kein Mo enthielten, die gleichen N-Gewinne auf wie diejenigen, denen neben Fe noch Mo aber kein Na-Humat zugesetzt wurde. Die geringe

TABELLE VI.

	Nährlösung mit Leitungswasser	Mit Mannit N-Gewinn auf 100 ccm in mg	Mit Glukose	
			N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1g verbrauchter Glukose in mg
1.	Ohne Zusatz	2·10	1·00	3·22
		2·52	0·75	2·77
2.	+ Ca + Fe - Mo	1·54	2·06	3·85
		2·10	2·34	4·17
3.	- Ca + Fe + Mo	27·26	24·60	13·29
		27·82	25·40	13·74
4.	+ Ca - Fe + Mo	4·90	3·00	4·18
		7·20	3·06	4·43
5.	+ Ca + Fe + Mo	29·32	24·40	13·19
		28·38	24·70	13·30
6.	+ Ca + Fe - MO + W	—	16·45	8·89
		—	17·26	9·32
7.	Mit Na-Humat + Ca + Fe - Mo	27·74	—	—
		28·58	—	—
8.	Mit Na-Humat + Ca + Fe + Mo	24·94	—	—
		31·90	—	—

aber doch deutliche N-Zunahme, die in den Kulturen mit Mo aber ohne Fe-Zusatz (Reihe 4) festgestellt wurde, ist auf die im Leitungswasser enthaltenen Fe-Spuren zurückzuführen. Es ist möglich, daß infolge einer Unvorsichtigkeit zu den Versuchen Leitungswasser verwendet wurde, das schon lange in den Röhren der Wasserleitung gelegen war, und daher an Fe reicher war als das gewöhnlich der Fall ist. In einer Nährlösung mit destilliertem Wasser würde diese N-Zunahme wohl nicht feststellbar sein.

Daß in Mannit — etwas größere Mengen gebundenen Stickstoffs als in den Glukose-Lösungen vorkamen, ist darauf zurück-

zuführen, daß das Mannit-Präparat weniger Wasser enthielt und einen größeren Grad von Reinlichkeit aufwies als die Glukose. Diese Unterschiede würden wohl nicht feststellbar sein, falls die Nährflüssigkeit entsprechend größere Mengen von Glukose enthalten würde.

Es folgt noch ein weiterer derartiger Versuch.

Versuch 5.

Kulturen mit Stammnährlösung (Leitungswasser, sowie 2% Glukose). Einem Teil der Kulturen wurden 0.2% Na-Humat zugesetzt, dem anderen nichts. Einzelne Kulturen enthielten außerdem 0.01% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 0.002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq}$. Die Menge der Nährflüssigkeit einer jeden Kultur betrug 100 ccm. Kulturdauer 7 Tage bei 28°C. (Tab. VII).

TABELLE VII.

	Nährlösung mit Leitungswasser	Ohne Natriumhumat		Mit Natriumhumat	
		N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g verbrauchter Glukose in mg	N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g verbrauchter Glukose in mg
1.	+ Fe + Mo	24.35 23.02	13.16 12.43	26.08 24.68	14.09 13.34
2.	+ Fe + Mo ¹⁾	— —	— —	26.64 19.62	14.40 10.60
3.	+ Fe - Mo	1.27 1.46	3.89 3.49	25.00 24.42	13.51 13.30
4.	- Fe + Mo	1.65 1.55	4.60 4.54	17.90 12.50	9.67 6.77

Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigen vollauf die oben angeführten Folgerungen über die Bedeutung des Molybdäns und Eisens für *Azotobacter*. Die früheren Versuche ergaben, daß Na-Humat ohne Nachteil durch Humusasche ersetzt werden kann.

¹⁾ Als MoO_3 .

Nun wird aber klar, daß in Versuchen mit Leitungswasser, das reich an Ca ist, aber wenig Fe enthält, das Molybdän das Natriumhumat nicht ersetzen kann, falls der Nährlösung nicht gleichzeitig Fe zugesetzt wird. Eisen ohne Molybdän blieb auch wirkungslos.

Die zuletzt angeführten Versuche erschöpfen somit eigentlich den am Anfang der Arbeit festgelegten Arbeitsplan. Es scheint aber von Bedeutung zu sein die Wirkungsart verschiedener Fe-Verbindungen sowie verschiedener Fe- und Mo-Mengen des näheren festzustellen.

Versuch 6.

Um die Wirkungsweise verschiedener Fe-Verbindungen auf die N-Bindung durch *Azotobacter* in Gegenwart von Mo wenigstens annähernd festzustellen, wurden Kulturen mit 100 ccm Stammlösung (Leitungswasser mit 2% Glukose) angelegt, mit einem Zusatz von 0.01% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. CaCO_3 wurde den Kulturen nicht zugesetzt. Die Zugabe von Eisensalzen erfolgte in Mengen von 2 oder 5 mg. Versuchsdauer 6 Tage bei 26°C (Tab. VIII).

TABELLE VIII.

	Nährlösung mit 0.01% Molybdän als $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fe mg	2 mg Eisensalz		Fe mg	5 mg Eisensalz	
			N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g. Glu- kose in mg		N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g. Glu- kose in mg
1.	+ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.40	23.38 26.60	12.29 13.82	1.00	25.20 26.88	12.94 13.80
2.	+ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$	0.48 ¹⁾	25.48 26.77	13.60 13.74	1.20 ¹⁾	27.30 27.44	14.13 14.03
3.	+ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.41	26.74 26.92	13.64 13.67	1.04	28.56 28.59	14.69 14.62
4.	+ $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$	0.94	22.92 —	13.61 —	1.88	20.65 22.82	12.33 13.00

¹⁾ Der Fe-Gehalt wurde analytisch bestimmt; andere Werte sind berechnet.

In Nährlösungen mit 0·01% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ erfolgt nach Zusetzung von löslichen Fe-Verbindungen in Mengen, die ungefähr 0·5 mg und 1 mg Fe entsprechen, eine starke Förderung der N-Bindung, wobei größere Fe-Mengen sogar günstiger zu wirken scheinen. Das unlösliche Eisenphosphat wirkte, obgleich in einer Menge eingeführt, die nahezu das zweifache an Eisen enthielt, bedeutend schwächer.

Weitere Versuche hatten den Zweck die Wirkungsart verschiedener Fe-Mengen auf die N-Bindung des näheren zu erproben und diese mit der Wirkung verschiedener Mo- und Humat-Mengen zu vergleichen.

Versuch 7.

Die Kulturen dieser Versuchsserie enthielten verschiedene Mengen von Na-Humat. Als Nährflüssigkeit diente die Stammlösung mit Leitungswasser, 2% Glukose sowie 0·002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq}$. Die Menge der Nährlösung einer jeden Kultur betrug 100 ccm. Kulturdauer 7 Tage bei 28°C (Tab. IX).

Man ersieht aus den oben angeführten Ergebnissen, daß eine Steigerung der N-Bindung bereits nach Zusetzung von 1 mg Natriumhumat zu 100 ccm Nährlösung erfolgt. Einer Vergrößerung der Humat-Mengen entspricht eine weitere Steigerung der N-Bindung. Als optimal erwies sich ein Zusatz von 0·2%—0·3% Natriumhumat. Größere Humatmengen scheinen auf die N-Bindung bereits hemmend zu wirken. Bei optimalen Humatmengen erreichen die in Bezug auf die verbrauchte Glukose berechneten N-Gewinne die höchsten Werte, indem auf 1 g Glukose bis 14 mg Stickstoff entfallen.

Versuch 8.

Dieser Versuch bezweckte die Wirkungsweise verschiedener Mo-Mengen auf die N-Bindung durch *Azotobacter* des näheren zu bestimmen. Nährlösung ohne Natriumhumat, sonst wie im Versuch 7 mit 0·002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq}$. Die zugesetzten Mo-Mengen betragen 0·00001% bis 1·5% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Kulturen mit je 100 ccm Nährlösung wurden 10 Tage lang bei 28°C gehalten (Tab. X).

Es wirkt bereits die kleinste Menge des eingeführten $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, die 4 γ Mo auf 100 ccm Nährlösung entspricht,

TABELLE IX.

	Nährlösung mit Leitungswasser	N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g Glukose in mg
1.	Ohne Na-Humat	1·52 2·15	5·63 5·62
2.	+ 0·001% Na-Humat	3·32 4·00	6·75 7·16
3.	+ 0·005% »	5·98 5·54	7·34 7·48
4.	+ 0·01% »	6·00 7·35	7·28 7·54
5.	+ 0·05% »	18·38 11·87	12·69 12·11
6.	+ 0·1% »	19·82 23·60	13·63 12·79
7.	+ 0·2% »	25·22 26·58	13·64 14·38
8.	+ 0·3% »	26·06 22·66	14·09 12·25
9.	+ 0·4% »	25·52 22·72	13·79 12·28

sichtlich fördernd auf die N-Bindung. Eine weitere Vergrößerung der Mo-Mengen steigert die N-Bindung nur noch in geringem Maße. Das Optimum entfällt auf 2—4 mg Mo; gleichzeitig erreicht auch die auf die verbrauchte Glukose berechnete N-Ausbeute ihr Maximum. Eine weitere Steigerung der Mo-Mengen beginnt auf die N-Bindung allmählich hemmend zu wirken, doch erfolgt sie noch bei 600 mg Mo in recht starkem Maße. Die Ergebnisse dieses Versuches stimmen in ihren Grundzügen mit denjenigen von Bortels (5) und Birch-Hirschfeld (3) überein.

TABELLE X.

	Nährlösung mit Leitungswasser + 0·002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$	Mo in mg	N-Gewinn auf 100 cem in mg	N-Gewinn pro 1 g Glu- kose in mg
1.	Ohne $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0·0	1·70 2·10	4·87 4·35
2.	+ 0·00001% »	0·004	7·14 12·82	9·32 9·78
3.	+ 0·00005% »	0·02	18·20 18·00	9·84 9·73
4.	+ 0·0001% »	0·04	18·60 19·30	10·05 10·43
5.	+ 0·0005% »	0·2	19·88 20·30	10·80 11·09
6.	+ 0·001% »	0·4	21·98 21·42	11·88 11·57
7.	+ 0·005% »	2·0	23·94 24·92	12·94 13·47
8.	+ 0·01% »	4·0	24·30 23·12	13·13 12·90
9.	+ 0·05% »	20·0	22·58 23·06	12·20 12·47
10.	+ 0·1% »	40·0	22·96 23·80	12·36 12·86
11.	+ 0·5% »	200·0	20·72 21·74	11·20 11·75
12.	+ 1·0% »	400·0	18·20 21·62	9·30 11·64
13.	+ 1·5% »	600·0	21·76 21·14	11·76 11·43

Versuch 9.

Der Einfluß verschiedener Mengen von Eisen auf die N-Bindung. Tabelle XI enthält die Ergebnisse zweier Versuchsserien, der einen vom 20. Juni 1936, der anderen vom 9. Juli 1936.

TABELLE XI.

	Nährlösung mit Leitungswasser und Mo	Fe mg	Serie vom 20. Juni 1936		Serie vom 9. Juli 1936	
			N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g Glukose in mg	N-Gewinn auf 100 ccm in mg	N-Gewinn auf 1 g Glukose in mg
1.	ohne $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. .	0	0.27 0.42	4.82 4.00	1.00 1.20	2.85 3.18
2.	+ 0.00001% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.0024	1.12 1.35	2.47 2.77	2.10 2.10	4.66 4.89
3.	+ 0.0001% »	0.024	3.64 3.45	5.86 5.98	4.06 6.07	6.72 6.00
4.	+ 0.001% »	0.24	9.24 18.48	9.98 12.87	23.80 23.66	12.76 12.26
5.	+ 0.002% »	0.48	23.10 23.66	13.75 13.87	25.48 26.77	13.00 13.74
6.	+ 0.005% »	1.20	23.80 24.64	12.00 12.41	27.30 27.44	14.13 14.03
7.	+ 0.01% »	2.40	26.32 25.90	13.26 13.05	27.72 27.72	14.14 14.24
8.	+ 0.05% »	12.0	26.04 ¹⁾ 27.86 ¹⁾	13.12 14.03	19.50 7.42	12.31 12.04
9.	+ 0.1% »	24.0	0.14 0.19	3.50 3.80	0.14 0.16	3.30 3.38

¹⁾ Diese zwei Kulturen enthielten an Stelle von $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ je 0.05% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 10 \text{ mg Fe}$.

Kulturflüssigkeit: Stammlösung mit Leitungswasser, dazu 0·01% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kein Natriumhumat, kein Eisen. Einzelnen Kulturen wurde $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$ in Mengen von 0·00001% bis 0·1% zugesetzt. Die Menge der Nährlösung einer jeden Kultur war gleich 100 ccm. Kulturdauer 6 Tage bei 26–28°C.

Schon nach Einführung von 2·4 γ Fe wurde in den Kulturen mit Leitungswasser eine Förderung der N-Bindung festgestellt. In der ersten Versuchsserie erfolgte die beste N-Bindung nach Zusatz von 2·4 bis 10 mg Fe zu je 100 ccm Nährlösung, in der zweiten, bei einem Eisengehalt von 1·2 bis 2·4 mg. Eine Menge von 12 mg Fe bewirkte in der zweiten Versuchsserie bereits eine hemmende Wirkung. In der ersten Serie konnte eine Menge von 10 mg Fe noch den allerbesten zugezählt werden. Die nächstgrößere Dosis betrug 24 mg Fe. Nach Einführung einer solchen Menge von Eisensulfat war in beiden Versuchsserien die N-Bindung dem Auslöschen nahe, was auf eine zu starke Ansäuerung der Nährlösung zurückzuführen sein dürfte.

Versuch 10.

Zum Schlusse wurden zu Vergleichszwecken Kulturen mit Leitungswasser und solche mit destilliertem Wasser angelegt. Die Stammlösung bestand aus 2% Glukose, 0·1% K_2HPO_4 , 0·05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Dieser Lösung wurden noch 0·003% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \text{ aq.} = 0·72 \text{ mg Fe}$, 0·01% $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 4 \text{ mg Mo}$, oder 0·2% Natriumhumat zugesetzt. Zu den Kulturen mit destilliertem Wasser wurde außerdem 0·05% CaCO_3 hinzugefügt. Der Gehalt einer jeden Kultur an Nährlösung war gleich 100 ccm. Kulturdauer 6 Tage bei 27–28°C. (Tab. XII).

Das zu den Versuchen der ersten Serie verwendete Wasser war zweimal aus »Pyrex« Glas destilliert worden. Bei der Auswahl von Chemikalien wurde auf deren größtmögliche Reinheit geachtet.

Die N-Gewinne in den Kulturen mit destilliertem Wasser waren denjenigen mit Leitungswasser gleich, wenn nicht größer. Es folgt daraus, daß etwaige unbekannte Bestandteile des Leitungswassers auf die N-Bindung von keinem Einflusse sind. Sollten sie dennoch irgendeine Wirkung ausgeübt haben, so war diese offenbar durch die Einwirkung der unvermeidlichen Verunreinigungen selbst der allerreinsten Be-

TABELLE XII.

	Nährlösung	Destilliertes Wasser + 0.05% CaCO ₃		Leitungswasser	
		N-Gewinn auf 100 cem in mg	N-Gewinn auf 1 g Glu- kose in mg	N-Gewinn auf 100 cem in mg	N-Gewinn auf 1 g Glu- kose in mg
1.	Ohne Zusatz	0.56 0.50	3.31 3.01	— —	— —
2.	+ 0.003% Fe ₂ (SO ₄) ₃ aq.	0.92 0.95	3.75 3.70	1.12 1.05	4.17 4.00
3.	+ 0.01% Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.70 1.85	4.00 4.30	— —	— —
4.	+ 0.003% Fe ₂ (SO ₄) ₃ aq. und 0.01% Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	26.18 26.50	14.12 14.28	24.78 25.20	14.20 14.00
5.	+ 0.2% Na-Humat	24.58 26.30	14.00 14.29	26.52 26.72	14.30 14.35

standteile der Nährlösung kompensiert worden. Ein Zusatz von bloßem Fe oder bloßem Mo zu den Kulturen mit destilliertem Wasser blieb eigentlich ohne Wirkung. Jedenfalls ist, im Vergleich mit der gleichzeitigen Einwirkung des Mo und Fe, die Wirkung des Fe oder Mo an und für sich als äußerst geringfügig anzusprechen.

III.

Die oben angeführten Versuche bestätigen fürs erste noch einmal die früheren Feststellungen, daß die Humus-Substanz die N-Bindung durch *Azotobacter* in hohem Maße fördert. Sie bekräftigen die Befunde Bortels, denen zufolge die Wirkung der Humusasche auf die N-Bindung der Einwirkung von Humaten gleichkommt. Sie beweisen sodann, daß die von Bortels festgestellte Steigerung der N-Bindung unter dem Einfluß von Molybdän nur dann erfolgen kann, wenn die Nährlösung eine genügende Menge von Eisen enthält. Es scheint, daß die Menge

des dazu notwendigen Eisens die Erfordernisse des *Azotobacter* an Eisen als Nährstoff übersteigt. Das Leitungswasser von Lwów enthält 0.15 mg FeO in einem Liter. 100 ccm Nährlösung auf Leitungswasser enthielten somit 0.012 mg Fe, eine Menge, die sich zur Aktivierung des den Kulturen zugesetzten Molybdäns als ungenügend erweist, obwohl sie als Nährstoff wohl ausreichen sollte. Zu seiner vollen Entwicklung benötigt der *Azotobacter* eines Zusatzes von 0.48 mg Fe als $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$ zu je 100 ccm Nährlösung, die mit Leitungswasser bereitet wurde und Mo enthält. Eine Nährlösung mit destilliertem Wasser würde zu gleichem Zwecke eine größere Menge des Fe erfordern. Kulturen mit Nährlösung, die Leitungswasser enthalten und denen kein Eisen hinzugesetzt wurde, wurden oben in den Versuchen 1, 4 und 9 angeführt. Es waren ihrer zwölf; die N-Zunahmen betragen bis 2.52 mg N. Nach Einführung von 0.002% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{aq.}$ wurde in den Kulturen keine Steigerung der N-Bindung festgestellt. In vierzehn Kulturen mit Zugabe von Eisen (angeführt in den Versuchen 2, 3, 4, 5, 7 u. 8) betragen die N-Gewinne höchstens 2.64 mg. Diese negativen Befunde stimmen aber nicht mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Remy und Rösing (17) überein, daß der günstige Einfluß der Humustoffe hauptsächlich auf deren Gehalt an Eisen zurückzuführen ist. Remy und Rösing haben in ihren Versuchen mit Beijerinckscher Nährlösung, der Fe zugesetzt wurde, fast die gleichen N-Gewinne festgestellt, wie in den Kulturen mit Humusstoffen.

Die Versuche, die in vorliegender Arbeit beschrieben wurden, beweisen aber, daß es zur vollen Entwicklung des *Azotobacter* sowohl des Eisens wie auch des Molybdäns bedarf und zwar beider in entsprechend großen Mengen. In dieser Hinsicht liegen hier offenbar ganz andere Erscheinungen vor, als diejenigen, mit denen Bojanovsky bei Untersuchung der die Zellulose zersetzenden Bakterien zu tun hatte (4).

In Versuchen mit *Azotobacter* lassen sich Eisen und Molybdän durch Natriumhumat oder Humusasche ersetzen. Dieser Befund berechtigt keineswegs zur Annahme, daß in Humaten Mo und Fe nebeneinander vorhanden sind. Es wird nur erwiesen, daß man durch Zusatz von Mo und Fe denselben optimalen Ablauf der N-Bindung wie mit natürlichen Humaten erzielen kann.

Im Lichte dieser Befunde wird erklärlich, warum die früheren Versuche mit Molybdänzusatz nicht dieselben Resultate ergaben. In diesen Versuchen wurde nämlich Mo fast ausnahmslos Nährlösungen zugesetzt, die mit destilliertem Wasser bereitet wurden. Bloß in der Arbeit von Schröder finden sich Versuche, die mit Leitungswasser angestellt wurden. Die Mengen von Eisen, welche je 100 ccm Nährlösungen zugesetzt wurden, betragen:

H. Bortels (5)	0·002 g FeSO ₄	= 0·74 mg Fe
K. Bassalik u. J. Neugebauer (1, 2)	0·0005 g FeCl ₃	= 0·17 mg Fe
L. Birch-Hirschfeld (3)	»Spuren« von FeCl ₃	= ?
A. J. Kluyver u. W. J. van Reenen (11)	0·002 g FeSO ₄	= 0·74 mg Fe
M. Schröder (21), Nährlösung I	0·001 g Fe ₂ (SO ₄) ₃	= 0·28 mg Fe
» » II	0·002 g FeSO ₄ · 7H ₂ O	= 0·4 mg Fe
» » III	0·005 g » »	= 1·01 mg Fe
A. Rippel (18)	»Spur« von FeSO ₄	= ?

Den Ergebnissen des Versuches 9 zufolge, beträgt nun die Menge von Eisen, deren es zur vollen Aktivierung des Molybdäns bedarf, 0·48 mg Fe auf 100 ccm einer 2⁰/₀ Glukose-Nährlösung mit Leitungswasser. Es ist demnach anzunehmen, daß manche Forscher ihren Kulturen zu wenig Eisen zugesetzt haben. Nur in den Nährlösungen von Bortels, Kluyver und van Reenen, sowie in der Nährlösung III von Schröder war Eisen in genügender Menge vorhanden. In den Nährlösungen, die K. Bassalik und J. Neugebauer benutzten, sowie in der Nährlösung I von Schröder war der Eisengehalt zu gering. Auch wenn Bortels und Kluyver das Eisen nicht in Form von FeSO₄, sondern als FeSO₄ · 7H₂O in die Nährlösung einführten, war seine Menge noch immer gleich 0·4 mg, somit gleich derjenigen aus dem Versuch II von Schröder und viel größer als der Gehalt an Eisen in der Nährlösung von K. Bassalik und J. Neugebauer. Nur die zu geringen Eisenmengen waren die Ursache, daß die letztgenannten Verfasser schwache Wirkung von Mo neben Fe festgestellt haben.

Die Nährlösungen von Birch-Hirschfeld haben, nach den Ergebnissen zu urteilen, eine genügende Menge an Eisen aufzuweisen gehabt. Die »Spuren« von Eisen waren somit, wie es scheint, recht beträchtlich. Anders in den Versuchen von A. Rippel (18), der eine Nährlösung mit destilliertem Wasser benutzte, welcher er auch eine »Spur« von FeSO₄ hinzufügte, und in

Gegenwart von Molybdän keine bessere Wirkung als bei kleinen Agarmengen feststellen zu können glaubt. Wir können annehmen, daß in diesen Versuchen der Eisengehalt der Nährlösung wirklich sehr gering war.

Im Einklang mit diesen Betrachtungen wurde in den Versuchen von Bortels, sowie von Kluyster und van Reenen eine sehr günstige Einwirkung des Molybdäns auf die Stickstoffbindung festgestellt, wogegen in den Versuchen von Bassalik, in denen nur sehr geringe Mengen von Eisen zur Anwendung kamen, das Molybdän die N-Bindung nur wenig beeinflussen konnte. Die N-Gewinne in den Kulturen mit Molybdän waren sogar kleiner als in den Versuchen mit sehr geringen Mengen von Humus oder Humusasche. Es war auch nicht anders zu erwarten, da je 100 ccm einer Nährlösung mit destilliertem Wasser 0.5 mg FeCl_3 zugesetzt bekamen. Es ist möglich, daß dabei das wasserfreie Eisenchlorid zur Anwendung kam, da der Eisengehalt in 0.5 mg FeCl_3 von den Verfassern als gleich 0.17 mg angegeben wird. Sollte es aber das gewöhnliche $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sein, dessen man sich bediente, so war der Gehalt an Eisen offenbar noch kleiner und betrug nicht mehr als 0.10 mg Fe.

M. Schröder (21) fügte 100 ccm einer Nährlösung mit Leitungswasser 1 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 = 0.28$ mg Fe hinzu. Nach 7 Tagen wurde eine N-Zunahme von 0.86 mg festgestellt, nach 24 Tagen eine Zunahme von 2.14 mg N (S. 199). In den Versuchen mit einer Nährlösung, die frei von Eisen war (Ashby, S. 200), betrug die N-Zunahme nach 14 Tagen nur 1.33 und 1.26 mg N. Da die Nährlösungen kein Molybdän enthielten, wurden sowohl in Kulturen, denen Eisen separat zugesetzt wurde wie auch in Kulturen, denen nur das im Leitungswasser enthaltene Eisen zu Verfügung stand, die gleichen Ergebnisse, und zwar nur eine geringe N-Zunahme verzeichnet. Die Versuche mit Mo sind unter Zuhilfenahme von Nährlösungen ausgeführt worden, die mehr Eisen enthielten. Der Eisengehalt betrug 2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.4$ mg Fe auf 100 ccm Kulturflüssigkeit (S. 201). In dieser Nährlösung war bei Mo-Zusatz sogar mit destilliertem Wasser die N-Bindung stärker, bei Anwendung von Leitungswasser sogar sehr groß. Nach 15 Tagen betrug die N-Zunahme in der Nährlösung mit destilliertem Wasser bei Zusatz von Mo 2.56 und 3.00 mg N pro 100 ccm, in der Nährlösung mit Leitungswasser 20.96 und

21.94 mg N (S. 200 u. 201). Es ist möglich, daß das Leitungswasser von Münster reich an Eisen ist, da ein Zusatz von 0.4 mg Fe eine stärkere Aktivierung des Mo bewirkte als destilliertes Wasser, dem dieselbe Dosis von Eisen hinzugefügt wurde. Um den Bestandteil des Leitungswassers ausfindig zu machen, der so günstige Ergebnisse bewirkte, stellte die Verfasserin noch einen weiteren Versuch an, bei dem eine Nährlösung zur Anwendung kam, die noch reicher an Eisen war und in 100 ccm 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 1.1$ mg Fe enthielt (S. 204). Dieser Versuch führte zu ganz anderen Ergebnissen. Nach 10 Tagen wurden sogar in den Kulturen mit destilliertem Wasser N-Gewinne verzeichnet, die 11 mg überschritten. Den weiteren Versuchen kann man folgende Zahlen entnehmen:

Nährlösung	N-Gewinn in mg	
	Destilliertes Wasser	Leitungswasser
Ohne Mo	0.12	0.12
	0.14	0.08
Mit Mo und W	17.62	17.52
	18.18	18.54

Diese Ergebnisse stimmen vollkommen mit Nr. 1 und 10 der oben beschriebenen Versuche überein.

Weitere Einzelheiten dieses Versuches sowie der folgenden von Schröder wollen wir nicht erörtern, um so mehr als die Verfasserin ihr Urteil über die Bedeutung des Cu und Zn auf die N-Bindung, angesichts der abweichenden Ergebnisse, weiteren Untersuchungen vorbehalten hat. J. E. Greaves (9) hat übrigens kurz darauf festgestellt, daß sowohl Cu wie Zn zur Entwicklung des *Azotobacter* nicht nötig sind.

Dessen ungeachtet wird die Nährlösung III von Schröder, die aus 10 Bestandteilen zusammengesetzt ist, weiter verwendet. Sie wurde z. B. von Roberg (19) benutzt, wobei viel bessere Ergebnisse erzielt wurden, als mit der Nährlösung von Ashby. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sie auf 100 ccm destillierten Wassers 0.1 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ neben 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ enthält.

Die anderen Bestandteile, wie Zn, Cu, Si und sogar W sind überflüssig.

Die voneinander oft abweichenden Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen über den Einfluß des Mo auf die N-Bindung durch *Azotobacter* finden somit, wie es scheint, volle Erklärung. Man könnte jedoch meinen, daß die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen so selbstverständlich sind, daß sie von vornherein zu erwarten wären. Sollen Molybdän und Eisen bloß als unentbehrliche Nährstoffe dienen, so müssen sie ja dem *Azotobacter* in der Nährlösung gleichzeitig zur Verfügung stehen, eine Tatsache, die mehrmals mit Nachdruck hervorgehoben wurde, in der Praxis aber, besonders wenn man mit Leitungswasser arbeitet, oft nicht genügend berücksichtigt wird. Das Wesentliche besteht aber nicht in der Tatsache, daß *Azotobacter* das Eisen als solches erfordert, sondern vielmehr in der Feststellung, daß zu seiner optimalen Entwicklung in Gegenwart von Molybdän verhältnismäßig recht große Mengen von Eisen nötig sind.

Welcher Art die Wirkung größerer Fe-Mengen auf die N-Bindung durch *Azotobacter* in molybdänhaltigen Nährlösungen ist, bildet den Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In der Einleitung wurde erwähnt, daß Bortels zufolge, zwischen dem Einwirken des Molybdäns auf die Stickstoffbindung durch *Azotobacter* und der Rolle des Molybdäns in dem chemotechnischen Verfahren bei der Synthese von NH_3 eine Analogie besteht. Im letztgenannten Prozesse wird jedoch die Wirksamkeit des Katalysators durch die Anwesenheit eines Aktivators sehr begünstigt, und zwar wird das Molybdän durch das Eisen aktiviert (8). Aus den Versuchen, die oben beschrieben wurden, folgt, daß sich auch in dem biologischen Prozesse der N-Bindung in Gegenwart von Mo das Eisen als notwendig erweist. Die Analogie, die zwischen der chemotechnischen Synthese des NH_3 und dem biologischen Prozesse der Stickstoffbindung besteht, wird dadurch wesentlich vertieft, um so mehr als Ammoniak als Zwischenprodukt der N-Assimilation durch *Azotobacter* angegeben wird. Es drängt sich die Vermutung auf, daß in der biologischen N-Bindung, ähnlich wie in der NH_3 -Synthese, den sog. Mischkontakten eine wichtige Rolle zuzuschreiben ist.

Zusammenfassung.

1. Der aus Gartenerde isolierte Stamm von *Azotobacter chroococcum* pflegte nur wenig Stickstoff zu assimilieren. Ein Zusatz des aus derselben Erde gewonnenen Humats oder auch bloß seiner Asche förderte die N-Bindung sehr stark.

2. Ein Zusatz von Natriummolybdat blieb ohne jeden Einfluß auf die N-Bindung, änderte auch nichts an den Versuchen mit Humat. Ähnlicherweise ließ sich auch nach Zugabe von Eisen bei gleichzeitigem Ausbleiben des Molybdän-Zusatzes keine merkliche Zunahme der N-Bindung feststellen, obwohl das zu den Versuchen verwendete Leitungswasser nur wenig Eisen enthielt.

3. Ein gleichzeitiger Zusatz von Eisen und Molybdän steigerte die N-Bindung so, wie dies Humat oder Humusasche zu bewirken pflegen. Die Menge des assimilierten Stickstoffs hängt von den Mengen der eingeführten Fe- und Mo-Verbindungen ab, ähnlich wie von der Menge der Humusstoffe.

4. Wurde zu der Nährlösung destilliertes Wasser verwendet, so wurden nach Mo- und Fe-Zusatz die gleichen Ergebnisse, wie bei Nährlösung mit Leitungswasser verzeichnet.

5. Die negativen Ergebnisse der Versuche mit Molybdän sind auf die zu geringen Mengen des gleichzeitig in die Nährlösung eingeführten Eisens zurückzuführen.

Aus dem Biologisch-Botanischen Institut der J. K. Universität Lwów, Polen.

Zusatz bei der Korrektur.

In seinen neuen Untersuchungen hat Bortels (Zbl. f. Bakt. II. **95**, 193, 1936) der Nährlösung auf je 100 ccm dest. Wassers statt 2 mg nur »circa« 0.1 mg FeSO zugesetzt und wider Erwarten mit Mo gute Ergebnisse erhalten.

In Rücksicht auf diese Befunde wurden, um die Wirkung verschiedener Fe-Mengen in Nährlösungen mit dest. Wasser zu vergleichen, schon während des Druckes dieser Arbeit noch je 11 Kulturen von *Azotobacter* mit 0.1 mg und 3.0 mg Ferro- bzw. Ferrisulfat auf 100 ccm Lösung neben 1 mg oder 10 mg Na_2MoO_4 angesetzt.

Nach 5 Tagen betragen die N-Gewinne: in Kolben mit 0.1 mg Fe — 8.82 ± 0.4 mg und in Kolben mit 3.0 mg Fe — 24.07 ± 0.8 mg. Es wurde somit nochmals erwiesen, daß in unseren Versuchen 0.1 mg FeSO nicht ausreichend ist, um das Mo vollständig zu aktivieren.

Literatur.

1. K. Bassalik u. J. Neugebauer, Acta Soc. Bot. Pol. **8**, 230, 1931. — 2. K. Bassalik u. J. Neugebauer, Acta Soc. Bot. Pol. **10**, 490, 1933. — 3. L. Birch-Hirschfeld, Arch. f. Mikrobiol. **3**, 341, 1932. — 4. R. Bojanovsky, Zentralbl. f. Bakt. II. **88**, 1, 1933. — 5. H. Bortels, Angew. Bot. **11**, 285, 1929. — Arch. f. Mikrobiol. **1**, 333, 1930. — 6. H. Bortels, Zentralbl. f. Bakt. II. **87**, 476, 1933. — 7. D. Burk, H. Lineweaver u. K. Horner, Soil Sc. **33**, 413, 1932. — 8. W. Frankenburger, Ztschr. Elektrochem. **39**, 45, 97, 269, 1933. — 9. J. E. Greaves, Soil. Sc. **36**, 267, 1933. — 10. K. Iwasaki, Biochem. Ztschr. **226**, 32, 1930. — 11. A. J. Kluyver, W. J. van Reenen, Arch. f. Mikrobiol. **4**, 280, 1933. — 12. K. Konishi u. T. Tsuge, Zentralbl. f. Bakt. II. **93**, 302, 1936 (Ref.). — 13. H. Krzemieniewska, Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie, 1910, 395 u. 402. — 14. S. Krzemieniewski, Bull. de l'Acad. d. Sc. Cracovie, 1908, 929. — 15. H. Ter Meulen, Rec. d. trav. Chim. d. Pays-Bas. **50**, 491, 1931; **52**, 349, 1932. — 16. C. B. van Niel, Arch. f. Mikrobiol. **6**, 215, 1935. — 17. Remy Th. u. Rösing G., Zentralbl. f. Bakt. II. **30**, 350, 1911. — 18. Rippel A., Arch. f. Mikrobiol. **7**, 212, 1936. — 19. M. Roberg, Jahrb. f. wiss. Bot. **82**, 65, 1935. — 20. Rösing G., Zentralbl. f. Bakt. II. **33**, 621, 1912. — 21. M. Schröder, Zentralbl. f. Bakt. II. **85**, 191, 1932.

Table des matières par noms d'auteurs

contenues dans le Bulletin International de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres
(Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles. Série B: Sciences Naturelles (I)).

Année 1936.

Le nombre inscrit à la suite de chaque Mémoire indique la page.

- Dyakowska (J).** Researches on the rapidity of the falling down of pollen of some trees (Planche 11) 155.
- Gatty-Kostyal (M)** et **Tesarz (J).** L'acide nucléique de l'ergot de seigle (II^e partie) 1.
- Hryniewiecki (B)** et **Kurtz (W).** La répartition des cônes siliceux dans les cellules des Cypéracées et leur corrélation (Planches 1—2) 33.
- Kovats (J) v. Krzemieniewski (S).**
- Kurtz (W) v. Hryniewiecki (B).**
- Krzemieniewski (S)** und **Kovats (J).** Über den Einfluß von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum* Beij. 169.
- Lityński (Th).** Recherches sur le dosage du phosphore nucléique dans les graines de féverole (*Vicia faba minor*) 103.
- Meremiński (H).** Über Embryosackentwicklung bei *Begonia incana* Lindl. (Ein Beitrag zur Embryologie der Gattung *Begonia*) (Planches 3—7) 53.
- Rouppert (K).** Zur Blattmorphologie von *Philodendron squamiferum* (Planche 10) 131.
- Tesarz (J) v. Gatty-Kostyal (M).**
- Vorbrodt (W).** Essai d'employer de l'eau oxygénée concentrée pour doser les composants minéraux des substances végétales et animales 139.
- Zabłocka (W).** Untersuchungen über die Mykorrhiza bei der Gattung *Viola* (Planches 8—9) 93.
-

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES
ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES

SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

DERNIERS MÉMOIRES PARUS.

N° 3—7 B I, 1936.

- Lityński Th.** Recherches sur le dosage du phosphore nucléique dans les graines de féverole (*Vicia faba minor*).
- Meremiński H.** Über Embryosackentwicklung bei *Begonia incana* Lindl. (Ein Beitrag zur Embryologie der Gattung *Begonia*) (Planches 3—7).
- Rouppert K.** Zur Blattmorphologie von *Philodendron squamiferum* (Planche 10).
- Vorbrott W.** Essai d'employer de l'eau oxygénée concentrée pour doser les composants minéraux des substances végétales et animales.
- Zablocka W.** Untersuchungen über die Mykorrhiza bei der Gattung *Viola* (Planches 8—9).

N° 5—7 B II, 1936.

- Garbowski T.** Von der Wiederholbarkeit einmaliger instinktiver Handlungen. (Auf Grund von Versuchen mit der Verpuppung der Gabelschwänze) (Planche 16).
- Markowski St.** Über die Trematodenfauna der baltischen Mollusken aus der Umgebung der Halbinsel Hel (Planches 13—15).
- Mikulski J. S.** The Influence of Alternating Temperatures upon the Development of the Amphibians, *Bufo americanus* Le Conte and *Ambystoma tigrinum* Green.
- The Effect of Constant and Alternating Temperatures on the Survival of some Developmental Stages of *Tribolium confusum* Duv. (Col.).
 - On the Changes of Developmental Velocity of some Developmental Stages of *Tribolium confusum* Duv. (Col.) when Influenced by Constant and Alternating Temperatures.
- Opoczyńska-Sembratowa Z.** Recherches sur l'anatomie et l'innervation du coeur de *Carausius morosus* Brunner (Planches 19—20).
- Rogoziński F. et Głowczyński Zb.** Sur la manière dont quelques colorants liposolubles se comportent dans l'organisme animal (Planche 17).
- Skarżyński B.** Untersuchungen über den Sterinstoffwechsel während der Entwicklung des Hühnereies.
- Szarski H.** Studies on the Anatomy and Physiology of the Alimentary Canal of Worms belonging to the *Naididae* Family (Planches 18).
- Zaéwilichowski J.** Über die Innervation und die Sinnesorgane der Flügel der Aferfrühlingsfliege *Isopteryx tripunctata* Scop. (Plecoptera) (Planche 12).

TABLE DES MATIÈRES.

Octobre—Décembre 1936.

	Page
J. DYAKOWSKA. Researches on the rapidity of the falling down of pollen of some trees (Planche 11)	155
S. KRZEMIENIEWSKI und J. KOVATS. Über den Einfluß von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung durch <i>Azotobacter chroococcum</i> Beij.	169

Le »*Bulletin International*» de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles) paraît en deux séries. La première (A) est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série (B) se divise en deux sous-séries; l'une d'elles »I« contient les mémoires qui se rapportent aux diverses branches de la Botanique (la Systématique, l'Anatomie et la Physiologie des Plantes), l'autre »II« est réservée aux publications qui concernent le vaste domaine des recherches morphologiques et physiologiques sur l'homme et les animaux (Anatomie, Biologie générale, Embryologie, Histologie, Physiologie, Psychologie, Zoologie systématique et expérimentale).

Depuis 1928, le »*Bulletin International*» ne contient que les communications dont l'étendue ne dépasse pas une limite strictement définie; les mémoires de plus vaste envergure sont réunis en un Recueil différent, les »*Mémoires*» de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles). Les *Mémoires* sont également publiés en deux séries: A et B. Chaque mémoire publié dans les *Mémoires* se vend séparément.

Les abonnements relatifs au »*Bulletin International*» sont annuels et partent de Janvier. Les livraisons de ce Recueil se vendent aussi séparément.

Adresser les demandes à l'Académie ou à la Librairie »Gebethner et Wolff« Rynek Gł., Cracovie (Pologne).
