

Zur Frage der Stickstoffassimilation einiger symbiontischen Cyanophyceen

(Mit 2 Tafeln)

Von

V. Vouk und P. Wellisch.

I.

Pascher hat für das Konsortium von Blaualgen mit anderen Organismen den trefflichen Ausdruck Syncyanosen geprägt, und je nachdem ob die Algen intra- oder extrazellulär vorkommen, Endo- und Ektocyanosen unterscheiden. Er hatte zwar zunächst die Cyanosen bei den Einzellern vor den Augen, doch kann man diesen Begriff ebensogut auch an bekannte Symbiosen zwischen Blaualgen und einigen höheren Pflanzen (*Blasia*, *Cavicularia*, *Anthoceros*, *Azolla*, *Cycas* und *Gunnera*) anwenden. Die letzteren sind in morphologischer und entwicklungsgechichtlicher Hinsicht ziemlich gut bekannt und wir meinen, dass es überflüssig wäre, das bekannte hier zu wiederholen. In der letzteren Zeit wurde aber von mehreren Forschern (Vouk 1914 und 1926, Pringsheim 1928, Nutall G. H. F. 1923, Tobler 1925) darauf hingewiesen, dass der Schlüssel für die Erklärung und Auffassung der Symbiosen hauptsächlich in der physiologischen Erforschung liegt. Vouk baute sogar auf Grund der bisherigen Erforschung vorwiegend pflanzlicher Symbiosen eine Hypothese auf, nach welcher »der physiologische Sinn der Symbiosen in der Wechselbeziehung der Kohlenstoff und Stickstoffassimilation besteht.« Diese Hypothese wird auch durch die Cyanosen bei höheren Pflanzen, welche von Vouk (1927) *Anabaena*-Symbiosen benannt wurden, gestützt.

Bereits Prantl (1889) vermutete, dass es sich bei den *Nostoc*- und *Anabaena*-Arten in diesen Symbiosen um die Luftstickstoffassimilation handelt. Die physiologischen Untersuchungen in dieser Richtung folgten aber viel später.

Als physiologisch best untersuchte Cyanose bei höheren Pflanzen soll an erster Stelle die *Azolla*-Cyanose genannt werden. Oes (1913) kultivierte *Azolla* in stickstofffreien Nährlösungen und konnte feststellen, dass diese auch ohne Stickstoff gut gedeihen kann. Ausser-

dem konstatierte O e s, dass in den Haaren der Cyanomhölungen bei *Azolla* reichlich Eiweisstoffe nachweisbar sind. Diese beiden Feststellungen führten ihn zum folgenden Resultate: »Es liesse sich gestützt auf die mitgeteilten Beobachtungen und Versuche ein Symbioseverhältniss denken, wobei die *Anabaena* der *Azolla* N-Verbindungen liefern und dafür andere Stoffe z. B. Kohlehydrate empfangen würde«. Diese Untersuchungen wurden später durch L i m b e r g e r (1921, 1925), dem es gelungen ist, *Anabaena*-freie *Azollen* zu bekommen und längere Zeit zu kultivieren, vertieft. *Azolla* mit *Anabaena* zeigte in N-freier Lösung eine bessere Vermehrung als *Azolla* ohne *Anabaena* in Knop'scher Nährlösung. »Es scheint also tatsächlich der Besitz der Blaulage bei geringem oder fehlendem Stickstoffgehalt des Nährsubstrates eine Lebensnotwendigkeit für den Farn zu sein, um eben mit ihrer Hilfe zu dem nötigen Stickstoff zu gelangen«. Der Beweis, dass die isolierte *Anabaena* den Luftstickstoff assimilieren kann, ist noch immer nicht erbracht. Auch L i m b e r g e r konnte keine vollkommen bakterienfreie Reinkultur von *Anabaena* erhalten. Dem gegenüber sind die Untersuchungen von P r i n g s h e i m zu nennen, dem es gelungen ist, *Anabaena Azollae* rein zu züchten. Pringsheim konnte keine N-Bindung bei dieser Alge nachweisen; die Kulturen ohne Nitrate zeigten kein Wachstum.

An zweiter Stelle sind von den physiologisch gut untersuchten Syncyanosen bei höheren Pflanzen jene bei den Lebermoosen *Blasia* und *Cavicularia* zu erwähnen. M o l i s c h isolierte aus den Cyanomen dieser beiden Lebermoose *Nostoc*-Arten und kultivierte sie in Reinkultur in N-freien und N-haltigen Lösungen. Er konnte feststellen, dass die *Anabaena* in N-freier Lösung besser oder fast ebensogut wie in N-haltiger Lösung gedeiht, woraus der Schluss gezogen wurde, dass diese *Nostoc*-Arten die Fähigkeit haben den Luftstickstoff zu assimilieren. »Es scheint daher »sagt M o l i s c h« die Annahme sehr naheliegend, dass das Lebermoos die Alge so gastlich aufnimmt, weil diese ihren gebundenen N, den sie bereiten vermag, als Gegenleistung überlässt«. Da in den Cyanomhöhlen von *Blasia* ähnliche Haare wie bei *Azolla* vorkommen »ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, dass die Haare vielleicht die von der Alge gebildeten N-Verbindungen aufzunehmen bestimmt sind und dem Moose zuzuführen«.

Die ähnliche Cyanose bei dem Lebermoose *Anthoceros* ist in dieser Hinsicht wenig untersucht. P e i r c e untersuchte *Anthoceros* auf sterilisiertem und unsterilisiertem Boden und konnte im allgemeinen feststellen, dass die Pflanzen auf sterilisiertem Boden keinen *Nostoc* enthielten, aber viel besser wuchsen, als jene mit *Nostoc* auf unsterilisiertem Boden. Nach Ansicht P e i r c e's dürfte dies gegen die von P r a n t l ausgesprochene allgemeine Ansicht sprechen. Doch wenn wir die neueren, hauptsächlich durch Russel und Hutchinson festgestellte Tatsachen, dass durch Sterilisation die Bodenwirksamkeit auf den Ertrag der Pflanzen begünstigt wird,

berücksichtigen, dürfen uns die Resultate Peirce's nicht mehr verwundern. Jedenfalls hat Molisch recht, wenn er sagt: »Eine Entscheidung in dieser Frage wird erst möglich sein, wenn Reinkulturen der im *Anthoceros* vorkommenden *Nostoc* unter anderem gezeigt haben werden, ob sie freien Stickstoff assimilieren können oder nicht« (Molisch 2, p. 125).

Gunnera- und *Cycas*-Symbiosen mit *Nostoc* sind insofern von den bisher besprochenen Symbiosen verschieden, da diese als Endocyanosen im Sinne Pascher's zu bezeichnen sind. Die als *Nostoc punctiforme* bezeichnete Cyanophyce, welche als Biont bei *Gunnera* und *Cycas* vorkommt, war schon öfters der Gegenstand physiologischer Untersuchung (Harriot 1892, Bouilhac 1896, Harder 1917, Pringsheim 1918). Absolute bakterienfreie Reinkulturen behauptete aber nur Harder zu haben. Alle Forscher kamen zu dem Resultate, dass *Nostoc punctiforme* auch myxotroph leben kann, d. h. befähigt ist, auch organische Kohlenstoffverbindungen zu assimilieren. Luftstickstoffassimilation wurde bei diesem *Nostoc* bisher nicht nachgewiesen. Harder konnte zwischen *Nostoc* und *Gunnera* keine spezifische Beziehung nachweisen, und er betrachtet auch den Befall von *Gunnera* mit *Nostoc* nur als »eine harmlose Erkrankung«. Allerdings spricht die eingehende entwicklungsgeschichtliche Untersuchung dieser Symbiose von Miehe gegen diese Auffassung. *Gunnera*-Symbiose ist nach diesem Forscher eine Knospensymbiose, da die Symbionten dauernd die Knospen besetzt halten und von hier aus in die spezifischen Wohnstätten (Phycomen) eindringen. Über das Verhältniss des *Nostoc* zum atmosphärischen Stickstoff liegen keine positive Erfahrungen vor. Die Angabe von Spratt, dass in den Phycorrhizen (Cyanomen) von *Cycas* *Azotobacter*, sogar auch *Bac. radicumicola* vorkommt, ist bisher von keiner Seite bestätigt worden und Watanabe kam sogar in Bezug auf die Frage der N-Bindung zum negativen Resultat.

Wenn wir alle diese Fälle von Cyanosen vom Standpunkte der physiologischen Auffassung der Symbiosen im Sinne der Hypothese von Vouk betrachten, so können wir zunächst folgendes feststellen:

1. Bei *Azolla*-Symbiose ist bisher noch kein einwandfreier Beweis geliefert, dass *Anabaena Azollae* den Luftstickstoff binden kann.

2. Von Lebermoosen ist in dieser Hinsicht *Anthoceros* gar nicht untersucht. Es ist die nächste Aufgabe den symbiontischen *Nostoc* zu isolieren und auf das N-Bindungsvermögen zu prüfen.

3. Der bei *Gunnera* und *Cycas* vorkommende *Nostoc punctiforme* ist auf das Vermögen der N-Bindung ebenso nicht geprüft.

4. Die einzig positiven Resultate im Sinne der N-Bindung-Hypothese seitens der Algen als Endobionten ergaben die Untersuchungen von Molisch bei *Blasia* und *Cavicularia*.

Wir hatten uns Aufgabe gestellt die genannten Cyanosen auf N-Bindung ihrer Cyanellen zu prüfen. Es ist uns bisher geglückt

Reinkulturen von *Anabaena Azollae*, *Blasia*- und *Anthoceros-Nostoc* zu erhalten und auf N-freien Substraten zu züchten. Obwohl wir nur zur Hälfte unserer Aufgabe gelangt sind, haben wir uns doch entschlossen, die bisher erhaltenen Resultate zu veröffentlichen, da wir glauben, dass bereits diese zur physiologischen Analyse dieser interessanten Cyanosen beitragen können.

II.

Den Versuch Molisch's mit *Nostoc* aus *Blasia* wiederholend und zugleich erweiternd wurden drei Parallelversuche mit *Nostoc* aus *Anthoceros*, mit *Nostoc* aus *Blasia* und mit *Anabaena Azollae* aufgestellt. Je sechs Erlenmayerkolben von 100 ccm Inhalt wurden zum Drittel mit Nährlösung beschickt und nach üblicher Sterilisation mit möglichst gleicher Menge vegetativer Zellen aus Reinkulturen erwähnter Cyanophyceen geimpft. Die Zusammensetzung der Nährlösungen in den drei Versuchsserien war die folgende:

H ₂ O doppelt destiliert . . .	1.000 gr.
MgSO ₄	0.25 gr.
K ₃ PO ₃	0.25 gr.
Fe ₃ Cl ₆	in Spuren
KNO ₃	0.25 gr.
CaCl ₂	0.25 gr.

In den Versuchsserien I. und II. wurde die Nährlösung ohne KNO₃ und ausserdem abwechselnd mit und ohne CaCl₂ gebraucht. Die Nährlösung, welche man in der Versuchsserie III. anwendete, enthielt KNO₃ mit und ohne Zugabe von CaCl₂. Die Versuchsanordnung war die gleiche, welche auch Molisch angewandt hatte. Die Versuchsserie I. wurde absolut N-frei gehalten, indem die Luft in den Kulturraum der Glasglocke befreit von NH₃ geleitet wurde. Die Luft passierte zuerst das mit Bimstein und H₂SO₄ gefüllte U-Rohr, dann die Waschflasche und erst aus dieser gelang sie in die Glasglocke, unter welcher die Kulturgläser standen. Der Versuch wurde 21. VIII. 1927 aufgestellt und 14. X. 1927 abgebrochen. Die Kulturflüssigkeit wurde filtriert, die Algen samt Filtrierpapier im Trockenschranke und im Exsikator getrocknet und ihr Trockengewicht auf analytischer Wage bestimmt. Die Resultate zeigt uns die Tabelle I.

Wenn wir die Trockengewichtszahlen der Tabelle überblicken, so fällt uns sofort auf, dass die Kulturen der Serie III. durchwegs eine viel bessere Ernte ergaben als jene der Serie I. und II. Die Erhöhung des Trockengewichtes der Kulturen der Versuchsserie III. betrug im Vergleich mit der Serie I. bei *Nostoc* aus *Anthoceros* 302.7%, bei *Nostoc* aus *Blasia* 145.8% und bei *Anabaena Azollae* 251.3%. Die Versuchsserie II. ergab hingegen Resultate, welche kaum einen Rückschluss auf den Einfluss und eventuelle Ausnützung der in Luft vorhandenen NH₃ Spuren erlauben. Die

Unterschiede sind an und für sich gering und auch variabel. Der erwähnte Befund, dass die Kulturen in nitrathaltiger Nährlösung besser gedeihen als in N-freier Nährlösung, steht nicht im Einklange mit den Resultaten welche Molisch bei *Blasia-Nostoc* erhielt. Molisch fand umgekehrt, dass *Blasia-Nostoc* in N-freier Nährlösung ein viel besseres Wachstum zeigte. Dagegen konnten wir den Befund Molisch's dass *Blasia-Nostoc* bei vollkommen N-freier mineralischer Ernährung wachsen kann, nicht nur bestätigen, sondern auch erweitern, da auch die beiden anderen symbiophilen Cyanophyceen ohne Zugabe von N auskommen können. Dies erlaubt wohl den Rückschluss auf Assimilation des elementaren Stickstoffs.

Tabelle I.

Versuchsdauer: 21. VII. — 14. X. 1927.
(Die Zahlen bedeuten Trockensubstanz in gr.)

Reinkultur Nährlösung	Nostoc aus Anthoceros		Nostoc aus Blasia		Anabaena Azollae	
	ohne CaCl ₂	mit CaCl ₂	ohne CaCl ₂	mit CaCl ₂	ohne CaCl ₂	mit CaCl ₂
Serie I. absolut N-frei	0.0112	0.0337	0.0249	0.0501	0.0134	0.0189
Serie II. nicht absolut N-frei	0.0248	0.0336	0.0469	0.0769	0.0108	0.0249
Serie III. N-enthaltend	0.0451	0.0538	0.0612	0.0698	0.0472	0.0549

In zweiter Linie konnten wir die Tatsache feststellen, dass in allen Versuchsserien die Algen in Nährlösungen bei Zusatz von CaCl₂ ein besseres Wachstum zeigten als in Nährlösungen ohne CaCl₂. Wir erhielten z. B. von *Anthoceros-Nostoc* in der Versuchsserie I. in Nährlösung + CaCl₂ einen um 200.8% grösseren Ernteertrag als in paralleler Kultur in CaCl₂-freier Lösung. Der Effekt der Zugabe von CaCl₂ war bei allen drei Cyanophyceen in der Versuchsserie I. auffallend grösser als in der Versuchsserie III. *Nostoc* aus *Anthoceros* zeigte z. B. in dieser Serie nur einen Zuwachs der Trockensubstanz von 25.9%. Während in der Versuchsserie III. bei *Nostoc* aus *Anthoceros* und *Nostoc* aus *Blasia* im Trockengewichte der Kulturen in Nährlösung + CaCl₂ gegenüber jener in CaCl₂-freier Nährlösung ein Zuwachs von 35.1% bzw. 59.7% zu vermerken war, betrug die Erhöhung des Ernteertrages bei *Anabaena Azollae* 130.5%, also noch weit mehr als in Versuchsserie I. Worauf diese Wirkung von CaCl₂ beruht, lässt sich nicht ohne weiteres sagen. Darauf, ob es sich hier um die Wirkung der Ca-Ionen in einer s. g. ausgeglichenen Lösung handelt, möchten wir hier nicht näher eingehen. Jedenfalls soll aber vermerkt werden, dass die H-Ionen Konzentration der Nährlösung durch den Zusatz von

CaCl₂ bedeutend geändert war. Nachträgliche Messung von pH frisch hergestellter Nährlösungen ergab folgende Werte:

pH	N-freie Nährlösung		N-haltige Nährlösung	
	ohne CaCl ₂	mit CaCl ₂	ohne CaCl ₂	mit CaCl ₂
	5.9	6.8	5.9	7.5

Es mag sein, dass der saure Charakter der Nährlösungen ohne CaCl₂ auf des Wachstum der untersuchten Algen ungünstig wirkte.

Im Jahre 1929/30 wurde der gesamte Versuch wiederholt und zwar vollkommen in derselben Weise. Nur wurden diesmal allein die Nährlösungen + CaCl₂ benutzt. Die H-ionen Konzentration der Nährlösung ohne KNO₃ betrug pH 6.8 und jener mit KNO₃ — pH 7.5. Es wurden im ganzen drei Serien in je 12 Erlenmayerkölbchen von 100 cm aufgestellt. Die erste Serie wieder in vollkommen NH₃-freier Luft und N-freier Nährlösung, die zweite in gewöhnlicher Luft und N-freier Nährlösung, und die dritte Serie in gewöhnlicher Luft mit Zusatz von KNO₃ zu der Nährlösung.

Nach vier Wochen konnte man feststellen, dass wie *Nostoc* aus *Anthoceros*, so auch *Nostoc* aus *Blasia* und *Anabaena Azollae* am reichlichsten in der Versuchsserie III. (mit KNO₃) entwickelt waren. Die üppigere Entwicklung in diesem N-haltigen Nährmedium zeigte sich bei *Nostoc* aus *Anthoceros* wie auch bei *Anabaena Azollae* nicht nur in der Menge der entwickelten Kolonien, sondern auch in ihrem Habitus. Während diese Algen in Versuchsserie I. nur leichte, kleine und lockere Flecken gebildet hatten, war in Versuchsserie III. das Aussehen der Kolonien und Ansammlungen viel massiver. In meisten Kulturen dieser Serie konnte man zahlreiche, dichte punktbis klümpchenartige Ansammlungen beobachten. Bei *Anabaena Azollae* war auch die Farbe der Kolonien in III. Versuchsserie merklich intensiver und dunkler. In der Versuchsserie II. war nur bei einigen Kulturen von *Nostoc* aus *Anthoceros* und *Anabaena Azollae* eine etwas bessere Entwicklung als in Versuchsserie I. feststellbar. Die Kulturen von *Nostoc* aus *Blasia* waren am Tage der Untersuchung, 3. IX., in der Versuchsserie II. noch überhaupt nicht entwickelt und in der Serie I. war nur in einem Kölbchen eine Kolonie zu beobachten.

Nach 6 Wochen der Versuchsdauer war der Stand der Algenkulturen wie mit Rücksicht auf die Menge der entwickelten Kolonien und ihren Habitus, so auch mit Rücksicht auf die Intensität der Farbe am zufriedenstellendsten in der Versuchsserie III., welche in allen Kulturen einen bedeutenden Zuwachs aufwies. Die Kulturen der Versuchsserien I. und II. zeigten zwar auch einen gewissen Zuwachs (bei *Nostoc* aus *Anthoceros* und *Anabaena Azollae* etwas reichlicher in II. als in I. Serie) doch erreichten sie weder in Anbetracht der Menge der entwickelten Kolonien, noch in Anbetracht der Dichtigkeit und Massivheit der Ansammlungen die Kulturen der Versuchsserie III.

Als man die Kulturen nach 22 Wochen der Versuchsdauer wieder untersuchte und verglich, war der Unterschied zwischen den

Versuchserien I. und III. noch viel auffalender. Während alle drei Versuchsubjekte in Kulturen der Versuchserie I. nur Netze von Punktkolonien und hie und da flockenartige, schütterere Ansammlungen und schleimige Überzüge bildeten, erreichten die klümpchenartigen, derben Ansammlungen des *Nostoc* aus *Blasia* in der Serie III. die Grösse eines Senfkorns bis einer Erbse, und diejenigen des *Nostoc* aus *Anthoceros* sogar die Grösse einer Kirsche. Ebenso war diesmal auch der Unterschied zwischen der Intensität der Farbe der Algenkulturen verschiedener Serien, welcher schon früher zu beobachten war, noch viel ausgeprägter. Beide *Nostoc* wie auch *Anabaena* wiesen eine deutliche Gradation der Intensität der Färbung auf; während die Farbe der Kolonien und Ansammlungen im allgemeinen in Versuchsserie I. am lichtesten und am schwächsten war, war sie in Serie III. am dunkelsten und am sattesten. Die dunklere Farbe dieser Kulturen könnte wohl zum Teile auch von der grösseren Dichtheit und Massivheit der Kolonien herrühren; dass sie jedoch auch durch andere Faktoren bedingt wird, zeigt der Umstand, dass die Kulturen von *Nostoc* aus *Blasia*, welche in Serie II. gleich oder fast schwächer als in Versuchsserie I. entwickelt waren, doch in dieser Serie intensiver und tiefer gefärbt erschienen.

Der Unterschied zwischen den Kulturen der Serie I. und III. ist auch aus den Photographien in Taf. I. und II. klar ersichtlich. Nach Abschluss des Versuches wurden die Kulturen filtriert, im Trockenschranke und im Exsikator getrocknet und schliesslich unter Beachtung aller Vorsichtsmassregeln gewogen. Die Resultate zeigt uns die Tabelle II. Obwohl die Variationen der Erntegewichte einzelner Kulturen ziemlich gross waren, konnte man doch das Resultat deutlich herauslesen.

Tabelle II.

Versuchsdauer von 3. VIII. 1929 — 27. I. 1930.
Trockengewicht einzelner Kulturen in gr.

Kultur	Anthoceros-Nostoc			Blasia-Nostoc			Anabaena-Azollae		
	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.
Kölbchen Nr. 1	0.240	0.094	0.564	0.315	0.188	0.504	0.251	0.265	0.431
„ „ 2	0.156	0.239	0.535	0.326	0.130	0.378	0.255	0.130	0.399
„ „ 3	0.273	0.168	0.535	0.043	—	—	0.187	0.066	0.513
„ „ 4	0.207	0.176	0.682	0.087	0.399	0.331	0.129	0.347	0.508
Zusammen	0.876	0.697	2.316	0.771	0.717	1.213	0.822	0.808	1.851
Pro 1 Kölbchen	0.219	0.174	0.579	0.193	0.239	0.404	0.205	0.202	0.464

Tafel I.

Fig. 1.

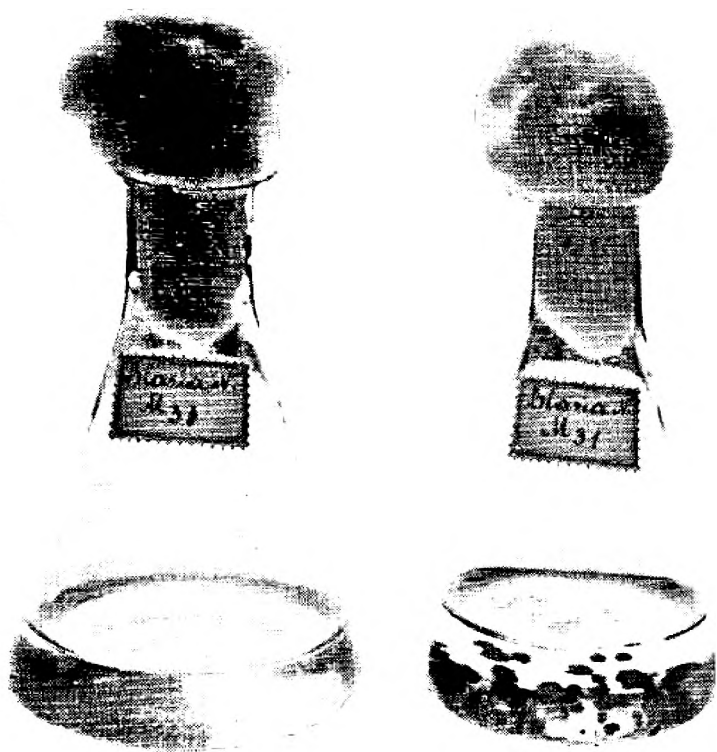
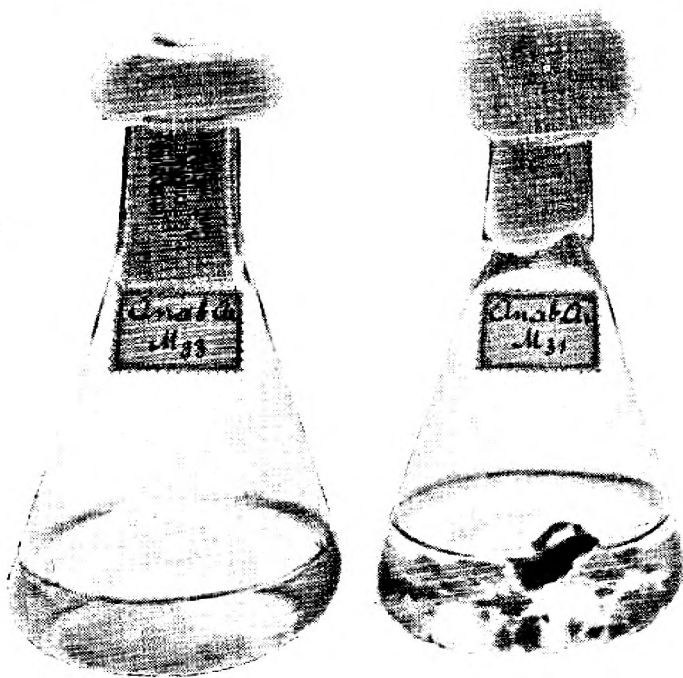


Fig. 2.



Tafel II.

Fig. 3.

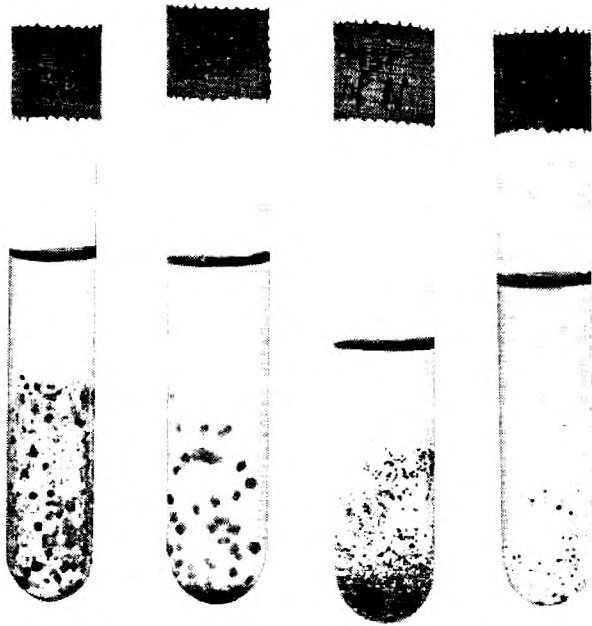
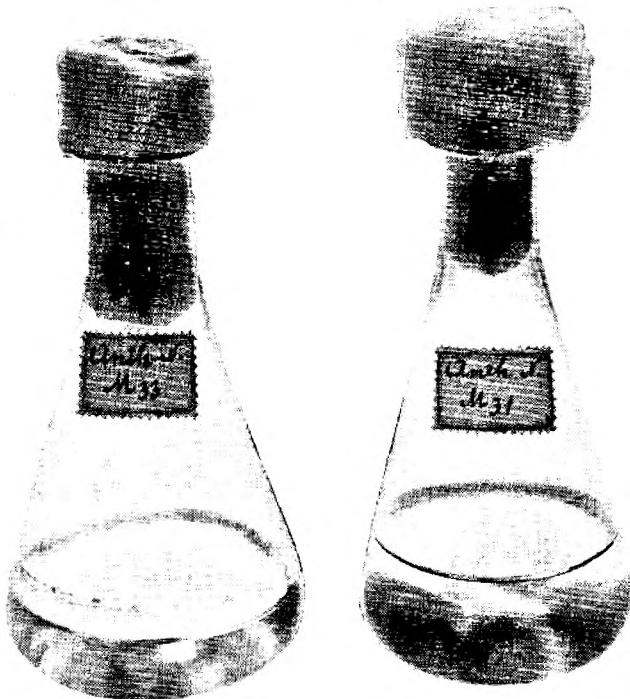


Fig. 4.



Der Betrag der Trockensubstanz ist in allen Kulturen der Versuchsserie III. (mit KNO_3) im Vergleich mit der Versuchsserie I. (absolut N-frei) mehr als verdoppelt. Dies bestätigte das Resultat der früheren Versuche, dass 1) die untersuchten Algen bei mineralischer Ernährung auch ohne gebundenen Stickstoff wachsen können und 2) dass dieselben Algen bei mineralischer Ernährung auf Kosten von Nitraten viel besser gedeihen als ohne diesen. Nebstbei soll bemerkt werden, dass die Versuchsserie II. gegenüber der Versuchsserie I. wieder keinen wesentlichen Unterschied aufwies. Die eventuellen Spuren von NH_3 der Luft haben also keinen Einfluss auf die Ernährung dieser Algen.

Es wurde schliesslich noch eine dritte Serie der Versuche in Eprouvetten, teilweise auch auf festen Agarboden, aber sonst mit denselben Nährlösungen ausgeführt. Wir wollen hier aus Raum-mangel von der näheren Beschreibung dieses Versuches Abstand nehmen, doch betonen wir, dass der Ausfall dieses Versuches inbezug auf die Stickstoffassimilation dasselbe Resultat ergab wie die früher besprochenen Versuchsserien. Auch in diesem Versuche zeigten die KNO_3 -Kulturen ein viel besseres Wachstum als jene ohne N. Dies illustriert übrigens auch die Fig. 3.

III.

Aus den bisher erwähnten Versuchen können wir nochmals folgende wichtige Resultate hervorheben:

1. Die symbiophilen Cyanophyceen, *Nostoc* aus *Blasia*, *Nostoc* aus *Anthoceros* und *Anabaena Azollae* können in Reinkultur bei vollkommen mineralischer Ernährung ohne gebundenen Stickstoff wachsen, woraus der Schluss gezogen wird, dass dieselben den elementaren Stickstoff assimilieren können.

2. Dieselben Cyanophyceen entwickelten sich aber durchwegs viel üppiger in mineralischer Nährlösung, welche auch Nitrate enthielt, als in N-freier Nährlösung.

Die beiden Resultate bedürfen kurzer Besprechung insbesondere inbezug auf die physiologische Erklärung der entsprechenden Symbiosen.

Das erste Resultat steht im Einklang mit der schon von Oes aufgestellten und nur teilweise begründeten Hypothese, dass *Anabaena Azollae* im Stande ist in der Symbiose mit *Azolla* den elementaren N zu assimilieren. Dem gegenüber stehen aber die Resultate Pringsheim's, der in vollkommener Reinkultur bei *Anabaena Azollae* ohne Nitrate kein Wachstum nachweisen konnte. Molisch hat jedoch für *Blasia-Nostoc* nachgewiesen, dass diese Cyanophycee im Stande ist den elementaren Stickstoff der Atmosphäre zu assimilieren und auch ohne gebundenen Stickstoff das Auslangen zu finden. Dies wird nun durch unsere Versuche nicht nur bestätigt sondern auch für *Anthoceros-Nostoc*, wie auch für *Anabaena Azol-*

Wie festgestellt. Allerdings ist das Wachstum dieser Algen bei reiner mineralischen N-freier Nährlösung verhältnismässig ein sehr schwaches. Dies steht nicht im Einklange mit dem Resultate von Molisch, der in einem Versuche bei *Blasia-Nostoc* in N-freier Nährlösung ein viel üppigeres Wachstum konstatieren konnte, als in N-haltiger Nährlösung. Im zweiten Versuche von Molisch waren die Erntegewichte von *Blasia-Nostoc* in N-freier und in N-haltiger Nährlösung fast gleich. Bei *Cavicularia-Nostoc* hat Molisch in N-freier Nährlösung wieder etwas höhere Erntegewichte erhalten als in N-haltiger Nährlösung. In unseren Versuche waren aber die Erntegewichte von allen drei untersuchten Cyanophyceen in N-haltiger Nährlösung durchwegs um mehr als 100% höher von jenen, welche man bei Kultivierung der Algen in N-freier Nährlösung erzielte. Worauf diese Unterschiede bei gleicher Versuchsanstellung beruhen, können wir uns allerdings nicht erklären. Theoretisch halten wir doch die Richtigkeit unserer Resultate für wahrscheinlich, da wir annehmen dürfen, dass für die Luftstickstoffbindung als Energiequelle organische Kohlenstoffquellen notwendig sind, ähnlich, wie man dies für luftstickstoffassimilierende Bakterien annimmt. Wir nehmen an, dass unsere Algen auch im Symbioseverhältniss den Kohlenstoff in organischer Form von dem Ektobionten erhalten. Die Algen sind daher in unseren Versuchen, in welchen ihnen keine organische C-Quelle dargeboten wurde, in bezug auf die Luftstickstoffassimilation unter anormalen Bedingungen, da ihnen nur das durch eigene CO₂-Assimilation hergestellte Atmungsmaterial zur Verfügung steht. Sie gedeihen auch deshalb verhältnismässig sehr kümmerlich.

Die Algen können natürlich fakultativ auch gebundenen Stickstoff assimilieren und dann fällt die Assimilation von elementarem N weg. Für dies haben wir eine Analogie bei *Clostridium Pasteurianum*, der bei reichlicher Ernährung mit Ammoniums Salzen keinen elementaren Stickstoff assimiliert. Jedenfalls ist die Luftstickstoffassimilation der untersuchten Cyanophyceen noch immer nicht zur Genüge erklärt. Es fehlen eben die entscheidenden Versuche welche uns das Verhalten dieser Algen in bezug auf die Luftstickstoffassimilation bei Ernährung mit organisch gebundenem Kohlenstoff zeigen würden. Nur eine weitere Vertiefung in die physiologischen Eigenschaften der symbiontischen Algen wird uns auch näher zu einer endgültigen Erklärung dieser interessanten Symbiosen bringen.

Benützte Literatur.

- Bouilhac, R.: Sur la culture du *Nostoc punctiforme* en presence de glucose. Compt. rend. de l'acad. d. Sc. Paris, 125, 880.
 Harder, R.: Ernährungsphysiol. Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen *Nostoc punctiforme*. Zeitschr. f. Bot. IX., Jahrg. p. 148, 1917.
 Harriot, P.: Sur une alge qui vit dans les racines des Cycadees. Compt. rend. de l'acad. Paris, 115, p. 325.

- Limberger, A.: Zur Frage der Symbiose von Anabaena mit Azolla. I. Sitz.-Anzeiger d. Akad. d. Wiss. Wien, Nr. 17. Juli 1921 II. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien I. 134, ½ Hft 1925.
- Miehe, H.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen der Algensymbiose bei Gunnera macrophylla. Flora 1924, 117, 1—15.
- Molisch, H.: I. Botanische Beobachtungen in Japan. IX. Mitt. Über die Symbiose der beiden Lebermoose *Blasia pusilla* und *Cavicularia densa* mit *Nostoc*. Sc. Reports Tohoku Imp. University, I. 2.
- Molisch, H.: II. Pflanzenbiologie in Japan. 1926.
- Nuttall, G. H. F.: Symbiosis in animals and plants. Nature Vol. 112, No. 2818, p. 657, 1923.
- Oes, A.: Über die Assimilation des freien Stickstoff durch *Azolla*. Zeitschr. f. Bot., 1913, Hft. 3, p.
- Pascher, A.: Studien über Symbiosen. I. Über einige Endosymbiosen von Blaualgen in Einzelleren. Pringsh. Jahrb. f. viss Bot. Bd. 71, Hft. 3.
- Pierce, J. G.: *Anthoceros* and its *Nostoc* Colonies. Botan. Gazette, 42, (1906), 55-59.
- Prantl, K.: Die Assimilation d. freien Stickstoffs und der Parasitismus von *Nostoc*. Hedwigia, 28, 135, (1889).
- Pringsheim, E. G.: Zur Physiologie endophytischer Cyanophyceen. Arch. f. Prot. 38, p. 126, 1928.
- Spratt, E. R.: Some observations of life history of *Anabaena* Cycadeae. Ann. of Bot., Bd. 25, p. 369, 1911.
- Vouk, V.: I. Das Problem der pflanzlichen Symbiosen 1914.
- Vouk, V.: II. Grundriss zu einer physiologischen Auffassung der Symbiose. Planta. II. Bd, 4/5 Hft, 1926.
- Watanabe, K.: Studien über die Korraloide von *Cycas revoluta*. Bot. Mag. Tokyo, 1924. 38.

Tafelerklärung.

- Taf. I. Fig. 1. Kultur von *Blasia-Nostoc* in N-freier Nährlösung (M₃₃) und in Nährlösung mit Nitraten (M₃₁).
- Fig. 2. Kultur von *Anabaena Azolla* in N-freier Nährlösung (M₃₃) und in Nährlösung mit Nitraten (M₃₁).
- Taf. II. Fig. 3. Kulturen von *Anabaena Azollae* (1. und 2. Eprouvette) und von *Blasia-Nostoc* (3. und 4. Eprouvette) in N-freier (M₃₃) und nitrathaltiger (M₃₁) Nährlösung.
- Fig. 4. Kultur von *Anthoceros-Nostoc* in N-freier (M₃₃) und nitrathaltiger (M₃₁) Nährlösung.
-