

## Sitzung vom 27. Mai 1904.

Vorsitzender: Herr A. ENGLER.

Als ordentliche Mitglieder sind vorgeschlagen die Herren:

**Schulze, Dr. Hilmar**, in **Braunschweig** (durch E. PFITZER und H. GLÜCK),  
**Hering, Dr. Georg**, in **Leipzig**, Schletterstr. 24, III (durch W. PFEFFER  
 und C. CORRENS).

Zu ordentlichen Mitgliedern sind proklamiert die Herren:

**Chamberlain, Charles**, in **Chicago**,  
**Hecke, Dr. Ludwig**, Professor in **Wien**,  
**Zörnig, Dr.**, in **München**.

Der Vorsitzende teilt mit, dass dem verdienten Mitgliede Herrn W. O. FOCKE in Bremen zu seinem 70. Geburtstag ein Glückwunschschreiben durch den Vorstand übersandt worden ist. Auf dasselbe ist ein Dankschreiben eingegangen, von dessen Inhalt der Vorsitzende der Gesellschaft Mitteilung machte.

## Mitteilungen.

### 40. **Charlotte Ternetz: Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch einen torfbewohnenden Pilz.**

(Vorläufige Mitteilung).

Eingegangen am 18. April 1904.

Im Sommer 1901 gelang es mir, aus den Wurzeln verschiedener einheimischer Ericaceen einen Pilz zu isolieren, der braune Pykniden bildete und dessen Mycel mit dem des entotrophen Mykorrhiza-Pilzes der Ericaceen durchaus übereinstimmte. Die Untersuchungen

mussten aber verschiedener Umstände halber abgebrochen werden, ohne definitive Resultate gezeitigt zu haben.

Erst im Oktober 1903 wurde die Arbeit wieder aufgenommen. Es gelang mir, wie früher, aus Ericaceenwurzeln Pilze zu isolieren und zur Fruktifikation zu bringen. Die Fruchtkörper gehören alle dem gleichen Pyknidentypus an; die Sporen aber variieren beträchtlich in Dimensionen und Proportionen, so dass es sich also jedenfalls um Spezies- oder zum mindesten um Rassenverschiedenheiten handelt. Bis jetzt habe ich solche Pilze aus den Wurzeln folgender Ericaceen isoliert: *Calluna vulgaris*, *Erica carnea*, *Andromeda polifolia*, *Oxycoccus palustris*, *Vaccinium Myrtillus* und *Vaccinium Vitis Idaea*. Jede der genannten Pflanzenspezies wurde in zahlreichen Exemplaren aus verschiedenen Gegenden bezogen (Torfmoor Jungholz, Botanischer Garten Basel, Freiburg i. B., Torfmoor bei Freiburg in der Schweiz).

Das Mycel der betreffenden Pilze ist septiert und reich verzweigt. Die Fruchtkörper sind von blossem Auge eben sichtbare, krugförmige Pykniden von hellbrauner bis schwarzer Färbung. Die fast ausnahmslos hyalinen Sporen sind so klein, dass sie ein dichtes Papierfilter ungehindert passieren. Sie keimen in Nährlösungen und auf Nährböden sehr leicht. — Andere Fruktifikationsformen als Pykniden habe ich bis jetzt nicht beobachtet. Doch bilden alle Mycelien braune Gemmen. Bei einigen Pilzen tritt überdies an den Luft-hyphen ein oïdienartiger Zerfall der Zellfäden ein.

Ob die isolierten Pilze wirklich die Mykorrhiza-Pilze der betreffenden Ericaceen sind, werden erst die im Gange befindlichen Versuche entscheiden. Vorderhand muss ich mich begnügen, von einem „*Oxycoccus*-Pilz“ usw. zu reden, immer unter dem Vorbehalt, dass dadurch bloss eine nahe liegende Vermutung, nicht aber eine Gewissheit ausgedrückt werde.

Um die Pilze zu isolieren, wurden kleine Stücke von jungen, lebenden Ericaceenwurzeln in 1prozentiger Salzsäure, dann in sterilisiertem Wasser gewaschen und in der feuchten Kammer oder in Petrischalen auf Nähragar gelegt. In günstigen Fällen trat schon nach 8 bis 14 Tagen Fruktifikation ein. Auch wenn fein zerstäubter Torf in Nähragar gebracht und dann Platten gegossen wurden, trat das charakteristische Mycel des Pyknidenpilzes auf. Doch ist es mir bis jetzt nicht gelungen, in diesen Kulturen Fruchtkörper zu erhalten, da die mitwachsenden Verunreinigungen sehr bald alles überwuchern.

Am genauesten untersucht ist bis jetzt der „*Oxycoccus*-Pilz“; doch hoffe ich in absehbarer Zeit auch über die andern von mir isolierten Pilze eine zusammenhängende Arbeit veröffentlichen zu können.

Bekanntlich haben verschiedene Forscher<sup>1)</sup> die Vermutung aus-

1) HILTNER, Beitrag zur Mykorrhiza-Frage. Naturw. Zeitschr. für Land- und Forstwissenschaft, Jahrg. I, 1903. Ref. Centralbl. für Bact. II Abt. 10, 1903.

gesprochen, dass die entotrophe Mykorrhiza zur Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs befähigt sei. Es galt also vor allem, festzustellen, ob dem aus *Oxycoccus palustris* isolierten Pilz diese Fähigkeit zukomme, ob er also imstande sei, in stickstofffreien Medien zu gedeihen.

Die stickstofffreien Nährlösungen waren Modifikationen der von WINOGRADSKY<sup>1)</sup> für *Clostridium Pastorianum* empfohlenen:

Ammoniakfreies destilliertes Wasser.	
Dextrose. . . . .	2—10 pCt.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,1 „
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,02 „
CaCO <sub>3</sub> . . . . .	4—0,1 „
NaCl } . . . . .	Spuren.
FeSO <sub>4</sub> }	

Alle Chemikalien waren stickstofffrei (vergleiche analytische Belege). Für jede einzelne Kultur wurden die Nährstoffe besonders abgewogen, in ausgekochtem, noch siedendem Wasser gelöst<sup>2)</sup> und sofort sterilisiert. Diese Vorsichtsmassregeln sind deshalb geboten, weil sonst aus der Luft Ammoniak absorbiert wird, das auch durch Kochen nicht mehr auszutreiben ist. Die Erlenmeyerkolben wurden vor Gebrauch mindestens 24 Stunden in ein Gemisch von Kaliumdichromat und konzentrierter Schwefelsäure gelegt. Anfänglich stellte ich die Kulturen unter Glocken, welche auf geschliffene Glasplatten luftdicht aufgesetzt und durch Wasser abgesperrt waren. Die in die Glocken eintretende Luft wurde zuvor durch Natronlauge und Schwefelsäure von salpetriger Säure und Ammoniak befreit.

Beim Impfen kamen fast ausnahmslos nur Sporen zur Verwendung. Es wurden Pykniden aus Reinkulturen in destilliertem, sterilisiertem Wasser tüchtig geschüttelt und dann einige Tropfen in die Nährlösung gegossen. Schon nach drei Tagen war das Mycel makroskopisch sichtbar. Der Pilz gedieh ausgezeichnet, sodass ich keine einzige Fehlkultur zu verzeichnen hatte. Gärungserscheinungen traten nicht ein. Zur Kontrolle wurden unter die nämlichen Glocken und mit den nämlichen Nährlösungen Kulturen von *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* gestellt. Nur ein einziges Mal haben die beiden Pilze etwas ausgekeimt, und auch dies erst, nachdem wiederholt geimpft worden war. Überdies sollen ja, nach PURIEWITSCH<sup>3)</sup>,

1) WINOGRADSKY, *Clostridium Pastorianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. Centralbl. für Bact. 1902, Bd. 9, S. 43ff. — A. FISCHER, Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl., S. 167.

2) Um die richtige Konzentration zu erhalten, markierte ich die Erlenmeyerkolben an der Stelle, bis zu welcher 100 (bzw. 150) ccm Wasser reichten, wenn sie zum Sieden erhitzt wurden.

3) K. PURIEWITSCH, Über die Stickstoffassimilation bei Schimmelpilzen. Ber. der Deutschen Bot. Ges. 1895, Bd. XIII.

*Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* ebenfalls zur Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs befähigt sein.

So gut nun aber auch der „*Oxycoccus*-Pilz“ in stickstofffreien Nährlösungen gedieh — er brachte es niemals zur Fruktifikation. Wurde aber der Nährlösung nur eine Spur von gebundenem Stickstoff zugeführt, so traten in kürzester Zeit Fruchtkörper auf.

Es lagen also zwei Möglichkeiten vor: Entweder genügte der molekulare Stickstoff bloss für die vegetative, nicht aber für die fruktifikative Entwicklung, oder aber, es war überhaupt zu wenig Stickstoff geboten. Dass letzteres die Ursache sein werde, liess sich schon aus der Art und Weise der Versuchsanstellung schliessen: Da die Glocken, unter welchen die Erlenmeyerkolben standen, bloss einseitig geöffnet waren, konnte der Gasaustausch nur ein sehr langsamer sein; überdies musste sich in den Kulturgläsern über dem kräftig wachsenden Mycelium Kohlensäure ansammeln und infolge ihres grösseren spezifischen Gewichtes eine stagnierende Schicht über der Kultur bilden.

Um diesem Übelstand abzuhelpfen, wurden die nachfolgenden Kulturen alle so angelegt, dass ein konstanter, langsamer Luftstrom durchgeleitet werden konnte. Zu diesem Zwecke wurden sechs Halbliter-Erlenmeyerkolben nebeneinander an ein und dieselbe Wasserstrahlpumpe gekoppelt. Jeder Kolben enthielt 100 oder 150 *ccm* stickstofffreier Nährlösung und war in üblicher Weise geimpft worden. Den Hals des Kolbens verschloss ein doppelt durchbohrter Kork, durch welchen eine kurze und eine bis unter die Flüssigkeit reichende Glasröhre führten. Die kurzen Röhren wurden sämtlich durch Gummischläuche und Gabelröhren mit der Pumpe verbunden, die langen auf gleiche Weise zu je dreien mit zwei hintereinander liegenden Waschflaschen, von denen die eine NaOH, die andere  $H_2SO_4$  enthielt. Zwischen der zweiten Waschflasche und den Kulturkolben wurde eine Glasröhre mit sterilisiertem Wattepfropf eingeschaltet. Alle Teile waren vor Gebrauch natürlich tüchtig sterilisiert worden: die Gummischläuche in starkem Alkohol, die Erlenmeyerkolben samt Verschluss im Autoklav. Nach dem Impfen wurden sämtliche Verschlüsse mit Paraffin zugegossen und ein langsamer, mittels Quetschhähnen regulierter Luftstrom durchgesogen, sodass in der Minute ca. 40–50 Luftblasen die Flüssigkeit passierten.

Der Pilz gedieh ausgezeichnet und bildete eine einzige, dichte Watte von anfangs gelblicher, später schwarzer Färbung<sup>1)</sup>. Gärung war ebenso wenig zu beobachten, wie in den Kulturen mit stagnierender Luft. In 8 bis 14 Tagen hatten sich an den Gefässwänden, in und auf der Flüssigkeit zahlreiche Pykniden gebildet.

Der Pilz kann also auch in stickstofffreien Nährlösungen zur Fruktifikation gebracht werden, wenn man für fortwährende Lufterneuerung sorgt<sup>2)</sup>.

1) Das Mycel wird um so dunkler, je weniger  $CaCO_3$  ihm zur Verfügung steht.

2) Der Sauerstoff der Luft spielt dabei keine Rolle. Der „*Oxycoccus*-Pilz“ gedeiht auch ganz gut unter abgesperrten Glocken, in welchen der Luftsauerstoff durch Pyrogallol absorbiert wird.

Nach drei bis vier Wochen wurden die Kulturen abgekoppelt und der Stickstoffgewinn ermittelt (vergleiche analytische Belege). Es stellte sich bald heraus, dass der Pilz absolut nur sehr wenig Stickstoff zu speichern vermag, weit weniger als *Clostridium Pastorianum*<sup>1)</sup>, wie nachfolgende Tabelle beweist:

Dauer des Versuches	N-Gewinn in mg	Gebotene Dextrose	
		in g	in pCt.
21 Tage . . . . .	1,4	3	2
21 „ . . . . .	1,9	4,5	3
26 „ . . . . .	2,1	6	4
25 „ . . . . .	2,2	10	10
25 „ . . . . .	2,7	10	10

Trotzdem aber stellt sich das Verhältnis für den „*Oxycoccus*-Pilz“ besser, als für *Clostridium Pastorianum*, wenn der assimilierte Stickstoff mit dem verbrauchten Zucker verglichen wird:

<i>Clostridium Pastorianum</i>				„ <i>Oxycoccus</i> -Pilz“ <sup>2)</sup>			
Dauer des Versuches	verarbeitete Dextrose	assimilierter Stickstoff	assimilierter N pro 1 g Dextrose	Dauer des Versuches	verarbeitete Dextrose	assimilierter Stickstoff	assimilierter N pro 1 g Dextrose
20 Tage	40 g	53,6 mg	1,34 mg	31 Tage	0,332 g	2,106 mg	6,34 mg
20 „	20 „	24,4 „	1,22 „	31 „	0,331 „	3,2994 „	9,97 „

Während *Clostridium Pastorianum* für 1 g vergärter Dextrose 1–2 mg Stickstoff assimiliert, speichert der „*Oxycoccus*-Pilz“ ca. 6–10 mg Stickstoff pro 1 g verbrauchter Dextrose. Der Pilz arbeitet also weit weniger energisch, dafür aber ökonomischer, als das Bakterium.

Bei den meisten Kulturen wurde auch das Verhältnis zwischen Stickstoff und Trockengewicht ermittelt. Die Zahlen mussten, aus den in den analytischen Belegen (S. 273) ersichtlichen Gründen, stets etwas zu niedrig ausfallen. Überraschend war aber anfangs die Tatsache, dass in den durchlüfteten Kulturen die Mycelien prozentualiter geringeren Stickstoffgehalt aufweisen, als in den Kulturen mit stagnierender Luft, und ferner, dass die Trockensubstanz umso stickstoffärmer wird, je reifer die Pykniden einer Kultur sind, wie aus der auf Seite 272 folgenden Tabelle hervorgeht.

Aus dieser Tabelle sind folgende Tatsachen zu entnehmen:

1. Von den Kulturen 1 und 2, welche mit Ausnahme der Durchlüftung ceteris paribus angelegt waren, zeigt die nicht durchlüftete einen zwar absolut geringeren, relativ aber höheren Stickstoffgehalt.

2. Die übrigen Kulturen, je 2 und 2 ceteris paribus angelegt, zeigen, dass, wenn der Stickstoffgehalt des Mycels prozentualiter ab-

1) WINOGRADSKY l. c.

2) Vergleiche analytische Belege.

Bemerkungen	Trocken- gewicht des Mycels	N-Gehalt des Mycels	N-Gehalt des Mycels in pCt. des Trockengewichts	N-Gehalt der abfiltrierten Nährlösung
1. 21 Tage, 3 pCt. Dextrose, nicht durchlüftet, Pyk- niden = 0 . . . . .	14,6 mg	0,56 mg	3,85	?
2. 21 Tage, 3 pCt. Dextrose, durchlüftet, Pykniden .	57,5 "	1,55 "	2,8	?
3. 25 Tage, 10pCt. Dextrose, durchlüftet, reife Pyk- niden . . . . .	76,5 "	1,19 "	1,56	0,98 mg
4. 25 Tage, 10pCt. Dextrose, durchlüftet, reife Pyk- niden . . . . .	86,2 "	1,33 "	1,55	1,40 "
5. 31 Tage, 3 pCt. Dextrose, durchlüftet, reife Pyk- niden . . . . .	127,7 "	1,06 "	0,82	1,05 "
6. 31 Tage, 3 pCt. Dextrose, durchlüftet, reife Pyk- niden . . . . .	131,7 "	0,77 "	0,6	2,53 "

nimmt, derjenige der Nährlösung wächst. Dies ist leicht erklärlich. Wie früher schon hervorgehoben wurde, passieren die Sporen ein Papierfilter mit Leichtigkeit. Ein Mycel, das Pykniden gebildet hat, wird also nur dann einen prozentualiter höheren Stickstoffgehalt aufweisen, wenn die Pykniden noch nicht reif sind. Im andern Fall werden beim Abfiltrieren die Sporen — also die eiweissreichsten Plasmapartien — ins Filtrat übergehen. Die Trockensubstanz wird dementsprechend geringeren, die Nährlösung höheren Stickstoffgehalt aufweisen.

### Zusammenfassung.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende Tatsachen:

1. Im Torf und in torfhaltigem Boden verschiedener Gegenden ist zum mindesten ein Pilz nachgewiesen worden, der befähigt ist, den atmosphärischen Stickstoff zu assimilieren.

2. Der betreffende Pilz hat ein weitverzweigtes, septiertes Mycel und bildet braune Pykniden, die sehr kleine, hyaline Sporen enthalten.

3. Die Stickstoffassimilation geht bei aërober Lebensweise und ohne Vergärung der Dextrose vor sich.

4. Der Stickstoff assimilierende Pilz arbeitet weit weniger energisch, dafür aber viel ökonomischer, als *Clostridium Pastorianum*.

### Analytische Belege.

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach der in HOPPE-SEILER's Physiologischen Chemie<sup>1)</sup> angegebenen Modifikation der KJELDAHL'schen Methode ausgeführt.

Die Nährstoffe, welche als garantiert N-frei von MERCK in Darmstadt bezogen worden waren, wurden sorgfältig untersucht und ihr N-Gehalt = 0 befunden. Derjenige der zur Analyse erforderlichen Reagentien wurde von Zeit zu Zeit ermittelt und als blinder Versuch in Abrechnung gebracht. Das für die Nährlösungen verwendete destillierte Wasser wurde jedesmal sorgfältig ausgekocht, untersucht und sein Stickstoffgehalt = 0 befunden.

Mycel und Nährlösungen wurden stets getrennt untersucht. Da die Nährlösungen aber viel Dextrose enthielten, infolgedessen leicht überschäumten und ausserdem die Oxydation viel Zeit erforderte, bestimmte ich jeweilen nur in einem Bruchteil der Nährlösung den Stickstoff und berechnete dann den Gesamtgehalt. Das Mycel wurde jeweilen auf einem gewogenen, aschenfreien Filter aufgefangen, mit kaltem Wasser gewaschen, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann gewogen. Durch das Auswaschen kann möglicherweise etwas N-haltige Substanz ins Filtrat übergegangen sein. Auch musste das Trockengewicht stets etwas zu hoch ausfallen, da die in der Nährlösung entstandenen Niederschläge (Anwesenheit von Fe, Ca und Mg neben Phosphorsäure) sowie das gebotene CaCO<sub>3</sub> mit Wasser natürlich nicht wegzuschaffen waren. Der Prozentgehalt des Mycels an Stickstoff ist also sicher etwas zu niedrig.

Um das Verhältnis zwischen verarbeiteter Dextrose und assimiliertem N feststellen zu können, wie dies WINOGRADSKY<sup>2)</sup> für *Clostridium Pastorianum* getan hat, wurde die vom Mycel abfiltrierte Nährlösung auch auf ihren Zuckergehalt geprüft. Zu diesem Zweck wurde das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen gebracht, davon 25 ccm entnommen, mit Bleiessig geklärt, Pb, Fe, Mg und Ca durch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ausgefällt und das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen ergänzt. Je 25 ccm wurden nach der gewichtsanalytischen Methode von ALLIHN auf Dextrose untersucht und aus dem Ergebnis der Dextrosegehalt der gesamten abfiltrierten Nährlösung berechnet.

Aus der beträchtlichen Anzahl von Analysen kann wegen Raum-mangels nur eine einzige in extenso ausgeführt werden.

Kultur 31 Tage alt. 150 ccm Nährlösung, worin 4,5 g Dextrose. Während 28 Tagen Luft durchgeleitet.

1) HOPPE-SEILER's Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse. 7. Auflage, Berlin 1903.

2) WINOGRADSKY, *Clostridium Pastorianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. Centralbl. für Bact. 1902, Bd. 9, S. 43 ff.

1. Mycel: Trockengewicht = 131,7 mg.

15 ccm  $\frac{n}{10}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vorgelegt; zurücktitriert mit 14,3 ccm  $\frac{n}{10}$  NaOH.

0,7 · 1,404 . . . . . = 0,9828 mg N

blinder Versuch . . . = 0,2106 " "

Mycel . . . . . = 0,7722 mg N = 0,6 pCt. des Trockengewichts.

2. Nährlösung: 100 ccm der auf 300 gebrachten, vom Mycel abfiltrierten Nährlösung auf N untersucht.

10 ccm  $\frac{n}{10}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vorgelegt; zurücktitriert mit 9,25 ccm  $\frac{n}{10}$  NaOH.

0,75 · 1,404 . . . . . = 1,0530 mg N

blinder Versuch . . . . . = 0,2106 " "

100 ccm . . . . . = 0,8424 mg N

Nährlösung = 300 " . . . . . = 2,5272 " "

Die Kultur hat also in 31 Tagen = 3,2994 mg N gespeichert.

3. Dextrosebestimmung in der abfiltrierten Nährlösung. Von dem auf 300 ccm gebrachten Filtrat 100 ccm geklärt usw. und auf 200 ergänzt; davon 25 ccm auf Dextrose untersucht.

25 ccm der 24 fach verdünnten Nährlösung fällen 0,3306 g Cu

331 mg Cu = 173,7 mg Dextrose.

Das Filtrat enthält also = 24 · 173,7 = 4168,8 mg Dextrose.

#### Resultat.

Verarbeitete Dextrose . . . . . = 331,2 mg

assimilierter N . . . . . = 3,2994 "

assimilierter N pro 1 g Dextrose . . . . . = 9,97 "

Basel, Botanisches Institut.

## 41. J. B. Overton: Über Parthenogenesis bei *Thalictrum purpurascens*.

Mit Tafel XV.

(Vorläufige Mitteilung.)

Eingegangen am 4. Mai 1904.

Meine Studien über Parthenogenesis bei *Thalictrum purpurascens* begannen im Sommer 1900 und wurden im Hull Botanical Laboratory der Universität Chicago fortgesetzt. Veranlasst wurden sie durch eine frühere Beobachtung von DAVID F. DAY<sup>1)</sup> in Buffalo, dass

1) DAVID F. DAY, Parthenogenesis in *Thalictrum Fendleri*. Bot. Gaz. XXII, 241, 1896.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1904

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Ternetz Charlotte

Artikel/Article: [Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch einen torfbewohnenden Pilz. 267-274](#)