

29. E. Hannig: Die Bindung freien atmosphärischen Stickstoffs durch pilzhaltiges *Lolium temulentum*.

(Mit einer Textfigur.)

(Vorläufige Mitteilung)

(Eingegangen am 23. März 1908.)

Die Nutzbarmachung freien atmosphärischen Stickstoffs durch höhere Pflanzen ist bis jetzt mit Sicherheit nur bei den Pflanzen mit Bakterien- oder mit Pilzknöllchen (Leguminosen, *Alnus*, *Elaeagnus* usw. und *Podocarpus*) und bei denen mit endotropher Mykorrhiza bekannt, für die ektotrophen Mykorrhizen liegen noch keine Untersuchungen vor und für Pflanzen ohne Wurzel-Symbionten (Cruciferen, Gramineen) konnte keine N-Bindung nachgewiesen werden (Lit. s. JOST¹). Auch bei Pflanzen, die nur in oberirdischen Organen Pilzparasiten führen, ist nach Assimilation des Luftstickstoffs gesucht worden, von BREFELD²) und BREFELD und FALK³) bei brandkrankem Getreide, von HILTNER⁴) bei pilzführendem *Lolium temulentum*. BREFELDS und FALKS Resultate waren negativ, HILTNER dagegen gelangte zu dem Schluß, daß bei *Lolium temulentum* eine geringe Menge Luftstickstoff gebunden werden müsse. Die Versuchsanstellung HILTNERs ist aber, wie wir gleich sehen werden, nicht einwandfrei, und deshalb eine erneute Untersuchung der Frage notwendig.

Bei *Lolium temulentum* besitzen (Lit. s. HANNIG⁵), die Samenkörner zwischen Samenschale und Aleuronschicht ein dichtes Hyphengeflecht, das von einem parasitischen Pilz unbekannter systematischer Stellung gebildet wird. Die Pilzhyphen treten im Stengel und in den Blättern nur spärlich auf und fehlen in den Wurzeln ganz. Bei anderen *Lolium*arten finden sich nur selten verpilzte Individuen. HILTNER konnte daher, als er *Lolium temulentum* auf sein Verhalten zum Luftstickstoff untersuchen wollte, *Lolium temulentum* nur mit einer anderen *Lolium*art vergleichen.

1) Vorlesungen über Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. 1908, 274 ff.

2) Nachrichten aus dem Klub der Landwirte. Berlin 1903, Nr. 466.

3) Untersuchungen aus dem gesamten Gebiet der Mykologie, XIII. 1905.

4) Bakteriologisches Zentralblatt. II, 9, 1896.

5) Botanische Zeitung 65, 1907. Heft 2. S. 27 ff.

Das erschwerte an sich schon die Beurteilung der Resultate, war aber um so mehr bedenklich, als seine Vergleichspflanze, *Lolium italicum*, nicht wie *Lolium temulentum* einjährig, sondern perennierend war. Im übrigen verfuhr H. folgendermaßen: „4 einliterige Blumentöpfe wurden mit reinem, völlig stickstofffreiem, aber sonst mit Mineralsalzen gedüngtem Quarzsande gefüllt und in diesen pro Topf je 5 Früchte von *Lolium temulentum* und *Lolium italicum* eingesät. Zum Begießen gelangte gutes Leitungswasser zur Verwendung, welches 0,84 mg N pro Liter enthielt. 2 Töpfe erhielten je 50 mg N in Form von KNO_3 (HILTNER l. c. 835). Das Ergebnis der Stickstoffbestimmungen war folgendes:

<i>Lolium temulentum</i>	ohne N	34,24	mit N	79,17 mg N
<i>Lolium italicum</i>	„	10,58	„	47,00 „
<hr/>				
Differenz zugunsten von				
<i>Lolium temulentum</i>	.	23,66 mg		32,17 mg N.

Da mit dem Begießwasser höchstens 8 mg Stickstoff in Form von KNO_3 zugeführt waren, mußte das Mehr von 36,8 mg aus dem Stickstoff der Luft stammen. Trotzdem läßt sich aus diesen Versuchen nicht der Schluß ziehen, daß der *Lolium*pilz die Ursache der Stickstoffbildung ist, da die Mitwirkung von Mikroorganismen nicht ausgeschlossen war. Außerdem sind die Zahlen deswegen nicht genau, weil sich in den Versuchsgefäßen die Wurzeln so dicht miteinander verflochten waren, daß sie nicht getrennt werden konnten und daher der Wurzelstickstoff summarisch je zur Hälfte den beiden *Lolium*arten angerechnet werden mußte.

Nachdem ich früher (l. c. S. 26) gezeigt hatte, daß es nicht schwer ist, pilzfreies *Lolium temulentum* zu erhalten, war die Grundlage für eine Nachprüfung der HILTNERschen Untersuchung gegeben. Es konnten jetzt nebeneinander *Lolium temulentum* mit und *Lolium temulentum* ohne Pilz sowohl in stickstofffreier als auch in stickstoffhaltiger Lösung kultiviert werden. Als Kulturmedium diente Quarzsand von MERCK (garantiert stickstofffrei, pro analysi); in diesem wurden kultiviert:

3 × 4	Pflanzen mit Pilz,	mit	Stickstoff.
3 × 4	„	„	ohne
3 × 4	„	ohne	„
3 × 4	„	„	ohne

Die Hauptschwierigkeit dabei war die Ausschließung von Pilzen und Bakterien, also die Beschaffung sterilen Materials und die Sicherheit aseptischer Kultur.

Die Sterilisierung der Körner. Die Körner stammten

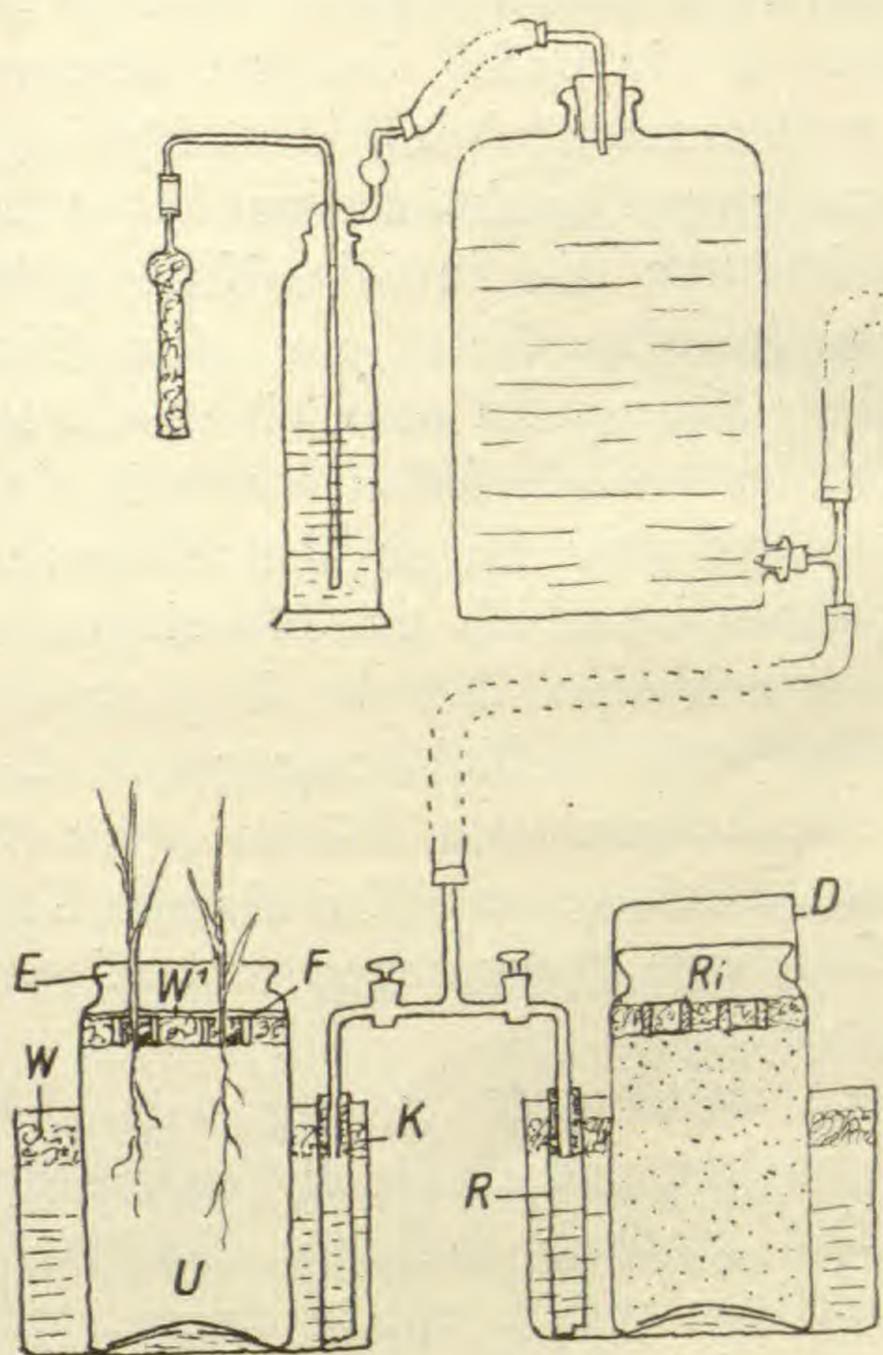
von Kulturen von *Lolium temulentum* mit Pilz und ohne Pilz, die im Jahre 1906 im botanischen Garten (Straßburg) vorgenommen worden waren. Sie wurden aus der Ernte so ausgesucht, daß sie ohne Spelzen möglichst gleich groß waren und zu je 4 genau 0,1366 g (0,0094 g pro Stück) wogen. Die Sterilisierung wurde nach der von FREEMANN¹⁾ vorgeschlagenen Weise durchgeführt, nämlich dadurch, daß die Körner 10 Min. lang in 1 proz. Sublimat eingelegt wurden. Da an den in der Sublimatlösung liegenden Körnern häufig Luftblasen anhafteten, die auch durch Schütteln nicht entfernt werden konnten, mußten die Körner zuerst in 50 proz. Alkohol geschüttelt werden; dadurch gelang es, auch die feinsten Spalten an den Samen zu benetzen, so daß das Sublimat überall hindringen konnte. Leider setzte die Sublimatlösung die Keimfähigkeit ziemlich stark herab, doch ließ sich das im Interesse einer sicheren Sterilisierung nicht vermeiden.

Da pilzhaltige und pilzfreie Pflanzen miteinander zu vergleichen waren, mußte jeder einzelne Samen genau geprüft werden. Früher waren zu diesem Zwecke die Körner durchgeschnitten und dann Querschnitte mikroskopisch untersucht worden. Da aber die Körner auf die angegebene Weise mit Sublimat sterilisiert werden sollten, konnte diese Methode nicht angewendet werden. Zum Glück stand ein anderer, viel einfacherer Weg offen. Da die Pilzschicht stets zwischen Aleuronschicht und Samenschale ausgebreitet ist, konnte mit Leichtigkeit durch Tangentialschnitte das Vorhandensein oder Fehlen des Pilzes nachgewiesen werden. Dazu genügten die kleinsten Schnitte, so daß sich jede nennenswerte Verletzung des Kornes vermeiden ließ. Spuren von Sublimat fanden natürlich von der Schnittwunde aus Eingang in das Endosperm, doch wurde dadurch niemals eine besondere Schädigung des Endosperms hervorgerufen.

Kulturmethode. Sehr viel umständlicher war es, bei den Kulturen die Anwesenheit von Mikroorganismen auszuschließen. Das geschah auf folgende Weise: Zur Aufnahme des Quarzsandes wurden Glasgefäße (*E*, Textfigur) von ca. $\frac{5}{4}$ l benutzt, in deren Boden ein Loch von 2—3 mm Durchmesser gebohrt war. Diese Öffnung wurde mit einem Uhrglas (*U*) verschlossen und das Gefäß in eine dickwandige Kristallisierschale gestellt, die $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{3}$ so hoch war wie die Kulturgläser. Zur Befestigung des Gefäßes in der Schale und zugleich zum Abschluß gegen die Luft wurde ein dichter Wattering (*W*) am oberen Rande

1) Philos. transactions r. soc. Ser. B 196, 1903 1—27.

der Kristallisierschale zwischen Schale und Gefäß so fest eingepreßt, daß die Watte sich hart anfühlte und beim Herausheben und Schütteln des Gefäßes *E* die Schale *K* sich nicht rühren konnte. In den Zwischenraum zwischen Kristallisierschale und Kulturgefäß wurde an einer Stelle eine starke Glasröhre (*R*) von der Höhe der Kristallisierschale beim Einfügen des Watteringes mit eingeklemmt und provisorisch mit Watte verschlossen. Der Quarzsand wurde nach dem Vorgange von HELLRIEGEL und WILLFAHRT¹⁾, nachdem er in einer großen Porzellanschale



mit einer bestimmten Menge Nährlösung (in der stickstoffhaltigen Lösung 0,492 g N pro Kilo Sand) gemischt war, bis er backend wurde, unter Benutzung von Gummifingern in das Kulturgefäß eingebröckelt, wodurch eine lockere Beschaffenheit der Sandmasse erzielt werden konnte. Als Abschluß des Quarzsandes nach oben diente eine dicke dichte Lage von Watte (W_1) in etwas größerem Durchmesser als dem lichten Durchmesser des Kulturgefäßes entsprach, diese wurde rund abgeschnitten, dann an den vier Stellen, an denen die *Lolium*keime eingepflanzt werden sollten, mit der Spitze einer großen Schere ein Loch eingebohrt und durch vor-

1) Beilageheft d. Zeitschr. f. d. Rübenzucker-Industrie, Nov. 1888.

sichtiges Drehen ein wenig erweitert. In diese vier Öffnungen der Watte mußte je ein Glasring (*Ri*) eingezwängt werden. Nach einiger Übung gelang es, den Verschuß vollständig dicht herzustellen. Auch die Glasringe wurden vorläufig mit Watte verschlossen und über das Gefäß als Deckel eine Kristallisierschale (*D*) gelegt, und der soweit hergerichtete Apparat im Dampfsterilisierapparat mehrmals sterilisiert.

Die sterilisierten Samen waren nach Abspülen mit sterilisiertem Wasser zuerst 24 Stunden zum Quellen eingelegt worden nachher auf sterilisiertem Filtrierpapier bis zum Auskeimen liegen gelassen und zuletzt in ein Gefäß, das mit übergreifendem Deckel geschlossen war, in Quarzsand (ohne Stickstoff) eingesetzt. Nachdem sie hier etwa 3 cm lange Keimblätter und 3—4 cm lange Wurzeln gebildet hatten, konnten sie in die Kulturgefäße eingepflanzt werden. Dabei mußte die Watte aus den Glasringen herausgenommen, mit einer Platinnadel oder einem Glasstab ein Loch in den Quarzsand gebohrt und die Pflanze soweit eingelassen werden, daß das Samenkorn mit dem Boden des Ringes abschloß. Dann wurde die Keimpflanze innerhalb des Glasringes mit sterilisierter Watte so dicht eingeschlossen, daß der Zugang zu dem Quarzsand abgesperrt war. Zur weiteren Sicherung gegen die Verunreinigung der Luft wurde eine Scheibe von Filtrierpapier (*F*), entsprechend der Stellung der 4 Keimlinge mit vier kleinen Kreuzschnitten versehen, über die Keimlinge übergezogen und dicht an Watte und Gefäßwand angepreßt.

Es mußte noch weiter dafür gesorgt sein, daß der Quarzsand genügend feucht gehalten und eventuell Verdunstungswasser ersetzt werden konnte. Das geschah dadurch, daß je 4 Gefäße in der Weise, wie die Textfigur angibt, mit je einem Aspirator verbunden wurden. Die Luft, welche in die Aspiratoren nachströmte, wurde durch eine mit Watte gefüllte Röhre und durch eine Waschflasche mit H_2SO_4 conc. filtriert. Die Gummischläuche zwischen den einzelnen Glasröhren waren in Watte eingeschlossen und mit Leinwandschläuchen überzogen. So konnte die Watte dauernd feucht gehalten und damit verhindert werden, daß die Gummischläuche in der Sonne brüchig wurden. Von den Aspiratoren aus wurden dann die Kristallisierschalen soweit mit Wasser gefüllt, daß noch etwa 2 cm Zwischenraum zwischen Watte und Wasseroberfläche frei blieb, was notwendig war, um eine Durchfeuchtung der Watte zu verhüten. Übrigens war der Wasserverbrauch ein verhältnismäßig geringer, da die Watteverschlüsse sehr dicht hielten, und infolgedessen reichte der Vorrat der Aspiratoren für die ganze Kultur bequem aus.

Die Kultur wurde im botanischen Garten vorgenommen, an einer Stelle, die möglichst gegen Wind geschützt war und dauerte von Ende Juni bis Mitte September 1907. Da natürlich die Benetzung der Watteverschlüsse verhindert werden mußte, wurde aus Gewächshausfenstern ein kleines Glashaus gebaut, das oben und an zwei Seiten verschlossen, an den beiden anderen Seiten frei war. Die freien Seiten waren mittels engmaschiger Hanfnetze gegen Vögel und größere Insekten geschützt. Eine reichliche Luftbewegung war zwar auf die Weise ermöglicht, trotzdem mußte bei höherer Temperatur die direkte Sonne mit Gewächshausjalousien abgeschwächt werden.

Während der Kultur zeigte sich, daß eine Anzahl von Samenkörnern durch die Sublimatbehandlung so gelitten hatte, daß sie nach kurzer Zeit zu wachsen aufhörten. Zwei Kulturgefäße wurden dadurch bald vollständig ausgeschaltet. In drei Gefäßen der stickstoffhaltigen Kulturen hatte sich nur je eine Pflanze weiter entwickelt, während in den fünf übriggebliebenen Gefäßen der stickstofffreien Kulturen die Pflanzen alle ziemlich gleichmäßig gut fort kamen.

Das Ergebnis der Versuche war, daß in allen Kulturen ohne Stickstoff die Pflanzen nur schwach wuchsen, während die mit Stickstoff versorgten kräftig gediehen. Letztere entwickelten sich und reiften Früchte wie normale Freilandpflanzen, und zwar so, daß sich die pilzhaltigen äußerlich von den pilzfreien nicht unterschieden.

Stickstoffzahlen. Die Stickstoffbestimmung wurde nach KJEHLDAHL ausgeführt. Leider platzte bei der Schwefelsäurebehandlung einer der Kolben, und zwar grade von einer Reihe, von der nur zwei Versuchsgefäße übrig geblieben waren, nämlich *Lolium* mit Pilz ohne Stickstoff. Diese Reihe mußte daher von neuem in Kultur genommen werden. Das geschah auf dieselbe Weise wie bei der ersten Serie, nur wurden die Samenkörner so ausgesucht und abgewogen, daß jedes einzelne 0,0053 g schwer war. Die Zahlen dieser Versuchsreihe sind in den folgenden Tabellen unter Serie II angegeben.

Laufende Nr.	Serie I.		
1	4 Körner	mit Pilz	enthalten 16,15 mg N
2	"	"	" 18,95 " "
3	"	"	" 14,04 " "
			Durchschnitt 16,38 mg N
			pro Korn 4,09 " "
4	je 4 Körner	ohne Pilz	von 0,0091 g pro Korn
5	"	"	enthalten 11,93 mg N
6	"	"	" 10,53 " "
			" 12,64 " "
			Durchschnitt 11,70 mg N
			pro Korn 2,92 " "

Serie II.

7	je 8 Körner mit Pilz von 0,0053 g pro Korn enthalten	23,87 mg N
8	„ „ „ „ „	21,76 „ „
9	„ „ „ „ „	21,57 „ „
	Durchschnitt	23,40 mg N
	pro 4 Körner	11,70 „ „
	pro Korn	2,92 „ „

Lauf. Nr.	Serie	Kultur	Anzahl der gewachsenen Pflanzen	Gesamtmenge des geerntet. N in mg	Entwicklung der Pflanzen im Durchschnitt
10	I	ohne Pilz	4	9,11	7 cm hoch
11		ohne N			
12		„			
		Durchschnitt für 4 Pflanzen		11,69 mg N	
		N-Gehalt von 4 pilzfreien Körnern		11,70 „ „	
		N-Zunahme in der Kultur		— 0,01 mg N	
13	I	mit Pilz	4	25,98	8 cm hoch
		ohne N			
		N-Gehalt von 4 Körnern mit Pilz		16,38 mg N	
		N-Zunahme in der Kultur		9,60 mg N	
14	II	mit Pilz	4	14,04	10 cm hoch
15		ohne N			
16		„			
		Durchschnitt für 4 Pflanzen		21,99 mg N	
		N-Gehalt von 4 pilzhaltigen Körnern		11,70 „ „	
		N-Zunahme in der Kultur		10,29 mg N	
17	I	ohne Pilz	1	42,12	14 cm hoch
18		mit N			
19		„			
		„	1	45,08	23 „ „
		„	1	330,70	25 „ „
					mehrere Halme
		Durchschnitt		152,60 mg N	
		N-Gehalt von 1 Korn ohne Pilz		4,09 „ „	
		N-Zunahme in N-haltiger Kultur		148,09 mg N	
20	I	mit Pilz	3	103,2	26 cm hoch
21		mit N			
		„	1	70,9	22 „ „
					mehrere Halme
		Durchschnitt für 4 Pflanzen		171,10 mg N	
		N-Gehalt in 4 Körnern mit Pilz		11,70 „ „	
		N-Zunahme		159,40 mg N	

1) Zwei Wochen länger in Kultur.

Diese Zahlen lehren

1. daß die pilzhaltigen Samen beträchtlich (28,3 pCt.) N-reicher sind wie die pilzfreien. Da FREEMAN l. c. 1903 gefunden hat, daß die Pilzschicht bei der Keimung ganz ausgesaugt wird, steht also den Keimlingen pilzführender Samen von vornherein fast das doppelte an Stickstoffreserve zur Verfügung wie den anderen.

2. Die Kulturen mit Stickstoff zeigen, soweit sich das bei der Verschiedenheit des Gedeihens beurteilen läßt, keinen Unterschied zu Gunsten der pilzhaltigen Pflanzen. Die Zahlen in den beiden Kategorien sind zwar auffallend ungleich, das rührt jedoch wahrscheinlich nur daher, daß die Keimlinge teilweise durch die Sublimatbehandlung geschädigt waren, teilweise infolge vorübergehend zu starker Erwärmung unter dem Gewächshaus etwas gelitten hatten und bedarf daher einer Kontrolle. Jedenfalls befindet sich unter den pilzfreien Pflanzen in einem Fall eine bedeutend höhere Stickstoffzahl wie unter den pilzhaltigen, so daß vorläufig eine Bevorzugung der Pilz-Pflanzen nicht angenommen werden kann.

3. Bei den stickstofffreien Kulturen von pilzfreien Pflanzen stimmt die Stickstoffernnte ungefähr mit dem Stickstoffgehalt der Körner überein. Das geringe Plus in Nr. 11 und 12 ist wahrscheinlich auf Ungenauigkeit der Stickstoffbestimmung oder auf Schwankungen im Stickstoffgehalt der Körner zurückzuführen (vergl. Tab. Nr. 1—9). Es ist aber auch möglich, daß hier eine geringe Stickstoffbindung vorliegt, da auch in den Untersuchungen von HILTNER bei *Lolium italicum* (cf. S. 239) eine geringe Stickstoffzunahme sich zeigte. Jedenfalls bedarf dies Verhalten noch genauerer Untersuchung.

4. Bei den pilzhaltigen Pflanzen fand, ohne daß die geringste Stickstoffmenge zugeführt wurde, eine Stickstoffvermehrung um ca. 100 pCt. des ursprünglichen N-Gehaltes statt, während, wie aus den Tabellen zu ersehen ist, die N-gedüngten Pflanzen fast um das hundertfache zunehmen können. Die Untersuchungen bestätigen also das Resultat HILTNERs, daß eine geringe Menge atmosphärischen Stickstoffs durch das pilzführende *Lolium temulentum* gebunden wird.

Daß die Menge des fixierten Luftstickstoffs nicht beträchtlicher ausfällt, ist nicht zu verwundern; denn es ist zu bedenken, daß die Hyphen des parasitischen Pilzes nur in den Samenkörnern in größerer Menge auftreten, während in den vegetativen Teilen nur dicht hinter dem Vegetationspunkt wenige Pilzfäden dem Wachstum der Pflanze folgen und im übrigen sowohl im Stengel als auch in den Blättern nur mit Mühe hier und da zerstreute Pilzfäden aufgefunden werden. Es hat einstweilen keinen Sinn Betrachtungen

darüber anzustellen, ob der parasitische Pilz den Luftstickstoff selbst bindet oder ob er die Wirtspflanze so verändert, daß sie den Luftstickstoff zu assimilieren vermag, wie man das früher zum Teil für die Leguminosen annahm. Diese Frage läßt sich erst entscheiden, wenn es gelingt, den *Lolium* pilz zu isolieren und zu kultivieren, wozu freilich nach den bisherigen Erfahrungen wenig Aussicht ist. Außerdem wird es notwendig sein, um die praktische Bedeutung des symbiontischen Verhältnisses beurteilen zu können, aseptische Kulturen in schwach stickstoffhaltigem Medium sowie vergleichende Freilandkulturen zwischen N-freiem und N-haltigem *Lolium temulentum* durchzuführen. Schließlich ist auch noch zu untersuchen, ob die anderen *Lolium* arten (*L. perenne*, *L. linocolum* usw.), bei denen hier und da Pilze gefunden worden sind, in Symbiose mit ihrem Pilz gleichfalls imstande sind, sich den Luftstickstoff nutzbar zu machen.

30. Ernst Küster: Keimung und Entwicklung von Schimmelpilzen in gebrauchten Nährlösungen.

(Vorläufige Mitteilung.)

(Eingegangen am 23. März 1908.)

Pilze, die auf irgend welchen Nährlösungen sich entwickeln, bleiben schon deswegen nicht während der ganzen Zeit ihrer Entwicklung unter denselben Vegetationsbedingungen, weil sich die Nährlösungen unter dem Einfluß der Pilze in der mannigfaltigsten Weise verändern. Zunächst ist die Abnahme der für den kultivierten Organismus wichtigen Stoffe, die in der Nährlösung enthalten waren, in Rechnung zu ziehen, ferner qualitative Änderungen, die sich in der Zunahme oder Abnahme der Azidität bzw. der Alkaleszenz aussprechen; außerdem dürfte während der Entwicklung der Pilze der osmotische Druck der Flüssigkeit vielfach zunehmen. Schließlich liefern die Organismen noch Stoffe, über deren chemische Eigentümlichkeiten wir wenig oder gar nichts wissen, von welchen aber wenigstens für manche Spezies festgestellt

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1908

Band/Volume: [26a](#)

Autor(en)/Author(s): Hannig E.

Artikel/Article: [Die Bindung freien atmosphärischen Stickstoffs durch pilzhaltiges *Lolium temulentum*. 238-246](#)