

(Aus dem Laboratorium für Bakteriologie an der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.)

## Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung.

Von

H. Bortels.

(Eingegangen am 5. April 1930.)

Das frei im Boden lebende Bakterium *Azotobacter chroococcum* hat seit seiner Entdeckung die Aufmerksamkeit vieler Biologen und Chemiker auf sich gelenkt durch die Fähigkeit, den elementaren Stickstoff der Luft zum Aufbau seines Zelleiweißes zu benutzen. Diese praktisch so wichtige Stickstoffautotrophie führte dazu, daß man die Ernährungsphysiologie des *Azotobacter* eingehend untersuchte und vor allem darauf bedacht war, die Bedingungen ausfindig zu machen, welche die Fixierung der größtmöglichen Menge Luftstickstoff gewährleisten. Schon durch *Krzemieniewska* (10) wurde festgestellt, daß *Azotobacter chroococcum* nicht ohne Kalium, Calcium, Phosphor, Magnesium und Schwefel leben kann. Sehr wahrscheinlich ist auch das Eisen hierher zu rechnen. Neben einer geeigneten Kohlenstoffquelle scheinen von diesen Aschenelementen Phosphor und Calcium besonders wichtig zu sein. Später fand man, daß die „Kalkbedürftigkeit“ nicht nur durch eine Calciumbedürftigkeit, sondern auch durch eine große Reaktionsempfindlichkeit bedingt war, worüber dann sehr viel geschrieben worden ist, ohne daß diese Frage heute etwa geklärt wäre.

Mit den bisher gesammelten Erfahrungen über die Ernährung des *Azotobacter* vermochte man diesen wohl in stickstoffhaltigen, nicht aber in stickstofffreien synthetischen Nährlösungen zu kultivieren. Vielmehr mußte man letzteren, um ein wirklich nennbares Wachstum zu erzielen, Erdextrakt zusetzen (3), (11), (12), (13), dessen chemische Zusammensetzung unbekannt und außerdem inkonstant ist. Die wichtigste Frage war also noch unbeantwortet geblieben, die Frage nämlich: Welche chemische Substanz befähigt *Azotobacter* zur Assimilation des Luftstickstoffs? Oder, was wahrscheinlich gleichbedeutend sein dürfte: Welches ist der wirksame Bestandteil des Erdextraktes?

Es war klar, daß mit Beantwortung dieser Fragen zugleich die Möglichkeit bestand, manches andere Dunkel auf wissenschaftlichem sowohl als auch auf praktischem Gebiet zu erhellen. Denn nicht die Extrakte jeder Erde waren wirksam, sondern nur diejenigen von fruchtbaren Böden, die

dann auch immer viel *Azotobacter* enthalten und meist humusreich sind. Besonders merkwürdig ist es, daß *Azotobacter* auch in solchen Böden gänzlich fehlen kann, die reichlich Phosphorsäure und Kalk und die anderen für das Pflanzenwachstum als notwendig erkannten Elemente enthalten (18). Diese vielfach als eine Art Bodenmüdigkeit bezeichnete Erscheinung hat man sich bis heute nicht erklären können, weil man es außer Acht ließ, daß für gewisse Pflanzen vielleicht auch noch andere Elemente von Bedeutung sein könnten, die nicht jeder Boden in genügenden Mengen enthält.

Auch kann nicht aus allen humosen Böden ein wirksamer Erdextrakt gewonnen werden. Die Wirksamkeit ist nämlich nicht an den Humus, also an den organischen Bestandteil des Bodens, sondern an die Asche gebunden. Davon kann man sich leicht überzeugen, wenn man einen guten *azotobacter*-fähigen Boden mit Wasser extrahiert, den gesamten wässrigen Auszug in zwei gleiche Teile zerlegt und davon den einen Teil eindampft, verascht und mit destilliertem Wasser wieder auf das ursprüngliche Volumen auffüllt. Dann übt der veraschte Teil dieselbe stark fördernde Wirkung auf das *Azotobacter*-wachstum aus wie der nicht veraschte. Mit diesem schon bei früherer Gelegenheit (1) mitgeteilten Versuchsergebnis war bereits viel gewonnen. Es konnte sich jetzt nur noch darum handeln, den wirksamen Bestandteil der Asche oder eine anorganische Substanz, die der Asche an Wirksamkeit gleichkam, ausfindig zu machen.

Verschiedentlich wurde schon nach diesem unbekanntem Stoff gefahndet (2). *Stoklasa* (19), *Kayser* (5) und *Kayser-Delaval* (6), (7) glaubten ihn in radioaktiven Substanzen, besonders im Uran, gefunden zu haben. Radioaktives Mineral hatte sich bei ihren Versuchen als außerordentlich günstig für das *Azotobacter*-wachstum erwiesen, womit aber noch nicht gesagt ist, daß die Wirkung durch die Radioaktivität oder das Uran verursacht war.

Im Verlauf früherer Untersuchungen (1) stellte ich fest, daß nur solche Extrakte ein kräftiges *Azotobacter*-wachstum veranlaßten, die bei alkalischer bis neutraler Reaktion hergestellt waren. Selbstverständlich waren alle diese Lösungen vor Gebrauch, wenn nötig, wieder neutralisiert worden. Die Herstellung einer wirksamen Erdextrakt-Aschenlösung wurde darum immer in folgender Weise vorgenommen:

1 kg fruchtbarer Ackererde wurde mit 1 Liter destillierten Wassers und einem Zusatz von Soda bis zur schwach alkalischen Reaktion  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 2 Atm. im Autoklaven extrahiert. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit abgossen, eingedampft und verascht. Die Asche wurde in destilliertem Wasser aufgenommen, filtriert und das Filtrat, wenn nötig, mit Salz- oder Schwefelsäure neutralisiert.

Wegen der Wichtigkeit der Reaktion bei Herstellung der Extrakte vermutete ich zunächst, daß der gesuchte Stoff in Alkali löslich und in Säure unlöslich wäre und baute auf dieser Vermutung meine Untersuchungsmethodik auf. Nach einigen Tastversuchen schien mir im Wolfram das als notwendiger Katalysator in Frage kommende Element vorzuliegen. Mehrere Versuche ergaben jedenfalls eine schwache, aber

immerhin erkennbare Wachstumssteigerung in Lösungen, die einen Zusatz von Natriumwolframat erhalten hatten.

Wenn nichts anderes angegeben, wurde immer diese Stammnährlösung verwendet:

Destilliertes Wasser . . . . .	100,0
Mannit . . . . .	2,0
$K_2HPO_4$ . . . . .	0,1
$MgSO_4$ . . . . .	0,05
$CaCO_3$ . . . . .	0,5
$FeSO_4$ . . . . .	0,002

Kultiviert wurde immer bei 25 bis 30° C in 20 ccm Nährlösung in 150-ccm-Erlenmeyerkolben aus Jenaer 20-Glas. Der Höhepunkt der Entwicklung war immer nach 4 Tagen erreicht. Die zur Beimpfung der zunächst nicht sterilisierten Nährlösungen verwendeten Reinkulturen von *Azotobacter chroococcum* wurden auf Möhrenagar-Schrägröhren gehalten.

Verdächtig war es, daß die Wirkung des Wolframats, ganz gleich, in welchen Konzentrationen, längst nicht derjenigen einer Erdextrakt-Aschenlösung an Stärke gleichkam. Zumindest also konnte das Wolfram nicht allein der wirksame Bestandteil solcher Aschenlösungen sein. In den hiernach folgenden Versuchen wurden darum den Nährlösungen zum Teil außer Natriumwolframat auch noch verschiedene andere Salze, die bezüglich ihrer Löslichkeit in Alkali in Frage kommen konnten, in verschiedenen, natürlich immer minimalen, Konzentrationen zugesetzt. Die Wirkung des Wolframs wurde dadurch aber in keinem Falle erhöht. Etwas besser war das Wachstum, wenn die Nährlösung mit Leitungswasser anstatt mit destilliertem Wasser zubereitet war. Auf einen kleinen Bruchteil seines ursprünglichen Volumens eingedampftes Leitungswasser, einer synthetischen Nährlösung zugesetzt, wirkte aber nur hemmend.

Es mußte also ein anderer Weg beschritten werden, und eine Überlegung der folgenden Art führte denn auch zum Ziel, d. h. zur Beantwortung der Frage, welches chemische Element *Azotobacter* zur Stickstoffautotrophie befähigt:

Wolfram steht mit Uran und Molybdän in der sechsten Gruppe des periodischen Systems. Diese Gruppe gewinnt eine besondere Bedeutung, wenn man in die Betrachtungen über die biologische Stickstoffbindung auch die chemisch-technische nach dem Verfahren von *Haber-Bosch* einbezieht. Bei diesem Verfahren dienen als Katalysatoren: Cer, Cer—Lanthan, Cer—Eisen, Eisen, Cer—Mangan, Mangan, Molybdän, Wolfram, Uran, Ruthenium und Osmium. Schließlich haben sich aber Eisen und Molybdän am besten bewährt (14). Von den genannten Katalysatoren waren von mir untersucht und als für *Azotobacter* un-

brauchbar gefunden Mangan und Osmium. Wolfram dagegen hatte eine schwach stimulierende Wirkung gezeigt, und Uran wurde von anderen Autoren als der natürliche Katalysator für die biologische Stickstoffbindung angesehen. Das alles war Grund genug, diese drei Elemente der sechsten Gruppe des periodischen Systems, Molybdän, Wolfram und Uran, etwas näher ins Auge zu fassen.

*Azotobacter chroococcum* wurden in der synthetischen Nährlösung Molybdän, Wolfram und Uran gleichzeitig geboten, und zwar Molybdän als Natriummolybdat 0,0001 %, Wolfram als Natriumwolframat 0,0005 % und Uran als Uranylнитrat 0,0001 %. Als Kontrollen dienten Lösungen ohne Zusatz und solche mit einer sehr wirksamen Erdextrakt-Aschenlösung. Der Erfolg dieses Experiments war überraschend gut. Das Wachstum von *Azotobacter chroococcum* in der Nährlösung mit Molybdän, Wolfram und Uran war mindestens ebenso kräftig wie dasjenige in der Erdaschen-Nährlösung.

Jetzt blieb noch zu untersuchen, welchem der drei gebotenen Elemente die starke biokatalytische Wirkung zu verdanken war. Zu dem Zwecke wurde die Nährlösung teils mit 0,0001 % Natriummolybdat, teils mit 0,0005 % Natriumwolframat und teils mit 0,0001 % Uranylнитrat versetzt. Um auch gleichzeitig zu entscheiden, ob die Wirkung etwa auf dem Nitratgehalt des Uranylнитrats beruht hatte, was wegen der minimalen Mengen von vornherein als unwahrscheinlich anzusehen war, erhielt ein weiterer Teil der Nährlösung eine entsprechende Konzentration Natriumnitrat (0,000 03 %). Das Ergebnis dieses Versuches ließ an Eindeutigkeit nichts zu wünschen übrig. Kräftiges Wachstum wiesen nur die Lösungen mit Molybdän oder mit Erdextrakt-Aschenlösung auf, und zwar in gleicher Weise. Die geringe Menge Natriumnitrat war ganz ohne Wirkung geblieben. Die anfangs gehegte Vermutung, daß Uran der wirksame Faktor gewesen sei, mußte auch fallen gelassen werden, da es ohne jeglichen Einfluß geblieben war. Eine schwache Wirkung hatte, wie auch bei früheren Versuchen, Wolfram gehabt. Jedoch wurde mit Wolfram und Molybdän gemeinsam kein stärkerer Effekt erzielt als mit Molybdän allein. Immerhin mußte dies Ergebnis noch mit anderen Molybdän-, Wolfram- und Uranverbindungen sowie mit anderen *Azotobacter*-stämmen nachgeprüft werden.

Die folgende Tabelle gibt von der Wirkung des Molybdäns auf *Azotobacter chroococcum* ein vorläufiges Bild. Neben der Rohkultur wurde diesmal auch die Wirkung des Molybdäns in Reinkultur geprüft. Jeweils 40 ccm Nährlösung mit dem darin gewachsenen *Azotobacter* wurden zentrifugiert. Die klare Lösung wurde vom Bodensatz abgegossen und dieser mit wenig Wasser aufgeschwemmt und in enge gleichlumige Röhrchen umgefüllt. Nach 24 Stunden wurde das Volumen

des *Azotobactersediments* gemessen und bei der Reinkultur in der Kontrollnährlösung ohne Zusatz gleich 1 gesetzt.

	Nährlösung	Relative <i>Azotobaktermenge</i>
Reinkultur . . .	1. ohne Zusatz	1,0
	2. mit Erdextraktasche	2,0
	3. mit 0,0005 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4$	3,0
Rohkultur . . .	1. ohne Zusatz	1,8 (1,0)
	2. mit Erdextraktasche	3,8 (2,2)
	3. mit 0,0005 % $\text{Na}_2\text{MoO}_4$	6,8 (3,9)

Die eingeklammerten Zahlen bedenten die relativen Werte, bezogen auf Rohkultur ohne Zusatz gleich 1.

Bei dem diesen Zahlen zugrunde gelegten Versuch hatte die Erdextrakt-Aschenlösung im Gegensatz zu früheren Versuchen schon sehr viel an Wirksamkeit eingebüßt. Im Laufe der Zeit hatte sich aus der anfangs wasserklaren und hochwirksamen Lösung ein weißer kristallinischer Niederschlag abgeschieden, was möglicherweise mit der Wirksamkeitsverminderung im Zusammenhang steht. Die hier verwendete Menge Aschenlösung entspricht 1 g Asche einer fruchtbaren Schwarzerde in 100 ccm Nährlösung. Mit dieser Konzentration erzielte ich bei den zahlreichen früheren Versuchen ungefähr dieselben *Azotobacter*-ernten wie mit 0,0005 % Natriummolybdat. Eine stärkere Wirkung als mit Molybdän habe ich aber selbst mit noch größeren Mengen Erdasche niemals erreicht.

Untersuchungen darüber, welche Molybdänmenge zur Erzielung des intensivsten Wachstums von *Azotobacter* unerlässlich ist, ergaben, daß diese Konzentration schon bei etwa 0,00005 bis 0,0001 % Natriummolybdat erreicht ist. Das entspräche einer Molybdänkonzentration von ungefähr 0,3 mg im Liter. Bei 0,00001 % Natriummolybdat ist das Wachstum schon bedeutend schwächer, obwohl auch hier noch eine fördernde Wirkung gegenüber der Kontrolle wahrzunehmen ist. Die Grenzkonzentration, bei der Giftwirkung auftritt, wurde noch nicht ermittelt, jedoch scheint die nicht giftige Zone sehr groß zu sein.

Molybdän ist also imstande, dieselbe Wirkung auf *Azotobacter* auszuüben wie Erdextraktasche. Ob diese ihre Wirkung auch ihrem etwaigen Molybdängehalt verdankt, das muß allerdings vorläufig dahingestellt bleiben. Es ist wohl aus verschiedenen Gründen sehr wahrscheinlich, aber noch nicht bewiesen.

Die bisher erwähnten Versuche wurden fast sämtlich mit Reinkulturen oder ausnahmsweise auch mit frisch gewonnenen Rohkulturen von *Azotobacter chroococcum* in nicht sterilisierter Nährlösung ausgeführt. Als Reinkultur in sterilisierte Nährlösung eingimpft, verhält sich

*Azotobacter chroococcum* durchaus analog. Nur ist hier das Wachstum, wie auch aus obiger Tabelle hervorgeht, im ganzen schlechter. Das ist eine Erscheinung, die schon von vielen anderen Autoren (11), (12) bemerkt wurde, bis jetzt aber noch keineswegs geklärt ist (19). Es kann sein, daß durch die Begleitbakterien die Kahmhaut tragfähiger wird, wodurch *Azotobacter* mit der Luft inniger in Berührung kommt, oder auch, daß durch die Begleitbakterien hemmende Stoffwechselprodukte des *Azotobacter* beseitigt oder für *Azotobacter* wachstumsfördernde Stoffe gebildet werden. Wie weit *Azotobacter chroococcum* in absoluter Reinkultur in synthetischer Nährlösung imstande ist, den Luftstickstoff zu binden, das müssen quantitative Untersuchungen zeigen, die bisher noch nicht ausgeführt werden konnten. Jedenfalls scheint es, als ob die Anwesenheit von Begleitbakterien für die Stickstoffbindung des *Azotobacter* von großer Bedeutung ist.

Mit der Feststellung der Molybdänwirkung ist wieder ein Element, dem von seiten der Biologen bisher wenig Beachtung geschenkt wurde, als Biokatalysator gekennzeichnet. Bemerkenswert ist, daß *Azotobacter chroococcum* nur in stickstofffreier Nährlösung das Molybdän benötigt, und daß sich auch das *Haber-Bosch*-Verfahren des Molybdäns als Katalysator bedient. Die Industrie scheint also im großen und ganzen nach demselben Verfahren zur Bindung des Luftstickstoffs zu arbeiten, das *Azotobacter chroococcum* in der Natur vielleicht schon immer angewendet hat. Wenn wirklich beide, die Natur wie die Technik, denselben Katalysator benutzen, so könnte man daraus eine Stütze für die Annahme ableiten, daß die Stickstoffbindung auch bei *Azotobacter chroococcum* über Ammoniak als Zwischenstufe verläuft (9).

Zur Beantwortung der Frage, ob außer Molybdän noch andere Elemente des Erdbodens für *Azotobacter* von Bedeutung sind, wurde fruchtbare Ackererde sowohl alkalisch, mit verdünnter Natronlauge, als auch sauer, mit verdünnter Salzsäure, extrahiert und in gleicher Weise in Aschenlösungen übergeführt, die dann neutralisiert wurden. Es zeigte sich, daß in allen Fällen, in denen der sauer gewonnene Erdauszug allein oder in Mischung mit dem alkalisch gewonnenen den Nährlösungen zugesetzt war, das *Azotobacter*wachstum stark gehemmt bzw. ganz unterbunden war, während die alkalisch gewonnene Aschenlösung wieder so stark fördernd gewirkt hatte wie Molybdän. Daraus folgt, daß nicht, wie früher von mir irrümlicherweise angenommen wurde, die wirksame Substanz in Säure unlöslich ist, sondern daß bei der sauren Extraktion Stoffe in Lösung gehen, die durch ihre Giftwirkung den fördernden Einfluß des Teiles, der auch in Alkali löslich ist, wieder illusorisch machen. Man dürfte wohl nicht fehlgehen in der Annahme, daß es sich bei den giftig wirkenden Stoffen des sauer gewonnenen Erdauszuges wahrscheinlich um bestimmte Schwermetalle handelt, und daß die

Säureempfindlichkeit des *Azotobacter chroococcum* in der Empfindlichkeit gegen solche Schwermetalle wenigstens zum Teil ihre Erklärung findet, von extremen Säurekonzentrationen natürlich abgesehen. Nach experimentellem Abschluß meiner Arbeit veröffentlichte *Schober* (16) seine Untersuchungen über Stickstoffbindung durch *Aspergillus niger*. Es ist im Hinblick auf die Säureempfindlichkeit von *Azotobacter* bezeichnend, daß die Stickstofffixierung durch *Aspergillus*, der in stickstoffhaltigen Nährlösungen wegen seines verhältnismäßig hohen Zinkbedarfs saure Reaktion bevorzugt, gerade durch Zinksalze und ebenfalls durch saure Reaktion stark gehemmt wird. Vielleicht hat man es hier mit einer wichtigen biologischen Gesetzmäßigkeit zu tun.

Während bei Kulturen von *Azotobacter chroococcum* in synthetischer sowie in Leitungswasser-Nährlösung ohne Molybdän auch nach mehr als 4 Tagen nur ein geringes Wachstum zu verzeichnen war, wuchs *Azotobacter agile* in solchen Nährlösungen meistens besser. Ungeachtet dessen erfuhr seine Entwicklung durch Molybdän ebenfalls einen kräftigen Antrieb. Als besonders charakteristisch gilt für den von mir benutzten Stamm von *Azotobacter agile* die Bildung eines gelbgrün fluoreszierenden Farbstoffs in Nährlösungen mit Leitungswasser. Dieser grüne Farbstoff wurde in synthetischen Lösungen mit destilliertem Wasser nicht gebildet, es sei denn, daß diese Stickstoff etwa als Asparagin enthielten. Statt dessen färbte sich die Lösung rot. Seltener trat diese Rotfärbung auch in Leitungswasser-Nährlösungen auf. Kulturen in synthetischer Nährlösung zeigten je nach ihrem Molybdängehalt verschiedene Färbung, und zwar wechselte sie etwa in folgender Weise:

$\% \text{ Na}_2\text{MoO}_4$	Farbe der Nährlösung
—	Farblos bis schwach rötlichbraun
0,000 005	Schwach rot
0,000 025	Stärker rot
0,000 05	Kräftig rot
0,000 25	Rot mit bräunlichem Stich
0,000 5	Braun
0,002 5	Gelbbraun mit schwacher grüner Fluoreszenz

Die gelbbraune Färbung bei 0,0025 %  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  wurde sowohl in synthetischer als auch in Leitungswasser-Nährlösung erreicht. Bei niederen Molybdänkonzentrationen hingegen wurde letztere Nährlösung im Unterschied zur synthetischen meist grün. Sehr kräftig grün fluoreszierend wurden auch synthetische Nährlösungen, denen einige Tropfen einer sauer gewonnenen Erdaschenlösung zugesetzt waren, wodurch aber das Wachstum im Gegensatz zu demjenigen des *Azotobacter chroococcum* kaum beeinträchtigt wurde. Das entspricht einer geringeren Empfindlichkeit des *Azotobacter agile* gegen „Bodensäure“. Alkalisch gewonnener

Erdauszug bewirkte Rotfärbung entsprechend einer Konzentration von etwa 2,5 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  in 1 Liter Erdextrakt-Aschenlösung. Man kann sich nämlich durch Kultur von *Azotobacter agile* in synthetischen Lösungen mit steigenden Molybdänmengen eine Farbskala herstellen, mit Hilfe deren man die Molybdänkonzentration einer Lösung, wenn sie weniger als etwa 5 mg und mehr als etwa  $\frac{1}{1000}$  mg Mo im Liter enthält, ungefähr bestimmen kann.

Von anderen stickstoffbindenden Mikroorganismen wurden hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Molybdän, Wolfram und Uran bei der Stickstoffbindung noch untersucht *Azotobacter Beijerinckii*, *Bacillus asterosporus* und *Bacillus radicicola* von *Pisum sativum*. Die Bakterien wurden in Reinkultur geprüft, wobei sich herausstellte, daß bei allen wahrscheinlich noch andere lebenswichtige Faktoren eine Rolle spielen, die unbekannt sind, weshalb ein optimales Wachstum in Reinkultur und stickstofffreier synthetischer Nährlösung auch bei Gegenwart von Molybdän, Wolfram oder Uran nicht stattfindet. Zur Auffindung dieser Faktoren sind noch umfangreiche Versuche notwendig. Dabei muß auch die Möglichkeit offen gelassen werden, daß in noch stärkerem Maße als bei *Azotobacter chroococcum* die Reinkultur als solche im Gegensatz zur Rohkultur oder Symbiose mit höheren Pflanzen für ein stickstoffautotrophes Wachstum der genannten Bakterien ungeeignet ist.

#### Schlußbetrachtung.

Einleitend wurde erwähnt, daß die Fruchtbarkeit eines Bodens in den von mir untersuchten Fällen ungefähr proportional ist der wachstumsfördernden Wirkung, die seine Asche auf *Azotobacter chroococcum* in stickstofffreier Nährlösung auszuüben imstande ist. Ähnliches fand *Winogradsky* (21). Ein von mir benutzter Tschernosemboden aus dem Oderbruch war sehr reich an *Azotobacter* und förderte dessen Wachstum am stärksten von allen untersuchten Böden. Tschernosem bringt in gewissen Gegenden seit vielen Jahren normale Ernten hervor, selbst von so stark stickstoffzehrenden Kulturpflanzen wie Rüben und Tabak, ohne daß der Boden mit Stickstoff oder überhaupt gedüngt würde (8). Diese Schwarzerden liegen in solchen klimatischen Zonen, in denen die Auswaschung gering ist. Jedoch kann das Klima nicht allein ausschlaggebend für ihre Fruchtbarkeit sein. Vielmehr müssen auch die jeweiligen geologischen Verhältnisse zur Erklärung mit herangezogen werden. Die Geologie hinwiederum kann Hinweise auf die chemische Zusammensetzung des Bodens geben, die, wie mir nach dem Ergebnis dieser Arbeit scheint, bei der Anreicherung der fruchtbaren Schwarzerden mit Luftstickstoff von hervorragender Bedeutung ist. Denn da nachgewiesenermaßen einige Tschernosemböden ganz außergewöhnlich viel *Azotobacter* enthalten, die Aschen ihrer alkalisch gewonnenen Extrakte in stickstofffreien Nährlösungen ein sehr kräftiges Wachstum von *Azotobacter*-Rohkulturen hervorrufen, und geringe Mengen eines löslichen Molybdän-salzes in gleicher Weise wirken, kann wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die fruchtbaren Böden verhältnismäßig reich

an Molybdän sind und hierauf zu einem guten Teil ihre Fruchtbarkeit zurückzuführen ist. Allerdings müssen zum vollen Beweis dieser Annahme erst noch Molybdänanalysen der verschieden wirksamen Böden ausgeführt werden.

Dann dürften auch wohl das Fehlen von *Azotobacter* in gewissen Böden und das Versagen von Bodenimpfungen mit *Azotobacter* ihre Erklärung finden. Es hat ja, von wenigen Ausnahmen abgesehen, keinen Zweck, einen im Ackerboden sich abspielenden mikrobiologischen Prozeß durch Impfung mit den betreffenden Mikroorganismen fördern zu wollen, sondern die Lebensbedingungen der jeweiligen in den meisten Fällen bereits vorhandenen Mikroben müssen so günstig wie irgend möglich gestaltet werden. Sind diese Lebensbedingungen unzureichend, dann nutzt auch keine Impfung. Ferner werden vielleicht die Methoden der mikrobiologischen Bodenanalyse zur Bestimmung des Kalks und der Phosphorsäure und jetzt vielleicht auch des Molybdäns von neuem Bedeutung erlangen.

Auf weitere zahlreiche Fragen, die bei Betrachtung der Molybdänwirkung auftauchen, will ich hier nicht eingehen (4), (13), (15). Zunächst müssen die bis jetzt gewonnenen Erkenntnisse auf das gesamte Problem der biologischen Stickstofffixierung unter Einbeziehung aller stickstoffbindenden Mikroben ausgedehnt und so auf eine festere und breitere Grundlage gestellt werden.

Zum Schluß möchte ich nicht verfehlen, Herrn Regierungsrat Dr. *Stapp* für die liebenswürdige Unterstützung, die er mir bei der Ausführung der Arbeit stets zuteil werden ließ, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

#### Zusammenfassung.

Molybdän übt auf das Wachstum von *Azotobacter chroococcum* in stickstofffreier Nährlösung eine besonders günstige Wirkung aus. Auf die Möglichkeiten, die sich hieraus für die Stickstoffbindung und die Verbreitung von *Azotobacter* im Boden ergeben, wurde hingewiesen.

#### Literatur.

- 1) *Bortels*, Biokatalyse und Reaktionsempfindlichkeit bei niederen und höheren Pflanzen. (Angew. Bot. **11**, 285, 1929.) — 2) *Greaves*, Reizwirkung des Arsens auf die stickstofffixierenden Organismen des Bodens. (Journ. Agric. Res. **6**, 389, 1916.) — 3) *Heinze*, Weitere Untersuchungen über die sogenannten Azotobakterorganismen als „frei“ im Boden lebende Stickstoffsammler. (Landw. Jahrb. **64**, 127, 1926.) — 4) *Hiltner*, Der Hederich und Ackersenf als Stickstoffschafter. (Mitt. d. Deutsch. Landw. Ges., Jahrg. 1915.) — 5) *Kayser*, Einfluß der Uransalze auf den „Stickstofffixierer“. (C. r. Acad. Sc. **172**, 1133. Ref.: Chem. Centralbl. **1921**, I, 552.) — 6) *Kayser* und *Delaval*, Radioaktivität und Stickstoffsammler. (C. r. Acad. Sc. **179**, 110. Ref.: Chem. Centralbl. **1924**, II, 1215.) — 7) *Dieselben*, Radioaktivität, Stickstoffbinder und alkoholische Hefen. (C. r. Acad. Sc. **181**, 115. Ref.: Chem. Centralbl. **1925**, II, 1610.) — 8) *Kostytschew*, Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. (Berlin, Springer, 1926.) — 9) *Kostytschew*, *Ryskaltshuk* und *Schwezwowa*, Biochemische Untersuchungen über *Azotobacter agile*. (Hoppe-Seylers Zeitschr. phys. Chem. **154**, 1, 1926.) — 10) *Krzemienievska*, Der Einfluß der Mineralbestandteile der Nährlösung auf die Entwicklung des Azotobacters. (Anz. d. Akad. d. Wiss. Krakau,

Reihe B, S. 376, 1910. Ref.: Bot. Centralbl. **116**, 52, 1911.) — 11) *Krzemieniewski*, Physiologische Untersuchungen über *Azotobacter chroococcum* Beij. (Anz. d. Akad. d. Wiss. Krakau, S. 746, 1907. Ref.: Chem. Centralbl. **1908**, I, 1198.) — 12) *Derselbe*, Zur Biologie der stickstoffbindenden Mikroorganismen. (Anz. d. Akad. d. Wiss. Krakau, S. 560, 1906. Ref.: Chem. Centralbl. **1907**, I, 1701.) — 13) *Loew*, Über die Ernährung des *Azotobakter* im Boden. (Zentralbl. f. Bakt. II, **70**, 36, 1927.) — 14) *Muspratts* Chemie, II. Chemische Technologie der anorganischen Industriezweige. I. Halbband. Herausgegeben von Dr. B. Neumann. (Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., 1926.) — 15) *Poschenrieder*, Über die *Azotobakter*fähigkeit einiger Kruziferenböden. (Ein Beitrag zur mikrobiologischen Bodenanalyse.) (Zentralbl. f. Bakt. II, **79**, 222, 1929.) — 16) *Schober*, Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*. (Jahrb. f. wiss. Bot. **72**, 1, 1930.) — 17) *Stapp* und *Ruschmann*, Zur Biologie von *Azotobakter*. (Arb. d. Biol. Reichsanstalt f. Land- u. Forstw. **13**, 305, 1924.) — 18) *Stoklasa*, Einfluß der Radioaktivität auf die stickstoffbindenden oder Stickstoffsubstanzen umwandelnden Mikroorganismen. (C. r. Acad. Sc. **157**, 879, 1913. Ref.: Chem. Centralbl. **1914**, I, 54.) — 19) *Derselbe*, Über die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffs durch *Azotobakter* und Radiobakter. (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **24**, 22, 1906.) — 20) *Winogradsky*, Etudes sur la microbiologie du sol. II. Sur les microbes fixateurs d'azote. (Ann. Inst. Pasteur **40**, 455, 1926.)

Weitere Literaturangaben finden sich in den Arbeiten 1 und 17.

---