

- [78] R. Vandenbosch, H. Warhanek u. J. R. Huizenga, Phys. Rev. 124, 846 (1961).
- [79] J. B. Wilhelmy, E. Cheifetz, R. C. Jared, S. G. Thompson u. H. R. Bowman, Phys. Rev. C 5, 2041 (1972).
- [80] P. Armbruster, H. Labus u. K. Reichelt, Z. Naturforsch. 26a, 512 (1971).
- [81] J. R. Huizenga u. R. Vandenbosch, Phys. Rev. 120, 1305 (1960); R. Vandenbosch u. J. R. Huizenga, ibid. 120, 1313 (1960).
- [82] V. D. Loveland u. Y. S. Shim, Phys. Rev. C 4, 2282 (1971).
- [83] D. C. Aumann, Habilitationsschrift, Technische Universität München 1971.
- [84] D. G. Sarantites, G. E. Gordon u. C. D. Coryell, Phys. Rev. 138 B, 353 (1965).
- [85] D. C. Aumann, K. F. Flynn, J. E. Gindler u. L. E. Glendenin, J. Inorg. Nucl. Chem. 31, 1935 (1969).
- [86] C. Rudy, R. Vandenbosch u. C. T. Ratcliffe, J. Inorg. Nucl. Chem. 30, 365 (1968).
- [87] J. H. Forster u. L. Yaffe, Can. J. Chem. 46, 1763 (1968).
- [88] G. B. Saha, J. Tomita u. L. Yaffe, Can. J. Chem. 46, 1763 (1968).
- [89] H. Nifenecker, C. Signarbieux, R. Babinet u. J. Poitan, siehe [17], Bd. 2, S. 117.
- [90] R. C. Ragaini, E. K. Hulet, R. W. Lougheed u. J. Wild, Phys. Rev. C 9, 399 (1974).
- [91] E. A. C. Crouch, At. Energy Res. Estab., Harwell (Great Britain), Rep. AERE-R 7209 (1973).
- [92] C. A. Fontenla, G. L. Griffith, R. B. Leachman u. A. M. Friedman, Proc. Int. Conf. Nuclear Physics, München 1973. North Holland, Amsterdam 1973, Bd. 1, S. 608.
- [93] R. L. Ferguson, F. Plasil, G. D. Alam u. H. W. Schmitt, Nucl. Phys. A 172, 33 (1971).
- [94] J. Weber, H. J. Specht, E. Konecny u. D. Heunemann, Nucl. Phys. A 221, 414 (1974).
- [95] D. C. Aumann u. E. Kowarschik, persönliche Mitteilung; E. Kowarschik, Diplomarbeit, Technische Universität München 1974.
- [96] D. C. Aumann u. D. Weismann, Nucl. Instrum. Methods 117, 459 (1974).
- [97] N. L. Lark, G. Sletten, J. Pedersen u. S. Bjørnholm, Nucl. Phys. A 139, 481 (1969).
- [98] J. W. Boldeman, A. R. De L. Musgrove u. R. L. Walsh, Aust. J. Phys. 24, 821 (1971).
- [99] H. R. Bowman, J. C. D. Milton, S. G. Thompson u. W. J. Swiatecki, Phys. Rev. 129, 2139 (1963).
- [100] F. Pleasanton, R. L. Ferguson u. H. W. Schmitt, Phys. Rev. C 6, 1023 (1972).
- [101] K. F. Flynn u. L. E. Glendenin, Argonne Nat. Lab. Rep. ANL-7749 (1970).
- [102] B. Laidler u. F. Brown, J. Inorg. Nucl. Chem. 24, 1485 (1962).
- [103] S. A. Karamyan, F. Nurmuratov, Yu. Ts. Oganessian, Yu. E. Penianzhkevich, B. J. Pustylnik u. G. N. Flerov, Sov. J. Nucl. Phys. 8, 401 (1969).
- [104] R. Vandenbosch, T. D. Thomas, S. E. Vandenbosch, R. A. Glass u. G. T. Seaborg, Phys. Rev. 111, 1358 (1958).
- [105] R. C. Jensen u. A. W. Fairhall, Phys. Rev. 109, 942 (1958).
- [106] R. C. Jensen u. A. W. Fairhall, Phys. Rev. 118, 771 (1960).
- [107] T. T. Sugihara, J. Roesmer u. J. W. Meadows, Jr., Phys. Rev. 121, 1179 (1961).
- [108] E. F. Neuzil, M. E. Phelps u. F. Ross, J. Inorg. Nucl. Chem. 27, 1463 (1969).
- [109] J. C. D. Milton u. J. S. Fraser, siehe [15], Bd. 2, S. 39.
- [110] E. E. Maslin, A. L. Rodgers u. W. G. F. Core, Phys. Rev. 164, 1520 (1967).

## Die Bindung des atmosphärischen Stickstoffs durch Mikroorganismen

Von Diethelm Kleiner<sup>[\*]</sup>

Zum Gedenken an Artturi Ilmari Virtanen

Die Erforschung der enzymatischen Assimilation von molekularem Stickstoff ( $N_2$ -Fixierung) hat in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte gemacht. Neben der rein wissenschaftlichen Seite dieses Vorgangs gewinnen auch die technologischen Aspekte immer mehr an Interesse. In diesem Fortschrittsbericht werden einige der wichtigsten Ergebnisse aus biochemischer Sicht zusammengefaßt.

### 1. Einleitung

Die Bindung des atmosphärischen Stickstoffs durch Mikroorganismen ist ein Vorgang, der an Wichtigkeit wohl nur von der Photosynthese übertroffen wird. Die Pionierarbeiten zu seiner Erforschung sind eng mit den Namen D. Burk, P. W. Wilson und A. I. Virtanen verknüpft. Aber erst nachdem es 1960 gelungen war, zellfreie Extrakte mit der Fähigkeit zur  $N_2$ -Fixierung herzustellen<sup>[1]</sup>, nahm die biochemische Aufklärung der enzymatischen Vorgänge einen großen Aufschwung.

Abb. 1 zeigt den Stickstoffkreislauf in der Natur. Danach gelangt ein Teil des anorganischen Bodenstickstoffs durch Auswaschen ins Grundwasser, ein anderer geht durch die

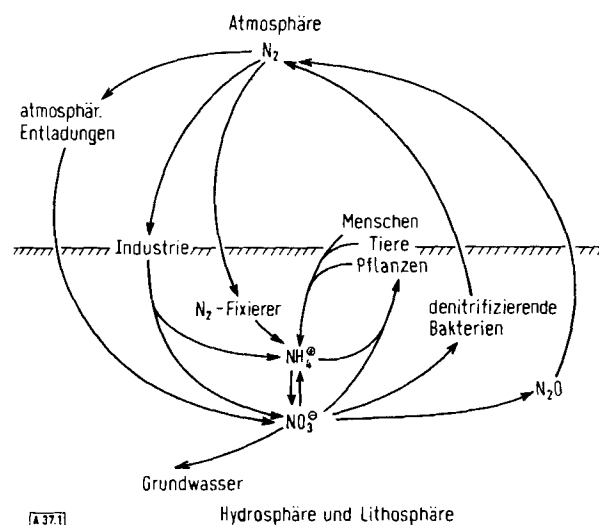


Abb. 1. Kreislauf des Stickstoffs in der Natur (nach [2]).

[\*] Dr. D. Kleiner  
Chemisches Laboratorium der Universität  
78 Freiburg, Albertstraße 21

Aktivität denitrifizierender Bakterien (Reduktion von Nitrat zu N<sub>2</sub>) an die Luft verloren. Diese Verluste werden im allgemeinen durch drei Prozesse ausgeglichen: Bildung von Stickstoffoxiden bei atmosphärischen Entladungen (wenige %), industrielle Düngemittelfabrikation (ca. 30%) und mikrobielle Aktivität (ca. 70%)<sup>[2]</sup>.

Viele der zur N<sub>2</sub>-Fixierung fähigen Mikroorganismen sind sicher zur Zeit noch unbekannt. Die bekannten – sowohl frei als auch in Symbiose lebenden – Organismen gehören ausschließlich dem Reich der Prokaryonten (Bakterien und Blaualgen) an (Tabelle 1). Sporadisch immer wiederkehrende Berichte über N<sub>2</sub>-Fixierung durch Pilze haben sich bei Nachprüfung mit Hilfe der sehr empfindlichen Acetylenreduktionsmethode (s. Abschnitt 3.2) noch in keinem Falle bestätigen lassen<sup>[3]</sup>.

Tabelle 1. N<sub>2</sub>-fixierende Organismen.

a) Frei lebend
1. Bakterien (z. B. <i>Clostridium</i> , <i>Azotobacter</i> )
2. Blaualgen (z. B. <i>Anabaena</i> , <i>Tolypothrix</i> )
b) Symbionten
1. Blaualgen in Flechten
2. Blaualgen oder Bakterien in Blättern (Blattsymbionten)
3. Rhizobien in Leguminosen
4. Mehrere weitgehend unbekannte Mikroorganismen (Actinomyceten?) in den Wurzeln von Angiospermen

Frei lebende N<sub>2</sub>-Fixierer sind in der Natur weit verbreitet. Man findet sie in vielen Böden<sup>[4-8]</sup>, in Seen und Meeren<sup>[9-13]</sup>, auf antarktischen Felsen<sup>[14]</sup>, in heißen Quellen<sup>[15]</sup>, im Holz absterbender Bäume<sup>[16]</sup> sowie im Darm von Termiten<sup>[17]</sup>, Säugetieren<sup>[18]</sup> und Menschen<sup>[18]</sup>. Landwirtschaftlich und ökologisch bedeutungsvoller jedoch sind die Symbionten, besonders die in den Wurzeln höherer Pflanzen vorkommenden Knöllchenbakterien.

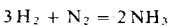
2. Die Reaktionsträgheit des N<sub>2</sub>-Moleküls

Stickstoff ist als reaktionsträges Element bekannt. Ein Vergleich einiger physikalischer Eigenschaften und molekularer Parameter der isoelektronischen Verbindungen N<sub>2</sub>, CO und C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Tabelle 2) zeigt als Hauptursache für diese Reaktionsträgheit den großen Zuwachs an Bindungsenergie beim Übergang von der Doppel- zur Dreifachbindung<sup>[19]</sup>.

Tabelle 2. Physikalische Eigenschaften der isoelektronischen Moleküle N<sub>2</sub>, CO und C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (nach [19]).

	:N≡N:	:C≡O:	HC≡CH
Bindungslänge [Å]	1.098	1.128	1.208
Ionisationsenergie [eV]	15.6	14.0	11.4
Dissoziationsenergie [kcal/mol]	225	235	200
Bindungsenergie [kcal/mol]			
1. Bindung	38	84	83
2. Bindung	100	170	147
3. Bindung	225	235	200

Obwohl die Reaktion



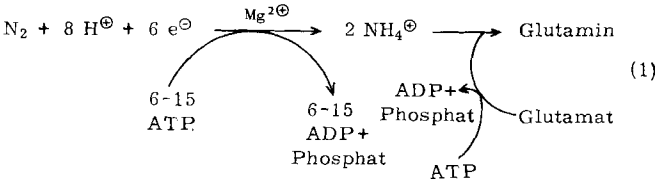
mit ΔG<sub>0</sub> = -12 kcal/mol exergonisch ist<sup>[19]</sup>, verläuft sie auch an den industriellen Eisenkatalysatoren (Haber-Bosch-Verfah-

ren) bei Raumtemperatur unmeßbar langsam. Zur Erzielung eines nennenswerten Umsatzes sind industrielle Temperaturen von mindestens 400°C und Drücke von etwa 200 atm erforderlich<sup>[20]</sup>.

3. Biochemie der mikrobiellen N<sub>2</sub>-Fixierung

3.1. Reaktionsweg

In den N<sub>2</sub>-fixierenden Mikroorganismen wird die Assimilation durch den binären Enzymkomplex Nitrogenase katalysiert. Dabei wird der Stickstoff nach Gl. (1) zu Ammonium-Ionen



reduziert<sup>[21]</sup>, die dann wahrscheinlich mit Hilfe des Enzyms Glutamin-Synthetase an Glutamat gebunden werden<sup>[22]</sup>. Ferredoxin<sup>[23-27]</sup> fungiert als Elektronenüberträger.

Wie beim Haber-Bosch-Verfahren kann die Reaktion nur unter beträchtlichem Energieaufwand eingeleitet werden. Diese Energie wird in Form von ATP bereitgestellt<sup>[28-32]</sup>. Die Zahl der zur Umsetzung jedes N<sub>2</sub>-Moleküls verbrauchten ATP-Moleküle ist nicht genau bekannt. Sie ändert sich bei Untersuchungen in vitro mit den experimentellen Bedingungen<sup>[33-35]</sup>.

3.2. Bestimmung der Nitrogenase-Aktivität<sup>[36]</sup>

Die älteste und direkteste Methode verfolgt die Reaktion mit Hilfe von schwerem Stickstoff. Das Gewebe oder die Enzympräparation wird nach der Inkubation nach Kjeldahl aufgeschlossen, NH<sub>3</sub> zu N<sub>2</sub> oxidiert und der Gehalt an <sup>15</sup>N massenspektrometrisch bestimmt. Diese Methode wird hauptsächlich zur Aktivitätsbestimmung in vivo angewendet.

Ammoniak kann auch direkt colorimetrisch nachgewiesen werden, wenn man Enzympräparationen untersucht, die es nicht weiter umwandeln können. Solchen gewöhnlich zellfreien Präparaten müssen dann die in Gl. (1) angegebenen Cofaktoren (Mg<sup>2+</sup>, ATP und ein Elektronendonator, wobei sich Dithionit<sup>[37]</sup> sehr gut bewährt hat) zugefügt werden.

Die einfachste, empfindlichste und daher am häufigsten angewendete Methode benutzt die gleichfalls durch Nitrogenase katalysierte Reduktion von Acetylen zu Äthylen (s. Abschnitt 3.3). Beide Verbindungen können mit geringem Aufwand gaschromatographisch bestimmt werden. Diese Methode ist so empfindlich, daß die Fixierungsaktivität von nur zwei Blaualgenkolonien noch nachgewiesen werden kann<sup>[38]</sup>.

3.3. Spezifität der Nitrogenase

Das aktive Zentrum der Nitrogenase ist nicht sehr substratspezifisch. Bisher ist die Reduktion der in Tabelle 3 aufgeführten Verbindungen unter dem Einfluß des Enzyms in vitro gelungen. Ist kein Substrat zugegen, so reduziert das Enzym Protonen; es entwickelt sich Wasserstoff. Bemerkenswert ist, daß Acetylen nur bis zum Äthylen reduziert wird<sup>[40]</sup>. In D<sub>2</sub>O bildet sich dabei ausschließlich cis-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>D<sub>2</sub><sup>[40]</sup>.

Tabelle 3. Durch Nitrogenase reduzierte Verbindungen (nach [39]). n = Zahl der übertragenen Elektronen,  $v_{rel}$  = relative Reaktionsgeschwindigkeit.

Substrat	Produkt	n	$v_{rel}$
$N_2$	$2NH_3$	6	1
$N_3^-$	$NH_3 + N_2$	2	3
$N_2O$	$H_2O + N_2$	2	3
$C_2H_2$	$C_2H_4$	2	3-4
HCN	$CH_4, C_2H_4, NH_3$	6	0.6
	$CH_3NH_2$	4	
$CH_3CN$	$C_2H_6, NH_3$	6	0.2
$CH_3NC$	$CH_3NH_2, CH_4$	6	0.8
	$C_2H_4, C_2H_6$	8, 10	
	$C_3H_6, C_3H_8$	12, 14	
$2H^+$	$H_2$	2	4

Die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsetzungen stehen – abgesehen von den unübersichtlichen Reaktionen der Cyanide und Isocyanide – in etwa umgekehrtem Verhältnis zur Zahl der übertragenen Elektronen. Es wird daher angenommen, daß die Aktivierung der Elektronen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Eine kinetische Analyse der gegenseitigen Beeinflussung der Substrate hat zur Hypothese eines flexiblen aktiven Zentrums geführt, das imstande ist, Substrate unterschiedlicher Struktur zu binden<sup>[41]</sup>. Alle Reaktionen außer der  $H_2$ -Entwicklung werden durch CO gehemmt<sup>[41, 42]</sup>. Von physiologischer Bedeutung ist die Reaktionshemmung durch das Produkt ADP<sup>[43]</sup> (s. Abschnitt 4). Es ist noch nicht geklärt, ob dabei nur Produktvergiftung oder auch eine regulatorische Hemmung des Enzyms vorliegt<sup>[39, 44, 45]</sup>. Sauerstoff denaturiert das Enzym irreversibel.

### 3.4. Reinigung des Enzyms

Die Denaturierung durch Sauerstoff ist die Hauptschwierigkeit bei der Reindarstellung der Nitrogenase. Alle Handhabungen müssen in einer sauerstofffreien Atmosphäre (unter  $N_2$ ,  $H_2$  oder Ar) durchgeführt werden.

Bulen und Le Comte<sup>[46]</sup> entdeckten 1966, daß die Nitrogenase ein Komplex aus zwei leicht voneinander trennbaren Proteinen ist, die in Ermangelung systematischer Namen mit Komponente I (Mo-Fe-Protein, Molybdoferredoxin, Azofermo) und Komponente II (Fe-Protein, Azoferredoxin, Azofer) bezeichnet werden. Im Lauf der Zeit wurde ein generelles Reinigungsschema mit den folgenden Hauptschritten entwickelt:

1. Herstellung eines Rohextraktes,
2. Grobreinigung (hauptsächlich fraktionierende Fällungen),
3. Chromatographie an Diäthyl-aminoäthyl-cellulose. Durch Eluierung mit Laufmitteln verschiedener Ionenstärken können beide Komponenten in noch unreiner Form voneinander getrennt werden,
4. weitere Reinigung der isolierten Komponenten (Gelfiltration, Elektrophorese, fraktionierende Fällungen, Hitzedenaturierungen).

Diese Trennung der beiden Komponenten und deren Reindarstellung ist für mehrere Mikroorganismen beschrieben worden. Es hat sich in jedem Fall gezeigt, daß keines der beiden Proteine allein in Gegenwart aller Cofaktoren die Reduktion von  $N_2$  zu katalysieren vermag.

Vermutungen, daß noch ein drittes Protein zur vollen Nitrogenase-Aktivität nötig sei<sup>[47, 48]</sup>, haben sich nicht bestätigt<sup>[49]</sup>.

### 3.5. Physikochemische Charakterisierung der Komponenten

Tabelle 4 zeigt die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Nitrogenase-Komponenten einiger Organismen. Trotz unterschiedlicher Herkunft der Komponenten gleichen sich ihre Eigenschaften in hohem Maße. Bemerkenswert sind das Vorkommen von Molybdän in Komponente I sowie die Kältelelabilität der Komponente II von manchen Organismen. Dem niedrigen isoelektrischen Punkt entsprechend zeigen die bisher

Tabelle 4. Eigenschaften der Nitrogenase-Komponenten aus Mikroorganismen.

Komponente I	Komponente II	Organismus [a]	Lit.
Molekulargewicht:			
220000	—	C. p.	[50]
—	55000	C. p.	[51]
210000	56000	C. p.	[52]
270–300000	—	A. v.	[53]
216000	64000	A. v.	[54]
218000	66800	K. p.	[55]
200000	—	Rh. j.	[56]
Untereinheiten:			
$2 \times 60000$	$2 \times 27500$	C. p.	[52]
$+ 2 \times 51000$	—	C. p.	[50]
$2 \times 60000$	—	C. p.	[50]
$+ 2 \times 50000$	—	C. p.	[51]
—	$2 \times 27500$	A. v.	[57]
$4 \times 70000$	—	A. v.	[54]
$4 \times 56000$	$2 \times 33000$	A. v.	[54]
$2 \times 50000$	—	K. p.	[55]
$+ 2 \times 60000$	$2 \times 34600$	Rh. j.	[56]
$4 \times 50000$	—	Chr.	[58]
2 Arten	—	Chr.	[58]
Isoelektrischer Punkt:			
5.0	4.6	C. p.	[52]
5.2	4.7	A. v.	[54]
5.5	4	K. p.	[55]
Gehalt an Mo [Atome pro Molekül]:			
1–1.5	—	C. p.	[52]
1.73	—	C. p.	[59]
1.8	—	A. v.	[53]
1.54	0	A. v.	[54]
1.04	0	K. p.	[55]
1.3	—	Rh. j.	[56]
1–2	—	Chr.	[58]
Gehalt an Fe [Atome pro Molekül]:			
—	4	C. p.	[51]
12–18	3–4	C. p.	[52]
22–24	—	C. p.	[59]
34–38	—	A. v.	[53]
24	3.5	A. v.	[54]
18	4	K. p.	[55]
29	—	Rh. j.	[56]
Gehalt an $S^{2-}$ [Atome pro Molekül]:			
—	4	C. p.	[51]
8–15	3–4	C. p.	[52]
22–24	—	C. p.	[59]
26–28	—	A. v.	[53]
20	3	A. v.	[54]
16.7	3.82	K. p.	[55]
26	—	Rh. j.	[56]
Kältelelabilität:			
—	+	C. p.	[60]
—	+	A. v.	[61]
—	—	K. p.	[55]
—	+	M. f.	[62]

[a] Abkürzungen: C. p. – *Clostridium pasteurianum*; A. v. – *Azotobacter vinelandii*; K. p. – *Klebsiella pneumoniae*; Rh. j. – *Rhizobium japonicum*; Chr. – *Chromatium vinosum*; M. f. – *Mycobacterium flavum*.

bekannten Aminosäureanalysen von I und II für alle Organismen eine Dominanz der sauren Aminosäuren<sup>[54–56, 63, 64]</sup>, wobei das Fehlen von Tryptophan in II auffällt. Die Aminosäurezusammensetzung läßt nach Marchalonis und Weltman<sup>[65]</sup> für die Komponenten I aus *C. pasteurianum*, *K. pneumoniae*, *A. vinelandii* und *Rh. japonicum* auf die Evolution aus einem gemeinsamen Vorfahren schließen. Desgleichen dürften die Komponenten II aus *C. pasteurianum*, *A. vinelandii* und *K. pneumoniae* aus einem Urprotein entwickelt worden sein.

Mit Hilfe der Mößbauer-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß die Fe-Atome von I drei Gruppen mit unterschiedlichen Spektren angehören, in II aber gleichartig gebunden sind<sup>[66]</sup>. Das Vorkommen von Eisen und Sulfidschwefel in etwa gleichen Mengen, die charakteristischen ESR-Signale (s. Abschnitt 3.7), die Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich und im nahen UV<sup>[45]</sup> sowie die H<sub>2</sub>S-Entwicklung beim Ansäuern klassifizieren beide Nitrogenase-Komponenten als Eisen-Schwefel-Proteine<sup>[67]</sup>. Viele Angehörige dieser unter den Prokaryonten weit verbreiteten Klasse zeichnen sich durch ein sehr niedriges Elektronenübertragungspotential aus.

### 3.6. Kombination der Komponenten aus verschiedenen Organismen

Obwohl sich die Nitrogenase-Komponenten verschiedener Organismen sehr ähneln, lassen sie sich doch nicht beliebig zu aktiven Komplexen kombinieren. Besonders taxonomisch nur weitläufig Verwandte zeigen geringe Kooperationsbereitschaft<sup>[39, 68, 69]</sup>. So sind z. B. weder die Kombination I aus *A. vinelandii* (obligater Aerobier) plus II aus *C. pasteurianum* (obligater Anaerobier) noch die reziproke Mischung zur N<sub>2</sub>-Fixierung imstande<sup>[69]</sup>. Näher Verwandte geben eher positive Resultate. So sind z. B. sämtliche „Kreuzungen“ der Nitrogenase-Proteine von *B. polymyxa* und *K. pneumoniae* (beides fakultative Anaerobier) etwa genauso aktiv wie die homologen Kombinationen<sup>[69]</sup>. Es ist noch nicht bekannt, wodurch diese Unterschiede hervorgerufen werden, da weder Aminosäuresequenz noch Tertiärstruktur von irgendeinem Nitrogenase-Protein bekannt sind.

### 3.7. Elektronentransport und Reaktionsmechanismus

Die Rolle der beiden Komponenten beim Gesamtvorgang ist erst in letzter Zeit mit Hilfe der ESR-Spektroskopie aufgeklärt worden<sup>[70–75]</sup>. Abb. 2 zeigt die ESR-Spektren beider Komponenten von *C. pasteurianum* einzeln und im Gemisch bei 13K mit und ohne Cofaktoren. Es wird angenommen, daß die Signale bei g=4.29, 3.77 und 2.01 halbreduziertes I zukommen, während reduziertes I keine Signale ergibt. Dagegen soll oxidiertes II keine Signale aufweisen, aber nach Reduktion Signale bei g=4.3, 2.05, 1.94 und 1.88 zeigen. Demnach liegt I auch in Gegenwart von Dithionit in halbreduzierter Form vor (a). II dagegen in reduzierter (b). Das Signal des Gemisches (c) zeigt schwache Wechselwirkungen beider Komponenten an, ohne daß eine Elektronenübertragung stattfindet. Zugabe von MgATP hat keinen Einfluß auf das Spektrum von I (d), verändert aber das Spektrum von II (e). Daraus wird auf die Bindung von MgATP an II geschlossen, ein Befund, der auch unabhängig durch Bindungsstudien<sup>[76, 77]</sup> und andere Experimente<sup>[78]</sup> bestätigt worden ist. Der Komplex von II mit MgATP ist nun imstande, I unter Hydrolyse von

ATP vollständig zu reduzieren, wobei dessen Signal weitgehend verschwindet (f). ATP könnte dabei zur Elektronenaktivierung oder Konformationsänderung von II führen, wonach dann eine Elektronenübertragung stattfinden kann.

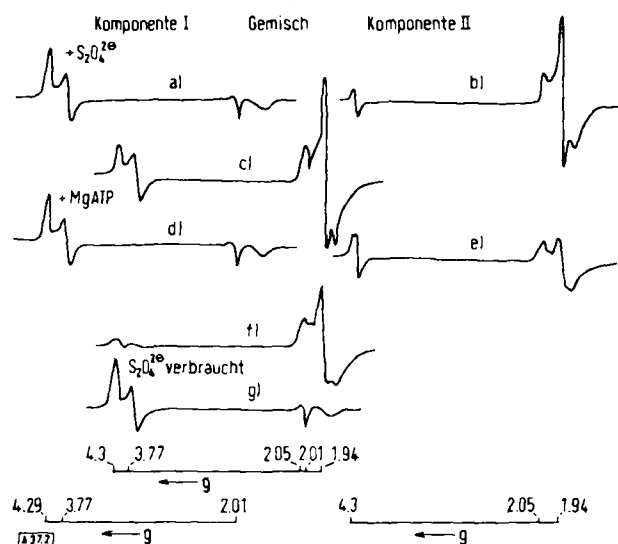
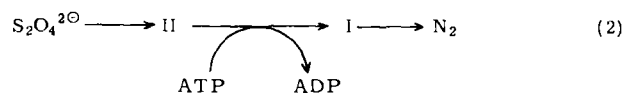


Abb. 2. ESR-Spektren der Nitrogenase-Komponenten I und II von *C. pasteurianum* unter verschiedenen Bedingungen. a)–g) siehe Text (nach [70]).

Nachdem die Elektronenquelle erschöpft ist, ist II oxidiert und I halbreduziert, und man sieht dann nur die Signale von I (g). Demnach wäre für die enzymatische Reduktion von N<sub>2</sub> ein Elektronenfluß wie in Gl. (2) zu postulieren.



Durch diese Untersuchungen ist zwar der Elektronentransport im Enzym-Komplex weitgehend aufgeklärt worden, aber nichts über die Beschaffenheit des aktiven Zentrums und den Mechanismus der N<sub>2</sub>-Reduktion ausgesagt. Der älteste und naheliegendste Vorschlag<sup>[79]</sup> nahm eine Reduktion des N<sub>2</sub> in drei Schritten über Diimin und Hydrazin zu Ammoniak an. Trotz intensiver Suche konnte aber keines dieser Zwischenprodukte entdeckt werden, überdies lassen sich weder Hydrazin noch Diimin durch Nitrogenase reduzieren<sup>[80, 81]</sup>. Zwei andere Mechanismen<sup>[82, 19]</sup> betonen die Fähigkeit von Mo<sup>III</sup> und Mo<sup>VI</sup>, stabile Verbindungen zu bilden. Außerdem wurde in Analogie zu den anorganischen N<sub>2</sub>-Komplexen<sup>[82a]</sup> die endständige Bindung des N<sub>2</sub> postuliert<sup>[82]</sup>. Keine dieser Theorien kann sich aber bislang auf experimentelle Beweise stützen[\*].

## 4. Die Regelung der Nitrogenase-Aktivität in vivo

Wie erwähnt, ist die mikrobielle Reduktion des N<sub>2</sub> nur dadurch möglich, daß zur Aktivierung des reaktionsträgen N<sub>2</sub>-Moleküls Energie in Form von ATP verbraucht wird. Damit ist dieser Assimilationsvorgang für den Organismus recht kost-

[\*] Anmerkung der Redaktion: Über die neuesten Anschauungen zum Mechanismus der Stickstoff-Reduktion wird in Kürze G. N. Schrauzer in dieser Zeitschrift berichten.

spielig. In vielen  $N_2$ -Fixierern hat sich daher im Laufe der Evolution ein Regulationssystem entwickelt, in dem die Nitrogenase-Synthese durch das Produkt  $NH_4^+$  reprimiert wird<sup>[83-90]</sup>. Die extrazelluläre  $NH_4^+$ -Konzentration, bei der diese Repression eintritt, kann bei manchen Organismen sehr gering sein (z. B. ca.  $10 \mu\text{mol/l}$  bei *A. vinelandii*<sup>[91]</sup>). Durch diesen groben Steuermechanismus wird bei ausreichendem externem Angebot an  $NH_4^+$ - (und  $NO_3^-$ )-Ionen die dann unnötige und kostspielige  $N_2$ -Assimilation gebremst. Eine Induktion der Synthese durch das Substrat  $N_2$  dürfte dagegen nicht vorliegen. Sie wäre vom Standpunkt der Evolution auch sinnlos, da es auf der Erde kaum ein von  $N_2$  freies Biotop geben dürfte<sup>[89]</sup>. Ein zweiter, feinerer Steuermechanismus, der schon erwähnt wurde, wirkt über die Inhibierung des Enzyms durch ADP<sup>[43]</sup>. Der Organismus ist somit nicht in der Lage, seinen gesamten Bestand an ATP zur  $N_2$ -Fixierung zu verwenden, falls das dabei entstehende Produkt ADP nicht sofort wieder in ATP umgewandelt wird. Auch wenn ein niedriger ATP-Spiegel allein schon die  $N_2$ -Fixierung verlangsamt, wirkt ADP darüber hinaus noch als Verstärker dieses Signals an die Nitrogenase. AMP hat keine Hemmwirkung<sup>[43]</sup>.

## 5. Möglichkeiten technologischer Nutzung

Anwendungstechnische Aspekte für die biologische  $N_2$ -Assimilation ergeben sich auf den Gebieten der Landwirtschaft, des Umweltschutzes und der Lebensmitteltechnologie.

### 5.1. Landwirtschaft und Umweltschutz

#### 5.1.1. Symbionten

Es ist seit langem bekannt, daß der Anbau von Leguminosen die anschließende Ernte anderer Kulturpflanzen fördert (Gründüngung)<sup>[92]</sup>. Die Ursache liegt in der  $N_2$ -Assimilation durch Knöllchenbakterien (Rhizobien), die 80–90 % ihres Stickstoffs an die Wirtspflanze abgeben können<sup>[93]</sup>. Vor allem *Vintanen* ist die Entwicklung sehr aktiver Rhizobienstämme zu verdanken, die zur Beimpfung von Leguminosensamen verwendet werden und zu beachtlichen Ertragssteigerungen geführt haben.

Bis jetzt ist allerdings ungeklärt, welche Faktoren die Rhizobien veranlassen, gerade mit den Leguminosen eine Symbiose einzugehen. An der Aufklärung dieses Problems wird zur Zeit intensiv gearbeitet<sup>[94, 95]</sup> in der Hoffnung, auch andere Kulturpflanzen zur Symbiose mit Rhizobien veranlassen zu können<sup>[95]</sup>. Stimulierend dürfte dabei die vor kurzer Zeit entdeckte Symbiose zwischen einer Nicht-Leguminose (*Trema aspera*) und einem Bakterium des Genus *Rhizobium* wirken<sup>[96]</sup>.

Neben den Leguminosen gibt es weitere  $N_2$ -assimilierende Symbiosen von ökologischer Bedeutung, z. B. in den Flechten und in den Wurzeln einiger Angiospermen und Gymnospermen<sup>[97, 98]</sup>. Im letzteren Falle ist die Isolierung des Endophyten (wahrscheinlich ein Actinomycet<sup>[99]</sup>) noch nicht gelungen. Beide Gruppen sind für die Besiedlung ausgewaschener arider Böden äußerst wichtig, die arm an den leichtlöslichen Nitraten und Ammoniumsalzen sind<sup>[92, 93]</sup>.

#### 5.1.2. Frei lebende Mikroorganismen

Die frei vorkommenden  $N_2$ -Fixierer scheiden bis zu 80 %<sup>[100]</sup> des von ihnen assimilierten Stickstoffs in gebundener Form

aus (u. a. als  $NH_3$ <sup>[100, 101]</sup>, Hydroxylaminderivate<sup>[102]</sup>, Aminosäuren<sup>[103, 104]</sup>, Peptide<sup>[105]</sup>, Wuchsstoffe<sup>[106]</sup>, Fungizide<sup>[106]</sup>). Diese Exkrete können von höheren Pflanzen aufgenommen und verwertet werden<sup>[107, 108]</sup>.

Die Zahl frei lebender  $N_2$ -Fixierer ist in den meisten Böden klein im Vergleich zur Zahl anderer Bodenbakterien<sup>[109]</sup>. Man nimmt aber an, daß frei lebende  $N_2$ -Fixierer infolge ihrer großen Verbreitung einen zwar geringen, aber signifikanten Beitrag zur Bodenfruchtbarkeit leisten (5–20 kg N pro ha und Jahr im Vergleich zu 100–300 bei Leguminosen<sup>[39, 94]</sup>). Eine Steigerung dieses Beitrags ist auf zwei Arten möglich: a) durch Übertragung des genetischen Materials zur  $N_2$ -Fixierung („nif-Gene“) auf häufig vorkommende Bodenbakterien, b) durch Optimierung der Lebensbedingungen für frei lebende  $N_2$ -Fixierer.

Zu a) Kürzlich ist durch Konjugation die Übertragung der nif-Gene von *K. pneumoniae* auf *E. coli* gelungen<sup>[110]</sup>, das sonst keinen Luftstickstoff assimilieren kann. Dieser Erfolg hat zu großer Hoffnung Anlaß gegeben. Aber bis zu einer technologischen Anwendung dürfte es noch weit sein, und eine von phantasiereichen Journalisten anvisierte Übertragung der nif-Gene ins menschliche Erbmateriale gehört bis auf weiteres zur science fiction.

Zu b) Die Zahl der  $N_2$ -Fixierer kann sich unter günstigen ökologischen Bedingungen so erhöhen, daß fast der gesamte Stickstoffbedarf eines Biotops durch ihre Aktivität gedeckt wird. Das ist der Fall, wenn in stickstoffarmen Böden die zur  $N_2$ -Assimilation benötigte Energiemenge zur Verfügung steht. Diese Energie stammt letztlich immer aus der Sonnenstrahlung und wird entweder durch Photophosphorylierung oder Photosynthese (Kohlenhydratbildung) und oxidative Phosphorylierung in Form von ATP konserviert. Zur Photophosphorylierung befähigte Bakterien und Blaualgen finden besonders gute Lebensbedingungen in den warmen, lichtreichen Überschwemmungsgebieten der Reisfelder<sup>[111]</sup>. Ihr hoher Beitrag zur Stickstoffbilanz wurde durch Messungen der  $N_2$ -Fixierung in situ bestätigt<sup>[112, 113]</sup>. Ferner ist aus zahlreichen Versuchen bekannt, daß sich die Reiserträge durch Beimpfung der Felder mit diesen Organismen steigern lassen<sup>[114-117]</sup>.

Andere günstige Biotope finden sich in den Wurzelzonen einiger Pflanzen, wenn die Wurzeln größere Mengen an organischen Verbindungen ausscheiden. (Die Reduktion von 10 mg  $N_2$  benötigt ca. 1 g Kohlenhydrat!) Am besten untersucht sind die Rhizosphären von Zuckerrohr und Bahiagrass (*Paspalum*<sup>[118, 119]</sup>). Diese Pflanzen sezernieren so viel Kohlenhydrat, daß Zuckerrohrfelder z. T. über 100 Jahre ohne Stickstoffdüngung kultiviert wurden und keinerlei Ernteinbußen zeigten<sup>[119]</sup>.

Es ist versucht worden, die Ernteerträge auch anderer Kulturpflanzen (Mais, Weizen, Hafer, Kartoffel usw.) durch Beimpfung der Felder mit  $N_2$ -Fixierern (besonders *Azotobacter*) zu erhöhen<sup>[106, 120-123]</sup>. In den meisten Fällen hatte die Anwendung dieser „Bakteriendünger“ auch eine leichte Ertragssteigerung zur Folge. Ironischerweise dürfte das aber weniger auf eine Erhöhung des N-Gehaltes (wegen Energiemangel) als auf die oben erwähnte bakterielle Produktion von Wuchsstoffen und Fungiziden zurückzuführen sein<sup>[106, 121]</sup>. Wegen des hohen Aufwandes geht die Anwendung der „Bakteriendüngung“ in letzter Zeit stark zurück<sup>[106]</sup>. Neues Interesse könnte diese Technologie aber finden, wenn Fragen des Umweltschut-

zes und der Industrieabhängigkeit der Landwirtschaft in den Vordergrund treten. Der Stickstoff des Kunstdüngers kommt den Pflanzen nur zu einem kleinen Teil zugute; der Rest geht durch Auswaschung ins Grundwasser verloren<sup>[109, 124, 125]</sup>. Das wieder trägt zur Nährstoffanreicherung der Gewässer und ihrer Eutrophierung bei. Dagegen werden die N-haltigen Sekrete der Mikroorganismen kontinuierlich abgegeben und wahrscheinlich besser im Boden festgehalten. Das Hauptproblem besteht nach wie vor in der Beschaffung einer billigen Energiequelle. Immerhin konnte schon gezeigt werden, daß der Stickstoffgehalt des Bodens unter bestimmten Bedingungen durch Strohzugabe (Cellulose) erhöht werden kann. Die Ursache war eine stimulierende Wechselwirkung zwischen N<sub>2</sub>-fixierenden und cellulose-zersetzenden Bakterien<sup>[126, 127]</sup>.

Es sei noch erwähnt, daß frei lebende N<sub>2</sub>-Fixierer wegen ihres hohen Kohlenhydratverbrauches für die biotechnologische Reinigung von Abwässern mit hohem Gehalt an organischen Verbindungen von Bedeutung sein könnten<sup>[128, 129]</sup>.

## 5.2. Lebensmitteltechnologie

Die Versorgung der Weltbevölkerung mit Kohlenhydraten und Proteinen ist eines der dringendsten Probleme unserer Zeit. Obwohl es sich dabei vorrangig um ein politisches Problem handelt<sup>[130]</sup>, müssen auf lange Sicht doch neue Methoden der Lebensmittelbeschaffung entwickelt werden. Hier sei nur kurz auf zwei unorthodoxe Lösungen des Proteinproblems hingewiesen.

Es gibt Papuastämme auf Neuguinea, deren tägliche Nahrung fast ausschließlich aus ca. 2 kg Süßkartoffeln mit Blättern besteht. Trotz des sich daraus ergebenden permanenten Proteinmangels ist das Gebiet dicht bevölkert, und die Erwachsenen können schwere Arbeit verrichten<sup>[131]</sup>. Des Rätsels Lösung könnte die kürzlich in der Darmflora dieser Papuas entdeckte signifikante Aktivität von N<sub>2</sub>-Fixierern sein<sup>[131]</sup>.

Eine mexikanische Forschergruppe<sup>[132]</sup> fand bei der Untersuchung eines indianischen Maisbreies („Pozol“), daß sich dessen N-Gehalt im Laufe der ortsüblichen Fermentationsperiode von 5 bis 10 Tagen um 30 bis 60 % erhöhte. Sie führen diese Anreicherung auf die Aktivität von N<sub>2</sub>-Fixierern zurück. Diese Annahme sollte aber noch nach der Acetylenreduktionsmethode überprüft werden. Immerhin ist es in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß die Fermentation von Nahrungsmitteln bei vielen außereuropäischen Völkern weit verbreitet ist<sup>[133]</sup>.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts und für anregende Diskussionen möchte ich Herrn Prof. K. Wallenfels herzlich danken.

Eingegangen am 27. Mai 1974 [A 37]

- [1] J. E. Carnahan, L. E. Mortenson, H. F. Mower u. J. E. Castle, *Biochim. Biophys. Acta* 38, 188 (1960).
- [2] C. C. Delwiche, *Sci. Amer.* 223, Nr. 9, S. 136 (1970).
- [3] J. R. Postgate: *The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Plenum Press, London 1971, S. 161.
- [4] M. F. Jurgensen u. C. B. Davey, *Can. J. Microbiol.* 14, 1179 (1968).
- [5] U. Granhall, *Oikos* 21, 330 (1970).
- [6] L. E. Henriksson, P. H. Enckell u. E. Henriksson, *Oikos* 23, 420 (1972).
- [7] A. N. McGregor u. D. E. Johnson, *Soil Sci. Amer. Proc.* 35, 843 (1971).

- [8] E. N. Mishustin u. V. T. Yemtsev, *Soil Biol. Biochem.* 5, 97 (1973).
- [9] R. Dugdale, V. Dugdale, J. Neess u. J. Goering, *Science* 130, 859 (1959).
- [10] J. S. Bunt, K. E. Cooksey, M. A. Heeb, C. C. Lee u. B. F. Taylor, *Nature* 227, 1163 (1971).
- [11] W. D. P. Stewart, T. Mague, G. P. Fitzgerald u. R. H. Burris, *New Phytol.* 70, 497 (1971).
- [12] A. J. Horne u. A. B. Viner, *Nature* 232, 417 (1971).
- [13] W. D. P. Stewart, *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 283 (1973).
- [14] O. Holm-Hansen, *Science* 139, 1059 (1963).
- [15] W. D. P. Stewart, *Phycologia* 9, 261 (1970).
- [16] R. J. Seidler, P. E. Aho, P. N. Raju u. H. C. Evans, *J. Gen. Microbiol.* 73, 413 (1972).
- [17] J. A. Breznak, W. J. Brill, J. W. Mertins u. H. C. Coppel, *Nature* 244, 577 (1973).
- [18] F. J. Bergersen u. E. H. Hipsley, *J. Gen. Microbiol.* 60, 61 (1970).
- [19] G. J. Leigh in [3], S. 19.
- [20] A. Nielsen, *Advan. Catal. Relat. Subj.* 5, 1 (1953).
- [21] R. H. Burris, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17, 155 (1966).
- [22] H. Nagatani, M. Shimizu u. R. C. Valentine, *Arch. Mikrobiol.* 79, 164 (1971).
- [23] L. E. Mortenson, *Biochim. Biophys. Acta* 81, 473 (1964).
- [24] D. C. Yoch, J. R. Benemann, R. C. Valentine u. D. I. Arnon, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1404 (1969).
- [25] D. C. Yoch u. D. I. Arnon, *Biochim. Biophys. Acta* 197, 180 (1970).
- [26] R. V. Smith, R. J. Noy u. M. C. W. Evans, *Biochim. Biophys. Acta* 253, 104 (1971).
- [27] Y. I. Shethna, N. A. Stombaugh u. R. H. Burris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 1108 (1971).
- [28] J. E. McNary u. R. H. Burris, *J. Bacteriol.* 84, 598 (1962).
- [29] R. W. F. Hardy u. A. J. D'Eustachio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 314 (1964).
- [30] L. E. Mortenson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52, 272 (1964).
- [31] W. A. Bulen, R. C. Burns u. J. R. Le Comte, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 265 (1964).
- [32] B. Koch, H. J. Evans u. S. Russell, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1343 (1967).
- [33] H. C. Winter u. R. H. Burris, *J. Biol. Chem.* 243, 940 (1968).
- [34] K. L. Hadfield u. W. A. Bulen, *Biochemistry* 8, 5103 (1969).
- [35] T. Ljones u. R. H. Burris, *Biochim. Biophys. Acta* 275, 93 (1972).
- [36] R. H. Burris in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1972, Bd. 24, S. 415.
- [37] W. A. Bulen, R. C. Burns u. J. R. Le Comte, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 53, 532 (1965).
- [38] W. D. P. Stewart, G. P. Fitzgerald u. R. H. Burris, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 2071 (1967).
- [39] H. Dalton u. L. E. Mortenson, *Bacteriol. Rev.* 36, 231 (1972).
- [40] M. J. Dilworth, *Biochim. Biophys. Acta* 127, 285 (1966).
- [41] J. C. Hwang, C. H. Chen u. R. H. Burris, *Biochim. Biophys. Acta* 292, 256 (1973).
- [42] C. J. Lind u. P. W. Wilson, *J. Amer. Chem. Soc.* 63, 3511 (1941).
- [43] E. Moustafa u. L. E. Mortenson, *Nature* 216, 1241 (1967).
- [44] I. R. Kennedy, *Biochim. Biophys. Acta* 222, 135 (1970).
- [45] T. Ljones, *Biochim. Biophys. Acta* 321, 103 (1973).
- [46] W. A. Bulen u. J. R. Le Comte, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 979 (1966).
- [47] L. E. Mortenson, *Biochim. Biophys. Acta* 127, 18 (1966).
- [48] K. B. Taylor, *J. Biol. Chem.* 244, 171 (1969).
- [49] D. Y. Jeng, T. Devanathan u. L. E. Mortenson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 625 (1969).
- [50] T. C. Huang, W. G. Zumft u. L. E. Mortenson, *J. Bacteriol.* 113, 884 (1973).
- [51] G. Nakos u. L. E. Mortenson, *Biochemistry* 10, 455 (1971).
- [52] M. Y. Tso, *Arch. Mikrobiol.* 99, 71 (1974).
- [53] R. C. Burns, R. D. Holsten u. R. W. F. Hardy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 90 (1970).
- [54] D. Kleiner u. C. H. Chen, *Arch. Mikrobiol.* 98, 93 (1974).
- [55] R. R. Eady, B. E. Smith, K. A. Cook u. J. R. Postgate, *Biochem. J.* 128, 655 (1972).
- [56] D. W. Israel, R. L. Howard, H. J. Evans u. S. A. Russell, *J. Biol. Chem.* 249, 500 (1974).
- [57] J. T. Stasny, R. C. Burns, B. D. Korant u. R. W. F. Hardy, *J. Cell Biol.* 60, 311 (1974).

- [58] M. C. W. Evans, A. Telfer u. R. V. Smith, *Biochim. Biophys. Acta* 310, 344 (1973).
- [59] W. G. Zumft, W. C. Cretney, T. C. Huang, L. E. Mortenson u. G. Plamer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1525 (1972).
- [60] E. M. Moustafa, L. E. Mortenson u. P. T. Bui, *Bacteriol. Proc.* 1968, 132.
- [61] E. Moustafa, *Biochim. Biophys. Acta* 206, 178 (1970).
- [62] D. R. Biggins, M. Kelly u. J. R. Postgate, *Eur. J. Biochem.* 20, 140 (1971).
- [63] R. C. Burns u. R. W. F. Hardy in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1972, Bd. 24, S. 480.
- [64] J. S. Chen, J. S. Multani u. L. E. Mortenson, *Biochim. Biophys. Acta* 310, 51 (1973).
- [65] J. J. Marchalonis u. J. K. Weltman, *Comp. Biochem. Physiol.* 38 B, 609 (1971).
- [66] B. E. Smith u. G. Lang, *Biochem. J.* 137, 169 (1974).
- [67] R. W. F. Hardy u. R. C. Burns in W. Lovenberg: *Iron-Sulfur Proteins*. Academic Press, New York 1973, Bd. 1, S. 65.
- [68] R. H. Burris in [3], S. 105.
- [69] R. W. Detroy, D. F. Witz, R. A. Parejko u. P. W. Wilson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 537 (1968).
- [70] W. H. Orme-Johnson, W. D. Hamilton, T. Ljones, M. Y. W. Tso, R. H. Burris, V. K. Shah u. W. J. Brill, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 3142 (1972).
- [71] B. E. Smith, D. J. Lowe u. R. C. Bray, *Biochem. J.* 130, 641 (1972).
- [72] B. E. Smith, D. J. Lowe u. R. C. Bray, *Biochem. J.* 135, 331 (1973).
- [73] G. Palmer, J. S. Multani, W. C. Cretney, W. G. Zumft u. L. E. Mortenson, *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 325 (1972).
- [74] W. G. Zumft, G. Palmer u. L. E. Mortenson, *Biochim. Biophys. Acta* 292, 413 (1973).
- [75] L. E. Mortenson, W. G. Zumft u. G. Palmer, *Biochim. Biophys. Acta* 292, 413 (1973).
- [76] P. T. Bui u. L. E. Mortenson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 1021 (1968).
- [77] M. Y. W. Tso u. R. H. Burris, *Biochim. Biophys. Acta* 309, 263 (1973).
- [78] G. A. Walker u. L. E. Mortenson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 904 (1973).
- [79] G. E. Hoch, K. C. Schneider u. R. H. Burris, *Biochim. Biophys. Acta* 37, 273 (1960).
- [80] R. H. Burris, H. C. Winter, T. O. Munson u. J. Garcia-Rivera in A. San Pietro: *Non-Heme Iron Proteins – Role in Energy Conversion*. Antioch Press, Yellow Springs, Ohio 1965, S. 315.
- [81] J. Garcia-Rivera u. R. H. Burris, *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 167 (1967).
- [82] J. Chatt u. R. L. Richards in [3], S. 57.
- [82a] D. Sellmann, *Angew. Chem.* 86, 692 (1974); *Angew. Chem. internat. Edit.* 13, 639 (1974).
- [83] G. W. Strandberg u. P. W. Wilson, *Can. J. Microbiol.* 14, 25 (1968).
- [84] M. C. Mahl u. P. W. Wilson, *Can. J. Microbiol.* 14, 33 (1968).
- [85] R. A. Parejko u. P. W. Wilson, *Can. J. Microbiol.* 16, 681 (1970).
- [86] D. C. Yoch u. R. M. Pengra, *J. Bacteriol.* 92, 618 (1966).
- [87] V. K. Shah, L. C. Davis u. W. J. Brill, *Biochim. Biophys. Acta* 256, 498 (1972).
- [88] R. S. Tubb u. J. R. Postgate, *J. Gen. Microbiol.* 79, 103 (1973).
- [89] G. Daesch u. L. E. Mortenson, *J. Bacteriol.* 110, 103 (1972).
- [90] D. Gadkari u. H. Stolp, *Arch. Microbiol.* 96, 135 (1974).
- [91] D. Kleiner, *Arch. Microbiol.* 101, 153 (1974).
- [92] A. I. Virtanen, *Angew. Chem.* 65, 1 (1953).
- [93] A. I. Virtanen u. J. K. Miettinen in F. C. Steward: *Plant Physiology*. Academic Press, New York 1963, Bd. 3, S. 539.
- [94] D. Werner, *Naturwiss. Rundsch.* 27, 177 (1974).
- [95] R. D. Holsten, R. C. Burns, R. W. F. Hardy u. R. R. Hebert, *Nature* 232, 173 (1971).
- [96] M. J. Trinick, *Nature* 244, 459 (1973).
- [97] W. D. P. Stewart, *Science* 158, 1426 (1967).
- [98] W. S. Silver in [3], S. 244.
- [99] J. H. Becking, *Plant Soil* 32, 611 (1970).
- [100] I. Zelitch, E. D. Rosenblum, R. H. Burris u. P. W. Wilson, *J. Biol. Chem.* 191, 295 (1951).
- [101] G. E. Fogg u. H. Pattnaik, *Phykos* 5, 58 (1966).
- [102] N. E. Saris u. A. I. Virtanen, *Acta Chem. Scand.* 11, 1438 (1957).
- [103] A. Watanabe, *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 50 (1951).
- [104] W. D. P. Stewart, *Nature* 200, 1020 (1963).
- [105] G. E. Fogg, *Proc. Roy. Soc. B* 139, 372 (1952).
- [106] E. N. Mishustin, *Plant Soil* 32, 545 (1970).
- [107] H. F. Mayland u. T. H. McIntosh, *Nature* 209, 421 (1966).
- [108] W. D. P. Stewart, *Nature* 214, 603 (1967).
- [109] T. Beck: *Mikrobiologie des Bodens*. Bayerischer Landwirtschaftsverlag, München 1968, S. 371ff.
- [110] R. A. Dixon u. J. R. Postgate, *Nature* 237, 102 (1972).
- [111] A. Watanabe u. Y. Yamamoto, *Plant Soil Spec. Vol.* 403 (1971).
- [112] I. C. McRae u. T. F. Castro, *Soil Sci.* 103, 277 (1967).
- [113] G. Rinaudo, J. Balandreau u. Y. Dommergues, *Plant Soil Spec. Vol.* 471 (1971).
- [114] A. Watanabe, S. Nishigaki u. C. Konishi, *Nature* 168, 748 (1951).
- [115] M. B. Allen, *Sci. Mon.* Aug. 1956, 100.
- [116] A. N. Ibrahim, M. Kamel u. M. El-Sherbeny, *Agrokem. Talajtan* 20, 389 (1971).
- [117] M. Kobayashi u. M. Z. Haque, *Plant. Soil. Spec. Vol.* 443 (1971).
- [118] J. Döbereiner, J. M. Day u. P. J. Dart, *J. Gen. Microbiol.* 71, 103 (1972).
- [119] J. Döbereiner, J. M. Day u. P. J. Dart, *Plant Soil* 37, 191 (1972).
- [120] F. E. Allison, *Soil Sci.* 64, 413 (1947).
- [121] R. Cooper, *Soils Fert.* 22, 327 (1959).
- [122] M. Sulaiman, *Beitr. Trop. Subtrop. Landwirt. Tropenveterinärmed.* 9, 139 (1971).
- [123] D. Bertrand, *C. R. Acad. Sci. D* 275, 2131 (1972).
- [124] W. V. Bartholomew, *Soils Humid Trop.* 1972, 63.
- [125] W. Vaughan, *Compost Sci.* 14, 26 (1973).
- [126] C. C. Delwiche u. J. Wijler, *Plant. Soil* 7, 113 (1956).
- [127] W. A. Rice u. E. A. Paul, *Can. J. Microbiol.* 18, 715 (1971).
- [128] O. Vejhora, D. Sokol u. V. Jozefy, *Listy Cukrov.* 85, 288 (1969); *Chem. Abstr.* 72, 82767 (1970).
- [129] R. V. Finn u. A. L. Tannahill, *Biotechnol. Bioeng.* 15, 413 (1973).
- [130] G. Myrdal: *Politisches Manifest über die Armut in der Welt*. Suhrkamp, Frankfurt 1970.
- [131] R. Luyken, F. W. M. Luyken-Koning, N. A. Pikaar u. A. Blom, *Amer. J. Clin. Nutr.* 14, 13 (1964).
- [132] M. Ulloa, T. Herrera u. G. de la Lanza, *Rev. Latino-amer. Microbiol. Parasitol.* 13, 113 (1971).
- [133] C. W. Hesseltine, *Mycologia* 57, 149 (1965).