

O nitryfikacji amoniaku i źródłach węgla podczas żywienia się fermentów nitryfikacyjnych.

Przez

E. Godlewskiego.

~~~~~  
(Z dwiema rycinami w tekście).  
~~~~~

Rzecz przedłożona na posiedzeniu Wydz. mat.-przyr. z d. 4. czerwca 1895 r.



I. Wstęp.

Jak wiadomo, już w r. 1879, Schlösing i Müntz wykazali, że znany od dawna proces przemiany amoniaku na kwas azotowy, jaki odbywa się z mniejszą lub większą łatwością, prawie w każdej uprawnej ziemi, nie jest prostym chemicznym utlenianiem, jak dawniej sądzono, ale sprawą fizyologiczną, powstającą pod wpływem pewnego właściwego uorganizowanego fermentu. Zapatrywanie przytoczonych autorów rychło zostało potwierdzone przez doświadczenia wielu innych badaczy, atoli usiłowania zmierzające do wyosobnienia w stanie czystej kultury mikroorganizmu, który w tym procesie odgrywał rolę fermentu, długi czas pozostawały bez skutku. Powodem niepowodzenia prac podejmowanych pod tym względem było to, że, jak się później okazało, poszukiwany mikroorganizm nie rośnie na żelatynie; a że usiłowano odosobnić właśnie za pomocą kultur żelatynowych, więc podjęte tą drogą

starania nie mogły być pomyslnym uwiecznione skutkiem. Dopiero za pomocą innych metod badania, otrzymano korzystniejsze wyniki.

Odosobnienie poszukiwanego fermentu udało się po raz pierwszy w r. 1890 i to współcześnie dwom badaczom Franklandowi¹⁾ i Winogradzkiemu²⁾. Każdy z nich doszedł do celu inną drogą. Dróg tych opisywać nie będziemy, ale podniesiemy tylko fakt, że obaj badacze zupełnie od siebie niezależnie przekonali się, jak zamiana amoniaku na kwas azotowy a z nią i rozwój właściwego fermentu może się odbywać w płynie czysto mineralnego składu, bez dodatku jakiegokolwiek bądź materii organicznej jako pokarmu węglowego dla owego fermentu.

Frankland używał płynu zawierającego na 100 g. wody destylowanej: 0,1 g. fosforanu potasowego, 0,2 g. siarkanu magnezowego, 0,1 g. chlorku wapniowego, 0,05 g. chlorku amonowego i 0,5 g. węglanu wapniowego. Winogradzki brał płyn, w którym na 100 cm³. wody jak najstaranniej destylowanej było: 0,1 g. fosforanu potasowego, 0,1 g. siarkanu magnezowego i 1 g. zasadowego węglanu magnezowego.

Obaj badacze przekonali się, że odosobniony w stanie czystej kultury ferment, zamienia amoniak nie na kwas azotowy ale na azotawy. Winogradzkiemu udało się jednak później³⁾ wyosobnić z ziemi drugi ferment, który znajdujące się w płynie azotyny zamieniał na azotany. W ten sposób udowodnił Winogradzki, że nitryfikacja amoniaku, t. j. utlenienie go na kwas azotowy odbywa się w dwóch okresach, pod wpływem dwu różnych mikrobu. W pierwszym okresie pod wpływem mikrobu, któremu autor daje nazwę *nitrosomonas*, amoniak zostaje utleniony na kwas azotawy. W okresie drugim pod wpływem innego mikrobu, który autor nazwał *nitrobacter*, utworzony poprzednio kwas azotawy, zostaje dalej utleniony na azotowy. W ziemi oba fermenty działają z równą energią, tak że tworzący się kwas azotawy natychmiast zamienia się na azotowy. W płynie, z powodu słabszego dostępu powietrza, *nitrosomonas* bierze górę, a *nitrobacter* dopiero wtedy zaczyna być czynnym, gdy amoniak już prawie zupełnie zniknął z płynu, t. j. gdy warunki rozwoju, dla silniejszego widocznie *nitrosomonas* stały się mniej korzystne.

¹⁾ Frankland P. S. and G. C. Transaction of the Roy Soc. London Vol. CLXXXI. 189 s. 107. Podług referatu w Jahresberichte über die Fortschritte in der Lehre der Gährungsorganismen. Braunschweig 1891. S. 107.

²⁾ Winogradzki. Annales de l'Institut Pasteur z roku 1890.

³⁾ Winogradzki. Recherches sur les organismes de la nitrification 4—5 memoire (Annales de l'Institut. Pasteur t. V. 1891).

Nitrobacter podobnie jak nitrosomonas rozwija się i wywołuje właściwą mu fermentacją, w płynie czysto mineralnego składu. Winogradzki wywoływał tę fermentację w wodzie destylowanej, do której dodawał tylko azotynu potasowego, fosforanu potasowego i zasadowego węglanu magnowego. W takim płynie nitrobacter rozwijał się pomyślnie i zamieniał azotyn potasowy na azotan. Wobec tych zjawisk nasuwało się badaczom pytanie, skąd oba fermenty czerpią węgiel potrzebny do ich rozwoju. Czyżby ilość materji organicznej była w nich tak mała, żeby do jej wytworzenia mogły wystarczyć jakieś ślady zanieczyszczeń wody destylowanej i soli mineralnych używanych do przyrządzania płynów żywiących? Bynajmniej. Bo naprzód, takich zanieczyszczeń w doświadczeniach Winogradzkiego prawie wcale nie było, skoro on z największą skrupulatnością starał się o to, żeby wszystkie materiały, których używał do przyrządzania swych płynów, były zupełnie pozbawione materji organicznych, a powtóre rozwój tych mikroorganizmów połączony jest z produkcją materji organicznej, wystarczającą do tego, aby ją ilościowo oznaczyć. Winogradzki po skończonym doświadczeniu oznaczał ilość węgla materji organicznej, zawartej w płynach, w których się odbywała nitryfikacja. Jakoż pokazało się, nie tylko że ta ilość nie była tak bardzo mała, ale nadto że była ona prawie ściśle proporcjonalna do ilości amoniaku utlenionego na kwas azotawy. I tak w czterech różnych kulturach analizy wykazały:

	1	2	3	4
utlenionego azotu	0,722 g.	0,5061 g.	0,9283 g.	0,8154 g.
węgla w materji organicznej	0,0197 „	0,0152 „	0,0264 „	0,0224 „
Stosunek	1: 36,6	1: 33,3	1: 35,2	1: 36,4.

Porównawcze oznaczenia węgla materji organicznej w płynach niezakażonych, w których zatem nie odbywała się nitryfikacja azotu, ale które przez cały czas trwania doświadczenia trzymane były w tych samych warunkach co płyny fermentujące, wykazywały w nich za ledwo ślady materji organicznych.

Wobec takich rezultatów nie można było wątpić, że mikroby nitryfikacyjne czerpią węgiel z innego jakiegoś źródła aniżeli z przypadkowych zanieczyszczeń płynu materjami organicznymi, i że z tego źródła materia organiczna gromadzi się w fermentującym płynie. Pytanie jakim być może to źródło. Winogradzki twierdzi, że źródłem tem był węgiel węglanu magnowego znajdującego się w płynie, ostatecznie więc kwas węglowy, tylko nie wolny ale w postaci soli magnowej. Byłby to pierwszy przykład tworzenia się materji organicznej z kwasu węglo-

wego w organizmie niezielonym i to bez wpływu światła. Proces tego rodzaju zbyt jest ważny pod względem teoretycznym, aby nie zasługiwał na dokładniejsze jeszcze zbadanie i usunięcie wszelkich możliwych wątpliwości, jakie nasuwałyby się mogły w uznaniu go za fakt udowodniony. Wątpliwości takie podniesione były nie bez pewnej podstawy, przez Elfinga, wkrótce po ukazaniu się pracy Winogradzkiego¹⁾.

Badacz ten zauważył, że pleśń *Briarea* rozwijała się w płynie żywiącym, złożonym wyłącznie z wody destylowanej i odpowiednich soli mineralnych, że jednakże w takim samym płynie nie rozwijała się, jeżeli flaszkę z płynem żywiącym, w którym ją wysiano, zatkało korkiem, przez który przechodziła rurka wypełniona kawałkami wodnika potasowego.

Doświadczenie to zdawało się wskazywać niewątpliwie, iż owa pleśń żywi się bezwodnikiem węglowym, zwłaszcza przemawiało za tem spostrzeżenie, że odgraniczenie powietrza kolbki od powietrza zewnętrznego ciałem pochłaniającem bezwodnik węglowy, jakim jest wodnik potasowy, wstrzymywało rozwój pleśni. A jednak, mimo tak łudzących pozorów, dokładniejsze zbadanie sprawy nie potwierdziło tego przypuszczenia, albowiem pokazało się, że w kolbkach odgraniczonych wodnikiem potasowym od zewnątrz, pleśń nie rozwiała się nawet i wtedy, gdy do ich powietrza doprowadzano umyślnie bezwodnik węglowy. A więc odgraniczenie powietrza kolbki od zewnątrz wodnikiem potasowym, nie dlatego wstrzymywało rozwój pleśni, że nie dopuszczało do niej bezwodnika węglowego, ale dlatego, że wstrzymywało dostęp do wpływu żywiącego innych jakichś ciał, z których grzyb istotnie czerpał pokarm węglowy. Ciałem tem był w tym przypadku kwas octowy lub jego aldehyd, których małe ilości znajdowały się w powietrzu laboratorium. Istotnie vegetacja pleśni była bardzo żywa, jeżeli w sąsiedztwie kolby z kulturą znajdowało się naczynie z octem.

Na mocy tych spostrzeżeń Elfing przypuszczał, że i w doświadczeniach Winogradzkiego mogło się odbywać coś podobnego, że i tu nie jest rzeczą wykluczoną, aby mikroby nitryfikacyjne nie czerpały węgla z jakichś lotnych organicznych połączeń, któreby się z powietrza rozpuszczały w wodzie pożywki mineralnej.

Prawda, że Winogradzki robił porównawcze oznaczenia materij organicznych, zawartych w płynie zakażonym i niezakażonym nitromonadami, i że w tym ostatnim znajdował nawet po najdłuższym jego

¹⁾ Elfing. Studien über die Einwirkung des Lichtes auf die Pilze. Helsingfors. 1890. s. 65.

staniu ledwo ślady organicznych połączeń ale i ten fakt rozstrzygającym jeszcze nie jest. Istotnie, przypuścićby można, że mamy tu do czynienia ze związkami organicznymi trudno rozpuszczającymi się w wodzie. Takie związki w płynie jałowym nawet po najdłuższem z niem zetknięciu się nie mogłyby się w znaczniejszej ilości nagromadzić, ale tam gdzieby w miarę swego rozpuszczania się były zużywane, przez rozwijające się mikroby, rozpuszczałyby się w coraz nowych ilościach i w ten sposób tworząca się z nich materya organiczna stopniowo gromadziłaby się w płynie fermentującym.

Ze względu na wielką teoretyczną doniosłość odkrycia Winogradzkiego, tyczącą się sposobu żywienia się fermentów nitryfikacyjnych, sądziłem, że rzecz zasługuje na ponowne doświadczalne zbadanie w celu stanowczego usunięcia nastęrczających się wątpliwości.

Rozstrzygnięcie więc pytania, w jakiej formie fermenty nitryfikacyjne pobierają pokarm węglowy, stanowi główny przedmiot niniejszej rozprawy. W toku jednak pracy nastęrczyła się też sposobność roztrząśnięcia innego jeszcze pytania, mianowicie: czy pod wpływem fermentów nitryfikacyjnych wszystkich azot amoniakalny przechodzi w odpowiednie związki kwasowe, czy też część jego wydziela się w stanie wolnym.

Tem pytaniem nie jednokrotnie już zajmowali się różni badacze i nie zawsze zgodne otrzymywali rezultaty. Po największej części odnajdywano w formie świeżo utworzonych kwasów mniej azotu, niż go ubyło z formy amoniaku. Tak np. Winogradzki odnajdywał w swoich płynach w formie kwasu azotawego a częściowo i azotawego tylko około 90% tej ilości azotu, jaka ubyła z płynu w formie amoniaku.

Wagner robiąc doświadczenia nad nitryfikacją soli amoniakalnych w ziemi, odnajdywał także w formie azotanów nie więcej jak 85—90% tej ilości azotu, którą dodawał do ziemi w postaci siarkanu amonowego. Schlösing¹⁾ umieszczał w zamkniętem naczyniu, oznaczoną ilość powietrza i pewną ilość ziemi z dodatkiem soli amonowych, a po upływie odpowiedniego czasu oznaczał w ziemi ubytek amoniaku i przybytek kwasu azotowego, a w powietrzu przybytek wolnego azotu. Rezultaty tych doświadczeń nie zawsze były jednakowe: czasem, a mianowicie wtedy, gdy soli amonowych mało dodano do ziemi, odnajdywano w formie kwasu azotowego blisko 98% azotu w nich zawartego, a więc azot amoniakalny prawie bez żadnej straty przechodził w kwas azotowy. Odpowiednio do tego, w powietrzu naczynia, w którym robiono doświadczenie znaleziono ilość azotu tylko niespełna o 1% większą niż

¹⁾ Comptes rendus 1889. T. 109.

na początku doświadczenia, a więc wolny azot nie wydzielał się tutaj prawie wcale. Jeżeli soli amonowych dodano do ziemi więcej, wydajność kwasu azotowego z tych soli była mniejszą a wydzielanie się azotu gazowego obfitsze; np. w jednym z doświadczeń odnaleziono w formie kwasu azotowego tylko 95% azotu pierwotnie dodanego do ziemi, a w powietrzu naczynia stwierdzono przybytek przeszło 5 cm³. wolnego azotu na 0,2 g. amoniaku utlenionego na kwas azotowy. Największe jednak ilości wolnego azotu wydzielały się wtedy, gdy prócz soli amoniakalnych dodano jeszcze do ziemi azotynów. W jednym z takich doświadczeń wydzieliło się np. 11,3 cm³. wolnego azotu na niespełna 0,2 g. amoniaku zamienionego na kwas azotowy. We wszystkich tych doświadczeniach odbywały się oba peryody procesu nitryfikacyjnego, nawet w doświadczeniach Winogradzkiego tworzył się nie tylko kwas azotawy ale i azotowy: nie można więc z tych doświadczeń na pewno wnioskować, czy wydzielanie się wolnego azotu zależy wyłącznie od przechodzenia amoniaku w kwas azotawy czy też raczej od utleniania się tego ostatniego na kwas azotowy. W naszych poniżej opisanych doświadczeniach odbywała się, jak później zobaczymy, jedynie przemiana amoniaku na kwas azotawy, kwas azotowy nie tworzył się przy tem wcale. W doświadczeniach nie używano ziemi tylko płynów żywiących, nie zawierających żadnych połączeń organicznych. Dlatego możemy na pewno wnosić, że wszystkie przemiany, jakie w płynach stwierdzono, stanowiły część składową jedynie pierwszej fazy procesu nitryfikacyjnego, t. j. przemiany amoniaku na kwas azotawy.

Rozpatrzmy się teraz w samym przebiegu doświadczeń.

II. Doświadczenia w naczyniach otwartych.

Doświadczenie pierwsze.

W wyborze metody kierowałem się następującem rozumowaniem. Winogradzki udowodnił, że nitryfikacja amoniaku, a z nią i rozwój odpowiednich fermentów, odbywa się bardzo dobrze w płynie, który nie zawiera nic innego jak tylko: siarkan amonowy, mający ulegać nitryfikacji, zasadowy węglan magnowy i małą ilość fosforanu potasowego.

Ponieważ w płynie takim, w chwili zakażenia go fermentem nitryfikacyjnym, nie było ani śladu jakiegokolwiek organicznych związków, przeto rozwijający się ferment mógł czerpać węgiel tylko z jednego z trzech następujących źródeł:

1-o Albo, jak chce Winogradzki, z zasadowego węglanu magnewego znajdujacego się w płynie.

2-o Albo z bezwodnika węglowego rozpuszczajacego się powoli w płynie żywiącym z powietrza.

3-o Albo z lotnych związków organicznych, znajdujących się w otaczającym powietrzu i rozpuszczających się powoli w płynie żywiącym, jak się to działo w doświadczeniach Elfinga nad żywieniem się Briarea.

Aby rozstrzygnąć, która z tych trzech możliwości istotnie jest prawdziwa, należało kolejno wyłączać jedne z tych źródeł, pozostawiając innym dostęp do mikrobów i badać, jak takie wyłączenie będzie odziaływać na nitryfikacyę.

Przystępując do doświadczenia, należało przedewszystkiem postarać się przynajmniej o przybliżenie czystą kulturę fermentu nitryfikacyjnego. Otrzymałem ją z łatwością trzymając się ściśle przepisu Winogradzkiego.

Płyn złożony ze 100 cm³. wody dwukrotnie destylowanej (drugi raz z retorty szklanej z dodatkiem nadmanganianu potasowego i nieco kwasu siarkowego) 0,1 g. siarkanu amonowego, 0,1 g. fosforanu potasowego i 1 g. zasadowego węglanu magnewego zakażono małą ilością ziemi, a w miarę znikania przez nitryfikacyę amoniaku dodawano małe ilości siarkanu amonowego. Gdy nitryfikacya znacznie postąpiła, przeszczepiano kilkakrotnie ferment do płynu świeżego, aż otrzymano prawie jednorodną wegatacyę mikrobów, odpowiadającą fermentowi azotawemu Winogradzkiego. Opisanego przez Winogradzkiego mikrobu drożdżowego nie obserwowano. Mając już przybliżenie czystą hodowlę fermentu azotawego, postąpiono w sposób następujący:

Do pięciu kolb Erleumayerowskich, mających około 1/2 litra objętości, nalano po 100 cm³. cieczy powyżej wskazanego składu; cztery z nich zakażono dodając do każdej kropelkę kultury fermentu azotawego wziętą z dna naczynia, z którem się odbywała nitryfikacya, piątą pozostawiono bez zakażenia.

Kolbę z płynem niezakażonym i jedną z kolb z płynem zakażonym pozostawiono po zatkaniu ich watą na wolnem powietrzu, trzy pozostałe kolby z płynami zakażonymi umieszczono na czarkach szklanych i nakryto kloszami. Dla zamknięcia kloszów od dołu nalano.

- 1) na jedną czarkę roztworu wodnika potasowego,
- 2) na drugą roztworu nadmanganianu potasowego,
- 3) na trzecią stężonego kwasu siarkowego.

Przez użycie do zamknięcia klosza wodnika potasowego chciano wyłączyć wpływ bezwodnika węglowego z powietrza.

Przez użycie nadmanganianu potasowego lub stężonego kwasu siarkowego spodziewano się uniemożliwić a przynajmniej bardzo utru-

dnie dostęp jakichbądź lotnych organicznych połączeń do zakażonych płynów.

Tak urządzając doświadczenie, spodziewać się należało, że jeżeli mikroby nitryfikacyjne czerpią węgiel z węglanu magnezowego, to we wszystkich czterech fiaskach nitryfikacja będzie się odbywać z równą łatwością. W razie gdyby go czerpały z bezwodnika węglowego powietrza, to zamknięcie naczyń wodnikiem potasowym powinnoby uniemożliwić nitryfikację, odgraniczenie ich zaś kwasem siarkowym lub nadmanganianem potasowym nie powinno jej wstrzymywać.

Przyjmując nareszcie, że pokarmem węglowym mikrobów byłyby lotne organiczne połączenia, to ponieważ spodziewać się było można, że każda z trzech użytych cieczy nie dopuści ich do wnętrza klosza, nitryfikacja powinna się odbywać tylko w kolbie pozostawionej na wolnym powietrzu.

Przebieg nitryfikacji śledzono w ten sposób, że od czasu do czasu badano ciecz co do zachowania się ich względem odczynników na amoniak i na kwas azotawy. Do wykrywania amoniaku używano odczynnika Nesslera, do wykrywania kwasu azotawego dwufenilaminy rozpuszczonej w stężonym kwasie siarkowym oraz roztworu skrobi z jodkiem potasu i rozcieńczonym kwasem siarkowym.

Ciecz ustawiono i zakażono kulturami nitrosomonas dnia 7 kwietnia 1892 r.

Dnia 7 maja pierwszy raz badano zachowania się cieczy wobec odczynników.

W cieczy niezakażonej zmiany nie było, t. j. amoniak znajdował się obficie, kwas azotawy nie było ani śladu.

W cieczach zakażonych znaleziono, co następuje:

1) Naczynie na wolnym powietrzu. Reakcja na amoniak znikła prawie zupełnie, reakcja na kwas azotawy bardzo silna.

2) Naczynie zamknięte stężonym kwasem siarkowym. Amoniak ledwo ślady, kwas azotawy obficie.

3) Naczynie zamknięte nadmanganianem potasowym: tak samo jak w poprzednim razie.

4) Naczynie zamknięte wodnikiem potasowym: reakcja na amoniak równie silna, jak na początku doświadczenia, azotawy ani śladu.

Do cieczy, z których amoniak znikł, dodano na nowo po 50 mg. siarkanu amonowego natomiast ciecz odgraniczona od powietrza wodnikiem potasowym, w którym nitryfikacja w soli się nie objawiła, ponownie zakażono kroplą kultury nitrosomonas.

Dnia 28 maja badano ponownie te hodowle.

Ciecz niezakażona nie wykazywała zmiany. Co do cieczy zakażonych, to na wolnym powietrzu, nad stężonym kwasem siarkowym i nad nadmanganianem potasowym-amoniaku były ledwo ślady a azotyny znajdowały się bardzo obficie, nad wodnikiem zaś potasowym ciecz była bez zmiany, nie znaleziono ani śladu reakcyi na azotyny.

Dnia 8 czerwca w cieczy nad wodnikiem potasowym zmiany niema i ani śladu nitryfikacyi.

Płyny na wolnym powietrzu nad kwasem siarkowym i nad nadmanganianem potasowym nie zawierają już ani śladu amoniaku, a dają bardzo silną reakcyą kwasu azotawego.

Dodano do płynów, z których znikł amoniak, po 0,1 g. siarkanu amonowego.

Dnia 30 czerwca płyn nad wodnikiem potasowym nie daje żadnej reakcyi ani z dwufenilaminą, ani z jodkiem potasu w roztworze skrobiowym, inne zakażone płyny zawierają bardzo dużo azotynów ale dają wyraźną jeszcze reakcyą amoniaku.

Dnia 10 lipca płyn nad wodnikiem potasowym nie zawiera ani śladu azotynów, amoniak obficie.

Płyn na wolnym powietrzu zawiera już tylko ślady amoniaku a bardzo dużo azotynów.

Płyny nad kwasem siarkowym zawierają bardzo dużo azotynów ale dają też jeszcze wydatną reakcyą z odczynnikiem Nesslera.

Całe to doświadczenie wykazuje zatem, że gdy powietrze otaczające płyn żywiący odgraniczone jest od powietrza zewnętrznego wodnikiem potasowym nitryfikacya mimo zakażenia płynu odpowiednim fermentem nie może się odbywać, natomiast odgraniczenie od powietrza zewnętrznego nadmanganianem potasowym albo kwasem siarkowym stężonym zwalnia wprawdzie cokolwiek proces nitryfikacyjny, ale go bynajmniej nie wstrzymuje.

Doświadczenie drugie.

Doświadczenie drugie wykonano w zupełnie taki sam sposób, jak pierwsze. Dnia 7 lipca zakażono dwa płyny po 100 cm³. w kolbach Erlenmayerowskich kroplami wziętymi z kultur pierwszego doświadczenia. Jedną kolbę zatkano watą i postawiono na wolnym powietrzu, drugą wstawiono pod klosz zamknięty od spodu wodnikiem potasowym.

Dnia 2 września w kolbie na wolnym powietrzu amoniaku niema już prawie ani śladu, kwas azotawy jest bardzo obficie; w kolbie nad

wodnikiem potasowym ani śladu nitryfikacji; do kolby pierwszej dodano znowu 50 cm³. płynu.

Dnia 5 listopada — na wolnem powietrzu wszystek amoniak zniknął, nad wodnikiem potasowym ani śladu nitryfikacji; do pierwszej kolby dodano znowu 50 mg. siarkanu amonowego.

Dnia 15 listopada na wolnem powietrzu amoniak zniknął, dodano znów 0,1 g. siarkanu amonowego; nad wodnikiem potasowym ani śladu nitryfikacji.

Dnia 3 grudnia: na wolnem powietrzu amoniak nie zniknął, dodano znów 0,1 g. siarkanu amonowego, nad wodnikiem potasowym ani śladu nitryfikacji.

Dnia 8 grudnia: na wolnem powietrzu amoniak zniknął, dodano znowu 10 g. amoniaku; nad wodnikiem potasowym ani śladu nitryfikacji; płyn zakażono ponownie kulturą nitrosomonas.

Dnia 4 stycznia na wolnem powietrzu amoniak zniknął zupełnie; nad wodnikiem potasowym mimo ponownego zakażenia płynu nie było ani śladu nitryfikacji.

I w tem więc doświadczeniu potwierdziło się w zupełności, że odgraniczenie powietrza otaczającego płyn zakażony od powietrza zewnętrznego wodnikiem potasowym uniemożliwia nitryfikacyą amoniaku, a więc widocznie wodnik potasowy pochłania te substancye, z których ferment czerpie pokarm węglowy.

Wnioski z doświadczeń w naczyniach otwartych.

Z obu powyżej opisanych doświadczeń możemy wyprowadzić następujące wnioski.

1-o Że węglan magnowy w płynie się znajdujący, nie może sam przez się dostarczać pokarmu węglowego fermentowi azotowemu; bo gdyby to było możliwe, to odgraniczenie kultur od powietrza zewnętrznego wodnikiem potasowym, nie wstrzymywałoby nitryfikacji.

2-o Że jest rzeczą bardzo mało prawdopodobną, aby lotne połączenia organiczne służyły za pokarm fermentowi nitryfikacyjnemu, bo gdyby tak było, to nitryfikacya byłaby się prawdopodobnie nie odbywała tam, gdzie kultury były od zewnątrz odgraniczone kwasem siarkowym lub nadmanganianem potasowym.

3-o Że jest rzeczą w najwyższym stopniu prawdopodobną, że źródłem węglowego pokarmu fermentu azotowego jest bezwodnik węglowy, rozpuszczający się z otaczającego powietrza w płynie żywiącym.

Pierwszy z tych trzech wniosków musi być uważany za zupełnie pewny, dwa drugie pozostawiają jeszcze pewne wątpliwości; bo jakkolwiek mało jest prawdopodobne, ale przecież możliwe, że w doświadczeniach naszych pokarmem węglowym fermentu były jakieś lotne organiczne połączenia (np. kwas octowy). Możliwy byłoby przypuszczenie, że takie połączenia były pochłaniane przez wodnik potasowy, ale dyfundowały przez kwas siarkowy i nadmanganian potasowy.

Dyfuzja taka nie jest wprawdzie prawdopodobną, ale nie można stanowczo twierdzić, by była niemożliwą.

III. Doświadczenia w naczyniach zamkniętych.

Doświadczenie trzecie.

1. Urządzenie doświadczenia, przyrządy i ogólny plan postępowania.

Wobec powyżej wymienionych wątpliwości sądziłem, że należało wykonać doświadczenie w warunkach takich, żeby dostęp lotnych organicznych połączeń do płynu był bezwarunkowo wykluczony, tak aby w otoczeniu zakażonego płynu prócz bezwodnika węglowego nie było żadnych innych połączeń węglowych. Sądziłem, że tym warunkom najłatwiej da się zadosyć uczynić w ten sposób, że doświadczenie wykona się w naczyniu szczelnie zamkniętym, w którym płyn zakażony stykałby się tylko z tem powietrzem, któreby się w naczyniu od początku doświadczenia znajdowało. W tych warunkach odbywanie się nitryfikacyi lub jej brak zależałyby wyłącznie od tego, czy ferment azotowy znajdowałby wszystkie pokarmy, jakie mu są potrzebne w płynie i gazie, które były zamknięte w naczyniu, w szczególności zaś czy znajdowałby tam odpowiedni pokarm węglowy. Jeżeli prawdą jest coś z poprzednich doświadczeń wywnioskowali, że kwas węglowy związany w zasadowym węglanie magnowym nie może służyć dla nitrosomonas za pokarm węglowy, to w takim razie płyn powyżej wskazanego czysto mineralnego składu zamknięty szczelnie w naczyniu, z niewielką tylko ilością zwykłego powietrza, nie powinienby wcale ulegać nitryfikacyi.

Jeżeli dalej prawdziwym jest nasz wniosek, że ferment azotawy czerpie pokarm węglowy z bezwodnika węglowego powietrza, to dość by było do powietrza zamkniętego w naczyniu dodać pewną ilość bezwodnika węglowego, aby wywołać w płynie proces nitryfikacyjny. Jeżeli wreszcie nitrosomonas czerpie pokarm węglowy z jakich lotnych organicznych połączeń, to dodatek bezwodnika węglowego do powietrza

zamkniętego nie umożliwi nitryfikacji zakażonego płynu amoniakalnego, ale za to będzie można wywołać nitryfikację przez umieszczenie w zamkniętym naczyniu nad płynem zakażonym osobnego małego naczynka, zawierającego np. kwas octowy, w takim bowiem razie małe ilości tego lotnego kwasu, ulatniając się, będą się powoli rozpuszczać w płynie zakażonym i służyć za pokarm dla nitrosomonas.

Wychodząc z takich założeń, użyto do doświadczenia trzy porcje płynu po 100 cm³. W każdej porcji znajdowało się 0,0477 g. azotu w postaci siarkanu amonowego, 0,1 g. KH_2PO_4 , około 1 g. zasadowego węglanu magnezowego (MgO , MgCO_3). Każdą z tych porcji płynu umieszczono we flasce z grubego szkła, mającej około litra objętości i 10 cm. średnicy dna. Flaszkę zatkało zwykłym korkiem, w którym tkwiły dwie rurki Fig. 1. Rurka *a* pod kątem prostym zgięta,

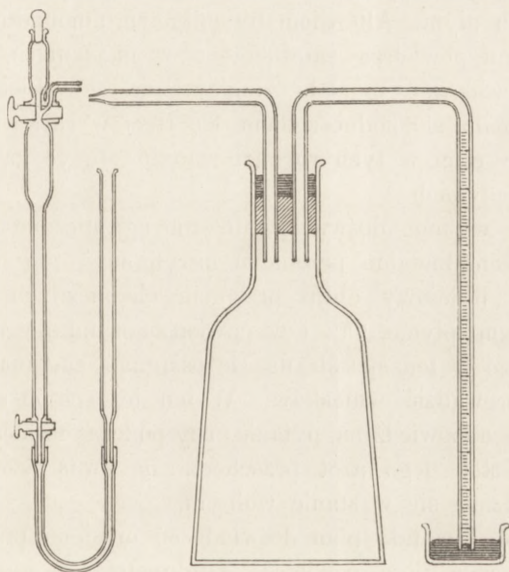


Fig. 1.

na końcu wyciągnięta i zatopiona służyła do wzięcia próbki gazu do analizy na końcu doświadczenia, rurka *b* dwa razy pod kątem prostym zgięta była przez cały ciąg doświadczenia zanurzona w rtęci. Dla uszczelnienia zamknięcia flaszką korek wsunięty był wgłąb jej szyjki i zalany u góry rtęcią.

Naturalnie przed zamknięciem każdej flaszką zakażono płyn w niej się znajdujący kroplą kultury nitrosomonas wziętą z dna naczynia.

W jednej z trzech użytych do doświadczenia flaszek, mianowicie we flaszcze *A* zamknięte było z płynem zwykle powietrze bez żadnego dodatku. Licząc w powietrzu 0,04% bezwodnika węglowego wypada, że we flaszcze znajdowało się nie więcej, jak 0,35 cm³ czyli 0,7 mg. tego gazu. Do drugiej flaszki *B* dopuszczono 29,3 cm³. bezwodnika węglowego, w trzeciej *C* umieszczono naczynko z 5 cm.³ kwasu octowego 28,9%.

W ten sposób kultura we flaszcze *A* miała być pozbawioną wszelkiego pokarmu węglowego prócz węgla węglanu magnezowego — kultura flaszki *B* miała zapewniony dostęp wolnego bezwodnika węglowego, kultura *C* mogła brać pokarm węglowy z par kwasu octowego.

Urządzenie doświadczenia we fiaskach zamkniętych opatrzonych rurkami, zanurzonemi w rtęci, miało tę dogodność, że pozwalało śledzić bieg procesu nitryfikacyjnego bez otwierania naczynia i badania zamkniętego w nich płynu. Albowiem nitryfikacya amoniaku odbywała się tu kosztem tlenu powietrza zamkniętego w naczyniach, zużywanie się więc tlenu powodować musiało zmniejszanie się objętości powietrza, które uwidoczniło się podnoszeniem się rtęci w rurkach *b*. Tak więc podnoszenie się rtęci w tych rurkach mogło służyć za miarę postępu nitryfikacyi w płynach.

Jednakże w tem doświadczeniu nie ograniczono się na takim tylko jakościowem badaniu przebiegu nitryfikacyi, ale starano się uzyskać całkowity ilościowy obraz przemian chemicznych, odbywających się tak w samym płynie, jak i w powietrzu zamkniętem w naczyniu, gdyż sądzono, że w ten sposób da się osiągnąć zupełną pewność mających się wyprowadzić wniosków. W ten też sposób spodziewano się jeszcze uzyskać odpowiedź na pytanie: czy podczas fermentacyi azotawej amoniaku wszystek jego azot przechodzi na kwas azotawy, czy też część jego wydziela się w stanie wolnym.

Ze względu na taki plan doświadczeń musiano przedewszystkiem dokładnie oznaczyć ilość powietrza zamkniętego w każdym naczyniu. Objętość każdej kolby wymierzono, ważąc ją najprzód w stanie suchym, a potem ponownie po wypełnieniu jej wodą destylowaną po znak zrobiony na szyjce. Oczywiście obliczając stąd pojemność kolby uwzględniono temperaturę wody. Zamykając kolbę wpychano korek dokładnie po ów znak zrobiony w szyjce. Do powietrza znajdującego się w kolbie należało jeszcze doliczyć powietrze zawarte w obu szklanych rurkach tkwiących w korku zamykającym flaszę. Pojemność tych rurek oznaczono wypełniając je rtęcią i ważąc następnie tę rtęć. W rurce *b*, która w swej dolnej części do wysokości 200 mm. opatrzona była milimetrową podziałką, przestrzeń, jaką zajmowało powietrze zmniejszała

się w miarę podnoszenia się w niej rtęci, dla tego rurka ta była w swej dolnej części za pomocą rtęci skalibrowaną.

Mając te dane, można było każdej chwili oznaczyć dokładnie ilość powietrza znajdującego się w którejkolwiek z trzech flaszek do doświadczenia użytych.

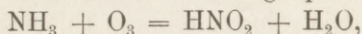
Objętość pozorną tego powietrza v' była = pojemności kolby po znak, do którego dosunięty był korek, + pojemności rurki a + pojemności rurki b , do powierzchni rtęci w tej rurce, — 100 cm³. płynu — objętość jaką zajmował węglan magnowy (jego waga podzielona przez 2) a w kolbie, gdzie zawieszono naczynko z kwasem octowym jeszcze — objętość kwasu octowego — objętość szkła naczynka i nitki, na której ono było zawieszone. Z tej objętości pozornej, obliczono objętość rzeczywistą, t. j. zredukowaną do 0,76 m. ciśnienia 0° temp. i stanu su-

chości podług znanego wzoru $v = \frac{v' \cdot (b - b' - b'')}{0.00366t \cdot 0.76}$, w którym to wzorze b' było wysokością rtęci w rurce b , do której jeszcze doliczano depresją kapilarną, odpowiadającą szerokości rurki.

Chcąc śledzić postęp nitryfikacyi w każdym z pojedynczych naczyn, odczytywano co jakiś czas wysokość rtęci w rurkach b , temperaturę i stan barometru i stąd obliczano zmniejszanie się całkowitej objętości powietrza w każdym z naczyń.

To zmniejszenie objętości odpowiadało przybliżeniu ilości tlenu zużytej do utleniania amoniaku, a więc dawało pewną miarę postępu nitryfikacyi. Mówimy odpowiadało przybliżeniu a nie dokładnie, bo nie były przy tem wykluczone zmiany w zawartości bezwodnika węglowego w powietrzu, bądź przez rozpuszczenie się pewnej jego części w wodzie i połączenie się z zasadowym węglanem magnowym, bądź znowu przez wydzielenie pewnej ilości tegoż bezwodnika z węglanu magnowego wskutek rugowania go przez tworzący się kwas azotawy. Rozumie się, że przybliżony obraz biegu procesu nitryfikacyjnego mogło dawać tylko istotne stopniowe zmniejszanie się ogólnej objętości gazów, nie zaś samo podnoszenie się rtęci w rurce b , bo, wobec bardzo znacznej objętości naczynia, podnoszenie się rtęci w tej rurce, często nawet dość znaczne, mogło być spowodowane obniżeniem się temperatury laboratorium, albo podniesieniem się stanu barometrycznego. Po kilku miesiącach, gdy objętość zamkniętych gazów już przestała się zmniejszać, przystępowano do zakończenia doświadczenia. Oznaczywszy objętość gazów w całym naczyniu, brano zapomocą pipety Seegera próbkę gazów, przeprowadzono ją do eudyometru i poddawano całkowitej analizie. Z analizy tej prze-liczano wiele każdego z pojedynczych gazów znajdowało się z końcem

doświadczenia w całym naczyniu i zestawiono stąd obraz zmian, jakim gazy naczynia uległy w ciągu doświadczenia. Obok tego wykonywano analizę płynu, mianowicie oznaczano w nim ilość pozostałego amoniaku i ilość wytworzonego kwasu azotawego. Z takich oznaczeń można było skontrolować, czy ilość tlenu, jaka znikła z powietrza, odpowiada ilości wytworzonego z amoniaku kwasu azotawego podług wzoru:



jako też czy ilość kwasu azotawego wytworzonego odpowiadała ubytkowi amoniaku, a jeśli była od niego mniejsza, to czy niedoborowi azotu w płynie odpowiadał odpowiedni przybytek wolnego azotu w powietrzu naczynia.

Przygotowywano doświadczenie w następujący sposób:

Płyny w naczyniach zakazono dnia 12 lipca 1892 i zamknięto je korkami w sposób wyżej opisany. Zanim rurki *b* pozanurzano w rtęci dla ostatecznego zamknięcia naczyń, ogrzano lekko każde z nich przez dotknięcie ręką, a to w tym celu, aby potem po powrocie naczyń do temperatury pokoju rtęć w rurkach *b* nieco się podniosła. Podniesienie poziomu rtęci w rurkach *b* ponad poziom rtęci zewnętrznej było z dwóch względów potrzebne, najprzód, aby w ten sposób można było poziom rtęci w rurce dokładnie odczytać powtórę, żeby uniknąć wypchnięcia pewnej ilości powietrza z naczynia w razie podniesienia się temperatury pokoju lub obniżenia się ciśnienia barometrycznego. W naczyniu *B*, gdzie miał być dopuszczony bezwodnik węglowy, należało rtęć w rurce *b* podnieść do znaczniejszej nieco wysokości, żeby zrobić miejsce dla mającego się wpuścić bezwodnika węglowego. Uskuteczono to z łatwością, łącząc rurkę *a* z pipetą gazową i wyciągając zapomocą tej ostatniej pewną ilość powietrza z kolby *B*, poczem dopiero rurkę *a* zatopiono.

Po pozostawieniu naczyń czas jakiś w spokoju przystąpiono do odczytania dat potrzebnych do oznaczenia objętości powietrza w naczyniach, t. j. poziomu zewnętrznego i wewnętrznego rtęci, temperatury i stanu barometrycznego. Z dat tych pokazało się, że objętości szukane po zredukowaniu ich na 0° i 760 mm. wynosiły:

W naczyniu *A* 779,9 cm³.

„ *B* 729,4 „

„ *C* 772,3 „

Do naczynia *B* wpuszczono teraz przez dolny otwór rurki *b* pewną ilość bezwodnika węglowego¹⁾ i pozostawiwszy przyrząd czas pe-

¹⁾ O czystości tego bezwodnika węglowego przekonano się poprzednio puszczając go do epruwetki napełnionej rtęcią i zawierającej około 1 cm³. stężonego ługu potasowego. Bezwodnik węglowy w znacznej ilości puszczony był w zupełności absorbowany, pozostawiając zaledwie banieczkę powietrza wielkości lepka od szpilka.

wien w spokoju odczytano objętość ponownie. Objętość wynosiła teraz 758.7 cm³. Powietrze w naczyniu zawierało zatem na początku doświadczenia 758.7 cm³. — 729.4 = 29,3 cm³. bezwodnika węglowego, a więc ilość odpowiadającą 3,86% całkowitej objętości mieszaniny gazów zawartych w naczyniu.

Teraz od czasu do czasu ponawiano odczytania objętości powietrza we wszystkich trzech naczyniach a odczytania te po zredukowaniu do 0° i 760 mm. ciśnienia zestawione są w następującej tablicy:

2. Metody analityczne i rezultaty w liczbach.

A. Zmiany objętości gazów, znajdujących się w ciągu doświadczenia.

D a t a	III. Naczynie z czystym powietrzem		II. Naczynie z powie- trzem zawierającym 3,86% CO ₂		I. Naczynie z zwykłym powietrzem i na- czyńkiem z kwasem octowym.	
	Objętość powietrza w cm ³	Zmniejs- zenie ob- jętości od początku doświad- czenia w cm ³ .	Objętość powietrza w cm ³ .	Zmniejs- zenie ob- jętości od początku doświad- czenia w cm ³ .	Objętość powietrza w cm ³ .	Zmniejs- zenie ob- jętości od początku doświad- czenia w cm ³ .
12 lipca	779·90	0·00	758·70	0·00	772·28	0·00
17 „	—	—	758·20	0·50	771·98	0·30
10 wrześ.	769·10	10·80	721·60	37·10	725·64	46·64
19 „	768·56	11·34	704·90	53·80	719·29	52·99
23 „	766·42	13·48	696·40	62·30	716·78	55·50
4 paźdz.	758·62	21·28	684·22	74·48	711·85	60·43
12 „	750·38	29·52	681·10	77·60	711·19	61·09
22 „	739·77	41·13	676·87	81·83	706·82	65·46
30 „	—	—	—	—	706·91	65·37
15 listop.	712·86	67·04	674·95	83·75		
19 „	708·13	71·77	674·91	83·79		
25 „	698·04	81·82				
27 „	695·00	84·56				

B. Rozbiory gazów i cieczy na końcu doświadczenia.

Metody analityczne.

1. Sposób analizowania gazów.

Skoro objętość gazów w któremkolwiek z naczyń przestała się już zmniejszać, uważano doświadczenie za skończone i wykonywano odpowiednio analizy.

Dla dokonania analizy, należało przedewszystkiem przeprowadzić część gazów z naczynia do eudyometru, w którym gaz miał być analizowany. Do tego właśnie celu służyła rurka *a* (fig. 1). Rurka ta była na końcu wyciągnięta i zatopiona. Za pomocą rurki kauczukowej wypełnionej rtęcią łączono tę rurkę z rurką odprowadzającą pipety Seegera (fig. 1). Naturalnie cała pipeta była poprzednio wypełniona rtęcią.

Następnie część ssącą pipety obniżano mocno, tak aby różnica poziomów rtęci w obu ramionach pipety przenosiła o kilkanaście centymetrów wysokość rtęci w rurce *b* kolby. Teraz otwierano kran pipety i łamano za pomocą żelaznych obciążków zatopiony koniec rurki *a*. Natychmiast powietrze z kolby przechodziło do pipety i oczywiście rtęć w rurce *b* jeszcze bardziej się podniosła. Gdy już dostateczna ilość powietrza przeszła do pipety, zamykano jej kran i podnoszono część ssącą pipety, tak aby powietrze w niej zamknięte znajdowało się pod ciśnieniem o kilka centymetrów większem niż powietrze zewnętrzne, poczem dopiero zdejmowano kauczuk łączący pipetę z kolbą.

Teraz należało przelać gaz z pipety do eudyometru. Podczas tej operacyi wypełniano naprzód rurkę odprowadzającą pipety rtęcią. Do tego używano rurki pod kątem prostym zgiętej, której koniec kapilarnie wyciągnięty wsuwano do rurki odprowadzającej pipety i wpuszczano przez nią rtęć. Po dokonaniu tego łączono rurkę odprowadzającą pipety za pomocą rurki kauczukowej z rurką szklaną przewodnią, mającą przeprowadzić gaz do eudyometru. Ta ostatnia rurka miała średnicę kapilarną i, jak się samo przez się rozumie, zarówno jak rurka kauczukowa, mająca je połączyć z pipetą, była w chwili łączenia wypełniona rtęcią. Dla wszelkiego bezpieczeństwa, aby uniknąć wprowadzenia do eudyometru jakiej bańki powietrza zewnętrznego, która by się przypadkowo gdzieś w rurce znajdować mogła, nie wsuwano rurki przewodniej wprost pod eudyometr, ale zanurzwszy ją w rtęci wanianki eudyometrycznej wypuszczano pierwsze kilka baniek gazu na zewnątrz, a dopiero następnie podsuwano rurkę pod eudyometr i wpuszczano doń gazy z pipety.

Do analizy używano zwykłych eudyometrów Bunsena.

Po wprowadzeniu gazu do eudyometru, wpuszczono nad rtęć odmierzoną ilość wody, około $\frac{1}{2}$ cm³. Uskuteczniło to za pomocą wąskiej pipetki na końcu ku górze zakrzywionej i opatrzonej podziałką. Objętość gazów w eudyometrze odczytywano na menisku rtęciowym. Od tej odczytanej objętości odejmowano objętość wpuszczonej nad rtęć wody, a dodawano wielkość menisku rtęciowego.

Po odczytaniu objętości wpuszczono wodór wywiązywany elektrolitycznie za pomocą przyrządu Ehrenberga. Po pozostawieniu eudyometru przez czas jakiś w spokoju, odczytywano objętość ponownie i przepuszczano ze szpulki Rumkorfa iskrę elektryczną. Jeżeli eksplozja nie następowała zaraz, wpuszczano do eudyometru nieco mieszaniny piorunującej i ponownie przepuszczano iskrę elektryczną.

Po eksplozji odczytywano objętość gazów, a $\frac{1}{3}$ zmniejszenia tej objętości, stanowiła objętość tlenu, znajdującego się w eudyometrze. Teraz wpuszczono nad rtęć do eudyometru odmierzoną ilość wodnika potasowego i po pewnym czasie odczytywano ponownie objętość gazów. Zmniejszenie objętości wykazywało ilość bezwodnika węglowego.

Odczytywanie objętości gazów na menisku rtęciowym i odejmowanie od tego objętości wody wymierzonej podczas jej wpuszczania do eudyometru uważam za korzystniejsze, niż odczytywanie za każdym razem objętość gazów na menisku wodnym, a to z dwóch względów: 1-o, że w ten sposób za każdym oznaczeniem objętości zamiast dwa razy raz się tylko odczytuje, a więc tem samem mniej błędów się popełnia, 2-o, że odejmując od odczytanej objętości zawsze tę samą ilość wody, unika się błędów pochodzących stąd, że czasem krople wody czepiają się ścian eudyometru.

2. Sposób analizowania cieczy.

Po wzięciu próbki gazów do analizy wydobywano korek zamykający naczynie, a płyn, którego było zawsze 100 cm.³, przesączano pod pompką przez sączek asbestowy. Z filtratu brano zwykle 3 próbki po 25 cm.³. W jednej próbie oznaczono pozostały amoniak przez oddestylowanie go z wodnikiem sodowym do $\frac{1}{10}$ normalnego kwasu siarkowego, w drugiej kwas azotawy przez miareczkowanie kameleonem, w trzeciej kwas azotawy i ewentualnie azotowy metodą Schlösinga zmodyfikowaną przez Glasera¹⁾.

¹⁾ Glaser Zeitschrift für analytische Chemie 1892. S. 285,

Wypadek każdego oznaczenia rozmnożony przez 4 dawał ilość oznaczanego składnika w całych 100 cm.³ płynu. Ponieważ pewna ilość amoniaku mogła się połączyć z kwasem fosforowym i magmem, które się w płynie znajdowały, i utworzyć z nimi nierozpuszczalny fosforan amonowo magmowy, należało oznaczyć także amoniak zawarty w osadzie. W tym celu cały osad zebrany na asbestowym sączku wraz z tym sączkiem i resztą niezużytego do innych oznaczeń płynu wrzucano do osobnej kolby, rozcieńczano wodą i oddestylowano z małą ilością wodnika sodowego, chwytając amoniak do $\frac{1}{10}$ normalnego kwasu siarkowego. Odejmując od amoniaku stąd oddestylowanego ilość jego przypadającą na płyn użyty do destylacji razem z osadem, otrzymywano ilość amoniaku zawartego w samym osadzie. Ten amoniak oddestylowany z osadu, którego zresztą było bardzo nie wiele, pochodził niezawodnie z dwóch źródeł: 1-o z fosforanu amonowo-magnowego, który się w płynie łatwo mógł utworzyć przez wzajemne działanie na siebie fosforanu potasowego, zasadowego węglanu magnowego i siarkanu amonowego; 2-o z azotu przyswojonego przez mikroby i zamienionego przez nie na połączenia organiczne na części składowe protoplazmy mikrobów. Takie połączenia przez gotowanie z ługiem sodowym dla oddestylowania amoniaku musiały też ulegać rozkładowi i oddawać część swego azotu w formie amoniaku.

Rezultaty analiz.

1. Z naczynia pierwszego.

Najpierwej zakończono doświadczenie z naczyniem I, gdyż tu o ile żywym było zmniejszanie się objętości gazów w pierwszych dwóch miesiącach, o tyle rychło zwalniać się ono zaczęło, a w ciągu całego miesiąca października objętość gazów zamkniętych w kolbie zmniejszyła się już tylko o 5 cm.³ Odczytania z 22 i 30 października dały już te same wyniki, t. j. 706,9 cm.³; przystąpiono zatem do zakończenia doświadczenia.

Analiza gazów. Dnia 30 października przelano gaz do dwóch eudyometrów, jednego większego, drugiego mniejszego i poddano je analizie. Dla przykładu podamy wszystkie odczytania z jednej analizy:

Objętość pozorna powietrza, odczytana na menisku rtęciowym.	39·01 cm. ³
Objętość wprowadzonej wody 0·6 cm. ³ — wielkość menisku rtęciowego 0·18 =	0·42 „
Istotna objętość pozorna gazów	<hr/> 38·59 cm. ³

Ciśnienie 0·5189 m.

Temperatura 16·4° C.

Objętość powietrza w eudyometrze po zredukowaniu do 0° i 76 cm. rtęci: 24·124 cm.³

Po dodaniu wodoru:

Objętość odczytana	.	46·88	cm. ³
Od tego (0·6—0·18)		0·42	„
Objętość pozorna	.	46·46	cm. ³

Ciśnienie 0·5739 m.

Temperatura 17·1° C.

Objętość gazów po zredukowaniu 32·086 cm.³

Po eksplozji:

Objętość odczytana	38·56	cm. ³
Od tego	0·42	„
Objętość pozorna	38·14	cm. ³

Ciśnienie 0·5145.

Temperatura 17·1°.

Objętość po zredukowaniu równa 23·538

$$32·086 - 23·538 = 8·548 \text{ cm.}^3$$

Więc tlenu w eudyometrze $\frac{8·548}{3} = 2·849 \text{ cm.}^3$,

a że $24·124 : 2·849 = 100 : x$ więc

$$x = 11·812$$

Zatem tlenu w powietrzu kolby I pozostało 11·812‰.

Wpuszczono nad rtęć do eudyometru 0·492 cm.³ roztworu wodnika potasowego.

Po kilku godzinach odczytano:

Objętość po menisk rtęciowy	38·71	cm. ³
Do odjęcia (0·42 + 0·49)	0·91	„
Objętość pozorna gazów	37·80	cm. ³

Ciśnienie 0·5154 m.

Temperatura 18·3° C.

Objętość zredukowana gazów po zaabsorbowaniu bezwodnika węglowego 23·253 cm.³

Zatem bezwodnika węglowego $23·538 - 23·253 = 0·285 \text{ cm.}^3$.

Układając równanie $24·124 : 0·285 = 100 : x$ otrzymujemy wartość $x = 1·181$.

Zatem powietrze w kolbie zawierało 1·181‰ bezwodnika węglowego.

Zatem skład powietrza w kolbie był podług tej analizy:

Tlenu	11.812%
Bezwodnika węglowego	1.181%
Azotu	87.007%
	100.000

Podług tej analizy w 706.91 cm.³ powietrza pozostałego w kolbie na końcu doświadczenia znajdowały się następujące ilości odrębnych gazów:

Bezwodnika węglowego	8.35 cm. ³ .
Tlenu	83.50 "
Azotu	615.06 "

Przyjmując, że powietrze początkowo zamknięte w kolbie zawierało 0.04% CO₂ i 20.93% O i obliczając z tego ilość każdego z gazów znajdującą się w kolbie na początku doświadczenia, otrzymujemy następujący bilans przybytków i ubytków gazów w ciągu doświadczenia:

	CO ₂	O	N	Suma gazów
Na początku	0.31	161.64	610.33	772.28
Na końcu	8.35	83.50	615.06	706.91
	+ 8.04	- 78.14	+ 4.73	- 65.37

Tak więc analiza gazów wykazuje znaczny ubytek tlenu, a obok tego pewien przybytek wolnego azotu i bezwodnika węglowego w powietrzu zamkniętem w kolbie.

Analiza płynu. Wiemy, że 100 cm.³ płynu znajdujące się w kolbie zawierały na początku doświadczenia 0.0477 g. azotu w postaci siarkanu amonowego. Płyn odfiltrowano przez sączek asbestowy, rozdzielono na kilka porej do osobnych oznaczeń.

1) Użyto 25 cm.³ płynu. Po rozcieńczeniu go wodą, oddestylowano go z ługiem sodowym dla oznaczenia amoniaku, znaleziono 0.00056 g. azotu amoniakalnego; zatem w całych 100 cm.³ płynu pozostało 0.00224 g. azotu amoniakalnego.

2) Użyto 20 cm.³ do oznaczenia kwasu azotawego przez zakwaszenie kwasem siarkowym i miareczkowanie kameleonem, przy czem znaleziono 0.01218 g. N₂O₃ = 0.00448 g. azotu; zatem w całych 100 cm.³ płynu 0.0609 g. N₂O₃ = 0.0224 g. N.

3) Wzięto dwie próbki, w jednej 10 cm.³, w drugiej 20 cm.³ do oznaczenia ilości łącznej azotanów i azotynów metodą Schlössinga¹⁾. Przytem zebrano NO.

z 10 cm.³. 3.56 cm.³. (w 0° i pod ciśnieniem 76 cm.) = 0.00224 g. N.
z 20 " 8.31 " (" " " ") = 0.00508 " N.

¹⁾ Zeitschrift für Analytische Chemie 1892. S. 285.

Zatem na całkowite 100 cm³. płynu przypada:

podług pierwszego oznaczenia 0·0224 g. N. w formie azotanów i azotynów,
podług drugiego oznaczenia 0·0254 g. N tychże substancji.

Średnia z tych dwóch oznaczeń wypada na 0·0239 g. N.

4) Użyto 20 cm³. płynu do oznaczenia bezwodnika węglowego rozpuszczonego w płynie i znaleziono 0·020 g., co po przeliczeniu na całe 100 cm³. daje 0·100 g. CO₂

Porównyując ilość azotu azotynów znalezioną przez miareczkowanie kameleonem 0·0224 g. z ilością azotu azotynów i azotanów znaleziono metodą Schlössinga 0·0224 i 0·0254 widzimy, że liczby obu metodami znalezione zgadzają się ze sobą, bo obserwowane różnice leżą w granicach błędów analitycznych. Z tego wynika, że w naszym doświadczeniu tworzyły się jedynie azotyny, azotany zaś nie powstawały wcale, to znaczy, że odbywała się tylko pierwsza faza procesu nitryfikacyjnego, t. j. zamiana amoniaku na kwas azotawy, ten ostatni zaś nie zmieniał się wcale na kwas azotowy.

Ostatecznie tedy z pierwotnej ilości 0·0477 g. N., znajdującego się w płynie w postaci siarkanu amonowego na początku doświadczenia odnaleziono w jego końcu:

w postaci amoniaku	0·00224 g.
„ kwasu azotawego	0·02240 „
Razem	0·02464 g.

Nadto widzieliśmy, że w powietrzu zamkniętem w naczyniu odnalazło, się o 4·73 cm³. azotu więcej niż go było na początku doświadczenia, oczywiście azot ten pochodzić musiał z uwolnienia się części azotu amoniakalnego, znajdującego się w płynie.

4·73 cm³. = 0·00594 g. azotu, dodając tę ilość do azotu, odnalezionego w płynie znajdziemy:

$$0·02240 + 0·00594 = 0·02834.$$

Ilość ta jest od pierwotnie się znajdującej 0·0477 g. mniejsza o 0·01536g.

2. Z n a c z y n i a d r u g i e g o .

Doświadczenie w kolbie II zakończono dnia 19 listopada, kiedy stwierdzono, że w ciągu ostatnich czterech dni objętość powietrza w kolbie już się nie zmniejszała.

Analizy gazów z tej kolby nie udało się niestety przeprowadzić, gdyż w czasie przelewania gazu dostało się przypadkiem do pipety nieco powietrza atmosferycznego, musiano zatem ograniczyć się do analizy płynu.

Z płynu odsączonego wzięto 3 poreye po 25 cm³. na oznaczenie amoniaku, kwasu azotawego metodą miareczkową i tegoż kwasu metodą Schlössinga.

Osobno oznaczono jeszcze azot amoniakalny w osadzie. Przytem znaleziono:

Azotu amoniakalnego w 25 cm ³ .	0·0002	więc w całych 100 cm ³ .	0·0008 g.
"	"	w osadzie stałym	0·0004 "
		Więc azotu amoniakalnego razem	<u>0·0012 g.</u>

Azotu w azotynach metodą miareczkowania.

W osobnej poreyi 25 cm ³	0,01047 g.	więc w całych	
100 cm ³			0·0419 g.

W 25 cm ³ używanych do oznaczania NH ₃	0·0102	więc	
w całych 100 cm ³			<u>0·0408 "</u>
więc średnio metodą miareczkowania			0·0413 g.

Z 25 cm³ przeznaczonych do analizy metodą Schlössinga otrzymano 15·26 cm³ tlenku azotowego, co odpowiada 0·00957 g. azotu więc w 100 cm³ 0·0383 g.

Zatem tu metodą Schlössinga znaleziono nieco mniej azotu kwasów niż metodą miareczkową, co dowodzi, że i w tym razie znajdowały się w płynie tylko azotyny, azotanów nie było wcale.

Ponieważ metoda Schlössinga daje zwykle nieco za nizkie rezultaty, przyjmujemy jako pewniejsze rezultaty miareczkowania i ostatecznie znajdziemy, iż z pierwotnych 0·0477 g. azotu amoniakalnego danego do płynu pozostało na końcu doświadczenia:

azotu amoniakalnego	0·0012 g.
azotu w azotynach	<u>0·0413 "</u>
Razem odnaleziono azotu w płynie	0·0425 g.

Ubytek więc azotu w płynie wynosi 0·0477—0·0425 = 0·0052 g., które prawdopodobnie wydzieliły się z płynu jako azot wolny.

3. Z naczynia trzeciego.

W tej kolbie, do której nie wprowadzono bezwodnika węglowego ani też nie umieszczono w niej naczynka z kwasem octowym, zmniejszanie się objętości rozpoczęło się znacznie później ale nie mniej dosięgło tych samych rozmiarów co w kolbie drugiej. Ukończono doświadczenia 27 listopada, gdy objętość powietrza w kolbie z pierwotnej 779·9 cm³ zeszła na 695·34 cm³, a więc zmniejszyła się o 84·56 cm³.

Analiza gazu. Próbkę gazu z tej kolby przeprowadzono do dwóch eudyometrów: w większym użyto do analizy 27·344 cm³, w mniejszym 11·113 cm³ gazu. W obu eudyometrach pochłonięto najprzód bezwodnik węglowy zapomocą wodnika sodowego, a następnie oznaczono

ilość tlenu, i to w eudyometrze większym, przez spalenie z wodorem, w mniejszym, przez pochłonięcie pyrogalasanem potasowym. Rezultaty analizy były następujące:

W eudyometrze większym na 27·344 cm.³ użytego gazu znaleziono:

CO ₂	1·049 cm. ³	co odpowiada	3·836%
O	1846 cm. ³	„	6·752%
N	24·449 cm. ³	„	89·412%

W eudyometrze mniejszym na 11·113 cm.³ znaleziono:

CO ₂	— 0·407 cm. ³	co odpowiada	3·662%
O	— 0·742 „	„	6·676%
N	— 9·964 „	„	89·662%

Ponieważ całkowita objętość powietrza w kolbie wynosiła w końcu doświadczenia 695·34 cm.³, zatem podług powyżej zestawionych analiz znajdowało się w końcu doświadczenia w kolbie.

	Podług analizy w większym eudyometrze	Podług analizy w mniejszym eudyometrze
CO ₂	26·67 cm. ³	25·47 cm. ³
O	46·95 „	46·43 „
N	621·72 „	623·44 „
	<u>695·34 cm.³</u>	<u>695·34 cm.³</u>

Przyjmując, że powietrze pierwotne zawierało 0·04% CO₂ i 20·93% tlenu, to ponieważ objętość powietrza zamkniętego na początku doświadczenia wynosiła 779·9 cm.³, znajdziemy że na początku doświadczenia było w kolbie

CO ₂	— 0·35 cm. ³
O	— 163·35 „
N	— 616·20 „
	<u>779·90 cm.³</u>

Porównywając ilość każdego z pojedynczych gazów, znajdujących się w kolbie na początku i na końcu doświadczenia, znajdziemy następujące różnice. Na końcu doświadczenia:

podług analizy w większym eudyometrze	podług analizy w mniejszym eudyometrze
CO ₂ + 26·32 cm. ³	+ 25·12 cm. ³
O — 116·40 „	— 116·92 „
N + 5·52 „	+ 7·24 „

I tu zatem, podobnie jak w doświadczeniu z naczyniem pierwszym, stwierdzony został w sposób niezawodny przybytek wolnego azotu w ciągu doświadczenia, to znaczy przejście pewnej ilości azotu amoniakalnego w stan wolny.

Analiza pŁynu. Z odfiltrowanego przez sŁączek asbestowy pŁynu wzięto 3 porceje po 25 cm.³ do pojedynczych oznaczeń. Z osadu znajdujĄcego się na asbestowym sŁączku oddestylowano amoniak osobno.

Rezultaty analizy były następujĄce:

Azotu amoniakalnego w 25 cm. ³ znaleziono	0·00054,
więc w caŁych 100 cm. ³	0·00216 g.
Azotu amoniakalnego w osadzie na sŁączku asbesto-	
wym byŁo	0·00262 „ ¹⁾
Razem azotu amoniakalnego znaleziono	<u>0·00478 g.</u>

Azotu azotynów znaleziono w 25 cm.³ przez miareczkowanie kameleonem 0·009223, z czego wypada na caŁe 100 cm.³ 0·03689.

Z 25 cm.³ przeznaczonych do oznaczenia azotu azotynów i azotanów metodĄ Schlössinga otrzymano 15·3 cm.³ tlenku azotowego, co odpowiada 0·00871 g. azotu, co daje na caŁe 100 cm.³ pŁynu 0·03484 g.

I tu zatem ilość azotu azotynów znaleziona metodĄ Schlössinga jest nieco niźszą, niź znaleziona przez miareczkowanie kameleonem, co do-
wodzi, że azotanów zupełnie w pŁynie nie byŁo.

Na podstawie tych analiz możemy zestawieć następujĄcy bilans azotu:

Na poczĄtku doświadczenia azotu amoniakalnego 0·0477 g.
Na końcu doświadczenia:

	metodĄ miareczkowania	metodĄ Schlössinga
Azotu amoniakalnego	0·00478 g.	0·00478 g.
Azotu azotynów	0·03689 „	0·03484 „
Razem azotu w zwiĄzkach w pŁynie	<u>0·04167 g.</u>	<u>0·03972 g.</u>
w porównaniu z	0·04770 „	0·04770 „
okazuje się ubytek	-0·00603 g.	-0·00798 g.

jako ilość azotu wydzielona prawdopodobnie z pŁynu w stanie wolnym.

Po przeliczeniu na objętość ilość ta wynosiłaby 4·88 cm.³, ewentualnie przyjmujĄc liczby z analizy metodĄ Schlössinga 6·36 cm.³.

Analiza gazów wykazała, jak widzieliśmy, przybytek azotu wolnego w powietrzu kolby w wysokośći 5·52 cm.³ podŁug analizy w większym eudyometrze, a 7·24 cm.³ podŁug analizy w eudyometrze mniejszym.

¹⁾ Oddestylowano 0·00271 g. azotu amoniakalnego, a że sŁączek przesiąknięty byŁ przez 4·5 cm.³ pŁynu, które zawierać musiały 0·00009 azotu amoniakalnego, więc na sam osad pozostaje 0·00271—0·00009=0·00262 g. azotu.

3. Ogólne wyniki doświadczenia trzeciego.

Wyniki opisanego dopiero doświadczenia wypadły nie zupełnie zgodnie z przewidywaniem. Na mocy doświadczenia I i II spodziewano się, że w naczyniu III nitryfikacja zupełnie nie będzie się odbywać, gdyż powietrze tego naczynia nie było zaopatrzone ani w bezwodnik węglowy, ani w pary kwasu octowego, i jedynym połączeniem węglowym, jakie w kolbie umieszczono, był zasadowy węglan magnowy dodany do płynu, ten zaś podług wyników doświadczenia I i II nie może służyć za pokarm węglowy dla nitrosomonasu.

Tymczasem w rzeczywistości i w naczyniu tem, podobnie jak w dwóch drugich, nitryfikacja wystąpiła i po ukończeniu doświadczenia prawie wszystkie amoniak był zamieniony na kwas azotawy. Ale przecież pomiędzy przebiegiem nitryfikacji w naczyniu II i III wybitna zachodziła różnica. Spojrzawszy na tablicę zestawioną na str. 128, widzimy, że 10 września, t. j. w dwa miesiące po rozpoczęciu doświadczenia, w naczyniu II objętość powietrza zmniejszyła się o 37 cm.³, natomiast w III tylko o 10·8 cm.³ 22 października w naczyniu II nitryfikacja już była prawie skończoną, gdy w III dopiero mniej więcej połowa amoniaku była utlenioną. Powietrze naczynia II zawierało od początku doświadczenia około 4% bezwodnika węglowego i temu niezawodnie należy przypisać szybszy przebieg nitryfikacji w tem naczyniu; o tyle więc rezultaty tego doświadczenia potwierdzają, że bezwodnik węglowy może służyć za pokarm dla nitrosomonas, ale zachodzi pytanie, czem żywiły się mikroby nitryfikacyjne w naczyniu III? Częściową odpowiedź na to pytanie znajdujemy w rezultatach analizy gazów tego naczynia na końcu doświadczenia. Analiza ta wykazała tu 3·7% bezwodnika węglowego, który oczywiście mógł mikrobom służyć za pokarm.

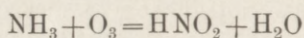
W naczyniu zamknięto zwykłe powietrze, więc CO₂ nagromadził się w niem dopiero w ciągu doświadczenia. To właśnie objaśnić nam może, dlaczego początkowo nitryfikacja w tem naczyniu była tak leniwą, a dopiero później, gdy już nagromadziła się w niem znaczniejsza ilość CO₂, postępowała szybko. Ale zachodzi pytanie skąd pochodził CO₂ znajdujący się w naczyniu III. Początkowo przypuszczałem, że może te ślady CO₂, które znajdują się w zwykłym powietrzu, a więc musiały być i w powietrzu zamkniętym w kolbie (z obliczenia wypada 0·35 cm.³ w całym powietrzu kolby) służyły najprzód jako bardzo skąpe pożywienie węglowe dla nitrosomonas i umożliwiały b. powolne i słabe tworzenie się kwasu azotawego, że ten tworzący kwas azotawy rozkładał węglan magnowy, wydzielając z niego CO₂, który znów dalszą nitry-

fikacją umożliwiał i że w ten sposób z rozkładającego się węglanu magnewego gromadziły się coraz większe ilości CO_2 w powietrzu kolby co pozwalało na coraz lepsze odżywianie się i coraz wybitniejszą pracę fermentu azotawego.

Atoli rezultaty analizy gazów i płynu zamkniętych w naczyniu III wykazały, że źródła bezwodnika węglowego gdzieindziej szukać należy.

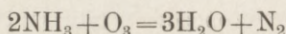
Analiza płynu wykazała jak widzieliśmy, że z pierwotnych 0.0477 g. azotu amoniakalnego 0.00478 g. pozostało w formie amoniaku, 0.03689 g. przeszło w formę kwasu azotawego a 0.00603 g. znikło z płynu więc prawdopodobnie wydzielilo się z niego w stanie wolnym. Te 0.00603 g. azotu odpowiada 4.88 cm^3 tego gazu, istotnie też analiza wykazała przybytek 5.52 cm^3 wolnego azotu w gazach zamkniętych w naczyniu.

Do utlenienia 0.03689 g. azotu amoniakalnego na kwas azotawy potrzeba podług wzoru



0.1264 g. czyli 88.44 cm^3 tlenu.

Do wydzielenia z amoniaku 4.88 cm^3 azotu potrzeba podług wzoru



7.32 cm^3 tlenu.

Zatem zmiany, jakim uległ azot amoniakalny wymagają 88.44 cm^3 + 7.32 czyli razem 95.76 cm^3 tlenu.

Tymczasem analiza gazowa wykazała, że ubytek tlenu w naczyniu wynosił rzeczywiście 116.4 cm^3 a więc o 20.64 cm^3 więcej aniżeli mogło go się użyć do utlenienia amoniaku na kwas azotawy i wolny azot. Obliczając ilość tlenu przypadającą na azot wolny wydzielony z amoniaku przyjęto za podstawę niedobór azotu w płynie odpowiadający 4.88 cm^3 . Gdyby przyjąć za podstawę rachunku przybytek azotu wolnego w naczyniu wykazany przez analizę gazową t. j. 5.52 cm^3 wypadłoby 8.28 cm^3 tlenu więc razem z 88.44 cm^3 wypadłoby 96.72 cm^3 a więc zawsze jeszcze o 19.68 cm^3 mniej, niż wynosił istotnie znaleziony ubytek tlenu z gazów naczynia.

Tak więc ubytek około 20 cm^3 tlenu nie da się wytłomaczyć procesem nitryfikacyjnym, który się odbywał w płynie. Ponieważ prócz amoniaku nie było w płynie żadnych ciał, któreby mogły się utleniać, zatem nie pozostaje nic innego, jak przypuścić, że korek, którym kolba była zatkana ulegał powolnemu utlenieniu. Z tego utlenienia musiał się tworzyć bezwodnik węglowy i według wszelkiego prawdopodobieństwa temu właśnie przypisać należało, że w kolbie, która na początku doświadczenia wypełniona była zwykłym powietrzem, zawierającym ledwo

ślady bezwodnika węglowego mogła się po upływie pewnego czasu rozpocząć nitryfikacja amoniaku. Aby owe ślady bezwodnika węglowego, jakie się w pierwotnie zamkniętem powietrzu znajdowały, mogły stopniowo doprowadzić do rozwinięcia się fermentacji azotawej, jak to chwilowo przypuszczałem, jest i z tego względu nieprawdopodobne, że wobec zasadowości dodanego do płynu węglanu magnowego te ślady bezwodnika węglowego rychło byłyby przez tlenek magnowy związane.

Tak więc dochodzimy do rezultatu, że i w naczyniu III, które chciano mieć wypełnione zwykłym tylko powietrzem, ferment azotawy odżywiał się według wszelkiego prawdopodobieństwa bezwodnikiem węglowym, którego źródło, jak widzieliśmy, było tu czysto przypadkowe. Że w tem naczyniu nitryfikacja rozpoczęła się nierównie później niż w II, do którego od razu dodano bezwodnika węglowego, nie dziwnego: bo trzeba było dłuższego czasu na to, aby przez owo powolne utlenianie się korka wytworzyła się ilość bezwodnika węglowego wystarczająca dla energiczniejszego rozwoju naszego mikroba.

Ale jakkolwiek tak objaśnione wyniki naszego doświadczenia w najwyższym stopniu przemawiają za tem, że bezwodnik węglowy jest zupełnie wystarczającym pokarmem węglowym dla nitrosomonasu, to przecież możnaby przeciwko stanowczemu wyprowadzeniu tego wniosku podnieść jeszcze pewną wątpliwość. Skoro udowodnione zostało, że korek, którym naczynia były zamknięte, nie zachowywał się biernie, ale pochłaniał tlen z powietrza znajdującego się w naczyniu i powolnie się utleniał, to możnaby przypuścić, że nie sam bezwodnik węglowy, ale i jakie lotne organiczne połączenia mogły się znajdować między produktami zmian, jakim korek ulegał. Gdyby tak być miało, to możnaby w dalszym ciągu przypuścić, że nie bezwodnik węglowy, ale te lotne organiczne produkty rozkładu korka służyły mikrobowi azotawym za pokarm. Okoliczność, że w naczyniu II, gdzie powietrze już od początku zawierało znacznie większą ilość CO_2 , nitryfikacja nierównie wcześniej się rozpoczęła niż w III, przemawia wprawdzie wybitnie za udziałem bezwodnika węglowego w żywieniu się w mowie będącego fermentu, ale i pod tym względem możnaby podnieść wątpliwość, czy udział ten nie jest tylko pośredni, czy mianowicie obecność bezwodnika węglowego nie działała w tym przypadku na przyspieszenie rozkładu korka i obfitsze tworzenie owych przypuszczalnych, lotnych, organicznych połączeń, które dopiero służyły mikrobowi za pokarm.

Rezultaty doświadczenia w naczyniu I nie sprzeciwiają się także przypuszczeniu, że pokarmem węglowym nitrosomonasu mogłyby być lotne połączenia organiczne.

W tem naczyniu, do którego nie wprowadzano CO_2 , ale zawieszono w niem naczynko z kwasem octowym, nitryfikacja rozpoczęła się prędzej jeszcze niż w naczyniu II, zawierajacem od początku doświadczenia CO_2 . Prawda, że jest rzeczą bardzo możliwą, że i tu służył za pokarm mikrobom nie kwas octowy, ale bezwodnik węglowy rugowany z węglanu magnowego przez kwas octowy, rozpuszczający się powoli w płynie, ale możliwem jest także i odwrotne przypuszczenie. Rezultaty doświadczenia w naczyniu I ciekawe też są z tego względu, że o ile nitryfikacja amoniaku rychło się tu rozpoczęła, o tyle prędko ustała i nie dosięgła tych rozmiarów, jak w obu innych naczyniach. 10 września, t. j. w dwa miesiące po rozpoczęciu doświadczenia, w naczyniu I zmniejszenie objętości powietrza wynosiło już 46.6 cm^3 , gdy w II doszło dopiero do 37.1 , a w III tylko do 10.8 cm^3 . Zato 23 września w naczyniu II zmniejszenie objętości wynosiło już 62.3 , a w I tylko 55.5 cm^3 . W ciągu miesiąca października objętość gazów w naczyniu I jeszcze tylko o 10 cm^3 się zmniejszyła tak, że gdy zmniejszenie doszło do 65.4 cm^3 , już dalej nie postępowało wcale.

Analiza płynu naczynia I wykazała, że z 0.0477 g . pierwotnego azotu amoniakalnego tylko 0.0224 g ., a więc niespełna tylko połowa, przeszło na kwas azotawy. Ale reszta amoniaku nie pozostała bez zmiany: bo azotu amoniakalnego odnaleziono w płynie tylko 0.0022 g . Brakło więc w płynie 0.0246 g . azotu, a że analiza gazowa wykryła tylko przybytek $4.73 \text{ cm}^3 = 0.0059 \text{ g}$. azotu w powietrzu naczynia, więc tylko tyle azotu amoniakalnego przeszło w stan wolny. Wypada z tego, że część azotu amoniakalnego znajdująca się pierwotnie w płynie, wynosząca 0.0153 g ., przeszła w jakiś inny związek, nie mogący już ulegać nitryfikacji. Najprawdopodobniej utworzył się tu jakiś amid kwasu octowego. Tak więc powodem wcześniejszego ustania nitryfikacji w naczyniu I nie były jakieś mniej korzystne, późniejsze warunki tego procesu, ale po prostu brak materiału, któryby mógł ulegać nitryfikacji. Że i w naczyniu I korek zamykający naczynie nie zachowywał się biernie, ale pochłaniał tlen, a więc ulegał rozkładowi, wykazuje porównanie ubytku tlenu, znalezioneego przez analizę gazową, z ilością tego gazu, jaka się użyć była powinna do zmian chemicznych azotu, jakie skonstatowano przez analizę płynu.

0.0224 g . azotu amoniakalnego do utlenienia się na kwas azotawy wymaga 0.0768 g . czyli 53.7 cm^3 tlenu. 4.73 cm^3 wydzielonego z amoniaku azotu wymaga 7.1 cm^3 tlenu. Razem więc do zmian, jakie skonstatowano w azocie siarkanu amonowego, danego pierwotnie do płynu, potrzeba było $53.7 + 7.1 = 60.8 \text{ cm}^3$ tlenu. Tymczasem analiza gazowa wykazała, że z powietrza, pierwotnie w kolbie zamkniętego, ubyło

78·1 cm.³ tlenu, zatem o 17·3 cm.³ więcej, niż mogło się zużyć do utlenienia amoniaku na kwas azotawy i azot wolny.

Ta nieprzewidziana okoliczność, że korek użyty do zatkania kolb, w których prowadzono doświadczenie, ulegał rozkładowi i wytwarzał oczywiście pewne gazowe produkty rozkładu, których natury nie można było ściśle określić, zamąciła jasność rezultatów doświadczenia. Z tego powodu, wnioski co do natury węglowego pokarmu nitrosomonasu, jakie można było wyprowadzić z tego doświadczenia, nie mają tego stopnia bezwarunkowej pewności, jaki byłby pożądanym w pytaniu, mającym pod względem fizyologicznym tak wysoką doniosłość. Dlatego uważałem za stosowne wykonać jeszcze jedno doświadczenie, zupełnie podobne do co dopiero opisanego, ale z wyłączeniem źródeł niepewności, jakie się w tem ostatniem znalazły. Ten cel ma właśnie:

Doświadczenie czwarte.

1. Urządzenie doświadczenia, przyrządy i sposób postępowania.

Niepewność rezultatów poprzedniego doświadczenia pochodziła, jak widzieliśmy, z zamknięcia naczyń, w których się nitryfikacja odbywała zwykłym korkiem, który w ciągu doświadczenia rozkładowi ulegał. Chcąc mieć rezultaty zupełnie ściśle, należało się postarać, aby nie tylko płyn, ale i powietrze kolby nie stykało się z żadnym ciałem natury organicznej. W tym celu obstalowano do mającego się opisać doświadczenia osobne naczynia, w których wszystkie części, stykające się nie tylko z płynem, ale i z powietrzem w nich zamkniętem, były ze szkła. Naczynia te wyobrażone na fig. 2 str. 189 miały budowę następującą.

Kolba *k* kształtu Erlenmeyerowskiego z grubego szkła ma średnicę w dnie 14 cm., a wysokości do szyjki 13 cm.; szyjka wysokości 28 mm., szeroka wewnątrz na 25 mm., jest zewnątrz oszlifowana. Na szyjkę zachodzi oszlifowany od wewnątrz hełm *h*, opatrzony u góry dwoma zagiętymi pod kątem prostym rurkami *a* i *b*. Każda z tych rurek jest przy końcu, na wewnętrznej stronie, oszlifowana dla szczelnego połączenia rurki *a* z krótką rurką *d*, której koniec wyciąga się i zatapia, i rurki *b* z rurką *c*, zgiętą pod kątem prostym, opatrzoną podziałką i zanurzoną w rtęci dla dopełnienia zamknięcia naczynia. Rurka *c* na całej długości podziałki jest skalibrowana zapomocą rtęci. Do rurki *b* są doszlifowane dwie rurki *c* na zmianę, jedna jest 20 cm., druga 80 cm. długa. Jeżeli spodziewanem jest znaczniejsze zmniejszenie się objętości

gazów w przyrządzie, zakłada się rurkę dłuższą, gdy to zmniejszenie ma być mniejsze, wygodniej jest użyć rurkę krótszą. Naturalnie można było kazać sporządzić hełm z rurkami *ad* i *bc* z jednej sztuki, byłoby to jednak z tego względu niedogodne, że przyrząd stałby się przez to łatwo łamliwy. Przytem rurka *ad* musi być podczas każdego doświadczenia wyciągnięta i zatopiona, więc po parokrotnem użyciu trzeba by do niej nowe kawałki dolutowywać, co by znów powiększało niebezpieczeństwo rozbicia hełmu.

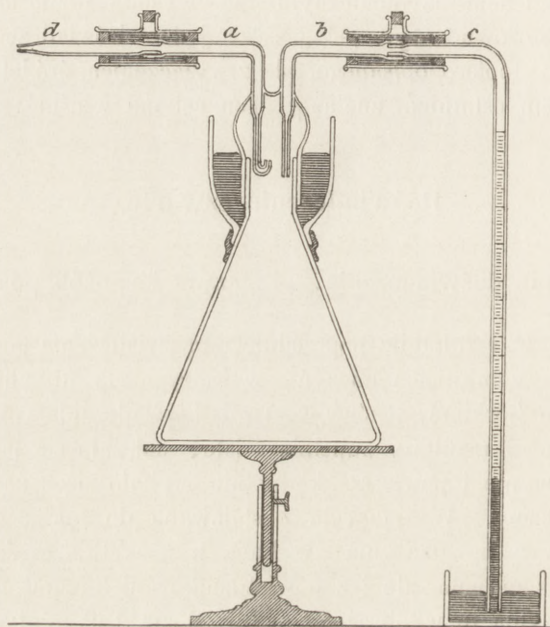


Fig. 2.

W przyrządzie w ten sposób zestawionym znajdowały się w trzech miejscach szlifowane zamknięcia. Podczas stopniowego zmniejszenia się ciśnienia gazów w naczyniu, powietrze zewnętrzne łatwo mogłoby się przedostać do jego wnętrza, jeżeliby te szlifowane zamknięcia przypadkowo nie pasowały dość szczelnie. Od tego należało się zabezpieczyć. W tym celu wszystkie zamknięcia szlifowe zalane były rtęcią. Aby można było zalać rtęcią zamknięcie między kolbą a hełmem, szyjka kolby otoczona jest rodzajem szklanego kołnierza, który przymocowany jest do kolby poniżej jej szyjki, zapomocą szerokiej kauczukowej obrączki.

Po zamknięciu kolby hełmem wlewa się do tego kołnierza rtęć. Połączenia szlifowe między rurkami *a* i *d*, oraz między *b* i *c* są także zalane rtęcią. Do pomieszczenia jej służą tu szerokie rurki szklane rodzaj mufli, które nasuwają się nad szlifowanymi połączeniami wspomnianych rurek. Te mufle zamknięte są z obu stron zwykłymi przedziurawionymi korkami, nasuniętymi na rurki połączone z sobą za pomocą szlifi. Każda mufelka ma z boku otwór, przez który nalewa się do niej rtęci. Gdy po skończonem doświadczeniu trzeba przyrząd rozebrać, obraca się mufelki otworami na dół, a rtęć wylewa się z nich z łatwością.

Pojemność wewnętrzną opisanych przyrządów oznaczano, ważąc je najprzód suche, a potem wypełnione wodą. Ta woda napełnia cały przyrząd łącznie z hełmem, zamykającym kolbę i jego rurkami *a* i *b*. Zaraz po zważeniu mierzono temperaturę wody, a znalezioną wagę wody, dzielono przez odpowiadający tej temperaturze, jej ciężar gatunkowy.

Wyznaczono pojemność każdego naczynia dwa lub trzy razy i z tych oznaczeń wzięto średnie. Pojedyncze oznaczenia różniły się między sobą co najwięcej o $\frac{1}{4}$ cm.³, zwykle znacznie mniej. Błąd więc w oznaczeniu pojemności nie był większy od 0.1 cm.³. Oznaczona w ten sposób pojemność naczyń wynosiła:

Pojemność naczynia	I	894.05	cm. ³
" "	II	917.10	"
" "	III	921.68	"

Osobno oznaczono, za pomocą rtęci, pojemność rurek dodatkowych *d* i *c*, należących do każdej z kolb, i pojemności ich doliczono do pojemności odpowiednich kolb. U rurek *c*, pojemności oznaczono po punkt *o* podziałki, a osobno skalibrowano ją w różnych miejscach podziałki.

Pojemność kolb łącznie z pojemnością rurek dodatkowych *d* i *c* po *o* podziałki wynosiła:

Naczynie	I	894.05	+0.85	+10.68	=905.58	cm. ³
"	II	917.10	+1.13	+10.68	=928.91	"
"	III	921.68	+1.08	+ 3.30	=926.06	"

Sposób postępowania podczas tego doświadczenia był zupełnie taki sam jak w poprzednim. Płyn żywiący miał taki sam skład jak i poprzednio; do jego przyrządzenia użyto wodę dwukrotnie przekroploną, ostatni raz z dodatkiem nadmanganianu potasowego i kwasu siarkowego. W litrze tego płynu rozpuszczono 2.5012 g. czystego siarkanu amonowego, co odpowiada 0.5305 g. azotu amoniakalnego w całym litrze, zatem 0.05305 w 100 cm.³. Bezpośrednie oznaczenie azotu amoniakal-

nego w 100 cm.³ płynu dało 0·0529 g., a więc tylko o 0·00015 g. mniej, niż wypadało z obliczenia.

Dnia 24 czerwca 1893 r. zakazano płyny we wszystkich trzech kolbach kulturami nitrosomonas, poczem kolby zamknięto.

Naczynie I i II miało być wypełnione powietrzem z bezwodnikiem węglowym, naczynie III powietrzem czystym. Dlatego właśnie do kolby III przystosowano rurkę *c* krótszą (długości 20 cm.), do kolb I i II rurki *c* dłuższe (długości 80 cm.).

Przed zatopieniem rurek *d*, w celu ostatecznego zamknięcia naczyń, podciągnięto rtęć w rurkach *c* zapomocą pipety rtęciowej połączonej z rurką *d* i to w naczyniach I i II do wysokości około 40 mm., aby zrobić miejsce na bezwodnik węglowy, który miał być do tych kolb dopuszczony, w naczyniu zaś III tylko do wysokości około 10 mm.

Nie można było wpuszczać bezwodnika węglowego do naczyń przez rurki *e*, gdyż fabrykant dostarczył te rurki zbyt wąskie; trzeba je było zatem wprowadzać przez rurki *d*. W tym celu rurkę *d* łączono z aparatem Kippa, wywiązującym CO₂, zapomocą rurki rozwidlonej, mającej kran o trzech drogach. Ustawiono naprzód kran tak, że przyrząd (w którym już poprzednio rtęć w rurce *r* podciągnięto do wysokości 40 mm.) był zamknięty. Bezwodnik węglowy przez otwór kranu wychodził drugim ramieniem rurki na zewnątrz. Gdy się przekonano, że bezwodnik węglowy, wywiązujący się, jest zupełnie czysty, przekrecono kran tak, aby aparat Kippa połączyć z kolbą. Wydzielający się CO₂ wchodził teraz do kolby, a rtęć w rurce *c* opadała. Skoro rtęć w rurce *c* opadła już do wysokości około 10 mm., zakrecano kran w celu ponownego zamknięcia przyrządu i zatapiano rurkę, przez co ostatecznie zamknięto cały przyrząd.

Teraz, zupełnie jak w doświadczeniu III, odczytywano, od czasu do czasu, objętość zamkniętych w naczyniach gazów, a stopniowe zmniejszanie się tej objętości służyło za miarę postępu nitryfikacji.

Ponieważ dokładność obliczeń bilansu gazów, zawartych w kolbach, zależała przede wszystkim od dokładnego oznaczenia pierwotnej i końcowej objętości gazów, zamkniętych w naczyniach, przeto objętość pierwotną odczytano trzykrotnie, a średnie z tych trzech odczytań, brano za podstawę dalszych obliczeń.

Płyny zakazano 24 czerwca po południu i po zamknięciu przyrządów odczytano zaraz objętość, a następnie powtórzono odczytania dnia 25 czerwca z rana i po południu.

Rezultaty tych odczytań, po zredukowaniu do 0° i 76 cm. ciśnienia, były takie:

	Naczynie I	Naczynie II	Naczynie III
24 czerwca	646·52 cm. ³	677·66 cm. ³	703·06 cm. ³
25 „ rano	646·53 „	677·81 „	703·47 „
„ „ po południu	646·46 „	678·51 „	703·39 „
średnio	646·50 cm. ³	677·69 cm. ³	703·31 cm. ³
po dopuszczeniu CO ₂	671·01 „	717·95 „	703·31 „
zatem dopuszczono CO ₂	24·51 cm. ³	40 26 cm. ³	0·0
czyli w ‰, zawartych w przy- rządzie gazów	3·6‰	5·6‰	0·0‰.

Odtąd odczytywano co pewien czas objętość gazów, zamkniętych w kolbach, a rezultaty tych odczytań zredukowane do 0°C. i 76 cm. ciśnienia zestawione są w następującej tablicy.

2. Rezultaty liczebne.

Zmiany objętości gazów, znajdujących się w przyrządach w ciągu doświadczenia.

Data	Naczynie I powietrze + CO ₂		Naczynie II powietrze + CO ₂		Naczynie III czyste powietrze	
	Objętość gazów w cm. ³	Zmniejsze- nie objęto- ści od 30 czerwca w cm. ³	Objętość gazów w cm. ³	Zmniejsze- nie objęto- ści ga- zów od d 30 czerwca w cm. ³	Objętość powietrza w cm. ³	Zmniejsze- nie objęto- ści ga- zów od d. 30 czerwca w cm. ³
25 czerwca, przed wpusz- czeniem CO ₂ .	646·50	—	677·69	—	703·31	—
25 czerwca, po wpuszczeniu CO ₂ .	671·01	—	717·95	—	703·31	—
26 czerwca	649·63	—	708·41	—	703·39	—
28 „	648·02	—	683·15	—	702·61	—
30 „	647·75	—	680·46	—	703·05	—
12 lipca	647·71	0·04	680·47	—0·01	702·54	0·51
21 „	644·81	2·94	675·73	4·73	702·51	0·54

Data	Naczynie I powietrze + CO ₂		Naczynie II powietrze + CO ₂		Naczynie III czyste powietrze	
	Objętość gazów w cm. ³	Zmiej- szenie obję- tości gazów od d. 30 czerwca w cm. ³	Objętość gazów w cm. ³	Zmiej- szenie obję- tości gazów od d. 30 czerwca w cm. ³	Objętość powietrza w cm. ³	Zmiej- szenie ob- jętości po- wietrza od d. 30 czerw. w cm. ³
5 sierpnia	622·50	25·25	651·01	29·45	703·42	— 0·37
7 września	566·98	80·77	583·08	97·38	703·08	— 0·03
13 paździer.	546·22	101·53	577·93	102·53	702·34	0·71
27 „	545·75 ¹⁾	102·00	578·16	102·30	701·73	1·32
20 listopada	—	—	577·20	103·26	702·43	0·62
12 grudnia	—	—	576·07 ²⁾	104·39	—	—
15 stycznia	—	—	—	—	701·64	1·41

Analizy powietrza i płynów na końcu doświadczenia.

1. Z naczynia pierwszego.

Najpierwej zakończono doświadczenia z naczyniem I. Dnia 27 października, a więc w 4 miesiące po rozpoczęciu doświadczenia, odczytano po raz ostatni całkowitą objętość gazów, zamkniętych w naczyniu. Odczytywano dwukrotnie i wzięto stąd średnią. Objętość wynosiła 545·75 cm³. Próbkę gazów przelano, zapomocą pipety Seegera, do eudyometru. Podczas tego przelewania postępowano zupełnie tak samo, jak w poprzednim doświadczeniu. Tak samo też, jak poprzednio, postępowano podczas analizy gazów.

W 21·417 cm.⁴ gazu użytego do analizy znaleziono:

CO ₂	0·619 cm. ³	czyli	2·89%
O	0·7187 „ ³⁾	„	3·35%
N	20·079 „	„	93·76%

¹⁾ przeciętna z dwóch odczytań.

²⁾ przeciętna z trzech odczytań.

³⁾ Zmniejszenie objętości po eksplozy z wodorem wynosiło 2·158 cm.³, więc

$$\frac{2 \cdot 158}{3} = 0 \cdot 7187 \text{ cm.}^3$$

Po przeliczeniu tego składu na 545·75 cm.³ gazu, które znajdowały się w naczyniu, wypada, że na końcu doświadczenia było w niem:

CO₂ 15·77 cm.³; — O 18·28 cm.³; — N 511·70 cm.³.

Na początku doświadczenia, przed wprowadzeniem do naczynia bezwodnika węglowego, znajdowało się w niem 646·50 cm.³ powietrza, potem dopuszczono jeszcze 24·51 cm.³ bezwodnika węglowego. Licząc, że powietrze pierwotne zawierało 0·04⁰/₀ CO₂, 20·93 O i 79·03 N, wypada, że w 671·01 cm.³ gazów, które się znajdowały w naczyniu, na początku doświadczenia było:

CO ₂	0·26 cm. ³ + 24·51 cm. ³ razem	24·77 cm. ³
O		135·31 "
N		510·93 "
		671·01 cm. ³

Porównyując ilość każdego z pojedynczych gazów, znajdujących się w naczyniu, na początku i na końcu doświadczenia, znajdziemy, że

CO ₂ w ciągu doświadczenia u b y ł o	9·0 cm. ³
O " " u b y ł o	117·03 "
N " " p r z y b y ł o	0·83 "

Przystępując do analizy płynu, przefiltrowano go najprzód przez sączek asbestowy, ten ostatni przemyto wodą, dopełniono filtrat do 500 cm.³ i wzięto: 200 cm.³ do oznaczenia amoniaku. W tej objętości znaleziono 0·0006 g. azotu amoniakalnego, co na całe 500 cm.² daje go 0·0015 g.

Osad zebrany na sączku, przez oddestylowanie z wodnikiem sodowym, dał jeszcze 0·0003 g. azotu amoniakalnego. Zatem razem pozostało w naczyniu azotu amoniakalnego 0·0018 g.

W 100 cm.³ oznaczono azot azotynów przez titrowanie kameleonem i znaleziono go 0·00972, co przeliczone na 500 cm.³ odpowiada 0·0486 g.

W 50 cm.³ powtórzono to samo oznaczenie i znaleziono azotu azotynów 0·00482 g., co przeliczone na całe 500 cm.³ daje 0·0482 g.

Biorąc średnią z obu oznaczeń znajdujemy azotu w postaci azotynów w całym płynie kolby 0·0484 g.

Oznaczenia azotu azotanów i azotynów, które chciano wykonać w osobnej próbie, metodą Schlösinga, zepsuło się przypadkowo, jednak wątpić nie można, że jak w poprzednim doświadczeniu, tak i tu kwas azotawy wcale się nie wytwarzał, dowodzi tego zresztą poniżej podana analiza płynu z naczynia II.

Ostatecznie odnaleziono w płynie

azotu amoniakalnego	0·0018 g.
azotu azotynów	0·0484 „
razem azotu związanego	0·0502 g.
Pierwotnie było w płynie	0·0529 „
Reszta nieodnaleziona wynosi	0·0027 g.

Przybytek azotu wolnego w powietrzu wynosił 0·83 cm.³, co odpowiada 0·0011 g. Odejmując te 0·0011 g. od 0·0027 g., pozostaje jeszcze nieodnaleziona reszta 0·0016 g. azotu, która stanowi już niedobór w całym bilansie azotu.

Ten niedobór przypisać naturalnie należy przedewszystkiem nieuniknionym błędom analitycznym, zwłaszcza przy analizach gazowych, gdzie podczas przeliczania rezultatów błąd analityczny mnoży się blisko 30 krotnie. Część niedoboru azotu pochodzić też może stąd, że pewna, choć nieznaczna, ilość azotu musiała wejść w skład protoplazmy mikrobów i że ten azot organiczny, w części tylko podczas gotowania osadu z wodnikiem sodowym mógł się odczepiać i destylować w postaci amoniaku, reszta musiała pozostać w osadzie.

2. Z naczynia drugiego.

Z naczyniem II zakończono doświadczenie 12 grudnia. Już dwa miesiące przedtem objętość gazów w naczyniu przestała się zmniejszać. W dniu zakończenia doświadczenia odczytano czterokrotnie objętość gazów w naczyniu; znaleziono za pierwszym razem 576·07 cm.³, za drugim — 576·03, za trzecim — 576·09, za czwartym zaś — 576·10 cm.³. Średnia z tych odczytań wynosiła 576·07 cm.³. Analizę wykonano tym razem w dwóch eudyometrach, do których przelano próbki gazu z przyrządu zapomocą pipety Seegera. Każde odczytanie eudyometru powtórzono 3—5 razy i obliczono stąd średnie.

Ponieważ do jednej z analiz zakradł się błąd, którego źródło tylko z prawdopodobieństwem a nie z zupełną stanowczością podać mogę, przeto, aby być obiektywny i czytelnikowi własny sąd ułatwić, wolę tym razem podać wszystkie odczytania. Przykład taki będzie zarazem mógł służyć za miarę stopnia dokładności odczytań eudyometrycznych w opisanych doświadczeniach.

Analiza I.

Objętość powietrza:

- 1) 22·027, 2) 22·020, 3) 22·019, 4) 22·010, 5) 21·992, 6) 22·009,
średnia **22·014**.

Po dopuszczeniu wodoru:

- 1) 24·259, 2) 24·254, 3) 24·244; średnia **24·252**.

Po dopuszczeniu mieszaniny piorunującej i po eksplozji:

- 1) 21·690, 2) 21·659, 3) 21·648, 4) 21·692, 5) 21·697;
średnia **21·676**.

Zatem tlenu:

$$\frac{24\cdot252 - 21\cdot676}{3} = 0\cdot8587 \text{ cm.}^3 \text{ czyli } 3\cdot900\%.$$

Po dopuszczeniu wodnika sodowego:

- 1) 21·347, 2) 21·243, 3) 21·244, 4) 21·203.

Ponieważ objętość ciągle się zmniejszała, a eudyometr po czwartym odczytaniu opróżniono, przyjęto to ostatnie za podstawę obliczenia CO₂.

Podług tego znajdowałoby się bezwodnika węglowego:

$$21\cdot676 - 21\cdot203 = 0\cdot473 \text{ czyli } 2\cdot153\%.$$

Analiza II.

Objętość powietrza:

- 1) 21·497, 2) 21·454, 3) 21·439, 4) 21·489, 5) 21·453; średnia **21·467**.

Po dopuszczeniu wodnika sodowego:

- 1) 20·890, 2) 20·830, 3) 20·825, 4) 20·840, 5) 20·821;

średnia z czterech ostatnich odczytań **20·830**.

Zatem bezwodnika węglowego 0·635 cm.³ czyli 2·958%.

Po dopuszczeniu kwasu pyrogalusowego:

- 1) 19·983, 2) 19·977; średnia **19·980**.

Zatem tlenu 20·83—19·98=0·85 cm.³ czyli 3·959%.

Widzimy, że oznaczenie ilości tlenu wypadło w obu analizach zgodnie, natomiast różnice w znalezionych ilościach bezwodnika węglowego były tak znaczne, że stanowczo przekraczają zwykłe granice błędów w odczytaniach i niezawodnie przyjąć trzeba, że jedna z analiz dała tu stanowczo błędne rezultaty.

Nie trudno dostrzedz, że to błędne oznaczenie dała analiza I, bo jeden rzut oka na liczby wyrażające odczytania objętości, po wprowadzeniu wodnika potasowego do eudyometru, wskazuje, że pochłanianie

bezwodnika węglowego, przez wodnik sodowy, jeszcze nie dobiegło do końca, skoro objętość gazów w eudyometrze ciągle się jeszcze zmniejszała. W analizie II pierwsze odczytanie po wprowadzeniu NaHO, dało także jeszcze objętość większą niż następne, ale 4 następne wypadły prawie zupełnie zgodne. Dlatego to nie wahałem się za podstawę wszystkich dalszych obliczeń przyjąć ilość $\%$ bezwodnika węglowego w gazach przyrządu podług analizy II, natomiast ilość tlenu przyjąłem średnią z obu analiz, t. j. $\frac{3\cdot900+3\cdot959}{2} = 3\cdot928\%$.

W ten sposób skład $\%$ gazów, zamkniętych w naczyniu na końcu doświadczenia będzie następujący:

CO ₂	—	2·958 $\%$
O	—	3·928 $\%$
N	—	93·114 $\%$
		100·000 $\%$

Obliczając podług tego ilość każdego z gazów, znajdujących się w naczyniu na końcu doświadczenia, znajdziemy:

CO ₂	—	17·04 cm. ³
O	—	22·62 "
N	—	536·41 "
		576·07 cm. ³

Na początku doświadczenia przed wpuszczeniem bezwodnika węglowego znajdowało się razem w naczyniu 677·69 cm.³ powietrza, potem dopuszczono jeszcze 40 26 cm.³ bezwodnika węglowego. Licząc, że powietrze pierwotne zawierało 0·04 $\%$ CO₂, 20·93 $\%$ tlenu i 79·03 $\%$ azotu, wypada: że w 717·95 cm.³ gazów, znajdujących się w naczyniu na początku doświadczenia, bezpośrednio po doprowadzeniu bezwodnika węglowego, było:

CO ₂	0·27 cm. ³ + 40·26 cm. ³ więc razem	40·53 cm. ³
O		141·85 "
N		535·57 "
		717·95 cm. ³

Porównyując ilość każdego z gazów, znajdujących się w naczyniu, na początku i na końcu doświadczenia, znajdziemy, że w ciągu doświadczenia:

ubyło bezwodnika węglowego	23·49 cm. ³
" tlenu	119·23 "
przybyło zaś azotu	0·83 "

Przystępując do analizy płynu, przefiltrowano go naprzód przez sączek asbestowy, a następnie podzielono na poreye do różnych oznaczeń. W osadzie, którego wcale nie było, oznaczono osobno ilość amoniaku.

1) Osad wraz z sączkiem, oddestylowany z ługiem sodowym, dał azotu amoniakalnego 0·00035 g.

2) 50 cm.³ płynu, oddestylowane z ługiem sodowym, dały 0·00018 g. azotu amoniakalnego, co przeliczone na całą ilość, t. j. 100 cm.³ płynu, daje 0·00036 g.

Zatem cała ilość azotu amoniakalnego, który pozostał w kolbie, na końcu doświadczenia, była

$$0\cdot00035 + 0\cdot00036 = 0\cdot00071 \text{ g.}$$

3) 20 cm.³ płynu, rozcieńczono wodą, zakwaszono kwasem siarkowym i miareczkowano w nich kwas azotawy kameleonem. Znaleziono azotu azotynów 0·0098 g., co przeliczone na całe 100 cm.³ daje 0·0490 g.

4) Drugie 20 cm.³ płynu, traktowane w ten sam sposób, dały 0·00985 g., co przeliczone na 100 cm.³ daje 0·04925 g.

5) 50 cm.³, w których oznaczono azot amoniakalny, użyto jeszcze do łącznego oznaczenia azotanów i azotynów zapomocą metody Kühna, przyjętej przez stacye doświadczenia niemieckie, w celu oznaczania azotu w saetrze chilijskiej.

Metoda ta polega na zredukowaniu azotynów i azotanów w roztworze alkalicznym zapomocą mieszaniny proszku cynku i żelaza (ferum limatum) i na oznaczeniu utworzonego stąd amoniaku. Naturalnie ług sodowy używany do przeprowadzenia tej redukcji nie powinien wcale zawierać azotanu lub azotynu sodowego. Niestety mój ług nie był dostatecznie czysty, dlatego trzeba było oznaczyć stopień jego zanieczyszczenia i wprowadzić potem do oznaczeń odpowiednią poprawkę.

Do każdego oznaczenia azotu używa się podług przepisu 80 cm.³ ługu sodowego. Z czterokrotnego oznaczenia, przekonałem się, że 80 cm.³ mego ługu zawierało 0·00151 g. azotu; należało więc od znalezionych oznaczeń tę liczbę odjąć.

Otóż 50 cm.³ wspomnianego płynu dało 0·0259 g., po odjęciu 0·00151 g., pozostaje 0·02439 g., więc na całe 100 cm.³ wypada 0·04878 g.

Titrowanie kameleonem dało, jak widzieliśmy, liczby 0·0490 g. i 0·04925 g., a więc zgodność wyników jest zupełnie zadowalająca. Zgodność ta dowodzi zarazem, że w płynie znajdował się tylko kwas azotawy, azotowego zaś nie było wcale.

Ostatecznie tedy znaleziono w płynie:

azotu amoniakalnego	0·00071 g.
azotu kwasu azotawego (średnio z trzech oznaczeń	0·04901 „
razem odnaleziono azotu w płynie	0·04972 g.
było azotu amoniakalnego pierwotnie	0·05290 „
nie odnaleziono	0·00318 g.

Przybytek azotu wolnego w powietrzu wynosił 0·83 cm.³, co odpowiada 0·0011 g.

Zatem w ogólnym bilansie azotu brakuje znowu 0·00208 g., który to brak położony być musi w większej części na karb błędów analitycznych, w mniejszej spowodowanym być mógł przez przejście pewnej części azotu w skład protoplazmy mikrobów.

3. Z naczynia trzeciego.

W tem naczyniu, napełnionem czystym powietrzem, bez CO₂, nie można było, jak widać z tablicy str. 191 i 192, stwierdzić stopniowego zmniejszania się objętości gazów.

Dnia 15 stycznia, a więc z górą w pół roku po rozpoczęciu doświadczeń, zmniejszanie objętości wynosiło tylko 1·4 cm.³. Pozostawiono przyrząd jeszcze i nadal w spokoju z zamiarem zrobienia analizy gazów i płynu po upływie całego roku.

Nowych odczytywań objętości nie robiono, ale w każdym razie, w początkach sierpnia, stwierdzono, że rtęć w rurce *c* trzymała się mniej więcej na tym samym poziomie, na którym była na początkach doświadczenia, nie było więc zmniejszania się objętości powietrza, któreby wskazywało na odbywanie się nitryfikacyi. W ciągu feryj, słuchający, robiąc na stole porządki, stłukł hełm przyrządu, i od tego czasu, przez przeciąg około 5 tygodni, kolba nie była szczelnie zamknięta. Naturalnie przepadła możność wykonania analizy gazów, zamkniętych w przyrządzie, można było tylko wykonać analizę płynu. Płyn w całości, łącznie z osadem, oddestylowany z wodnikiem sodowym, dał 0·0462 g. amoniaku, kwasu azotawego nie było wcale.

Analiza płynu wykazała tedy, że w ciągu piętnastomiesięcznego stania przyrządu ubyło z płynu 0·0067 g. azotu amoniakalnego, który przecież nie uległ nitryfikacyi, bo, jak wspomniano, w płynie nie było wcale kwasu azotawego, ale niezawodnie ulotnił się z płynu jako amoniak. Takie ulotnienie się części amoniaku było tu możliwe, bo przyrząd w ciągu ostatnich 5 tygodni, wskutek stłuczenia hełmu, nie

był szczelnie zamknięty, a w płynie znajdował się zasadowy węglan magnowy, którego tlenek magnowy mógł rugować amoniak z siarkanu magnowego.

3. Wyniki doświadczenia czwartego oraz porównanie ich z wynikami trzeciego doświadczenia.

Wątpliwości, jakie napotkaliśmy w interpretowaniu rezultatów doświadczenia III, zostały przez wyniki doświadczenia IV w zupełności usunięte. Przy opisie doświadczenia III widzieliśmy, że w naczyniu, do którego nie dodano wcale bezwodnika węglowego, nitryfikacja amoniaku rozpoczęła się wprawdzie później niż tam, gdzie ten gaz dopuszczono, ale przecież nastąpiła, i wszystek amoniak został w końcu zamieniony na kwas azotawy. Był to rezultat wprost sprzeczny z tym, którego się spodziewano, na podstawie rezultatu doświadczenia I i II.

W celu wyjaśnienia tej sprzeczności przyjął się, że mikroby nitrosomonas żyły tu kosztem produktów rozkładu korka, użytego do zamknięcia kolby. Pomędzy tymi produktami był kwas węglowy, ale mogły być także lotne materye organiczne, dlatego pozostała wątpliwość, czy pierwsze, czy też drugie służyły mikrobowi za pokarm. Wątpliwość ta istniała nawet i co do tych kultur, które znajdowały się w naczyniach, do których dopuszczono bezwodnik węglowy, bo i te były zatkane korkiem, i tu stwierdzono, że korek, w czasie doświadczenia, ulegał rozkładowi.

Wszystkich tych wątpliwości nie mogło być w tłumaczeniu wyników doświadczenia IV. Powietrze zamknięte w naczyniach stykało się tu tylko z płynami czysto mineralnego składu, ze szkłem i z rtęcią. O dostępie jakiegokolwiek organicznych związków do wnętrza przyrządów nie mogło być mowy, a więc mikroby mogły czerpać węgiel tylko albo z bezwodnika węglowego, dopuszczonego do powietrza albo z węglanu magnowego, gdyż żadnego innego związku węglowego nie było w przyrządach, przez cały czas trwania doświadczenia.

To też odpowiedź na pytanie, które miało być rozstrzygnięte tem doświadczeniem, wypadła zupełnie stanowcza i jasna.

W naczyniach I i II, w których do powietrza dopuszczono bezwodnik węglowy, nitryfikacja rychło się rozpoczęła, i prawie wszystek amoniak został zamieniony, po upływie pewnego czasu, na kwas azotawy. Inaczej w naczyniu III, w którym pozostawiono zwykłe powietrze, bez żadnego dodatku. Tu objętość powietrza, zamkniętego nad płynem, nie zmniejszyła się prawie wcale, przez ciąg całych 15 mie-

sięcy, a azot w płynie jak był, tak i pozostał w formie amoniaku. Ponieważ we wszystkich trzech naczyniach skład płynu był jednakowy i wszędzie w jednakowy sposób zakażono płyn, więc wystąpienie nitryfikacji w naczyniu I i II, a brak jej w naczyniu III, mogły pochodzić tylko z obecności lub braku bezwodnika węglowego w powietrzu tych naczyń.

Dlatego z tego doświadczenia możemy w sposób wykluczający wszelkie wątpliwości wyprowadzić dwa następujące wnioski:

1) Kwas węglowy, związany w zasadowym węglanie magnowym, nie może mikrobie nitryfikacyjnym służyć za pokarm węglowy.

2) Wolny bezwodnik węglowy jest zupełnie wystarczającym pokarmem węglowym dla mikroba fermentacji azotawej.

Oba te wyniki najzupełniej zgadzają się z rezultatami doświadczenia I i II i potwierdzają zarazem zrobione poprzednio przypuszczenie, że w doświadczeniu III nitryfikacja dlatego się odbywała także w kolbie, do której bezwodnika węglowego nie dodano, że gaz ten tworzył się przez rozkład korka, służącego do zatkania kolby.

Co do stosunków ilościowych, jakie zachodzą podczas procesu przemiany amoniaku na kwas azotawy, to rezultaty doświadczenia IV są w ogólnym zarysie zgodne z rezultatami doświadczenia III. I tu mianowicie pokazało się, że po ukończeniu się procesu nitryfikacyjnego nie znajdujemy w postaci kwasu azotawego wszystkiego azotu, jaki dodany był do płynu w formie soli amoniakalnych, że część jego jakkolwiek bardzo mała, pozostaje w formie amoniaku, część zaś ulatnia się w stanie wolnym. Jednakże stosunki liczebne przemian chemicznych w tem doświadczeniu są nieco odmienne, niż w poprzednim. Stosunki te są następujące;

W doświadczeniu III znaleziono:

Z 0·0477 g. azotu, dodanego do płynu, w formie amoniaku, odnaleziono w płynie na końcu doświadczenia:

W naczyniu II, 0·0413 g. N, jako HNO_2 , + 0·0012 g. N, jako NH_3 , razem 0·0425 g. N.

W naczyniu III, 0·03689 g. N, jako HNO_2 , + 0·00478 g. N, jako NH_3 , razem 0·04167 g.

W doświadczeniu IV:

Z pierwotnej ilości 0·0529 g. azotu amoniakalnego odnaleziono:

W naczyniu I: 0·0484 g. N, jako HNO_2 , + 0·0018 g. N, jako NH_3 , razem 0·0502 g. N.

W naczyniu II: 0·04901 g. N, jako HNO_2 , + 0·00071 g. N, jako NH_3 , razem 0·04972 g. N.

Z tego po przeliczeniu znajdziemy, że ze 100 części azotu, dodanego do płynu, w formie siarkanu amonowego, odnaleziono w płynie na końcu doświadczenia:

		w formie HNO ₂	w formie NH ₃	razem
W doświadczeniu III	w naczyniu II	86·5	2·6	89·1
	" III	77·5	9·8	87·3
W doświadczeniu IV	w naczyniu I	91·5	3·4	94·9
	" II	92·6	1·4	94·0

Ze 100 części azotu amoniakalnego, który z płynu zniknął w czasie doświadczenia, odnaleziono w formie kwasu azotawego:

W doświadczeniu III w naczyniu	II	— 88·8 ⁰ / ₀
" "	III	— 86·0 ⁰ / ₀
" IV	I	— 94·7 ⁰ / ₀
" "	II	— 93·9 ⁰ / ₀

W powietrzu zamkniętym w naczyniach, znalezione na końcu doświadczenia przybytek azotu w ilości:

		w cm. ³	w g.	w ⁰ / ₀ azotu amoniakalnego dodanego	w ⁰ / ₀ azotu amoniakalnego, który znikł z płynu
W doświad. III	naczyniu III	5·52	0·0069	14·4	16·7
" "	" I	4·73	0·0059	12·3	12·9
" IV	" I	0·83	0·0011	2·1	2·2
" "	" II	0·83	0·0011	2·1	2·1

Z tego zestawienia widzimy, że w doświadczeniu IV wydajność kwasu azotawego, z przefermentowanego amoniaku, była znacznie większą niż w doświadczeniu III. Ze 100 części amoniaku, który z płynu zniknął, w doświadczeniu IV, odnaleziono średnio przeszło 94⁰/₀ azotu, zaś w III tylko niespełna 88⁰/₀ w formie kwasu azotawego. To też odpowiednio do tego, w doświadczeniu IV znalezione tylko bardzo stosunkowo nieznaczny przybytek wolnego azotu w powietrzu, gdy w doświadczeniu III przybytek ten był bardzo wybitny.

Wobec nieuniknionych błędów analitycznych, zwłaszcza podczas analizy gazów ¹⁾, nie można się było spodziewać, aby przybytek wol-

¹⁾ Ponieważ analizowano nie cały gaz ale tylko niewielką jego próbkę w eudyometrze, więc niewielki stosunkowo błąd analityczny podczas przeliczania na całą objętość gazu, znajdującego się w kolbie, dawał już błąd dość znaczący.

nego azotu w powietrzu w zupełności odpowiadał niedoborowi azotu w płynie. To też w doświadczeniu III (naczynie III) suma azotu azotyńców i przybytku wolnego azotu na 100 części przefermentowanego azotu amoniakalnego wynosi 102.7% , więc o 2.7% za dużo; w doświadczeniu IV, naczynie I wykazuje — 96.8% , naczynie III — 96% , a więc o 3.2% , względnie o 4% za mało. Że w doświadczeniu IV okazał się nieco większy niedobór w bilansie azotu, pochodziło być może stąd, że dno kolb, do tego doświadczenia używanych, miało znacznie większą powierzchnię niż dno kolb doświadczenia III. Średnica dna tych ostatnich wynosiła 100 cm., co odpowiada powierzchni 79 cm.^2 , gdy dno nowych kolb miało 14 cm. średnicy, a więc 154 cm.^2 powierzchni. Podczas brania próbki gazu, wskutek działania ssącego pipety, zmniejsza się naturalnie ciśnienie gazów wewnątrz kolby, jeżeli więc to branie próbki trwa pewien czas, to możliwym jest, że pewna ilość bezwodnika węglowego, rozpuszczonego w płynie, dyfunduje do powietrza i dostaje się także do próbki, branej do analizy. Wskutek tego analiza, nawet zupełnie dokładna, mogła wykazać ilość bezwodnika węglowego, nieco większą od tej, jaka się znajdowała w naczyniu podczas ostatniego odczytywania w niem objętości gazów. Jeżeli zaś analiza dała, co do ilości bezwodnika węglowego, nieco za wysoki rezultat, to tem samem oznaczenie azotu musiało wypaść cokolwiek za nisko. Błąd taki, jeśli rzeczywiście istniał, musiał być większy w doświadczeniu IV niż w III, gdyż z płynu rozlanego na dnie o większej powierzchni, bezwodnik węglowy łatwiej mógł dyfundować. Takie i inne dające się jeszcze przewidzieć źródła błędów, pod tym samym względem oddziaływać musiały. Można by np. przypuścić, że mimo wszelkich ostrożności podczas przelewania gazów z przyrządów do eudyometrów, dostała się do badanych próbek jakaś bańka atmosferycznego powietrza. Gdyby tak było, to ponieważ powietrze zewnętrzne zawiera około 21% tlenu, a w powietrzu przyrządów, na końcu doświadczenia, było nie więcej jak $3\text{--}4\%$ tego gazu, to owa bańka powietrzna bardziej wzbogaciłaby próbkę analizowaną w tlen niż w azot i znów ilość azotu znalazłoby się za mało. Tak więc tylko błędy, płynące z samych odczytań eudyometrycznych podczas analizy, mogły wypaść zarówno w kierunku + jak — co do ilości znajdowanego azotu, wszystkie inne, dające się przewidzieć źródła błędu, mogły wpływać tylko na za niskie oznaczenia ilości zawartego w naczyniach azotu. Gdy zaś mimo to wszystkie oznaczenia bez żadnego wyjątku wykazały na końcu doświadczenia ilość azotu w naczyniach większą, niż była w nich na początku, więc nie może ulegać żadnej wątpliwości, że: Podczas procesu przemiany amoniaku na kwas azotawy pod wpływem fer-

mentu nitrosomonas pewna ilość azotu wydziela się w stanie wolnym.

Ta ilość azotu, wydzielająca się w stanie wolnym na daną ilość amoniaku utlenionego na kwas azotawy, nie zawsze jest jednakowa, ale zależy od warunków, w jakich się nitryfikacja amoniaku odbywa. W doświadczeniu III wynosiła ona około 12%, w doświadczeniu IV (przyjmując cały niedobór azotu w płynie jako wydzielony w stanie wolnym) nie więcej jak 6% azotu amoniakalnego, który zniknął z płynu. Zkądże te różnice? Zatkanie korkiem zwykłym kolb w doświadczeniu III a szklaną kapą w doświadczeniu IV, nie mogło chyba tych różnic spowodować, trudnoby sobie było przynajmniej z takiego wpływu zdać sprawę.

O wiele prawdopodobniejsze jest przypuszczenie, że powodem była tu niejednakowa powierzchnia dna kolb, do obu tych doświadczeń użytych.

W obu doświadczeniach ilość płynu wprowadzonego do każdego z naczyń była jednakowa i wynosiła dokładnie 100 cm.³. Ale w doświadczeniu III te 100 cm.³ rozlane były na dnie o 79 cm.², stanowiły więc warstwę płynu około 12·5 mm. grubą, w doświadczeniu IV pokrywały dno mające 154 cm.² powierzchni, a więc stanowiły tylko warstwę 6·5 mm. grubą.

Uważam za rzecz w wysokim stopniu prawdopodobną, że ta właśnie niejednakowa grubość warstwy cieczy była przyczyną wydzielania się niejednakowych ilości wolnego azotu. Wpływ ten grubości cieczy wyobrażam sobie w sposób następujący.

Wiadomo, że niezbędnym warunkiem do tego, żeby utlenianie na kwas azotawy mogło się prawidłowo odbywać, jest między innymi i to, aby w otoczeniu znajdowała się zasada, z którąby tworzący się kwas azotawy łączył się na odpowiednią sól. Tą zasadą był w naszych doświadczeniach, podobnie jak w doświadczeniach Winogradzkiego, zasadowy węglan magnowy, który jako nierozpuszczalny spoczywał na dnie naczynia. Rozwijające się mikroby nitrosomonas trzymają się też głównie, jak to wykazał Winogradzki, dna naczynia, pokrywając tu jakby galaretowatymi kłaczkami cząstki węglanu magnowego. Ale i w całym płynie, choć stosunkowo w mniejszej ilości, pływają swobodnie komórki nitrosomonas.

Skoro utlenianie się amoniaku na kwas azotawy odbywa się pod wpływem mikrobów nitrosomonas, to przyjąć trzeba, że proces ten, który jest właściwie oddychaniem tych mikrobów, odbywa się wewnątrz ich komórek, a kwas azotawy, będący produktem tego oddychania, wydziela się z nich w najbliższe otoczenie. O ile przemiana dokonywa się

pod wpływem komórek, bezpośrednio przytykających do węglanu magnewego, tworzący się kwas azotawy łączy się natychmiast z tlenkiem magnowym na azotyn magnowy, ale o ile kwas azotawy wydzielany jest przez komórki, pływające w wyższych warstwach płynu, potrzeba pewnego czasu, aby wszedł w zetknięcie ze spoczywającym na dnie naczynia węglanem magnowym. Dlatego chwilowo może się znajdować w płynie mała ilość wolnego kwasu azotawego. Im grubszą jest warstwa płynu, pokrywającego dno naczynia, im większa wskutek tego odległość pływających w nim komórek nitrosomonas od cząstek węglanu magnewego, tem większe ilości wolnego kwasu azotawego mogą się w płynie znajdować. Wiadomo, że wolny kwas azotawy, w zetknięciu z amoniakiem, może rozkładać się z wydzielenia wolnego azotu podług wzoru $\text{NH}_3 + \text{HNO}_2 = \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$.

Naturalnie tego rodzaju rozkład będzie się tem łatwiej odbywał, im więcej będzie w płynie wolnego kwasu azotawego; tem właśnie objaśnić sobie możemy, że w doświadczeniu III, w którym płyn stanowił grubszą warstwę, wydzielanie się wolnego azotu było obfitsze, niż w doświadczeniu IV, w którym warstwa płynu potrzebnego do nityfikacyi była o połowę cieńsza.

4. Kontrola rezultatów doświadczenia czwartego przez bilans tlenu.

W celu skontrolowania wiarogodności rezultatów analitycznych doświadczenia IV spróbujemy jeszcze przeprowadzić bilans tlenu, zużytego w ciągu doświadczenia, to jest, porównajmy ubytek tlenu, jaki wykazała analiza gazów, z jego ilością potrzebną do utlenienia, na kwas azotawy i azot, tego amoniaku, który zniknął z płynu.

Obliczenie takie z doświadczenia III doprowadziło nas właśnie do przeświadczenia, że prócz nityfikacyi amoniaku odbywały się tam inne procesy utlenienia, gdyż ubytek tlenu, wykazany analizą, był większy, niż wypadal z takiego obliczenia. Z tego wywnioskowaliśmy wówczas, że korki zatykające kolby ulegały w ciągu doświadczenia rozkładowi. Ponieważ w doświadczeniu IV zamknięcie było ze szkła, przez co źródło ubocznego zużywania się tlenu zostało usunięte, więc ilości tlenu, jakie znikły z naczyń, powinnyby dokładnie odpowiadać zmianom, których doznał amoniak. Ściśle rzecz biorąc, powinien nawet rzeczywisty ubytek tlenu w naczyniach być o parę miligr. mniejszy niż wypadający z rachunku, a to dlatego, że jeśli prawdą jest (a o tem wątpić już nie można), że mikroby pobierają węgiel z bezwodnika węglowego, to tlen tego zaasymilowanego bezwodnika, musi być od niego oddzie-

lony i zużyty, wraz z tlenem wolnym, do utlenienia amoniaku na kwas azotawy. Ponieważ Winogradzki znalazł, że na każde 35 mg. utlenionego azotu amoniakalnego wytwarzają mikroby ilość materji organicznej, odpowiadającej 1 mg. węgla, więc nie trudno obliczyć, jaką ilość tlenu mógł dla procesu nitryfikacyjnego dostarczyć bezwodnik węglowy w naszych doświadczeniach.

Wykonajmy te obliczenia.

1. Bilans tlenu w naczyniu pierwszym.

Analiza gazów wykazała tu ubytek 117·03 cm.³ tlenu. Przyjmując wagę 1 cm.³ na 0·00143 g., wypada, że podczas procesu nitryfikacyjnego, jaki się w kolbie przyrzędu odbywał, zużyło się istotnie 0·16735 g. tlenu.

Analiza płynu wykazała, że z płynu ubyło 0·0511 g. azotu amoniakalnego, z czego 0·0484 g. zostało zamienione na kwas azotawy.

Do utlenienia 0·0484 g. azotu amoniakalnego na kwas azotawy potrzeba, podług wzoru: $\text{NH}_3 + \text{O}_3 = \text{HNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, — 0·16541 g. tlenu.

Część azotu przeszła w azot wolny. Analiza gazu wykazała przybytek 0·83 cm.³ czyli 0·0011 g. azotu wolnego w powietrzu kolby. Gdyby tę ilość przyjąć za prawdziwą i wziąć za podstawę obliczenia, to w myśl wzoru $2\text{NH}_3 + \text{O}_3 = 3\text{H}_2 + \text{N}_2$, wypadłoby, że do tego wydzielenia wolnego azotu zużyć się było powinno 0·00188 g. tlenu, a więc razem do nitryfikacji i wydzielenia azotu wolnego powinno się być zużyć: $0·16541 + 0·00188 = 0·16729$ g.

Ale analiza płynu wykazała nam ubytek azotu amoniakalnego nie 0·0495 g., jaki wypada ze zsumowania azotu, odnalezionego w formie kwasu azotawego i w formie azotu wolnego, ale 0·0511 g., (bo z ilości 0·0529 g. azotu amoniakalnego pierwotnego, pozostało w płynie tylko 0·0018 g. azotu w formie NH_3).

Różnica między temi dwoma liczbami wynosi $0·0511 - 0·0495 = 0·0016$ g. azotu. Nie jest rzeczą prawdopodobną, aby taka ilość azotu mogła być zaasymilowana przez mikroby i przejść w związki organiczne. Sucha masa mikrobów, choćby i przeważnie składała się z materji białkowatych, nie mogłaby zawierać więcej jak 1 część azotu na cztery części węgla, znajdującego się w tej suchej masie. Winogradzki, jak wspomnieliśmy, wykazał, że na 35 mg. utlenionego azotu amoniakalnego mikroby asymilują 1 mg. węgla. W naszym doświadczeniu utleńnię się 48 mg. węgla, więc mikroby mogły przytem zaasymilować 1·4 mg. węgla, zatem azotu nie więcej jak 0·35 mg. Osad, w którym mikroby się znajdowały, gotowano z wodnikiem sodowym w celu od-

pędzenia resztek amoniaku, mogącego się tam znajdować w formie fosforanu amonowo-magnowego. Podczas tego gotowania część azotu organicznego mikrobów, musiała się także odczepić w formie amoniaku i została oznaczona jako amoniak, tak że w osadzie i płynie nie mogło zostać więcej jak 0·2 mg. azotu. Jeżeli tę ilość odejmiemy od ilości azotu, której w płynie nie odnaleziono, to reszta musiała wydzielić się w stanie wolnym. Z pierwotnej ilości 0·0529 g. azotu amoniakalnego odszukano w płynie 0·0502 g., w formie kwasu azotawego i amoniaku, dodając do tego jeszcze 0·0002 g., jako ilość azotu pozostałego prawdopodobnie w formie materij organicznych, otrzymamy 0·0504 g. całego azotu, pozostałego w płynie i osadzie.

Odejmując tę ilość od pierwotnej 0·0529 g., znajdziemy, że 0·0025 g. musiało się wydzielić w stanie wolnym. Jeżeli analiza gazów wykazała tylko przybytek 0·0011 g. wolnego azotu, to różnica 0·0014 g. musiała pochodzić głównie z błędów analizy gazów, bo analiza płynu jest niezawodnie pewniejszą.

Przyjmując, że 0·0025 g. azotu amoniakalnego przeszło w stan wolny, znajdziemy, że do tego musiało się zużyć 0·0043 g. tlenu.

Zatem razem do wywołania zmian, jakim uległ amoniak dodany pierwotnie do płynu, musiało się zużyć: 0·1654 g. + 0·0043 g. = = 0·1697 g. tlenu, podczas gdy ubytek istotny, wykazany analizą gazów, wynosił 0·16729 g., a więc o 0·00241 g. mniej.

Ta ilość tlenu 0·00241 g. musiała pochodzić z bezwodnika węglowego, którego węgiel został zaasymilowany przez mikroby nitryfikacyjne.

Powyżej na podstawie rezultatów badań Winogradzkiego obliczyliśmy, że mikroby w kolbie II musiały zaasymilować około 1·4 mg. węgla, do czego zużyć musiały 5·13 mg. czyli 2·61 cm.³ bezwodnika węglowego. Ta ilość bezwodnika węglowego dostarczyła do procesów utleniania 2·61 cm.³ czyli 3·74 mg. tlenu. Gdyby wszystkie nasze założenia i oznaczenia analityczne były absolutnie dokładne, to istotny ubytek tlenu w kolbie powinien był być o 3·74 mg. czyli o 2·61 cm.³ mniejszy, niż wypadł z obliczenia. W rzeczywistości mniejszym był tylko o 2·41 mg. czyli o 1·75 cm.³. Różnica 1·33 mg. czyli 0·86 cm.³ leży naturalnie w granicach błędów doświadczenia.

2. Bilans tlenu w naczyniu drugim.

Analiza gazów wykazała ubytek 119·23 cm.³ tlenu, co odpowiada 0·1705 g. Taka więc ilość tego gazu zużyła się do procesu nitrykacyjnego, jaki się odbywał w przyrządzie II.

Analiza płynu wykazała ubytek 0·05219 g. azotu amoniakalnego, z czego 0·04901 g. przeszło w kwas azotawy.

Do utlenienia 0·04901 g. azotu amoniakalnego na kwas azotawy, potrzeba było, podług wyżej przytoczonego wzoru, 0·1675 g. tlenu. Część azotu i tu przeszła w azot wolny. Analiza gazów wykazała przybytek azotu, tak jak i w przyrządzie II, 0·83 cm.³ czyli 0·0011 g., ale niedobór azotu w płynie wynosił więcej, mianowicie 0·00314 g. I tu więc, prawdopodobnie wskutek tych samych co powyżej omówionych źródeł błędu, gazometryczne oznaczenie azotu wypadło, jak się zdaje, za nisko.

Gdyby oznaczenie gazometryczne przyjąć za prawdziwe, wypadłoby, że do wydzielenia azotu we wskazanej niem ilości potrzebaby 0·00188 g. tlenu.

A więc razem do nitryfikacji i wydzielenia azotu powinny się było zużyć: 0·1675 g. + 0·00188 g. = 0·16938 g. tlenu.

Ale prawdopodobniejszem jest, że istotne wydzielanie wolnego azotu było większe i odpowiadało niedoborowi azotu w płynie, zmniejszonemu tylko o ilość azotu zaasymilowaną przez mikroby.

Niedobór azotu w płynie wynosił 0·00314 g., przypuszczając, że w osadzie i płynie pozostało 0·0002 g. azotu organicznego, zaasymilowanego przez mikroby, wypadłoby, że azotu wolnego wydzieliło się 0·00294 g.

Do wydzielenia 0·00294 g. azotu wolnego z amoniaku potrzeba 0·00504 g. tlenu.

Więc przyjmując, że z potraceniem 0·0002 g. azotu organicznego, zaasymilowanego przez mikroby, cały wykazany w płynie niedobór azotu pochodził z przejścia części jego w stan wolny, wypada, że do procesów, które zaszły w kolbie przyrządu, powinno się było zużyć tlenu: 0·1675 g. + 0·00504 g. = 0·17254 g.; ilość, która od ubytku istotnie przez analizę gazową stwierdzonego (0·1705 g.) jest o 0·00204 g. czyli o 1·43 cm.³ większa. Ta ilość musiała pochodzić z bezwodnika węglowego, który był asymilowany przez mikroby. Ta ilość powinna była wynosić około 2·6 cm.³ czyli 3·74 mg.

Różnicę 1·37 cm.³ czyli 1·7 mg. azotu trzeba przypisać błędom doświadczenia.

Powyżej przeprowadzone porównanie istotnego ubytku tlenu, zamkniętego w przyrządach, z obliczoną ilością tego gazu, potrzebną do wywołania zmian, jakie zaszły w składzie płynów, znajdujących się w kolbach, daje nam zupełnie zadowalające stwierdzenie wiarygodności osiągniętych dat analitycznych i wniosków, jakieśmy z nich wyprowadzili. W porównaniu tem mamy między innymi także jeszcze stanowczy

dowód na to, co nam już wykazała analiza płynów, że w naszych doświadczeniach odbywała się wyłącznie przemiana amoniaku na kwas azotawy, bez żadnej przymieszki utleniania się tego ostatniego na kwas azotowy; bo gdyby kwas azotowy tworzył się był także, choćby w niewielkiej ilości, to zużycie tlenu musiałyby być większe, niż wypadło z obliczenia potrzeby tlenu w celu zamiany amoniaku na kwas azotawy. Istotnie, aby jeden miligram azotu kwasu azotawego mógł się zamienić w formę kwasu azotowego, potrzeba zużycia prawie 1·2 mg., a więc prawie 0·9 cm.³ tlenu.

Okoliczność, że ubytek tlenu skonstatowany przez analizę gazową, jest nieco niższy od ilości tlenu, jaka musiała być zużyta do utlenienia amoniaku, który znikł z płynu, na odpowiednią ilość kwasu azotawego i azotu wolnego, zgadza się zupełnie z przewidywaniem opartem na fakcie czerpania węgla z bezwodnika węglowego przez mikroby nitryfikacyjne, a zatem może poniekąd służyć jako dalsze stwierdzenie samego tego faktu. Sama przez się okoliczność ta, tylko dlatego nie mogłaby służyć za wystarczający dowód tego faktu, że absolutne liczby, o które tu idzie, są tak niskie, że niewiele co wykraczają poza granice błędów doświadczenia. Jednakże wobec innych zupełnie stanowczych dowodów, któreśmy przedtem poznali, ten bilans tlenu może stanowić także pożądane stwierdzenie wyprowadzonych wniosków.

IV. Ogólny wynik wszystkich doświadczeń.

Ogólne wyniki wszystkich doświadczeń dadzą się streścić w następujących zdaniach:

1. Nie ulega żadnej wątpliwości, że mikroby nitrosomonas pobierać mogą pokarm węglowy z wolnego bezwodnika węglowego.

2. Mikroby nitrosomonas nie mogą pobierać węgla z soli kwasu węglowego, a przynajmniej nie pobierają go z zasadowego węglanu magnewego.

3. Pod wpływem mikrobów nitrosomonas amoniak utlenia się jedynie na kwas azotawy, kwas azotowy nie tworzy się przytem wcale.

4. Podczas utleniania się amoniaku na kwas azotawy, pod wpływem nitrosomonasu, pewna część azotu wydziela się w stanie wolnym.

5. Ilość wolnego azotu nie znajduje się w żadnym stałym stosunku z ilością amoniaku, zamienionego na kwas azotawy, ale na tę samą ilość wytworzonych azotynów, ilość azotu wydzielonego w stanie wolnym może być większa lub mniejsza, stosownie do warunków, w jakich odbywa się proces nitryfikacyjny.

V. Zakończenie.

Wobec tego, że podany przez Winogradzkiego fakt asymilacji bezwodnika węglowego przez *nitrosomonas* został, przez powyżej opisane doświadczenia, z całą stanowczością stwierdzony, następuje pytanie, jak fakt ten należy pojmować i jak go pogodzić z utartem i jako dogmat przyjętem zapatrywaniem fizyologii, że tylko części roślinne zabarwione zielenią lub pokrewnym jej barwikiem, i tylko wobec światła, mogą wytwarzać materye organiczne z bezwodnika węglowego. Podług naszych dzisiejszych pojęć światło dostarcza roślinie energii do oddzielenia cząstek tlenu od bezwodnika węglowego i wody, czyli po prostu od kwasu węglowego, a barwik jest pośrednikiem chwytającym tę energią światła i przenoszącym ją na drobiny kwasu węglowego które mają być rozłożone. Komórki *nitrosomonas* nie są zielone i do swego odżywiania się i rozwoju wcale światła nie potrzebują, a jednak biorą pokarm węglowy z kwasu węglowego. Kwas węglowy, by przejść w materyę organiczną, musi uleść redukcji, musi pozbyć się pewnej części swego tlenu. Czyżby to oddzielenie się tlenu miało się tu odbywać bez zużycia odpowiedniej ilości kinetycznej energii? Oczywiście nie, tylko źródło tej energii musi być w tym przypadku inne. Energii dostarcza tu proces utleniania się amoniaku na kwas azotawy.

Ta szczególna forma oddychania, jaką się odznacza *nitrosomonas*, umożliwia mu asymilowanie bezwodnika węglowego niezależnie od światła i jakiegobądź barwika. Zwykłe rośliny zielone oddychają, jak wiemy, także, ale oddychają tylko kosztem swej materyi organicznej, t. j. kosztem tego materiału, który bez światła wytworzyć się w nich nie może, gdy światła zabraknie, to w końcu i tego oddechowego materiału zabraknąć musi. *Nitrosomonas* bierze materiał oddechowy z zewnątrz w formie amoniaku, byle tego materiału było pod dostatkiem, byle brak tlenu lub inne niekorzystne warunki nie tamowały możności zamiany jego na kwas azotawy, *nitrosomonas* ma zapewnioną energią nie tylko do rozmaitych procesów życiowych, ale i do tego, aby kwas węglowy, który się z zewnątrz do niego dostaje, rozłożyć i wytworzyć z niego potrzebną dla siebie ilość materyi organicznej.

Przyjmując takie pojmowanie przyczyn wyjątkowego sposobu żywienia się fermentu *nitrosomonas*, możemy z góry być przeświadczeni, że podobny wyjątkowy sposób zachowywania się znajdziemy u wszystkich tych organizmów, które, podobnie jak *nitrosomonas*, czerpią materiał oddechowy z zewnątrz w formie jakichś beztlenowych lub w tlen

ubogich mineralnych substancyj i przy pomocy tlenu powietrza przemieniają je na związki wyższego utlenienia. Wątpić tedy nie można, że i *bacterium nitrificans*, zamieniające kwas azotawy na azotowy i bakterye siarkowe, utleniające siarkowodór na siarkę i kwas siarkowy, należą także do kategorii organizmów, które, jakkolwiek nie zielone, mogą pobierać pokarm węglowy w formie kwasu węglowego i to zupełnie niezależnie od światła.

