

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Halle a/S.]
(Director: Prof. Dr. C. Fraenkel.)

Beitrag zur Frage der Stickstoffassimilation durch den *Bacillus ellenbachensis* α Caron.

Von

Stabsarzt Dr. E. Jacobitz,
Karlsruhe.

Im Jahre 1895 machte Rittergutsbesitzer Caron¹ die Mittheilung, dass es ihm gelungen sei, aus der Ackererde seines Gutes Ellenbach bei Kassel einen Mikroorganismus zu gewinnen, der im Stande sei, eine Anreicherung des Bodens mit Stickstoff zu bewirken, und der von ihm seit mehreren Jahren zur Impfung seines Saatgetreides mit bestem Erfolge benutzt werde. Ob dieser Bacillus den Stickstoff organischer Bodenbestandtheile aufzuschliessen oder ob er durch Assimilation atmosphärischen Stickstoffs die Ernteerträge zu erhöhen vermöge, darüber hat Caron eine bestimmte Ansicht nicht geäußert. Das erwähnte Bacterium wurde dann in künstlichen Reinculturen unter der Bezeichnung „Alinit“ von den Elberfelder Farbwerken als eigentliches Düngemittel in den Handel gebracht und so weiteren Kreisen zugänglich gemacht.

In der Folge erschienen nun eine grosse Reihe von Veröffentlichungen über den im „Alinit“ verkörperten *Bacillus ellenbachensis*, die ein Mal die in der Praxis, im Feldversuch gesammelten Erfahrungen berichteten, andererseits aber auch die morphologischen und culturellen, sowie die biologischen Eigenschaften des Bacillus, insbesondere die ihm vielfach zugeschriebene Fähigkeit, atmosphärischen Stickstoff zu assimiliren, einer mehr oder weniger eingehenden Erörterung unterwarfen. Wir können

¹ Caron, Landwirthschaftlich-bakteriologische Probleme. *Die landwirthschaftlichen Versuchsstationen*. 1895. Bd. XLV. S. 401.
Zeitschr. f. Hygiene. XLV.

indessen wohl um so eher darauf verzichten, hier die einschlägige Litteratur noch ein Mal des Genaueren zu besprechen, als dieselbe in der von mir verfassten Uebersicht „Die Assimilation des freien elementaren Stickstoffs“¹, ferner auch in dem Aufsatz von C. Schulze: „Beiträge zur Alinitfrage“² und endlich in der Abhandlung von Heinze: „Ueber die Beziehungen der sogenannten Alinitbakterien — *Bacillus ellenbachensis* α Caron — zu dem *Bacillus megatherium* de Bary bezw. zu den Heubacillen — *Bacillus subtilis* Cohn —“³ schon ausführlich wiedergegeben und kritisirt worden ist. Aus diesen Veröffentlichungen erhellt jedenfalls so viel, dass die Ansichten und Urtheile über den *Bacillus ellenbachensis* bisher keineswegs geklärt, dass vielmehr sowohl seine Stellung im Reiche der Bakterien, wie auch sein ganzes biologisches Verhalten noch auf das Ernstlichste umstritten sind.

Während nun die eine Seite der Frage, die die morphologischen und culturellen Eigenthümlichkeiten des in Rede stehenden Mikroorganismus, insbesondere seine Beziehungen zum *Bacillus megatherium* und zum *Bacillus subtilis* betrifft, in unserem Institute durch die eben erwähnte Arbeit von Heinze eine genauere Prüfung erfahren hat, habe ich im Auftrage des Hrn. Geheimrath C. Fraenkel zu ermitteln gesucht, ob der *Bacillus ellenbachensis* in künstlichen Culturen den atmosphärischen Stickstoff thatsächlich zu assimiliren und also eine für die praktische Landwirthschaft sicherlich ungemein wichtige Rolle zu spielen vermöge.

Zur Lösung dieser Aufgabe geht man am zweckmässigsten so vor, dass man zunächst beim Beginn des Versuches den Stickstoffgehalt des Nährbodens vor und nach der Impfung bestimmt, alsdann im Experiment selbst nur Luft, die frei von gebundenem Nitrogenium ist, zuführt und darnach wiederum den Stickstoffgehalt feststellt. Findet sich nun eine Zunahme des Stickstoffs, so kann derselbe nur aus dem zugeführten und assimilirten freien, atmosphärischen Nitrogenium herkommen. Unerlässliche Vorbedingung für irgendwie brauchbare und gleichmässige Ergebnisse ist es allerdings, dass der gebundene Stickstoff nicht nur aus der zugeleiteten Luft, sondern auch aus den benutzten Gefässen, aus den sonstigen Werkzeugen und Geräthen bis auf die letzten Spuren entfernt wird, da anderen Falls die Fehlerquellen sich so sehr häufen, dass ein einwandfreies Resultat kaum noch erwartet werden kann. Auch der Nährboden wird am besten frei oder mindestens möglichst frei von gebundenem

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Abth. II. Bd. VII. S. 783.

² *Landwirthschaftl. Jahrbücher*. 1901. Bd. XXX. S. 319—360.

³ *Centralblatt für Bakteriologie*. Abth. II. Bd. VIII. S. 449.

Stickstoff hergestellt, da auf den gewöhnlichen N-haltigen Substraten das Wachsthum der Mikroorganismen in Folge Anhäufung von Stoffwechselproducten, Aenderung der Reaction u. s. w. in der Regel schon aufhört, ehe das vorhandene gebundene Nitrogenium aufgebraucht und damit erst die Möglichkeit einer Sammlung atmosphärischen Stickstoffs gegeben ist. Dass es freilich kaum oder nur mit der grössten Mühe gelingt, dieser Forderung zu genügen, d. h. das gebundene Stickgas aus den Nährlösungen, sowie aus allen sonst für die Experimente nothwendigen Apparaten u. s. w. zu entfernen, leuchtet wohl bei der Allgegenwärtigkeit dieses Elements ohne Weiteres ein, und so habe auch ich, wie alle meine Vorgänger, Anfangs reiches Lehrgeld zahlen müssen und mannigfache Fehlschläge zu verzeichnen gehabt, bis ich die Methodik in der gehörigen Weise beherrschen gelernt und schliesslich das im Folgenden kurz beschriebene Verfahren als für meine Zwecke geeignet befunden hatte.

In Cloez'sche Kolben wurden mit einer Pipette je 50^{ccm} der zu verwendenden Nährlösung gefüllt und diese dann mit der betreffenden Bakterienaufschwemmung geimpft. Durch die Kolben wurde mit einer Wasserstrahlpumpe Luft hindurchgesaugt, die zunächst eine Vorlage mit concentrirter Schwefelsäure und dann eine solche mit Natronlauge (1 + 2) passirt hatte, also frei von gebundenem Stickstoff war. Vor jedem Cloez'schen Kolben und in der Mehrzahl der Versuche auch noch unmittelbar hinter jedem war immer eine leere Waschflasche eingeschoben, um die etwa überlaufende Nährlösung aufzunehmen, falls die Pumpe einmal versagen sollte; auch ein derartiger Versuch konnte dann ja ohne Bedenken noch verworfen werden. Auf diese Schutzflasche bezw. unmittelbar auf den Cloez'schen Kolben selbst folgte jedes Mal eine Waschflasche mit 25^{ccm} verdünnter Schwefelsäure (1:10·0), die den aus dem Kolben mit dem Luftstrom fortgerissenen, gebundenen Stickstoff absorbiren und so einen Uebertritt in den nächsten Cloez'schen Kolben verhindern sollte. Schliesslich war zur Sicherheit auch noch unmittelbar vor der Luftpumpe eine leere Flasche aufgestellt.

Zur Erläuterung des eben Gesagten diene die beigegebene photographische Wiedergabe einer derartigen Versuchsanordnung.

Verbunden waren alle Kolben und Flaschen unter sich und mit der Luftpumpe durch gute Gummischläuche, die unmittelbar vor dem Gebrauch zunächst kurze Zeit in kochendes, stickstoffreies Wasser, dann in Sublimatlösung gelegt, hierauf in grossen sterilen Doppelschalen mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen und durchgespült, endlich in eben solchen leeren, keimfrei gemachten Gefässen getrocknet und bis zur Verwendung aufbewahrt wurden. Bei dieser selbst wurde mit grösster Sorgfalt darauf geachtet, dass sich die Gummischlauchstücke, welche die Verbindung

zwischen den einzelnen Flaschen herstellten, ganz luftdicht an die Wandungen der Glasröhren schmiegeten, zu dem gleichen Zweck auch stets noch das Schlauchende und das Glasrohr mit Paraffin überzogen. Eine solche Dichtung mit Paraffin geschah schliesslich auch noch bei den eingeschliffenen Stöpseln der Waschflaschen.

Alle zu dem Versuche benutzten Glasgeräte, wie Waschflaschen, Kolben und die zum Einfüllen der Nährlösung, wie die bei ihrer Impfung benutzten Pipetten wurden natürlich jedes Mal vorher sorgfältig im Dampftopf oder im Trockenschrank sterilisirt.



Als Nährflüssigkeit diente bei der ersten Hälfte der Versuche die von Winogradsky¹ angegebene und von ihm zur Reinzüchtung des *Clostridium Pasteurianum* verwandte Dextroselösung, die die nachstehende Zusammensetzung hat: Aqua destillata 1000·0, Kal. phosphat 1·0, Magnes sulf. 0·5, Eisensulfat, Mangansulfat, Kochsalz je 0·01 bis 0·02 und 20·0 bis 40·0 ^{grm} Dextrose, dazu etwas vorher sorgfältig gereinigte Kreide. Um die Lösung stickstofffrei herzustellen, war ein Mal das erforderliche Wasser so bereitet, dass destillirtes Wasser, mit kleinen Mengen Kal. permang. versetzt, noch ein Mal der Destillation unterlag; die ersten Antheile des Destillats wurden dabei so lange verworfen, als die Nessler'sche Reaction noch ein positives Ergebniss lieferte, also noch

¹ Winogradsky, Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. *Archives des sciences biologiques publiées par l'Institut Impérial de médecine expérimentale à St. Pétersbourg.* 1895. T. III. Nr. 4.

Spuren von Ammoniak vorhanden waren. Weiter wurden aus dem gleichen Grunde von den oben angegebenen Salzen nur die reinsten Präparate, die im Handel erhältlich waren, benutzt und auch diese noch ein Mal umkrystallisiert. Es gelang so, bei allen den Stickstoff völlig zu beseitigen, bis auf die Dextrose, die allen derartigen Bemühungen trotzte und auch bei mehrfacher Behandlung noch deutliche Mengen von N aufwies. Ich bezog daher „chemisch reinen Traubenzucker“ von E. Merck, Darmstadt, also gewiss aus der zuverlässigsten und bewährtesten Quelle. Indessen auch dieses Präparat enthielt in 10 g^{m} noch 1.26 mg N, der, da alle Mittel, ihn zu entfernen, versagten, schon als unvermeidlicher Versuchsfehler mit in den Kauf genommen werden musste.

Die endliche Lösung wurde nun in der Weise bereitet, dass zunächst zu 1000.0 ccm Wasser die Salze in der angeführten Menge kamen, dann an zwei auf einander folgenden Tagen je eine zweistündige Sterilisation im Dampftopf statt hatte und alsdann erst der Zusatz von Dextrose nebst einer Messerspitze vorher gut gereinigter Kreide erfolgte. Der so fertige Nährboden wurde noch ein Mal gründlich sterilisiert, aber auf diese Weise doch eine Karamelisierung des Zuckers verhütet.

Für die zweite Reihe der Versuche gelangte die von Beyerinck¹ für „oligonitrophile Mikroben“ angegebene Nährflüssigkeit: 1000.0 ccm Wasser + 20 g^{m} Mannit + 0.2 g^{m} K_2HPO_4 zur Verwendung.

Schliesslich benutzte ich auch noch eine stark verdünnte Bouillon ohne Zusatz von Pepton und Kochsalz als Nährmedium, und zwar wurde die Verdünnung so gewählt, dass auf 1000.0 ccm Wasser 10 ccm Fleischwasser entfielen.

Bemerkt sei noch, dass jedes Mal die eine Hälfte des Cloez'schen Kolben, nachdem alle mit 50 ccm einer der Lösungen gefüllt waren, 24 Stunden bei Zimmertemperatur, die andere aber bei 37° aufbewahrt wurde. Erst wenn nach dieser Frist alle unverändert, also steril geblieben waren, wurden sie geimpft und weiterhin benutzt.

Den eigentlichen Versuchen voraus gingen Experimente, die ermitteln sollten, ob die zu prüfenden Mikroorganismen in den eben des näheren beschriebenen Nährböden überhaupt gediehen. An sich wird man von den hierher gehörigen Bakterien ja natürlich erwarten müssen, dass sie sich in stickstofffreien Substraten entwickeln, und diese Voraussetzung ist durch frühere Beobachtungen auch bereits bestätigt worden. Aber damit ist die Brauchbarkeit jeder beliebigen stickstofffreien oder stickstoffarmen Nährlösung begreiflicher Weise noch nicht erwiesen, und es muss vielmehr für den einzelnen Fall besonders festgestellt werden, wie sich diese Dinge

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Abth. II. Bd. VII. S. 568.

gestalten. In der That hatte nun in unseren Medien ein Wachsthum statt, das freilich einen recht verschiedenen Grad zeigte; weitaus am besten erfolgte die Entwicklung in der Beyerinck'schen Flüssigkeit, etwas spärlicher in der Winogradsky'schen Zuckerlösung und kaum angedeutet war sie in der verdünnten Bouillon.

Die verwendete Cultur des *Bacillus ellenbachensis* war mir von Hrn. Rittergutsbesitzer Caron, dem ich für sein liebenswürdiges Entgegenkommen hiermit meinen verbindlichsten Dank sage, zugesandt worden. Da der *Bacillus* bekanntlich mit einigen anderen im Boden vorkommenden von manchen Seiten zusammengeworfen wird, so habe ich dann auch diejenigen beiden Arten, deren Identität mit dem Caron'schen Mikroorganismen noch immer am nachdrücklichsten behauptet wird, nämlich den *Bacillus subtilis* Cohn und den *Bacillus megatherium* de Bary, zugleich in meine Versuche einbezogen, und zwar wurden hier dieselben Stämme benutzt, die Heinze¹ des Näheren beschrieben und geprüft hat. Zur Aussaat dienten 24 Stunden alte Agar-culturen, von denen jedes Mal mit derselben Platinöse möglichst gleiche Mengen (2 bis 4 Oesen) in der betreffenden Nährlösung (2 bis 4 ^{cem}) aufgeschwemmt und dann zu je 1 ^{cem} in die Kolben gebracht wurden. Selbstverständlich wurde vor jedem Versuch und auch bei Beendigung eines solchen stets die Reinheit der Cultur festgestellt.

Wurde der Versuch abgebrochen, so erfolgte die genaue chemische Analyse. Zu diesem Zweck vereinigte ich den Inhalt je eines Cloez'schen Kolbens zunächst mit der in der entsprechenden Waschflasche enthaltenen verdünnten Schwefelsäure. Die so entstandene schwefelsaure Lösung musste nun vor der Zerstörung im Stickstoffapparat durch Eindampfen concentrirt werden. Um hierbei einen Verlust sowohl an Ammoniak, als auch an Salpetersäure zu vermeiden, wurde die Mischung zunächst in der Kälte bis zur alkalischen Reaction mit Natrium carbonicum und hierauf mit Citronensäure bis zum Eintritt der sauren Reaction versetzt. Als Indicator diente Cochenillelösung², die gegen freie Kohlensäure unempfindlich ist. War die Flüssigkeit dann auf etwa 25 bis 30 ^{cem} eingedampft, so wurde die Stickstoffbestimmung nach der von Förster³ angegebenen Modification der Kjeldahl'schen Methode ausgeführt, mit deren Hülfe nicht nur der Gehalt an organischem und Ammoniak-Stickstoff, sondern auch an Stickstoff der Salpetersäure ermittelt werden kann. Die Zerstörung geschah in denselben Kolben, die auch bei der

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Abth. II. Bd. VIII. S. 517.

² Glaser, *Indicatoren*. 1901. S. 58—59.

³ *Chem. Zeitung*. 1889. Nr. 13. S. 229.

nachfolgenden Destillation benutzt wurden. Diese selbst hatte in dem von Bremer¹ angegebenen Apparat statt, der sich für diesen Zweck im Allgemeinen gut bewährt hat. Als Vorlage diente $\frac{1}{20}$ Normalschwefelsäure, zur Titration demgemäss und als Indicator Congoroth (Congoroth 0.5 + Aqua destillata 90.0 + Alkohol absolut. 10.0).

Da, wie vorhin erwähnt (S. 100), bei der Herstellung der Lösungen eine vollkommene Stickstofffreiheit nicht erzielt worden war, und namentlich die Dextrose noch Spuren von N enthielt, so konnte schon aus diesem Grunde der beim Abschluss der Versuche in den einzelnen Kolben constatirte Stickstoffgehalt nicht allein auf die Thätigkeit der ausgesäten Mikroorganismen zurückgeführt werden. Es musste also zunächst ein Mal ermittelt werden, wie viel Nitrogenium in den ungeimpften Nährlösungen sammt allen zugesetzten Reagentien sich vorfand. Es ergab sich nun bei zahlreichen einzelnen Prüfungen, dass durchschnittlich in 50^{ccm} der Winogradsky'schen Lösung 1.3^{mg} N, in 50^{ccm} der Beyerinck'schen Nährflüssigkeit 1.6^{mg} N und in der gleichen Menge der verdünnten Fleischwasserlösung 10^{mg} N enthalten waren. Diese nach Kjeldahl-Förster ausgeführte Bestimmung wurde aber zu aller Sicherheit auch immer noch vor jedem einzelnen Versuche mit den ungeimpften Nährböden wiederholt. Die hierbei gewonnenen Resultate zeigten jedoch keine oder nur eine ganz geringe Abweichung von dem eben angegebenen Mittel. Im Uebrigen sei noch bemerkt, dass bei nochmaliger genauer Analyse der einzelnen benutzten Bestandtheile sich auch jetzt wieder der Zucker, die Dextrose und das Mannit als die eigentlichen oder alleinigen Träger des Stickstoffs erwiesen.

Weiterhin musste aber vor einer Verwerthung der Befunde begreiflicher Weise festgestellt werden, ob nicht die Menge von Stickstoff, die durch die Uebertragung der Bakterien selbst in das Nährmedium gelangte, Berücksichtigung erforderte. Vor jedem Versuch wurde daher auch noch eine Stickstoffbestimmung der geimpften Nährlösung ausgeführt. Der so aus der Differenz zwischen der geimpften und der ungeimpften Flüssigkeit hervorgehende Stickstoffgehalt der benutzten Mikroorganismen schwankte innerhalb gewisser Grenzen, obwohl ich stets bemüht war, möglichst gleiche Mengen für die Aussaat zu verwenden, Immerhin betrug der Unterschied doch im Durchschnitt etwa 0.4^{mg} N, erreichte also eine Höhe, die jedenfalls eine entsprechende Stelle bei der Berechnung der Endergebnisse finden musste.

¹ *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.* 1898. S. 316—318.

Tabella I. Art und Menge der benutzten Nährflüssigkeit: Winogradsky'sche Dextrosalösung, 50^{cem}.

| Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----|-------------------------------------|---|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|
| | N-Gehalt des ungeimpften Nährbodens | N-Gehalt des geimpften Nährbodens vor dem Versuch | Dauer des Versuchs | N-Gehalt nach dem Versuch | Anreicherung mit N | |
| I | 1.2 ^{ms} | B. ellenb. 1.5 ^{ms} | 21 Tage | B. ellenb. 2.0 ^{ms} | B. subtilis 1.9 ^{ms} | B. subtilis ± 0 ^{ms} |
| II | 1.3 ^{ms} | 1.6 ^{ms} | 14 " | 2.2 ^{ms} | 1.8 ^{ms} | + 0.6 ^{ms} |
| III | 1.3 ^{ms} | 1.5 ^{ms} | 14 " | 2.0 ^{ms} | 1.6 ^{ms} | + 0.5 ^{ms} |
| IV | 1.3 ^{ms} | 1.4 ^{ms} | 14 " | 2.2 ^{ms} | B. megath. 1.9 ^{ms} | + 0.8 ^{ms} B. megath. + 0.3 ^{ms} |

Tabella II. Art und Menge der benutzten Nährflüssigkeit: Beyerinck'sche Lösung, 50^{cem}.

| Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|-------------------------------------|---|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| | N-Gehalt des ungeimpften Nährbodens | N-Gehalt des geimpften Nährbodens vor dem Versuch | Dauer des Versuchs | N-Gehalt nach dem Versuch | Anreicherung mit N | |
| V | 1.6 ^{ms} | B. ellenb. 2.0 ^{ms} | 18 Tage | B. ellenb. 3.5 ^{ms} | B. megath. 3.3 ^{ms} | B. megath. + 1.3 ^{ms} |
| VI | 1.6 ^{ms} | B. megath. 3.1 ^{ms} | 15 " | B. megath. 4.1 ^{ms} | B. subtilis 3.6 ^{ms} | B. subtilis + 1.0 ^{ms} |
| VII | 1.6 ^{ms} | B. ellenb. 2.1 ^{ms} | 15 " | B. ellenb. 3.7 ^{ms} | B. megath. 3.4 ^{ms} | B. ellenb. + 1.6 ^{ms} |
| VIII | 1.6 ^{ms} | B. subtilis 2.0 ^{ms} | 25 " | B. subtilis 2.1 ^{ms} | Bodenprobe 2.8 ^{ms} | B. subtilis + 0.1 ^{ms} Bodenprobe + 0.7 ^{ms} |
| | | B. ellenb. 2.0 ^{ms} | | B. ellenb. 3.1 ^{ms} | B. subtilis 2.1 ^{ms} | B. ellenb. + 1.1 ^{ms} + 2.4 ^{ms} |
| | | | | b) 4.4 ^{ms} | 4.2 ^{ms} | B. subtilis ± 0 ^{ms} + 2.1 ^{ms} |

Zeigte sich dann schliesslich noch eine Zunahme des Stickstoffgehalts der geimpften Nährlösungen nach dem Wachsthum der eingebrachten Mikroorganismen, so konnte diese Anreicherung nur durch die Lebensthätigkeit der betreffenden Mikroorganismen bedingt sein und nach der ganzen Anordnung des Versuchs allein aus dem freien Stickstoff der Atmosphäre herrühren, auf einer Bindung, auf einer Assimilation des letzteren beruhen.

Werfen wir nun einen Blick auf die in den nebenstehenden Tabellen verzeichneten Beobachtungen, so muss ohne Weiteres eingeräumt werden, dass sie an Zahl noch einigermaassen gering sind. Aber ein Mal handelt es sich gleichsam um die Endglieder einer langen Kette von Versuchen, die aus dem einen oder anderen Grunde missglückten, bis die ganze Technik schliesslich in die richtigen Bahnen gelenkt war, zweitens erforderte jede Reihe auch dann noch einen erheblichen Aufwand an Zeit und Mühe, endlich aber stimmen die erzielten Resultate unter sich so genau überein, dass sie wohl unbedingte Gültigkeit wenigstens für die hier gewählten Verhältnisse beanspruchen können und eine Wiederholung der Experimente in der gleichen Weise unnöthig erscheinen musste. Die Ergebnisse sprechen im Uebrigen für sich selbst, und die Tabellen bedürfen daher kaum noch einer Erläuterung. Im Einzelnen sei nur kurz das Folgende angeführt:

In Versuch VII ist ein Kolben mit 1^{ccm} einer Aufschwemmung geimpft worden, die nicht wie sonst aus einer Reincultur des Ellenbach'schen Bacillus, sondern mit einer uns von dort durch Hrn. Caron freundlichst übersandten Bodenprobe hergestellt worden war. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigten sich neben zahlreichen kleinen, lebhaft beweglichen auch grössere, im Aussehen und in der Beweglichkeit dem Bacillus ellenbachensis gleichende Stäbchen. Auf dem Wege der Züchtung und weiteren Prüfung konnte in der That ihre Uebereinstimmung mit dem Caron'schen Bacillus nachgewiesen werden.

Im Versuch VIII sind zwei Versuchsreihen neben einander angesetzt worden. Bei der einen (a) war die Anordnung die gewöhnliche, bei der zweiten (b) aber wurden die beiden Vorlagen, die sonst mit Schwefelsäure und Natronlauge gefüllt waren, leer verwendet, d. h. dem Versuchskolben unveränderte atmosphärische Luft zugeführt.

Das Wachsthum war in b deutlich besser als in a.

Aus beiden Tabellen ergeben sich ferner noch folgende Punkte, die hervorgehoben zu werden verdienen:

Die Staffel 2 zeigt uns eine völlige Gleichheit der für den N-Gehalt der ungeimpften Nährlösungen gefundenen Werthe unter sich und beweist also, dass die Genauigkeit der Bestimmungs-

methode nichts zu wünschen übrig lässt. Nur in einem Falle (Versuch I) hat sich die ganz geringe Differenz von 0.1^{mg} herausgestellt, die aber natürlich ohne Belang ist.

Dagegen lehrt uns Staffel 3, dass, wie auch vorhin schon erwähnt, der Stickstoffgehalt der zur Aussaat benutzten Bakterienmenge und also auch die Zahl der verimpften Mikroorganismen, trotz der Verwendung möglichst gleichmässiger Aufschwemmungen in stets der nämlichen Menge, doch nicht unerheblichen Schwankungen unterliegt, die daher bei der Berechnung durchaus berücksichtigt werden müssen.

Einen zusammenfassenden Ueberblick über die erhaltenen Ergebnisse gewährt uns endlich die letzte Staffel 6. Es erhellt daraus ein Mal, dass der *Bacillus ellenbachensis* in der That die Fähigkeit besitzt, bei seinem Wachstum in künstlichen Nährflüssigkeiten den freien atmosphärischen Stickstoff der Luft zu binden, dass dieses Vermögen ferner auch dem *Bacillus megatherium* zusteht, hingegen beim *Bacillus subtilis* nahezu völlig vermisst wird. Freilich ist die stickstoffspeichernde Kraft des Caron'schen *Bacillus* nur eine sehr geringfügige. Am stärksten tritt sie noch in der Beyerinck'schen Lösung und bei Zufuhr unveränderter, d. h. gebundenen N-Stoff enthaltender Luft hervor; aber selbst hier bewegte sie sich in so bescheidenen Grenzen, dass sich unwillkürlich die Frage aufdrängte, ob nicht bei Verwendung noch anderer Substrate vielleicht bessere Erfolge erzielt werden könnten. Schon oben war in diesem Zusammenhange von der verdünnten Bouillon die Rede; indessen war das Wachstum des Caron'schen *Bacillus* hier ein so kümmerliches, dass von ihrem Gebrauch deshalb alsbald Abstand genommen werden musste.

Besonders nahe lag nun begreiflicher Weise der Gedanke, die Züchtung der hier geprüften Mikroorganismen unter möglichst genauer Anlehnung an die natürlichen Verhältnisse, d. h. in sterilisirten Auszügen von Boden oder in diesem letzteren selbst zu versuchen. Leider sind meine eifrigen Bemühungen nach dieser Richtung hin jedoch sämtlich fehlgeschlagen; nicht in einem einzigen Falle liess sich bei den Vorversuchen auf den eben erwähnten Nährmedien überhaupt eine sichere Entwicklung der Bakterien feststellen und damit war jeder weitere Schritt auf dem gleichen Wege aussichtslos geworden. Es ist das um so bedauerlicher, als wir uns ja nicht verhehlen können, dass das von uns für den Caron'schen *Bacillus* festgestellte Maass der Stickstoffanreicherung an sich längst nicht genügt, um die Erfolge zu deuten, die man mit diesem Mikroorganismus in der Praxis, nach einer Infection des Saatguts oder des Ackerbodens, an verschiedenen Stellen erzielt haben will, und so sind wir also für die Erklärung dieses Widerspruches auch fernerhin auf

Muthmaassungen angewiesen. Man kann sich denken, dass es eben doch bestimmte, uns noch unbekannte Lebensbedingungen, Nährmedien, Bodenarten u. s. w. giebt, welche bei diesen und vielleicht auch bei manchen anderen Bakterien die stickstoffsammelnde Kraft aus ihren bescheidenen Keimen zu reicher Blüthe entwickeln. Man wird auch mit der Möglichkeit rechnen müssen, dass hier eine Symbiose verschiedener Mikroorganismen in Betracht kommt, was nach unseren Erfahrungen mit der aus Ellenbach stammenden Bodenprobe selbst freilich nicht eben wahrscheinlich ist, und man wird endlich zu erwägen haben, ob nicht die günstige Wirkung des Bacillus überhaupt auf einem ganz anderen Gebiete liegt, ihm z. B. nur die Fähigkeit innewohnt, die im Boden vorhandenen Stickstoffverbindungen aufzuschliessen, umzuformen und so den höheren Pflanzen zugänglich zu machen.

Es wird Sache weiterer Untersuchungen sein, diese Punkte aufzuklären. Unter den von uns gewählten Bedingungen hat sich jedenfalls ein bündiger Beweis für die besondere, dem Bacillus ellenbachensis zugeschriebene Rolle in der praktischen Landwirtschaft nicht erbringen lassen.
