

Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch Pilze.

Von

Dr. Charlotte Ternetz.

Mit 2 Textfiguren.

Im Mai 1904 erschien in den Berichten der Deutsch. Bot. Gesellsch. meine vorläufige Mitteilung über einen torfbewohnenden Pilz, der befähigt ist, den atmosphärischen Stickstoff zu binden. Seit jener Zeit habe ich die Frage nach der Assimilation des molekularen Stickstoffes weiter verfolgt und auf andere Pilze ausgedehnt. Das Ergebnis meiner Untersuchungen ist, wenigstens teilweise, in vorliegender Arbeit niedergelegt.

Mehrfach kam ich in die Lage, fremde Hilfe in Anspruch zu nehmen, und habe dabei das herzlichste Entgegenkommen gefunden. Es freut mich, den verschiedenen Herren bei dieser Gelegenheit für die Förderung und Ermütigung, die sie mir bei meiner Arbeit so bereitwillig haben zuteil werden lassen, meinen aufrichtigen Dank abzustatten. Herr Prof. H. Kreis, Kantons-Chemiker in Basel, hat mich in die Methoden der Stickstoff- und Dextrosebestimmung eingeführt. Das Genus der untersuchten Pyknidenpilze wurde von den Herren Prof. G. Lindau und P. Hennings in Berlin festgestellt, und Herr Prof. A. Fischer, Vorsteher der Basler botanischen Anstalt, bewies mir sein Interesse durch Überlassung eines Arbeitsplatzes und durch Entgegenkommen in jeder Art während der ganzen Dauer meiner Untersuchungen.

I. Einleitung.

Die Frage, ob gewisse Pilze, wie manche Bakterien, befähigt seien, den molekularen Stickstoff zu assimilieren, hat sich mir aufgedrängt, als ich die entotrophe Mykorrhiza unserer einheimischen

Ericaceen untersuchte. Bei meinen Versuchen, den Pilz oder die Pilze, welche die Wurzelepidermis der Ericaceen bewohnen, zu isolieren und in Reinkulturen zu züchten, erhielt ich 8 verschiedene Pyknidenpilze, von denen zur Zeit 5 auf die Fähigkeit, den molekularen Stickstoff zu assimilieren, geprüft worden sind. Da gleich die ersten Vorversuche positive Resultate ergeben hatten, wurde die Frage nach dem Wurzelpilz der Ericaceen beiseite gelassen und dafür die Stickstoffassimilation der genannten 5 Pyknidenpilze eingehend untersucht. Nebenbei wurden auch *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* in die Untersuchung einbezogen und für beide Pilze Bindung des atmosphärischen Stickstoffes nachgewiesen.

Auf die ziemlich umfangreiche Literatur brauche ich hier nicht näher einzugehen, da die Entwicklung unserer Kenntnis der stickstoffbindenden Organismen in älteren wie in neueren Arbeiten eine erschöpfende und übersichtliche Darstellung erfahren hat. Für die ältere Literatur verweise ich auf Pfeffers Pflanzenphysiologie¹⁾ sowie auf das Sammelreferat von Jacobitz²⁾, für die neuere auf die 1904 erschienene Arbeit von Keutner³⁾ über die stickstoffbindenden Bakterien des Meeres, auf das Referat von B. Heinze⁴⁾ und besonders auf die zusammenfassende Darstellung von J. Vogel⁵⁾.

II. Die Isolierung und Reinkultur der Pyknidenpilze.

Wie schon in der Einleitung hervorgehoben worden ist, habe ich die stickstoffassimilierenden Pyknidenpilze gefunden, als ich versuchte, den Wurzelpilz unserer einheimischen Ericaceen zu isolieren. Ich war ausgegangen von der Frage nach der Funktion der endophyten Pilzknäuel der Ericaceen. Obschon die Frage nicht gelöst worden ist, bin ich doch genötigt, zum Verständnis des dabei

1) W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 1897, Bd. I, S. 383 ff.

2) E. Jacobitz, Die Assimilation des freien elementaren Stickstoffs (Zusammenfassende Darstellung nach der einschlägigen Literatur), Centralbl. f. Bact. II, Bd. 7, S. 783.

3) J. Keutner, Über das Vorkommen und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien im Meere. Separatdruck aus: Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen usw., Abt. Kiel, Neue Folge, Bd. 8.

4) B. Heinze, Sind Pilze imstande, den elementaren Stickstoff der Luft zu verarbeiten und den Boden an Gesamtstickstoff anzureichern? Annales Mycologici, 1906, Bd. IV, Nr. 1, S. 41.

5) J. Vogel, Die Assimilation des freien, elementaren Stickstoffes durch Mikroorganismen. Centralbl. f. Bact., 1906, II. Abt., Bd. 15, S. 33, 174, 215.

angewendeten Verfahrens etwas ausführlich von der Mykorrhiza der Ericaceen zu reden.

Die Pyknidenpilze sind auf folgende Weise erhalten worden: Möglichst kleine, 2—4 mm lange Stückchen von jungen Ericaceenwurzeln wurden in 1% HCl und dann in sterilisiertem Wasser gewaschen und in Petrischalen und feuchten Kammern auf Nähragar gelegt. Das Substrat bestand in der Regel aus 2% Agar und einem Zusatz von Torf- oder Rhododendronblätter-Dekokt. Geimpft wurde mit den Wurzeln folgender Ericaceen: *Andromeda polifolia*, *Oxycoccus palustris*, *Calluna vulgaris*, *Erica carnea*, *Erica Tetralix*, *Vaccinium Myrtillus*, *V. Vitis Idaca*, *V. uliginosum*¹⁾.

Die Pflanzen, deren Wurzeln zum Impfen verwendet wurden, stammten aus folgenden Gegenden: Torfmoor Jungholz bei Säckingen, Torfmoor bei Freiburg in der Schweiz, Botanischer Garten Basel, Freiburg i. B. Wo es möglich war, wurde die gleiche Pflanzenspecies in Exemplaren von verschiedenen Standorten untersucht.

Die Feuchtkammerkulturen wurden derart eingerichtet, daß das Auswachsen des Pilzes aus den Wurzeln direkt mit dem Mikroskop bei 500 — 1000 facher Vergrößerung beobachtet werden konnte: es galt ja, den Mykorrhizapilz zu isolieren! Die Feuchtkammerkulturen gelangen im allgemeinen sehr gut: schon nach 24 Stunden sproßte aus der Wurzel ein kräftiges, septiertes Mycel, das nach ein paar Tagen bräunliche Färbung annahm. Natürlich waren die Kulturen häufig verunreinigt, namentlich durch *Penicillium glaucum* und *Mortierella Rostafinskii*. Traten diese Verunreinigungen gleich anfangs auf, so wuchs aus der Wurzel entweder gar kein Mycel, oder der Pilz stellte sein Wachstum unter Entleerung der Hyphen bald ein.

Daß die in das Substrat wachsenden Pilzhypen wirklich aus den in den Wurzelzellen liegenden Knäueln hervorgegangen sind, ist sehr schwer festzustellen. Daß eine Hyphe von einem Knäuel herkommt, beweist noch nicht, daß sie auch aus ihm hervorgegangen ist: eine gerade über dem Knäuel der Zelloberfläche anhaftende Spore kann ausgekeimt haben und das Auswachsen der Hyphe aus dem Knäuel vortäuschen. Im Profil liegende Zellen, aus denen Fäden austreten, geben auch nur in seltenen Fällen ein einigermaßen klares Bild: Die Durchbruchstelle in der äußern Zellwand läßt sich durch höhere und tiefere Einstellung des Mikroskopes schlechterdings nicht nachweisen; nur ein glücklicher Längsschnitt durch eine austretende Hyphe könnte Klarheit verschaffen. Damit wäre aber dann bloß erwiesen, daß eine Hyphe austritt; der organische

1) Außerdem versuchsweise mit *Rhododendron ferrugineum*, *Vacc. macrococcum*, *Erica arborea*, *Picea excelsa*.

Zusammenhang mit dem Knäuel ließe sich höchstens durch Serienschritte feststellen. Diese umständliche Methode hat aber bei der gegebenen Fragestellung nur sehr wenig Wert: Wo durch Serienschritte der Zusammenhang zwischen Pilzknäuel und äußeren Hyphen erwiesen ist, fällt die Möglichkeit, den Pilz weiter zu kultivieren, dahin. Wo aber keine Serienschritte gemacht werden, fehlt die nötige Sicherheit, daß der kultivierte Pilz auch wirklich der Mykorrhizapilz ist.

Am deutlichsten ist der Zusammenhang der jungen Hyphen mit dem Knäuel an denjenigen Stellen, wo sich aus dem Knäuel ein vereinzelt gebräuntes Fadenstückchen erhebt. Keimt dieses dann zufällig aus, so läßt sich der Zusammenhang mit Sicherheit konstatieren. Rechnet man aber alle die Eventualitäten zusammen, die ein sicheres Ergebnis unmöglich zu machen geeignet sind, wie Verunreinigung der Kulturen, ungünstige Lage des Wurzelstückchens, zu dichte Knäuel, vertikales statt laterales Auswachsen der Hyphen — so ist die Wahrscheinlichkeit, klare Bilder zu erhalten, eine sehr geringe. Immerhin bin ich in der Lage, einige mit dem Zeichenapparat skizzierte Bilder von Feuchtkammerkulturen vorzulegen, bei denen der Zusammenhang der neugebildeten Hyphen mit dem Pilzknäuel in der Zelle über jeden Zweifel erhaben ist. Vgl. Fig. 1—5.

Dadurch, daß der Mykorrhizapilz verschiedener Ericaceenarten in einem künstlichen Substrat zum Auswachsen gebracht wurde, war noch herzlich wenig erreicht. Es galt nun, den Pilz zu isolieren, in Reinkulturen zu züchten und auf sein physiologisches Verhalten zu prüfen. Diesem Vorhaben stellten sich aber große Schwierigkeiten entgegen. Da der Zusammenhang der äußeren Hyphen mit dem Hyphenknäuel der Zelle nur bei starker Vergrößerung nachweisbar ist, mußte eigentlich eine Feuchtkammerkultur den Ausgangspunkt für die Reinkulturen bilden. Ein einzelnes, aus einer endophyten Hyphe sprossendes Fadenstückchen zu isolieren, mißlang wegen der Kleinheit des Objektes. Eine Zelle samt Knäuel und ausgewachsenen Hyphen aus dem Wurzelstückchen zu trennen, war zwar weniger schwierig; doch gingen die Kulturen regelmäßig an den bei dieser Methode unvermeidlichen Verunreinigungen zugrunde.

Nun hatten sich aber wiederholt in den oben beschriebenen Feuchtkammerkulturen Pykniden gebildet. Die bräunlichen Hyphen, auf denen die Pykniden saßen, stimmten in bezug auf Dimension und Aussehen mit den aus den Wurzeln auswachsenden überein. Die Vermutung lag daher nahe, daß die Pykniden zum Mykorrhizapilz gehörten. Beweisen ließ sich die Richtigkeit dieser Vermutung

jedoch nicht; denn in dem Gewirr von Pilzfäden war der Zusammenhang der pyknidentragenden Hyphen mit dem endophyten Pilzknäuel nicht immer nachweisbar. Aber selbst wo sich die pyknidentragenden

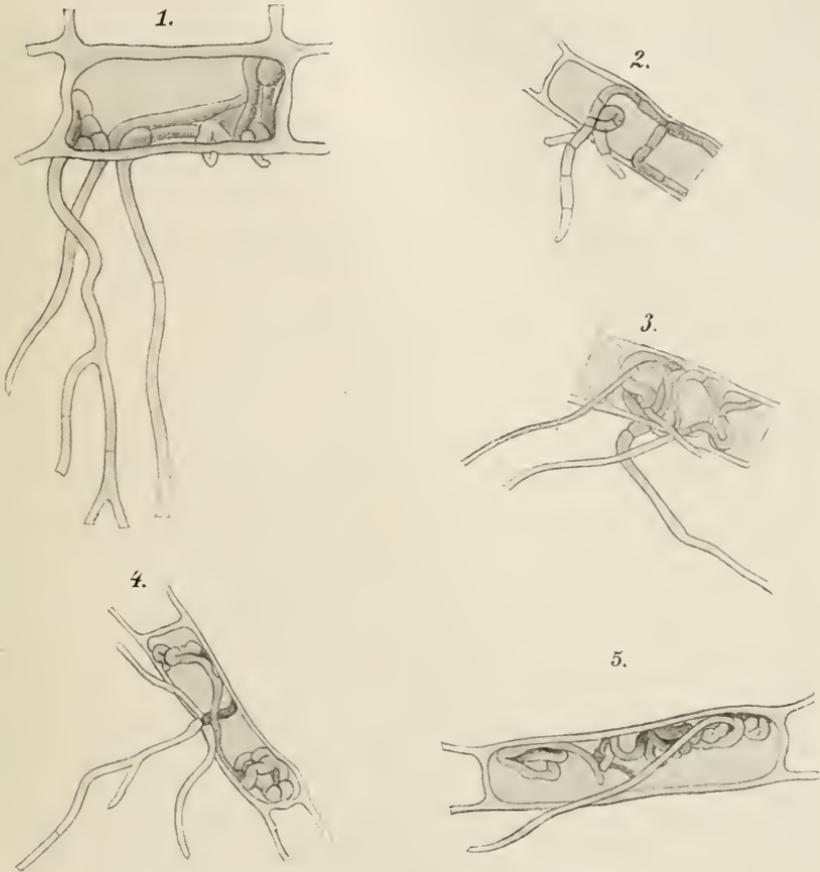


Fig. 1—5. Epidermiszellen aus Ericaceenwurzeln mit Hyphen, die in künstlichen Substraten ausgewachsen sind. Sämtliche Figuren sind mit dem Abbe'schen Zeichenapparat entworfen worden. Die braunen Hyphen der Pilzknäuel sind dunkel gehalten; von den neu ausgewachsenen Hyphen sind nur die Umrisse angegeben.

1. *Vaccinium Myrtilus*. 1 : 680.

2 u. 3. *Andromeda polifolia*. 1 : 535.

4 u. 5. *Calluna vulgaris*. 1 : 535.

Hyphen bis zum Wurzelstückchen zurückverfolgen ließen, durfte, nach dem früher Gesagten, nicht ohne weiteres auf die Zugehörigkeit der Pykniden zum Wurzepilz geschlossen werden. Diese Frage konnte nur das Experiment beantworten. Wenn es gelang, durch

Impfen mit Pyknosporen an pilzfreien Pflänzchen typische Mykorrhizabildung zu veranlassen, so durfte die Zusammengehörigkeit der Pykniden und der endophyten Wurzelpilze als erwiesen betrachtet werden. Um auf diese experimentelle Weise Aufschluß zu bekommen, sind unzählige Versuche gemacht worden. Sie waren aber erfolglos, weil es mir nie gelang, pilzfreie Ericaceen auf festem Substrat zu ziehen.

Die zu den Versuchen erforderlichen Samen hatte ich an denselben Standorten gesammelt, von denen die ausgewachsenen Pflanzen stammten. Die Samen wurden in 1% HCl oder 1% Formol oberflächlich sterilisiert¹⁾, in sterilisiertem Wasser abgewaschen und auf sterilen Torfscheiben in Glasdosen mit eingeschlifftem Deckel ausgesät. Der Torf war jeweils zweimal mit einem Intervall von 1—2 Tagen bei 120° keimfrei gemacht worden.

Die benutzten Samen stammten von folgenden Ericaceen-Arten: *Calluna vulgaris*, *Oxycoccus palustris*, *Andromeda polifolia*, *Vaccinium Vitis Idaea*, *Vaccinium Myrtillus*, *Vaccinium uliginosum*.

Im günstigsten Fall keimten die Samen nach 2—3 Tagen aus; oft aber waren hierzu ebenso viele Wochen oder gar Monate erforderlich. Die Samen der *Vaccinium*-Arten und der *Andromeda* waren meistens überhaupt nicht zum Auskeimen zu bringen. Woher diese Unregelmäßigkeit rührt, konnte nicht ermittelt werden. Das Sterilisieren scheint die Samen nicht zu schädigen, denn die sterilisierten keimten oft schneller aus, als gleichzeitig ausgesäte nicht sterilisierte. Am schnellsten und regelmäßigsten entwickelte sich *Calluna vulgaris*, auf die sich deshalb die Versuche auch hauptsächlich beschränkten. Wenn die *Calluna*-Pflänzchen eine Höhe von 1—1,5 cm erreicht hatten, ergab die mikroskopische Prüfung, daß jede Spur von Verpilzung fehlte. Wurden die Pflänzchen aber etwas später untersucht, wenn sie eine Höhe von 2,5—3 cm erreicht hatten, so konnte nicht ein einziges, wirklich pilzfreies Exemplar auffindig gemacht werden, wenn auch die für *Calluna vulgaris* so typischen Pilzknäuel noch nicht überall vorhanden waren. Sie entstehen eben erst, wenn die Pflänzchen etwas älter geworden sind.

Der Umstand, daß selbst in sorgfältig sterilisierten Kulturen und trotzdem der Deckel des Gefäßes nur bei der Aussat geöffnet

1) Die Samen wurden in Salzsäure, bzw. in Formol zentrifugiert. Die Sterilisation ist aber, namentlich bei den *Calluna*-Samen, wegen der anhaftenden Luft eine sehr unvollkommene.

worden war, Mykorrhizabildung mit unvermeidlicher Sicherheit eintrat, legte den Gedanken nahe, der Same selbst könnte schon infiziert sein. Die Untersuchung von *Calluna*-Samen ergab, daß der Keimling vollständig pilzfrei ist, daß aber in den Samenschalen da und dort braune Hyphen vorkommen, wie man sie auch an den Wurzeln der Ericaceen, namentlich an etwas älteren Teilen vorfindet. Die Annahme, daß die Infektion der Ericaceen-Keimlinge nicht erst im Boden stattfindet, wurde noch durch einen andern Umstand gestützt: Die Samen der *Andromeda polifolia* keimen nämlich nicht selten aus, während sie sich noch in der (geöffneten) Kapsel befinden; dabei senken sich die Würzelchen in die Kapselwandung ein¹⁾. Die Untersuchung dieser auf der Mutterpflanze ausgewachsenen Keimlinge ergab, daß die trotz ihrer Kürze schon ziemlich stark verzweigten Würzelchen typische Pilzknäuel besaßen.

Auf welchem Weg gelangt nun der Pilz in die Samenschale, bezw. in die Keimpflanze? Wird er, ähnlich wie der Pollen der anemophilen Pflanzen, durch den Wind mit kleinen Staubteilchen in die Blüte getragen, oder gelangt er vom Boden her in die Blüte, indem er die ganze Pflanze durchwächst? Bei *Andromeda polifolia* habe ich tatsächlich auch in oberirdischen Teilen braune Hyphen gefunden, nämlich in der abgestorbenen primären Rinde älterer Zweige. Da die Zweige von der ganz intakten Epidermis noch vollständig bedeckt waren, ist anzunehmen, daß die Pilzfäden vom Boden her durch das abgestorbene Rindengewebe emporgestiegen sind. Um aber innerhalb der Pflanze in die Blüte zu gelangen, müßte der Pilz notwendigerweise Achsenteile passieren, die keine leblosen Gewebe enthalten. Bekanntlich meidet aber der Mykorrhizapilz, wie durch verschiedene Forscher²⁾ festgestellt worden ist, die chlorophyllführenden Zellen; auch die Elemente des Zentralzylinders sind davon frei³⁾. Mit diesen Angaben stimmt daher die Beobachtung vollständig überein, daß bei *Andromeda* weder im Blütenstiel, noch in der intakten primären Rinde Pilzfäden vorkommen. Somit bleibt vorderhand die Annahme, es erfolge in den Blüten eine „Pilzbestäubung“, die wahrscheinlichere. —

1) Das Auskeimen des Samens in der Kapsel habe ich bis jetzt nur an den Exemplaren des bot. Gartens beobachtet; die wildwachsenden Exemplare werden sich aber vermutlich nicht anders verhalten.

2) J. M. Janse, Les Endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. Extr. d. Ann. du Jard. Bot. de Buitenzorg, Vol. XIV, 1, 1896.

3) Fr. Johow, Die chlorophyllfreien Humuspflanzen nach ihren biologischen und anatomisch-entwicklungsgeschichtlichen Verhältnissen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1889, S. 475.

Doch auf welche Weise auch die Infektion vor sich gehen mag — sicher ist, daß ich bis jetzt niemals ganz pilzfreie Ericaceen auf festem Substrat erhalten habe und daß ich somit nicht entscheiden konnte, ob die Pykniden zu den endophyten Wurzelpilzen gehören oder nicht.

Die Pyknidenpilze waren unterdessen in der bekannten Weise übertragen und in Reinkulturen gezüchtet worden, die Vorversuche hatten auf Bindung des molekularen Stickstoffes schließen lassen, so daß die Untersuchung dieser sekundären Frage in den Vordergrund trat und die Identifizierung der Wurzelpilze beiseite gelassen wurde. Ob mir die Lösung dieser Hauptfrage je gelingen wird, ist, nach den bisherigen Ergebnissen zu schließen, äußerst zweifelhaft.

Die ausführliche Angabe der Kulturmethode der Wurzelpilze scheint mir aber trotzdem berechtigt, ja notwendig, weil immerhin ein gewisser Grad von Wahrscheinlichkeit vorhanden ist, daß wir es bei den Pyknidenpilzen tatsächlich mit den Wurzelendophyten der Ericaceen zu tun haben. Daß es sich aber bloß um eine Wahrscheinlichkeit handelt, wird, außer durch das früher Gesagte, noch durch einen andern Umstand erhärtet: Die Fruchtkörperbildung tritt nur in einer verhältnismäßig sehr kleinen Zahl von Rohkulturen auf, nämlich dann, wenn die unvermeidlichen Verunreinigungen durch Bakterien und Schimmelpilze gering sind. In diesem Fall entstehen die Pykniden allerdings in kurzer Zeit, d. h. in 5—16 Tagen durchschnittlich.

Bei einer Reihe von Versuchen impfte ich das Substrat nicht mit Wurzelstückchen, sondern mit Torf: eine Aufschwemmung von feinzerteiltem Torf wurde in Nähragar gebracht und das Gemisch in Platten gegossen. Bei der Untersuchung fanden sich dann wohl gebräunte Hyphen, die den aus den Pilzknäueln sprossenden durchaus ähnlich sahen, aber niemals Fruchtkörper. Doch ist keineswegs ausgeschlossen, vielmehr sogar wahrscheinlich, daß auch auf diese Weise die typischen Pykniden erhalten werden können. Nur ist die Versuchsanstellung weniger günstig, da bei der Infektion mit Torfstaub eine viel stärkere Verunreinigung des Substrates unvermeidlich ist.

Die Kultur der Pyknidenpilze bietet keinerlei Schwierigkeiten: sie gedeihen auf sehr verschiedenen Substraten, vorausgesetzt, daß diese weder stark sauer noch stark alkalisch sind. Ein Gehalt von 0,25 % Äpfelsäure oder Zitronensäure unterdrückt z. B. beim

„*Oxycoccus*-Pilz“ die Weiterentwicklung, während 0,5% Asparaginsäure das Wachstum verlangsamt, aber nicht verhindert.

Die Zimmertemperatur scheint die optimale zu sein. Schon bei 22—24° C (Thermostat) entwickelt sich der „*Oxycoccus*-Pilz“ in Flüssigkeiten nicht weiter.

Die Pilze wurden sowohl auf festem Substrat — in Petrischalen und Reagensgläsern — als auch in Nährlösungen gezüchtet.

Auf festem Substrat ist die Entwicklung ungleich stärker, wenn etwas gebundener Stickstoff zugesetzt wird. Die Pykniden entstehen aber auch ohne diesen Zusatz sehr bald, und zwar meistens in und auf dem Substrat, wie auch an der Wandung der Kulturgefäße.

In Flüssigkeitskulturen geht die Fruchtkörperbildung nur dann normalerweise vor sich, wenn den Pilzen gebundener Stickstoff zur Verfügung steht, oder, bei Abwesenheit von gebundenem Stickstoff, wenn die Kulturen durchlüftet werden¹⁾. Damit soll nicht gesagt sein, daß sich in nicht durchlüfteten Kulturen ohne Stickstoffverbindungen gar keine Pykniden bilden. Vereinzelt Fruchtkörper treten auch in diesem Falle auf, namentlich bei höherem Zucker- oder Phosphatgehalt (S. 375 u. folg. dieser Arbeit). Ihre Zahl ist aber im Vergleich mit Kulturen, die Stickstoffverbindungen enthalten, verschwindend klein.

Am besten charakterisieren sich die Pyknidenpilze in Reagensglas-Strichkulturen. Sie zeigen dann punkto Wuchsform und Fruchtkörperbildung derartige Unterschiede, daß die einzelnen Arten schon mit bloßem Auge kenntlich sind.

Auf festem Substrat lassen sich auch häufig Kristallausscheidungen wahrnehmen. Meistens handelt es sich um kohlen-sauren oder oxalsaurer Kalk; nur in einem Fall konnte Calciumphosphat nachgewiesen werden²⁾.

III. Systematische Stellung und Diagnostizierung der Pyknidenpilze.

Die untersuchten 5 Pyknidenpilze gehören sämtlich dem Genus *Phoma*³⁾ [Fam. Hyalosporae Sacc.] an. Sie sind, nach dem Urteil der Herren G. Lindau und P. Hennings (Berlin) von allen bisher auf Ericaceen gefundenen Pyknidenpilzen verschieden. Daß sie

1) Ch. Ternetz, a. a. O., S. 270.

2) W. Behrens, Tabellen. 3. Aufl., 1898, S. 153.

3) Rabenhorst, Fungi imperfecti. 6. Abteilung, 1 u. 2.

mit *Phoma*-Arten anderer Pflanzen identisch sind, ist zwar nicht ausgeschlossen, aber nach Ansicht von G. Lindau wenig wahrscheinlich. Die Pilze werden deshalb in dieser Arbeit als vorläufige neue Arten¹⁾ angeführt und mit neuen Namen belegt.

Was diese 5 Pyknidenpilze von den bisher auf *Ericaceen* gefundenen Formen vor allem unterscheidet, ist die sehr geringe Größe der Sporen. Die *Phoma Callunae* Karst., die *Phyllosticta Ericae* Allescher, die *Phoma Ericae* Sacc. und die *Phoma obturata* Sacc. haben alle Sporen von 10—15 μ Länge. Nur von der *Phoma glomerata* Sacc. auf Blättern einer unbekanntes peruvianischen *Ericacee* finde ich die Angabe, daß die Sporen „sehr klein“ seien²⁾.

Die von mir untersuchten *Phoma*-Arten dagegen haben Sporen von 4 bis höchstens 5 μ Länge.

Die 5 Pyknidenpilze werden in dieser Arbeit unter folgenden Namen figurieren:

1. *Phoma radiceis Oxycocci* von den Wurzeln von *Oxycoccus palustris*;
2. *Phoma radiceis Andromedae* von den Wurzeln von *Andromeda polifolia*;
3. *Phoma radiceis Vaccinii* von den Wurzeln von *Vacc. Vitis Idaea*;
4. *Phoma radiceis Tetralicis* von den Wurzeln von *Erica Tetralix*;
5. *Phoma radiceis Ericae* von den Wurzeln von *Erica carnea*.

Wenn die Namen³⁾ der Pilze einen Hinweis auf die Pflanzen, von denen sie isoliert worden sind, enthalten, so soll damit nicht angedeutet werden, daß die Pilze die Mykorrhiza der betreffenden *Ericaceen*arten bilden. Im vorhergehenden Abschnitt ist schon mit aller Deutlichkeit hervorgehoben worden, daß mir der Nachweis der Identität dieser Pilze mit den Endophyten der *Ericaceen* in einwandfreier Weise nicht gelungen ist.

Dennoch bleibt es unter allen Umständen auffallend, daß aus ein und demselben Moorbeet, wo *Calluna vulgaris*, *Vaccinium Vitis Idaea*, *Erica Tetralix*, *Andromeda polifolia* und andere *Ericaceen* in buntem Durcheinander wuchsen, von jeder der drei letztgenannten

1) de Vries, Mutationstheorie. II, S. 653.

2) Rabenhorst, Fungi imperfecti. 6. Abt., 1, S. 207.

3) Die Namenbildung wäre natürlich logischer, wenn der ganze Name der *Ericaceen*art beigefügt würde. Der Kürze halber wurde davon Umgang genommen, zumal es sich möglicherweise um schon bekannte Arten handelt.

Pflanzenarten ein ganz spezieller Pyknidenpilz isoliert worden ist, der sich von den Pilzen der benachbarten Ericaceen durch ganz bestimmte morphologische und physiologische Merkmale unterscheidet. — *Calluna vulgaris*, *Oxycoccus palustris* und *Vacc. Myrtillus* waren vom Torfmoor Jungholz gebracht und nebeneinander in ein großes Tonbecken mit Torf vom Standort gepflanzt worden: von jeder der drei Pflanzenarten habe ich einen besonderen Pyknidenpilz isoliert. *Vacc. Vitis Idaea* von Freiburg in der Schweiz lieferte eine andere Pyknidenart, als die im bot. Garten in Basel wachsenden Exemplare.

In all den 6 Jahren aber, in denen ich mich mit diesen Pilzen beschäftigt habe, sind nicht ein einziges Mal zwei verschiedene Pyknidenpilze nebeneinander in der gleichen Rohkultur gefunden worden; wohl aber haben die Wurzeln der gleichen Ericaceenart bei Wiederholung der Versuche die gleiche Pyknidenart geliefert. Wenn also die Pyknidenpilze auch nicht mykorrhizabildend sind, ist doch immerhin eine Kontaktsymbiose zwischen Wurzel und Pilz denkbar, wie sie Pfeffer¹⁾ zwischen höheren Pflanzen und Bakterien für möglich hält. Nach Beijerinck²⁾ fehlt im Heidesand der weitverbreitete *Azotobacter*; er ist auch, wie *Clostridium Pastorianum*, meines Wissens in Torfböden nicht nachgewiesen worden³⁾. Vielleicht übernehmen an solchen Standorten die von mir isolierten Pilze die Bindung des Luftstickstoffes. Ob sie dabei in Symbiose leben oder nicht, ist erst von sekundärer Bedeutung.

Ehe wir zur Diagnostizierung der untersuchten Pyknidenpilze schreiten, muß vorausgeschickt werden, daß allgemein gültige Diagnosen sich für keine der gefundenen Arten aufstellen lassen. Die Fruchtkörper variieren nämlich in Form, Größe und Anordnung je nach dem Substrat ganz beträchtlich, und die Sporen sind einander in bezug auf Form und Größe zu ähnlich, um sichere Unterscheidungsmerkmale abzugeben. Am schärfsten charakterisieren sich die einzelnen Arten einerseits in stickstoffreien Nährlösungen, andererseits in den schon erwähnten Reagensglas-Stich-

1) W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie. Bd. I, S. 386.

2) M. W. Beijerinck, Über oligotrophile Mikroben. Centralbl. f. Bact. 1901. II, Bd. 7, S. 561. Vgl. auch J. Keutner, a. a. O., S. 6.

3) H. R. Christensen, Über das Vorkommen und die Verbreitung des *Azotobacter chroococcum* in verschiedenen Böden. Ein Beitrag zur Methodik der mikrobiologischen Bodenforschung. Centralbl. f. Bakt. 1906. II. Abt., Bd. 17, S. 109, 161, 378.

kulturen (vgl. S. 361). Bei der letzteren Methode ergeben sich im Wachstumsmodus des Mycels, in der Größe, Form und Anordnung der Fruchtkörper derartige Differenzen, daß sich die einzelnen *Phoma*-Species schon mit bloßem Auge unterscheiden lassen.

Als Beweis hierfür möge Tabelle I dienen.

Tabelle I. Reagensglas-Strichkulturen.

	Substrat	Alter der Kultur Tage	Längen- ausdehnung des Mycels cm	Länge der v. Pykniden bedeckten Zone (um die Impfstelle) cm	Zahl der Pykniden	Größe der Pykniden	Bemerkungen
1. <i>Ph. rad. Oxye.</i>	Agar + Rhododendronblättr-Dekokt	19	10	2	ca. 40	groß ¹⁾	Pykniden in und auf dem Substrat.
2. <i>Ph. rad. Andr.</i>		19	11	10	} viele Hunderte	meist sehr klein	} Pykniden in und auf dem Substrat, mauerförmige Conidien.
3. <i>Ph. rad. Vacc.</i>		19	12	10,5		meist sehr klein, aber etw. größer als bei 2	
4. <i>Ph. rad. Tetr.</i>		19	8	0,7	wenige	groß	
5. <i>Ph. rad. Ericae</i>		19	8	7,5	ca. 400	groß	Pykniden nur oberflächlich.

Die Unterschiede sind in die Augen springend. Während bei den Arten 2, 3 und 5 das Mycel fast in seiner gesamten Ausdehnung sich mit Pykniden bedeckt, bilden die Arten 1 und 4 nur in sehr beschränkter Entfernung von der Impfstelle Fruchtkörper. Die Arten 2, 3 und 5 unterscheiden sich ihrerseits durch Größe und Zahl der Pykniden, 1 und 4 vor allem durch die Färbung des Substrates.

Diese Unterschiede bestehen nicht etwa bloß in den ersten Wochen; sie treten im Gegenteil später (nach 4 Monaten) noch schärfer hervor.

Verwendet man zu den Reagensglas-Strichkulturen ein anderes Substrat, z. B. Agar + Dextrose oder Agar + stickstofffreie Nährlösung, so werden die makroskopisch wahrnehmbaren Unterschiede wieder ganz andere: die Pykniden bilden sich bei allen 5 Pilzen mehr oder weniger gleichmäßig zerstreut auf dem ganzen Substrat, wenn auch in sehr verschiedener Menge; die winzigen Fruchtkörper

1) „groß“ = von der Größe eines kleinen Stecknadelkopfes.

der *Phoma radicis Andromedae* und der *Ph. radicis Vaccinii* umgeben sich mit schwarzbraunen kurzcelligen Fäden und kommen dadurch den Pykniden der übrigen Kulturen an Größe gleich, das Substrat der *Ph. radicis Oxycocci* färbt sich rötlich, das der *Ph. radicis Tetralicis* durch und durch tiefschwarz.

Die Diagnosen, die nun folgen, beziehen sich deshalb auf die Wuchsformen eines ganz bestimmten Substrates und haben nur für diese Geltung. Das Substrat besteht aus gleichen Teilen 2% iger Agar-Lösung und Dekokt¹⁾ von Rhododendronblättern, kommt also noch am ehesten einem natürlichen nahe²⁾. Die Angaben über die Verteilung der Pykniden beziehen sich auf Reagensglas-Strichkulturen.

1. *Phoma radicis Oxycocci*.

Pykniden schwarzbraun, von sehr wechselnder Größe, zahlreich, in und auf dem Substrat, ca. 3 cm um die Impfstelle bedeckend. Größte Pykniden von der Größe eines kleinen Stecknadelkopfes, bei der Reife im Durchschnitt 176—196 μ lang, 176—196 μ breit, im allgemeinen etwas länger als breit. Papille ziemlich schwach. Fruchtkörper immer einporig, Sporen in Ranken entleert. Die Rankenentleerung dauert 1 Stunde und länger. Ranke sehr fest, zerbricht in Stücke, ohne Sporen zu verlieren, ca. 16000 μ (1,6 cm) lang, im Maximum 32 μ breit. Sporen hyalin 4—5 μ lang, 2 μ breit, stäbchenförmig, oft aber auch ganz schwach gekrümmt oder an einem Ende dicker, mit 2 Öltröpfchen an den beiden Polen. — Der Pilz bildet weder Conidien, noch besonders gestaltete Gemmen. Das Mycel wird im Alter dunkelbraun.

Auf Agar + stickstofffreier Nährlösung werden die Fruchtkörper fast kohlig und sind mehr oder weniger über das ganze Substrat zerstreut. Die Kultur färbt sich rötlichbraun, was einerseits von der braunen Farbe der Hyphen, andererseits von roten, unregelmäßig sternförmigen Ausscheidungen im Substrat herrührt.

2. *Phoma radicis Andromedae*.

Pykniden lange Zeit gelbbraun, erst später dunkel werdend, von ziemlich gleichmäßiger Größe, für das unbewaffnete Auge punktförmig, von den 5 *Phoma*-Arten am kleinsten, sehr zahlreich, in und

1) 50 g frische Blätter verschiedener Varietäten des *Rhododendron ponticum* L. in 1000 ccm aq. dest. 2 Stunden gekocht, filtriert, Filtrat auf 400 ccm eingeeengt und wieder filtriert.

2) Gibt man statt dessen Torfdekokt, so ist die Entwicklung der Pilze äußerst spärlich.

auf dem ganzen Substrat regelmäßig zerstreut. Im Durchschnitt 78μ lang, die Papille eingerechnet, und 78μ breit; im allgemeinen aber eher etwas breiter als lang. Papille deutlich. Fruchtkörper einporig. Rankenentleerung selten zu beobachten. Dagegen treten die Sporen in Form einer Blase aus dem Fruchtkörper und bleiben, die Mündung verschließend, oft Tage lang vor der Papille liegen. Wo Rankenentleerung eintritt, zereißt die lockere Ranke gleich nach ihrem Austritt mit großer Vehemenz. Sporen hyalin, von wechselnder Größe, im allgemeinen dicker und kürzer als bei voriger Art; 4μ lang, $2-2,6 \mu$ breit, aber zuweilen auch 5μ lang, 2μ breit. Öltröpfchen an den Polen fehlen. — Neben den Pykniden treten als zweite Fruktifikationsart mauerförmige Conidien¹⁾ auf, oft im engsten Zusammenhang mit den Fruchtkörpern. Conidien schwarzbraun, einzeln oder in Reihen und dann nur undeutlich voneinander abgesetzt.

Auf Agar + Dextrose werden die Pykniden anscheinend viel größer, weil sich um sie ein dichtes Gewirr kohlgiger, engseptierter Fäden anlagert, die eine Art Gemmenmycelium²⁾ bilden.

3 *Phoma radicis Vaccinii*.

Der vorigen Art außerordentlich ähnlich. Pykniden lange Zeit hellbraun, dann dunkel werdend, von ziemlich gleichmäßiger Größe, nur wenig größer, als bei voriger Art, sehr zahlreich, in und auf dem ganzen Substrat regelmäßig zerstreut. Im Durchschnitt 76μ lang, die Papille eingerechnet, und 80μ breit, im allgemeinen breiter als lang. Papille deutlich. Fruchtkörper meist einporig, doch bilden sich auch zwei- und dreiporige Exemplare, ohne daß dadurch die typische Krugform eine Veränderung erlitte. Sporenranke sehr locker, die längste beobachtete 735μ lang und im Maximum 30μ breit. Sporen oft auch einzeln aus der Papille tretend. Sehr häufig über der Papillenmündung Sporenblasen, wie bei voriger Art. Sporen hyalin, unregelmäßig in Gestalt und Größe, eher ei- als stäbchenförmig, oft an einem Ende dicker, 5μ lang (auch etwas weniger), $2-3 \mu$ breit. An einem oder beiden Polen Öltröpfchen. — Neben den Pykniden treten als zweite Fruktifikationsart mauerförmige Conidien von dunkelbrauner Farbe auf. Conidien einzeln oder in Reihen und dann scharf voneinander abgesetzt.

1) Zopf. Die Pilze, 1890, S. 35.

2) Zopf, a. a. O., S. 77.

In Agar und N-freier Nährlösung werden die Pykniden anscheinend viel größer, weil sich rings um sie ein Gewirr von schwarzbraunen, kohligen, engseptierten und unregelmäßig gestalteten Fäden anhäuft. Auch sind dann, wenigstens in älteren Kulturen, die Sporen nicht mehr ganz hyalin, sondern blaßbräunlich.

4. *Phoma radicis Tetracis*.

Pykniden schwarz, kohlig, sehr wenig zahlreich, nur an der Oberfläche des Substrates, im engsten Umkreis um die Impfstelle, im Mittel 157 μ lang, 137 μ breit, Papille ziemlich undeutlich. Fruchtkörper einporig. Sporenentleerung durch Ranken, die an der Austrittsstelle sehr dick sind, aber rasch abnehmen (Ranken ca. 7700 μ lang, an der Austrittsstelle 32 μ , im Hauptteil 16 μ , am Ende nur 6 μ breit). Sporen hyalin, schwächer lichtbrechend, als die der vier andern Arten, 5 μ lang (auch etwas weniger), 1,3–2 μ breit. Keine Öltröpfchen an den Polen. — Der Pilz bildet weder Conidien, noch besonders gestaltete Gemmen. Das Mycel färbt das ganze Substrat tiefschwarz.

5. *Phoma radicis Ericae*.

Pykniden schwarzbraun, von ziemlich gleichmäßiger Größe, zahlreich, an der Oberfläche des ganzen Substrates zerstreut. Der einzelne Fruchtkörper krugförmig, ohne deutlich abgesetzte Papille, 157 μ lang, 107 μ breit. In älteren Kulturen merkwürdig zusammengesetzte Formen, indem ein Krug aus dem andern hervorzusprossen scheint. Fruchtkörper ein- bis fünfporig. Sporen in einer dicken Ranke austretend, Ranke mindestens 3200 μ lang, 35 μ breit. Sporen hyalin, regelmäßig, kurz stäbchenförmig, 3,9 μ lang, 1,3 μ breit, selten 4 μ lang, 2 μ breit. — Der Pilz bildet weder Conidien, noch besonders gestaltete Gemmen.

Die in den obigen Diagnosen angegebenen Zahlen über die Größe der Fruchtkörper und die Länge und Breite der Ranken beanspruchen natürlich keine allgemeine Gültigkeit. Die Maßzahlen der Fruchtkörper sind angeführt worden, weniger, um die Dimensionen der Pykniden festzustellen, als um zu zeigen, wie variabel diese Dimensionen sind und wie wenig sie als diagnostisches Merkmal verwertet werden können.

So gering aber die Unterschiede zwischen den einzelnen Pilzspecies auch sind, so beweist doch das konstante Auftreten dieser Unterschiede, daß wir es in der Tat mit verschiedenen *Phoma*-Arten zu tun haben. Gestützt wird diese Ansicht noch durch das

ganz verschiedene Verhalten der einzelnen Formen in stickstofffreien Nährlösungen. Bei reichlichem Luftzutritt und ziemlich hoher Dextrosekonzentration der stickstofffreien Kulturlösung bildet *Phoma radialis Oxycocci* viel Mycel und sehr viel reife Pykniden, *Phoma radialis Vaccinii* und *Phoma radialis Andromedae* bedeutend weniger Mycel und relativ sehr viel Pykniden, *Phoma radialis Tetralicis* sehr viel Mycel mit wenig oder gar keinen Pykniden, *Phoma radialis Ericae* viel Mycel mit vielen Pykniden, die aber die Reife in der gegebenen Kulturzeit (4 Wochen) nicht erlangen. Am geringsten sind die morphologischen Unterschiede zwischen *Phoma radialis Andromedae* und *Phoma radialis Vaccinii*. Sie beschränken sich auf geringe Größendifferenzen in den Fruchtkörpern, auf das Fehlen der polaren Öltröpfchen in den Sporen der ersten Art und auf kleine Verschiedenheiten in der Ausbildung der mauerförmigen Conidien.

IV. Kulturen in stickstofffreien Nährlösungen.

1. Kulturmethoden.

Da meine früheren Untersuchungen mich belehrt hatten, daß die von mir isolierten Pilze nur sehr geringe Mengen von Stickstoff zu binden vermögen, wurde auf die Anlegung der Kulturen die peinlichste Sorgfalt verwendet, um wenigstens die Fehlerquellen zu vermeiden, die vermieden werden können.

Die Versuche beschränkten sich ausschließlich auf N-freie Nährlösungen, da diese größere Sicherheit gegen Verunreinigungen bieten und für die Analyse viel handlicher sind. Das Trockengewicht der Pilze ließe sich überdies auf festem Substrat nicht bestimmen.

Als N-freie Nährlösungen wurden zahlreiche Modifikationen der von Winogradsky¹⁾ für *Clostridium Pastorianum* empfohlenen verwendet.

Dextrose	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 20%
KH ₂ PO ₄	0,01 0,1 0,4 0,5 1%
MgSO ₄	0,002 0,02 0,2%
CaCO ₃	0,01 0,1 1 4%

1) Winogradsky, Recherches sur l'assim. de l'azote libre de l'atmosph. par les microbes. Arch. des sc. biolog. de St. Pétersbourg, 1895. III, S. 297. Derselbe, *Clostridium Pastorianum*, seine Morphol. und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. Centralbl. f. Bakt. 1902. II. Abtl., Bd. 9, S. 43 und 107. A. Fischer, Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl., S. 167.

[Statt CaCO_3 auch manchmal MgCO_3]

NaCl }
FeSO₄ } Spuren

25 50 100 150 ccm NH_3 -freies dest. Wasser.

Als Kohlenstoff-Quelle wurde statt der Dextrose bisweilen auch Rohrzucker (2%, 10%) oder Mannit (2%) geboten.

Die am häufigsten verwendete Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

100 ccm NH_3 -freies dest. Wasser

Dextrose	7%	CaCO_3	0,01%	} Spuren.
KH_2PO_4	0,5%	NaCl		
MgSO_4	0,01%	FeSO_4		

Die Chemikalien waren von Merck in Darmstadt als garantiert N-frei bezogen worden. Sie wurden sorgfältig untersucht und ihr N-Gehalt tatsächlich = 0 befunden (vgl. analyt. Belege, Analyse 1). Für jede einzelne Kultur wurden die Nährstoffe besonders abgewogen, das destillierte Wasser jedesmal ausgekocht und noch siedend zu den Nährstoffen gegeben. Dann wurde sofort im Autoklav bei 120° sterilisiert und die Nährlösungen bis zum Erkalten im verschlossenen Autoklav belassen. Diese Vorsichtsmaßregeln sind durchaus geboten, um der Absorption von NH_3 vorzubeugen, die verhältnismäßig nicht unbedeutend sein kann (vgl. analyt. Belege, Analyse 18). Die verwendeten Erlenmeyerkolben waren vor Gebrauch jeweilen 24 Stunden lang mit einem Gemisch von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$ conc. gefüllt, dann mit heißem, destilliertem Wasser ausgewaschen und vor ihrer Verwendung staubfrei getrocknet worden.

Aspergillus und *Penicillium* wurden stets durch möglichst wenige Conidien aus Reinkulturen (Strichkulturen in Reagensgläsern) übertragen, die *Pykniden*-Pilze hie und da durch Mycelflöckchen aus Reinkulturen in Erlenmeyerkolben, meist aber durch einen einzelnen Fruchtkörper oder durch Sporen aus reinen Strichkulturen in Reagensgläsern. Im letzteren Fall wurden einige Pykniden in sterilem destilliertem Wasser geschüttelt, worauf die Sporen in langen, makroskopisch deutlich sichtbaren Ranken austraten. Dann wurden einige Tropfen des sporenhaltigen Wassers in die Nährlösung übertragen.

Daß die Kulturen, welche das Impfmateriel abgaben, auf ihre Reinheit geprüft wurden, ist wohl selbstverständlich, ebenso, daß nach Abschluß des Versuches an den N-freien Kulturen die Prüfung

wiederholt wurde (mikroskopische Untersuchung mit Immersion, mit oder ohne Färbung mit Ziehlscher Karbol-Fuchsin-Lösung). Nur in sehr wenigen Kulturen traten Verunreinigungen durch Bakterien auf. Häufiger waren solche durch *Aspergillus niger* und besonders durch *Penicillium glaucum*.

Der kleinere Teil der Kulturen kam, durch Baumwollpfropfen verschlossen, unter Glocken, die geschliffenen Glasplatten luftdicht aufsaßen und durch Wasser abgesperrt wurden. Die eintretende Luft passierte 2 U Röhren mit in NaOH resp. in H_2SO_4 getränkten Bimssteinstücken, um dem gebundenen Luftstickstoff den Zutritt zu wehren. Die meisten Kulturen aber wurden so angelegt, daß ein konstanter, langsamer Luftstrom durchgeleitet werden konnte.

Zu diesem Zweck wurden 6 Halbliter-Erlenmeyerkolben, je 3 nebeneinander, mit Gabelröhren und Gummischläuchen an eine Wasserstrahlpumpe gekoppelt. Jeder Kolben enthielt 100 bzw. 150 ccm Nährlösung und war in der oben erwähnten Weise gereinigt, sterilisiert und geimpft worden. Den Hals eines jeden Kolbens verschloß ein doppelt durchbohrter Kork, durch welchen eine kurze und eine bis unter die Flüssigkeitsoberfläche reichende Glasröhre führten. An beiden Glasröhren wurden bei den späteren Versuchen Kugeln geblasen, die, mit Baumwolle gefüllt, einen guten Abschluß gewähren und das Eindringen von Bakterien während des Aufstellens der Kulturgefäße verhindern¹⁾.

Nun wurden je 3 der kurzen Glasröhren durch Gummischläuche und Gabelröhren mit der Pumpe verbunden, die langen auf gleiche Weise zu je dreien mit 2 hintereinander liegenden großen U-Röhren, die fast ganz mit Bimssteinstücken und zu etwa $\frac{1}{3}$ mit NaOH bzw. H_2SO_4 gefüllt waren. Zwischen der Schwefelsäure-Vorlage und den Gabelröhren wurde ein 10 cm langer Glaszylinder mit sterilisiertem Watterpfropf eingeschaltet. Zu den ersten Versuchen waren statt der U-Röhren Waschflaschen verwendet worden, bei denen aber die NH_3 -Absorption viel unvollkommener ist²⁾.

1) Die Baumwollpfropfen in den Kugeln dürfen ja nicht zu fest sein, sonst entsteht beim Sterilisieren ein Überdruck im Gefäß, die Flüssigkeit steigt im langen Rohr empor, durchtränkt die Baumwolle und macht so den Kolben unbrauchbar.

2) Eine gleichlange absorbierende Flüssigkeitssäule bietet überdies in einer Waschflasche bedeutend größeren Widerstand, als in einer U-Röhre. Auch können die runden Blasen, die in der Waschflasche aufsteigen, nur an ihrer Oberfläche NH_3 abgeben, während die Luft im Innern der Blase unverändert bleibt. In der U-Röhre ist nicht nur die absorbierende Oberfläche sehr viel größer, sondern die Luftblasen werden auch, indem

Alle Teile, die bei Kulturen Verwendung fanden, wurden vor Gebrauch tüchtig sterilisiert: Der Kolbenverschluß natürlich gleichzeitig mit dem Kolben im Autoklav, die Gummischläuche in 80%-igem Alkohol, die Gabelröhren in Chromsäure ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ conc.) und kochendem Wasser. Nach dem Impfen wurden sämtliche Verschlüsse mit Paraffin oder mit einem Gemisch von Kolophonium und gelbem Wachs zugegossen.

Unter den 6 mit der Wasserstrahlpumpe verbundenen Kolben befand sich bei den späteren Versuchen stets eine Kontrollkultur, die vor dem Sterilisieren geimpft worden war und solange wie die übrigen Kulturen durchlüftet wurde. Leider ist bei den ersten Versuchen diese Vorsichtsmaßregel unterlassen worden. Bei der Verwertung der gefundenen Zahlen soll daher jedesmal eine Anmerkung gemacht werden, wenn die Kontrollkultur fehlt.

Ein solcher Kontrollversuch ist bei den durchlüfteten Kulturen durchaus erforderlich, weil trotz aller Vorsichtsmaßregeln im Laufe der Zeit eine Absorption von gebundenem Stickstoff stattfinden kann (vgl. analyt. Belege 18, 19). Daß dieser Stickstoff aber erst während der wochenlangen Durchlüftung in die Nährlösungen gelangt, wird durch den Umstand bewiesen, daß die Kontrollversuche der nicht durchlüfteten Kulturen ohne Ausnahme N-frei bleiben (vgl. analyt. Belege 6, 8).

2. Wachstums- und Fruktifikationsbedingungen.

Von Einfluß auf das Gedeihen der untersuchten Pilze in N-freien Nährlösungen ist in erster Linie die C-Quelle. Rohrzucker und Mannit sind in dieser Beziehung weniger günstig, als Dextrose, die deshalb fast ausschließlich als C-Quelle verwendet wurde.

Die Schimmelpilze scheinen anspruchsvoller zu sein, als die *Phoma*-Arten; diese gedeihen in 2% Rohrzucker- oder Mannitlösung noch ganz gut, während *Aspergillus* und *Penicillium* bei Darbietung von 2% Rohrzucker nur äußerst kümmerlich wuchsen und zuweilen überhaupt nicht einmal auskeimten. Immerhin ist auch für die *Phoma*-Arten Dextrose wesentlich besser, als Mannit oder Rohrzucker. *Phoma radicis Oxycocci* bildete z. B. bei Darbietung von 2% Dextrose in 28 Tagen 30 mg Trockensubstanz, bei 2% Mannit in der gleichen Zeit nur 11,8 mg.

sie sich zwischen den Bimssteinstücken durchzwängen, verändert und zerteilt, wodurch natürlich viel mehr Luft mit der Schwefelsäure in Berührung kommt.

Nun entwickeln sich zwar sämtliche Pilze am besten, wenn ihnen Dextrose geboten wird; doch bestehen zwischen den verschiedenen Arten bei gleichen Kulturbedingungen sehr große Differenzen. *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* z. B. entwickeln sich in den unter Glocken gehaltenen Kulturen, also bei stagnierender Luft, nur wenig, bilden aber bald Conidien und bleiben nach 2—3 Wochen in der Entwicklung fast ganz stehen. In durchlüfteten Kulturen dagegen gedeihen sie vegetativ ungleich besser, während die Conidienbildung bei *Penicillium* relativ weniger ausgiebig ausfällt und bei *Aspergillus* sogar fast ganz unterbleibt¹⁾.

Vergleichen wir damit einen der Pyknidenpilze, z. B. *Phoma r. Oxycoeci*, so finden wir, daß er auch in stagnierender Luft ausgezeichnet wächst und ein dichtes, bald braun oder schwarz werdendes Mycel bildet. Dieses bedeckt die Oberfläche der Nährlösung in einer bis 0,5 cm dicken, kompakten Schicht, so daß der Erlenmeyerkolben vollständig umgekehrt werden kann, ohne daß ein Tropfen der Nährlösung ausfließt. Während aber die beiden Schimmelpilze unter den gleichen Bedingungen nach wenigen Tagen zur Fruktifikation schreiten, bildet *Phoma radiceis Oxycoeci* keine einzige Pyknide. Diese entstehen dann aber um so zahlreicher, wenn die Kultur durchlüftet wird. Vergleichen wir nun die Trockengewichte der drei oben erwähnten Pilze, so finden wir bei Kulturen in stagnierender Luft folgendes Verhältnis (*Penicillium* = 1 gesetzt):

<i>Phoma r. O.</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>Pen. glauc.</i>
7,6	2,3	1.

In durchlüfteten Kulturen stellen sich die beiden Schimmelpilze wesentlich günstiger und zwar nicht nur relativ, sondern auch absolut. Setzen wir das Trockengewicht von *Penicillium* = 1, so ergibt sich folgendes Verhältnis:

1) Diese Verschiedenheit zwischen den beiden Schimmelpilzen ist jedenfalls nicht so zu deuten, als ob *Aspergillus* infolge der günstigeren Kulturbedingungen die Conidienbildung unterlasse. Die Ursache liegt vielmehr in dem Umstand, daß die Conidienträger von *Aspergillus* zarter sind und in der durch austretende Luftblasen fortwährend erschütterten Flüssigkeit umfallen. Dadurch ist natürlich die Bildung der schwarzbraunen Sporen ausgeschlossen (Klebs, Phys. d. Fortpfl. S. 457). Durch mikroskopische Untersuchung lassen sich im submersen Mycel zahlreiche umgestürzte Conidienträger nachweisen, deren Sterigmen zu Fäden, manchmal sogar wieder zu Conidienträgern ausgewachsen sind (Klebs, a. a. O.), sodaß die abenteuerlichsten Gebilde entstehen. Auch durchwachsene Hyphen sind nicht selten, wobei es im Innern eines Conidienträgers bis zur Bildung eines neuen Trägers mit Sterigmen und Sporen kommen kann.

<i>Phoma r. O.</i>	<i>Asp. niger</i>	<i>Pen. glauc.</i>
3,6	1,8	1.

Immerhin bilden auch hier die Schimmelpilze bedeutend weniger Trockensubstanz, als *Phoma r. O.*, die unter den untersuchten *Phoma*-Arten betreffs Bildung von Trockensubstanz die Mitte hält.

Sämtliche untersuchten Pilze wachsen übrigens in stagnierender Luft so, daß die Mycelien von Anfang an möglichst die Flüssigkeitsoberfläche einnehmen, während sie in den durchlüfteten Kulturen entweder ganz oder doch während längerer Zeit submers bleiben. Bedingt wird diese Verschiedenheit in erster Linie durch die ungleiche Sauerstoff-Versorgung. Bei den *Phoma*-Arten wirkt aber auch noch das Stickstoff-Bedürfnis mit, da in anaëroben, nicht durchströmten Kulturen die Mycelien ebenfalls, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt, die Flüssigkeitsoberfläche bevorzugen.

Was nun die Fruktifikation anbelangt, so ist schon hervorgehoben worden, daß die *Phoma*-Arten in N-freien Nährlösungen steril bleiben können unter Bedingungen, bei denen die Schimmelpilze noch reichlich Conidien bilden. Nun hängt aber, wie wir später sehen werden, die Größe der Stickstoffbindung wesentlich davon ab, ob Fruktifikation eintritt oder nicht. Es galt deshalb festzustellen, welche Faktoren für die Entstehung der Pykniden maßgebend sind. Am genauesten untersucht wurden die Verhältnisse bei *Phoma radiceis Oxycocci*. Das Ergebnis darf aber nicht ohne weiteres verallgemeinert werden, da die übrigen *Phoma*-Arten z. T. nicht unwesentliche Abweichungen zeigen.

Schon in meiner vorläufigen Mitteilung¹⁾ habe ich hervorgehoben, daß der „*Oxycoccus*-Pilz“, so gut er auch in N-freien Nährlösungen bei ruhender Luft gedieh, es doch niemals zur Fruktifikation brachte.

Diese Angabe war für den damaligen Stand der Untersuchungen vollkommen richtig, denn zu jener Zeit hatte ich den Pilz nur in Dextroselösungen von niedriger Konzentration (2%, 3%) gezüchtet. Die neueren Versuche haben die früheren Befunde bestätigt, wie aus nachfolgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle II. Nährlösung.

25 cem NH ₃ -freies dest. Wasser. Nicht durchlüftet.						
Dextrose	2%	4%	6%	8%	10%	CaCO ₃ 0,01%
KH ₂ PO ₄	0,1%	NaCl } Spuren
MgSO ₄	0,02%	FeSO ₄ }

1) a. a. O., S. 270.

Pilz	Alter	Konz. der Dext.	Bemerkungen
1.	49 Tage	2%	Mycel gleichmäßig die Nährlösung erfüllend; keine Pykniden.
2.	49 "	4 "	Mycel bildet 8 mm breite, lockere Oberflächenschicht, keine Pykniden.
3.	49 "	6 "	Mycel bildet 7 mm breite Oberflächenschicht, Luftmycel; 3—4 winzige Pykniden.
4.	49 "	8 "	} Oberflächenschicht 5—6 mm dick, sehr kompakt, starkes Luftmycel; 3—4 kleine Pykniden.
5.	49 "	10 "	

Bei einem Dextrosegehalt bis zu etwa 5% fehlt also in ruhender Luft die Pyknidenbildung gänzlich; bei höheren Konzentrationen bleibt sie *ceteris paribus* äußerst gering. Eine Erklärung dieser Erscheinung soll weiter hinten versucht werden; hier sei nur darauf hingewiesen, daß der Reichtum an organischen Kohlenstoff-Verbindungen für die Fruktifikation offenbar erst von sekundärer Bedeutung ist. Denn auch bei niedrigen Dextrosekonzentrationen oder bei Darbietung minderwertiger C-Quellen, wie Mannit, tritt reichlich Pyknidenbildung ein, wenn die Kulturen durchlüftet werden.

Was den unter Glocken abgesperrten Kulturen fehlt, ist also entweder der Sauerstoff oder der Stickstoff.

Der Sauerstoff scheint auf den ersten Blick allerdings eine nebensächliche Rolle bei der Pyknidenbildung zu spielen, wie aus folgendem Versuch hervorgeht: 4 Reagensgläser wurden zu $\frac{3}{4}$ mit N-freier Nährlösung gefüllt und derselben soviel KNO_3 zugesetzt, daß jede Kultur 0,7 mg N erhielt. Nach dem Impfen kamen die Kulturen unter einen engen, oben geschlossenen Zylinder, der einer Glasplatte luftdicht aufsaß und durch Wasser abgesperrt wurde. Die in den Kulturgefäßen eingeschlossene Luftmenge betrug höchstens 3 ccm mit ca. 0,6 ccm Sauerstoff. Die Mycelfläche, die mit der Luft in Berührung trat, war höchstens 1 qcm groß. Aber trotzdem der Sauerstoffzutritt ein äußerst beschränkter war, bildeten sich in kurzer Zeit normale Pykniden aus.

Die Kulturen in Halbliter-Erlenmeyerkolben dagegen, die wie üblich unter großen Glocken standen, aber bei sonst gleicher Nährlösung keinen gebundenen Stickstoff erhielten, blieben vollkommen steril, trotzdem ihnen das 130fache an Sauerstoff zur Verfügung stand¹⁾ und die Myceloberfläche mindestens 75 qcm betrug.

1) Die Halbliter-Erlenmeyerkolben enthielten neben 100 ccm Nährlösung noch 400 ccm Luft mit rund 80 ccm Sauerstoff und 320 ccm Stickstoff.

Steht also den Kulturen gebundener Stickstoff zur Verfügung, so fruktifizieren sie, trotz des sehr beschränkten Sauerstoff-Zutrittes, ganz normal, während sie bei relativ viel besserer Sauerstoff-Versorgung steril bleiben, wenn ihnen nur molekularer Stickstoff geboten wird. Dieses Verhalten läßt sich ohne Schwierigkeit aus der Tatsache erklären, daß zur Bindung des Luftstickstoffes eben sehr viel mehr Energie erforderlich ist, als zur Assimilation von Stickstoffverbindungen. Es ist aber einleuchtend, daß bei durchlüfteten Kulturen, wo der Sauerstoff direkt dem ganzen Mycel zugänglich ist, die Atmung eine viel ausgiebigere sein wird, als in stagnierender Luft, wo die kompakte Oberflächenschicht die tieferliegenden Mycelpartien von der Luft gänzlich abschließt.

Die Menge des verfügbaren Stickstoffes spielt bei dieser Erscheinung offenbar eine ganz untergeordnete Rolle. Die 0,7 mg gebundenen Stickstoffes in den Reagensglaskulturen genügen zur Fruktifikation, die 400 mg Atmosphärenstickstoff¹⁾ der Erlenmeyerkulturen genügen nicht — oder besser gesagt, sie können nicht genügend verwertet werden, weil die zur Assimilation nötige Energie fehlt.

Um also durch reichliche Fruktifikation eine ansehnliche Stickstoffbindung zu erzielen, muß den Kulturen viel Sauerstoff zur Verfügung gestellt werden. Für das bloß vegetative Wachstum ist dies durchaus nicht erforderlich; da zeigt sich der Organismus im Gegenteil sehr genügsam (vgl. S. 393).

Nun ergibt sich aber aus Tabelle II, daß *Phoma radidis Oxy-cocci* auch in stagnierender Luft vereinzelte Pykniden bilden kann — dann nämlich, wenn die Dextrosekonzentration 5% überschreitet. Diese veränderte Sachlage schreibe ich aber nicht etwa direkt der besseren Ernährung zu, oder einem geringen Stickstoffgehalt der Dextrose, der sich erst bei höherer Konzentration geltend machte, sondern dem Umstand, daß der Pilz bei höherem Dextrosegehalt ein ausgeprägtes Luftmycel bildet²⁾. Dadurch wird aber sowohl die assimilierende, als auch die atmende Oberfläche stark ver-

1) Die Halbliter-Erlenmeyerkolben enthielten neben 100 ccm Nährlösung noch 400 ccm Luft mit 320 ccm N, oder 1 l N = 1,25440 g gesetzt, rund 400 mg N.

2) Daß das Luftmycel erst bei höherem Dextrosegehalt auftritt und mit steigender Konzentration zunimmt, führe ich darauf zurück, daß das dem osmotischen Wert des Substrates angepaßte Mycel erst bei höherem Dextrosegehalt vor zu starker Transpiration genügend geschützt ist, um an die Luft wachsen zu können.

größert. Wenn sich daher in nicht durchlüfteten Kulturen überhaupt Pykniden bilden, so entstehen sie nur an der Luft, d. h. an der Oberfläche des Mycels oder an der freien Gefäßwandung.

Nun kommen aber für die Pyknidenbildung noch zwei weitere Faktoren in Betracht, nämlich das Kaliumphosphat und das Magnesiumsulfat der N-freien Nährlösung. Über den Einfluß des Phosphatgehaltes gibt die nachfolgende kleine Tabelle Aufschluß.

Tabelle III. Nährlösung.

25 ccm NH₃-freies dest. Wasser.

Dextrose	10%	CaCO ₃	0,01%
KH ₂ PO ₄	0,01%	0,1%	1%	. . . NaCl } Spuren
MgSO ₄	0,02%	FeSO ₄	

Unter Glocken, nicht durchlüftet.

Pilz	KH ₂ PO ₄	Entwicklung des Mycels nach				Pykniden
		6 Tagen	7 Tagen	20 Tagen	62 Tagen	
1. <i>Phoma radicis</i>	0,01%	noch nicht nachweisb.	wenig	ordentlich	} in allen 3 Kulturen gleich stark	2 kleine Pykniden im Luftmycel.
2. <i>Oxycocci</i>	0,1 "	noch nicht nachweisb.	ordentlich	ordentlich		zieml. viel kleine Pykniden.
3. <i>Oxycocci</i>	1 "	makrosk. sichtbar	sehr gut entwickelt	außerord. stark		sehr zahlr. kleine Pykniden.

Die Dextrosekonzentration ist absichtlich so hoch (10%) gewählt worden, weil dann nach dem früher gesagten (S. 374, 375) Pyknidenbildung von vorne herein zu erwarten stand.

Aus der Tabelle entnehmen wir die Tatsache, daß innerhalb der gegebenen Grenzen die Kulturen sich um so schneller entwickeln, je höher der Phosphatgehalt der Nährlösung ist. Diese Überlegenheit der phosphatreichen Kulturen besteht aber nur während der ersten 2—3 Wochen, später findet ein Ausgleich statt, so daß die Mycelien in bezug auf Masse nicht mehr voneinander zu unterscheiden sind. Anders verhält es sich mit der Fruktifikation. Da können wir nur die unzweifelhafte und dauernde Überlegenheit der phosphatreicheren Kulturen konstatieren. Denn während bei 0,01% Phosphat in 2 Monaten nur 2 Pykniden entstanden sind, haben sich in der gleichen Zeit bei 0,1% ziemlich viele, bei 1% sogar sehr zahlreiche Fruchtkörper gebildet. Mit steigendem Gehalt an KH₂PO₄ nimmt also innerhalb der gegebenen Grenzen die Fruchtkörperbildung zu. Ob diese günstige Wirkung der Phosphorsäure, oder dem Kalium, oder beiden Bestandteilen des Salzes zuzuschreiben ist, habe ich nicht untersucht, da

es mir ja lediglich darauf ankam, die Fruktifikationsfähigkeit des Pilzes zu steigern.

Durch ganz analoge Versuche wurde der Einfluß des $MgSO_4$ auf die Entstehung der Pykniden ermittelt. Wir finden die Ergebnisse in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV. Nährlösung.

25 cem NH_3 -freies dest. Wasser.

Dextrose	10%				$CaCO_3$	0,01%
KH_2PO_4	0,1%				$NaCl$	} Spuren
$MgSO_4$	0,002%	0,02%	0,2%		$FeSO_4$	

Unter Glocken, nicht durchlüftet.

Pilz	$MgSO_4$	Entwicklung des Mycels nach				Pykniden
		6 Tagen	7 Tagen	11 Tagen	62 Tagen	
1. <i>Phoma radidis</i>	0,002%	makrosk. sichtbar	kräftig	gut entw.	} in allen 3 Kulturen gleich stark	ziemlich viel norm. Pykniden.
2. <i>Oxycocci</i>	0,02 "	} makrosk. nicht sichtbar	ordentlich	gut entw.		nicht halb so viel wie in 1.
3. <i>Oxycocci</i>	0,2 "		schwach	zieml. schwach		3 oder 4 winzige Pykniden.

Aus Tabelle IV ist ersichtlich, daß sich die Kulturen gerade entgegengesetzt verhalten, wie die der vorhergehenden Versuchsreihe, d. h. die Kultur mit minimalem Magnesiumgehalt entwickelt sich am schnellsten, diejenige mit maximalem am langsamsten. Aber auch hier gleichen sich die Unterschiede schon nach 2 Wochen nahezu, nach 2 Monaten vollständig aus. Dauernd bleiben wiederum nur die Unterschiede in der Pyknidenbildung: die Kultur mit minimalem Mg-Gehalt weist ziemlich viele, z. T. große Fruchtkörper auf, diejenige mit mittlerem Gehalt nicht einmal halb so viel, diejenige mit maximalem Gehalt bloß 3 oder 4, und dazu noch sehr kleine Exemplare. Mit steigendem Gehalt an $MgSO_4$ nimmt also ceteris paribus und innerhalb der gegebenen Grenzen die Fruchtkörperbildung ab.

So günstig aber auch die Konzentrationen des Phosphates und des Magnesiumsalzes gewählt sind — eine auch nur annähernd so reichliche Fruktifikation, wie in den durchlüfteten Kulturen, tritt in stagnierender Luft niemals ein. Die Pykniden bleiben meistens klein und erreichen nur selten die volle Reife. Das kann nach dem früher Gesagten nicht überraschen. Was ja diesen Kulturen fehlt, ist in erster Linie die Zuführung von Sauerstoff zu möglichst großen Teilen des Mycels. Und über den Sauerstoffmangel helfen

auch die optimalen Phosphatkonzentrationen nicht hinweg. Der Pilz bringt wohl zahlreiche Fruchtkörperanlagen hervor; aber die Bildung der Sporen unterbleibt. —

Endlich sei noch der Einfluß erwähnt, den der Dextrosegehalt der Nährlösung auf die Fruktifikation ausübt. Während bei allen Kulturen mit steigender Konzentration (bis zu 10 oder 12%) das Trockengewicht zunimmt (vgl. S. 390 dieser Arbeit), übt der Dextrosegehalt auf die Pyknidenbildung nur in den durchlüfteten Kulturen einen merklichen Einfluß aus: von 2% Dextrose ansteigend erreicht die Fruktifikation ihr Maximum bei etwa 8%, um von da an wieder abzunehmen.

Fassen wir die gefundenen Resultate zusammen, so ergibt sich trotz der unvermeidlichen und z. T. sehr beträchtlichen individuellen Schwankungen für die Fruchtkörperbildung bei *Phoma radicis Oxycoeci*, daß sie von der Menge des assimilierbaren Stickstoffes abhängt, daß sie mit steigender Dextrosekonzentration bis zu dem um 8% liegenden Optimum zunimmt und daß sie, ceteris paribus, in phosphatreicheren (bis zu 1%) oder in magnesiumärmeren (bis zu 0,002%) Nährlösungen eine Steigerung erfährt.

3. Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes.

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch Pilze haben z. T. recht widersprechende Resultate zutage gefördert. Während Puriewitsch¹⁾ *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* die Fähigkeit zuerkannte, den molekularen Stickstoff zu binden, kam Fermi²⁾ bei den nämlichen Organismen zum entgegengesetzten Resultat: nicht einmal qualitativ ließ sich Stickstoff nachweisen, wenn die Pilze in N-freier Nährlösung gezüchtet worden waren. Fermi zog daraus den Schluß, die fraglichen Organismen vermöchten überhaupt ohne Stickstoff zu gedeihen. Negative Resultate ergaben auch die Versuche von Brefeld³⁾ mit einem Brandpilz, und der geringe Stickstoff-Gewinn (2,3 mg), den Gerlach und Vogel⁴⁾ bei

1) Puriewitsch, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1895, S. 342.

2) C. Fermi, Stickstofffreie Mikroorganismen und Enzyme? Centralbl. f. Bakt. 1896, II. Abt., Bd. 2, S. 505.

3) Brefeld, Versuche über die Stickstoffaufnahme bei Pflanzen. 78. Jahres-Ber. d. Schles. Ges. f. vaterl. Cult. 1900, Zool.-bot. Sect., S. 27—38.

4) Gerlach und Vogel, Weitere Versuche mit stickstoffbind. Bakt. Centralbl. f. Bakt. 1903, II. Abt., Bd. 10, S. 636.

der Reinkultur eines Schimmelpilzes in N-freier Nährlösung erzielten, wird von den beiden Forschern als innerhalb der Fehlergrenze liegend betrachtet. Zu positiven Resultaten kam in neuerer Zeit Saida¹⁾, der für *Phoma Betae*, *Aspergillus niger* und einige andere Pilze Assimilation von molekularem Stickstoff nachgewiesen hat.

Wir stehen also vor der Tatsache, daß den nämlichen Organismen von den einen Forschern die Bindung von Luftstickstoff zugeschrieben wird, während andere ihnen diese Fähigkeit aberkennen. Die Ursache dieser Diskrepanz liegt z. T. darin, daß sich bei Wiederholung der Versuch durch verschiedene Experimentatoren abweichende Resultate ergeben haben, z. T. aber auch darin, daß Zahlen, die die einen als beweiskräftig anführen, von den andern als innerhalb der Fehlergrenze liegend abgelehnt werden.

Nun ist die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes naturgemäß zuerst bei denjenigen Organismen entdeckt worden, die diese Fähigkeit im höchsten Grade besitzen, bei den Bakterien. Durch die bahnbrechenden Arbeiten von Hellriegel²⁾ und Winogradsky³⁾, durch die Auffindung des *Azotobacter chroococcum* durch Beijerinck⁴⁾ ist uns die Kenntnis von Stickstoff-Sammlern allerersten Ranges vermittelt worden.

Wenn durch Hellriegel und Wilfahrt⁵⁾ ein Stickstoff-Gewinn von über 900 mg, durch Winogradsky⁶⁾, Beijerinck und van Delden⁷⁾, Gerlach und Vogel⁸⁾ Stickstoffgewinne von 40—120 mg festgestellt worden sind, so erscheinen daneben die durch Pilze erzielten Stickstoffgewinne von 3—10 mg allerdings verschwindend klein. Aber so unbedeutend an und für sich ein

1) Saida, Über die Assim. des freien Stickstoffes durch Schimmelpilze. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 1902, Generalvers. Heft, S. 107.

2) Hellriegel, Untersuchung über die Stickstoffnahrung der Gramineen und der Leguminosen. 1888.

3) Winogradsky, Recherches sur l'assim. de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. Arch. sc. biol. St. Pétersbourg. 1895, Tome III.

4) Beijerinck, Über oligonitrophile Mikroben. Centralbl. f. Bakt. 1901, II. Abt., Bd. 7, S. 561.

5) Hellriegel und Wilfahrt, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 1889, S. 141.

6) Winogradsky, a. a. O. und Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. 9, S. 43 u. 107.

7) Beijerinck und van Delden, Über d. Assim. d. freien Stickstoffes durch Bakterien. Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. 9, S. 3.

8) Gerlach und Vogel, Stickstoffsammelnde Bakterien. Centralbl. f. Bakt. 1902, Bd. 9, S. 817 und 881.

solcher Stickstoffgewinn auch sein mag, und so wenig die assimilatorische Tätigkeit der Schimmelpilze für die Landwirtschaft auch ins Gewicht fallen mag — für den Organismus selbst kann sie deswegen doch von fundamentaler Bedeutung sein.

A priori ist kein Grund für die Annahme vorhanden, die Pflanzen schieden sich bezüglich ihrer Stickstoff-Ernährung in zwei prinzipiell scharf getrennte Gruppen: in solche, die nur Stickstoffverbindungen, und in solche, die nur den molekularen Stickstoff verwerten können. Nach Pfeffer¹⁾ darf man vielmehr „auf Grund der Erfahrungen über andere Funktionen mit Sicherheit erwarten, daß die Befähigung zur Assimilation des freien Stickstoffs in einem graduell verschiedenen Maße ausgebildet ist, und daß sich Abstufungen zu denjenigen Organismen finden, in denen eine solche Assimilation nicht mehr zu bemerken ist“.

Die Frage ist nur, ob wir imstande sind, mittels der uns zu Gebote stehenden chemischen Methoden derartige minimale Stickstoffmengen mit genügender Sicherheit nachzuweisen. Von den Forschern, die zu positiven Resultaten gelangt sind, wird dies ohne weiteres angenommen, von den andern ebenso bestimmt verneint. Aber meines Wissens enthält keine der veröffentlichten Arbeiten²⁾ Angaben über die Zuverlässigkeit der allgemein üblichen Kjeldahl'schen Methode. Und doch hängt von diesem Faktor alles ab.

Dazu kommt noch, daß bei so außerordentlich kleinen Stickstoffmengen die chemischen Untersuchungen mit der peinlichsten Gewissenhaftigkeit ausgeführt werden müssen, daß wenigstens alle Fehler, die vermieden werden können, auch unbedingt vermieden werden, wenn nicht alles auf dem Spiele stehen soll. Und da es bei diesen Arbeiten in erster Linie auf fehlerfreie chemische Untersuchungen ankommt, so ist die genaue Angabe der angewendeten Methode, der Hinweis auf die möglichen Fehlerquellen und eine möglichst unverkürzte Anführung der Analysen ebenso unerläßlich, wie bei irgend einer andern chemischen Arbeit. Denn nur auf diese Weise ist es für andere möglich, die Befunde gehörig nachzuprüfen, übersehene Fehler aufzudecken und der Arbeit das Zutrauen zu schenken, das sie verdient.

Die Besprechung der chemischen Methoden und die analytischen Belege finden sich im folgenden Abschnitt zusammengestellt.

1) Pfeffer, Pflanzenphysiologie. 1897, I, S. 384.

2) Die Arbeit von Thiele in den Mitteil. d. landwirtsch. Institut. d. königl. Univ. Breslau, Bd. III, 1905, Heft 2 war mir leider nicht zugänglich.

Hier sollen nur die Gesamtresultate erörtert werden. Bezüglich der in den Tabellen verwendeten Zahlen und der ihnen anhaftenden Fehler und Mängel sei ebenfalls auf die analytischen Belege verwiesen. Die Versuchsanstellung ist zu Anfang des III. Abschnittes eingehend besprochen worden, sodaß ich mich hier kurz fassen kann.

A. Die Schimmelpilze.

Aspergillus niger.

Tabelle V. Nährlösung.

100 bzw. 50 ccm NH₃-freies dest. Wasser.
 Dextrose 5% CaCO₃ 0,01%
 KH₂PO₄ 0,1% bzw. 1% NaCl } Spuren
 MgSO₄ 0,02% FeSO₄ }
 Kulturen teils in ruhender Luft unter Glocken, teils durchlüftet.

Nr. 1.	100 ccm	} während 40 Tagen von N-Verbindung. freie Luft durchgesogen.
„ 1 x.	100 „ Kontrollvers., vor dem Sterilisieren geimpft	
Nr. 2.	50 ccm	} 53 Tage unter Glocken in ruhender Luft; Zutr. von N-Verbindung. ausgeschlossen.
„ 2 x.	50 „ Kontrollvers., vor dem Sterilisieren geimpft	
Nr. 3.	100 ccm 1% KH ₂ PO ₄	} während 55 Tagen von N-Verbindung. freie Luft durchgesogen.
„ 3 x.	100 „ desgl., Kontrollvers., vor d. Sterilis. geimpft	

Resultate¹⁾.

Nr. 1 x = 0,8775 mg N (4)
 „ 2 x = N-frei (6)
 „ 3 x = 1,2067 mg N²⁾.

	Nr. 1 (3) 41 Tage	Nr. 2 (5) 53 Tage	Nr. 3 (7) 55 Tage
Trockengew. d. Mycels .	106,3 mg	37,2 mg	75 mg
N-Gehalt des Mycels . .	0,7010 mg = 0,66%	0,5616 mg = 1,45%	0,7024 mg = 0,94%
N-Gehalt der Nährlösg. <u>3,5100 „³⁾</u>	<u>0,0000 „</u>	<u>0,0000 „</u>	<u>3,3696 „</u>
Gesamtgehalt an N . .	4,2110 mg	0,5616 mg	4,0720 mg
N-Gehalt d. Kontrollvers. <u>0,8775 „</u>	<u>0,0000 „</u>	<u>0,0000 „</u>	<u>1,2067 „²⁾</u>
N-Gewinn	3,3335 mg	0,5616 mg	2,8653 mg
Verarbeitete Dextrose .	1220 mg	nicht bestimmt	1971 mg
Ass. N für 1 g verarb. Dextrose	2,71 „	„ „	1,45 „

1) Die eingeklammerten Zahlen verweisen auf die entsprechenden Analysen im folgenden Abschnitt.

2) Kontrollversuch 3 x ist verunglückt; daher wurde das Ergebnis des Kontrollversuches 1 x auf 55 Tage berechnet und in Abzug gebracht.

3) Der relativ hohe N-Gehalt der Nährlösung rührt davon her, daß das Mycel zuerst dekantiert wurde, wodurch natürlich die meisten Sporen ins Filtrat gerieten.

In den Kulturen 1 und 3 bilden sich innerhalb 8 Tagen Conidien, in 2 etwas später; Kultur 3 wies aber mehr Conidien auf, als Kultur 1, was vielleicht dem höheren Phosphatgehalt zuzuschreiben ist.

Aus Tabelle V ergeben sich folgende Tatsachen:

1. *Aspergillus niger* gedeiht in N-freien Nährlösungen, ob dieselben durchlüftet werden oder nicht. Doch ist das Wachstum in den durchlüfteten Kulturen 2—3 mal so stark. Relativ hoher Phosphatgehalt scheint die Bildung von Trockensubstanz ungünstig zu beeinflussen.

2. Je höher das Trockengewicht ist, um so geringer fällt sein prozentualer Stickstoffgehalt aus.

3. Der absolute Stickstoffgewinn ist außerordentlich gering, namentlich in den nichtdurchlüfteten Kulturen. Doch findet auch hier unzweifelhafte Stickstoffassimilation statt.

4. Das günstigere Ergebnis der durchlüfteten Kulturen ist jedenfalls nicht nur der reichlicheren Sauerstoff-Versorgung zuzuschreiben, sondern auch der Zufuhr geringer Mengen gebundenen Stickstoffes. Daß der Pilz aber auch ohne diesen sich zu entwickeln vermag, beweisen die Kulturen in ruhender Luft.

Aspergillus niger und *Penicillium glaucum*.

Tabelle VI. Nährlösung.

50 cem NH₃-freies dest. Wasser.

Dextrose 5%	CaCO ₃ 0,01%
KH ₂ PO ₄ 0,4%	NaCl } Spuren
MgSO ₄ 0,002%	FeSO ₄ }

Kulturzeit 28 Tage.

Nr. 4. <i>Aspergillus niger</i>	} unter Glocken in ruhender Luft. N-Verbindungen der Luft ausgeschlossen.
„ 4 a. <i>Penicillium glaucum</i>	
„ 4 x. Kontrollversuch, vor dem Sterilisieren geimpft	

Resultate.

4 x = N-frei (8).

	Nr. 4 (9)	Nr. 4 a (10)
Trockengewicht des Mycels	17,4 mg	7,5 mg
N-Gehalt des Mycels	0,4212 mg = 2,42%	0,2106 mg = 2,8%
Nährlösung	N-frei	N-frei
Verarbeitete Dextrose	596 mg	359 mg
Assim. N pro 1 g verarb. Dextrose . .	0,707 mg	0,587 mg

In beiden Kulturen im Verhältnis zu den armseligen Mycelien ziemlich reichliche Conidienbildung.

Tabelle VII. Nährlösung.

100 ccm NH₃-freies dest. Wasser.

Dextrose 7%	Ca CO ₃ 0,01%
KH ₂ PO ₄ 0,5%	Na Cl } Spuren
MgSO ₄ 0,01%	FeSO ₄ }

Kulturzeit 28 Tage.

Nr. 5. <i>Aspergillus niger</i>	} Von N-Verbindungen freie Luft durchgeleitet
„ 5 a. <i>Penicillium glaucum</i>	
„ 5 x. Kontrollversuch, vor dem Sterilisieren geimpft)}	

Resultate.

Kontrollversuch 5 x nicht brauchbar, weil verunreinigt.

	Nr. 5 (11)	Nr. 5 a (12)
Trockengewicht des Mycels	48,8 mg	28,3 mg
N-Gehalt des Mycels	1,0530 mg = 2,15 %	1,4040 mg = 4,96 %
N-Gehalt der Nährlösung	0,8424 „ ¹⁾	1,4040 „ ¹⁾
Gesamtgehalt an N	1,8954 mg	2,8080 mg
Verarbeitete Dextrose	1105,6 mg	740,8 mg
Assim. N pro 1 g verarb. Dextrose	1,71 „	3,8 „

In Tabelle VII ist möglicherweise der Gesamtgehalt an Stickstoff etwas zu hoch angegeben, da der Kontrollversuch nicht in Abzug gebracht werden kann. Legt man den Kontrollversuch 1 x Tabelle V zugrunde, und nimmt man an, die Absorption der in der Luft enthaltenen N-Verbindungen verlaufe proportional der Durchlüftungszeit, so wären bei 5 und 5 a 0,1775 mg in Abrechnung zu bringen und die Menge des gebundenen Stickstoffes pro 1 g verarbeiteter Dextrose = 1,55 bzw. 3,55 mg zu setzen.

Den Tabellen VI u. VII entnehmen wir folgende Tatsachen:

1. Auch *Penicillium glaucum* ist in durchlüfteten wie nicht-durchlüfteten Kulturen zur Bindung des atmosphärischen Stickstoffes befähigt, allerdings ebenfalls in sehr geringem Grade.

2. Die durchlüfteten Kulturen erweisen sich wiederum als für die Entwicklung viel günstiger.

3. *Penicillium glaucum* bildet unter den gebotenen Bedingungen nur halb soviel Trockensubstanz, wie *Aspergillus niger*.

4. Auch *Penicillium glaucum* kann, obgleich nur kümmerlich, ohne gebundenen Stickstoff fortkommen.

Vergleichen wir die *Aspergillus*-Kulturen von Tabelle VI u. VII mit denjenigen der Tabelle V, so scheint sich hieraus eine Bestätigung der (S. 382) ausgesprochenen Vermutung zu ergeben, daß höherer Phosphatgehalt die Bildung von Trockensubstanz beeinträchtigt. Berechnet man die Trockengewichte der verschiedenen Kulturen auf die gleiche Zeitdauer, so findet man folgende Verhältnisse:

1) Nährlösung abfiltriert, ohne zu dekantieren.

Kulturen in ruhender Luft, 53 Tage alt.

Nr. 2.	50 ccm Nährlösung,	5%	Dextrose	0,1%	KH ₂ PO ₄	37,2 mg	Trockensubst.	
Nr. 4.	50 "	"	5%	"	0,4%	"	34 "	" berechnet

Durchlüftete Kulturen.

Nr. 1.	100 ccm Nährlösung,	5%	Dextrose	0,1%	KH ₂ PO ₄	106,2 mg	Trockensubst.	
Nr. 5.	100 "	"	7%	"	0,5%	"	73,2 "	" } be-
Nr. 3.	100 "	"	5%	"	1 %	"	55,9 "	" } rechnet

Die Zahlen gelten natürlich nur unter der Voraussetzung, daß die Bildung der Trockensubstanz der Zeitdauer proportional sei. Diese Annahme ist aber erst durch den Versuch zu bestätigen.

Aus den oben angeführten, allerdings wenig zahlreichen Versuchen ergeben sich folgende Tatsachen:

Aspergillus niger und *Penicillium glaucum* sind beide zur Bindung des molekularen Stickstoffes befähigt, allerdings nur in sehr geringem Grade. Im Gegensatz zu Puriewitsch¹⁾ und in (teilweiser) Übereinstimmung mit Saida²⁾ ist Wachstum und Stickstoffassimilation auch dann beobachtet worden, wenn gebundener Stickstoff in der Nährlösung fehlte.

Die im großen und ganzen doch nur kümmerliche Entwicklung der Mycelien in N-freien Nährlösungen, wie auch der Umstand, daß die Fähigkeit, den atmosphärischen Stickstoff zu binden, nur in sehr geringem Maße vorhanden ist, legen den Gedanken nahe, es handle sich hier um einen Notbehelf der beiden Organismen: Wenn kein gebundener Stickstoff vorhanden ist, verstehen sie es, sich auch mit molekularem Stickstoff zu behelfen.

Das sehr viel bessere Gedeihen der beiden Schimmelpilze in durchlüfteten Kulturen ist, wie schon erwähnt, z. T. jedenfalls daraus zu erklären, daß die Nährlösungen trotz der Vorlagen sehr geringe Mengen von Stickstoffverbindungen aus der Luft absorbieren. Daneben mag aber auch die viel ausgiebigere Sauerstoff-Versorgung eine nicht unbedeutende Rolle spielen. Die Pilze bedürfen zur Festlegung des sehr inaktiven molekularen Stickstoffes natürlich mehr Energie, als zur Assimilation von Stickstoff-Verbindungen. In durchlüfteten Kulturen ist aber, im Gegensatz zu den nichtdurchlüfteten, der ungehinderte Sauerstoffzutritt zu allen Teilen des Mycels möglich, wodurch die Atmung, d. h. die Beschaffung von Energie, eine wesentlich ausgiebigere sein dürfte.

1) Puriewitsch, a. a. O., S. 342.

2) Saida, a. a. O., S. 107.

Ob der atmosphärische Stickstoff auch dann assimiliert wird, wenn das Substrat ausreichende Mengen von Stickstoffverbindungen enthält, habe ich nicht untersucht. Angesichts der offenbaren Schwierigkeit, den molekularen Stickstoff zu binden, ist a priori nicht einzusehen, warum die beiden Schimmelpilze sich mit dem gebundenen Stickstoff nicht begnügen sollten¹⁾. Bei Darbietung von kleinen Dosen von Stickstoffverbindungen hat Saida²⁾ u. a. für *Aspergillus niger*, Puriewitsch³⁾ für *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* Stickstoff-Anreicherung gefunden.

B. Die *Phoma*-Arten.

Um das verschiedene Verhalten der einzelnen *Phoma*-Arten bei der Kultur in N-freien Nährlösungen zu charakterisieren, finden sich in Tabelle VIII eine Reihe von Parallelkulturen zusammengestellt.

Tabelle VIII. Nährlösung.

100 ccm NH₃-freies dest. Wasser.

Dextrose 7%		MgCO ₃ 0,01%
KH ₂ PO ₄ 0,5%		NaCl } Spuren
MgSO ₄ 0,01		FeSO ₄ }

Kulturzeit 28 Tage.

Von Stickstoffverbindungen freie Luft in ununterbrochenem, langsamem Strom durchgeleitet.

- Nr. 1. *Phoma radialis* *Oxycocci*,
- " 2. " " *Andromedae*,
- " 3. " " *Vaccinii*,
- " 4. " " *Tetralicis*,
- " 5. " " *Ericae*,
- " 6 x. Kontrollversuch, vor dem Sterilisieren geimpft.

Resultate.

Kontrollversuch Nr. 6 x = 0,5616 mg N (18).

	Nr. 1 (13)	Nr. 2 (14)	Nr. 3 ⁴⁾ (15)
Trockengew. des Mycels	87,2 mg	41,3 mg	21,6 mg
N-Gehalt des Mycels . .	1,2636 mg = 1,45%	0,9828 mg = 2,38%	0,4914 mg = 2,27%
N- " der Nährlösg. <u>14,6016 "</u>	<u>14,6016 "</u>	<u>6,8796 "</u>	<u>15,7248 "</u>
Gesamtgehalt an N	15,8652 mg	7,8624 mg	16,2162 mg
N-Gehalt d. Kontrollvers. <u>0,5616 "</u>	<u>0,5616 "</u>	<u>0,5616 "</u>	<u>0,5616 "</u>
N-Gewinn	15,3036 mg	7,3008	15,6546 mg
Verarbeitete Dextrose .	846,4 mg	668,5 mg	707 mg
N-Gew. f. 1 g verarb. Dext.	18,08 "	10,92 "	22,14 "

1) Saida, a. a. O. S. 108.
 2) Saida, a. a. O. S. 112.
 3) Puriewitsch, a. a. O. S. 344.
 4) Etwas durch Bakterien verunreinigt.

	Nr. 4 (16)	Nr. 5 (17)
Trockengewicht des Mycels	177,2 mg ¹⁾	324,6 mg ¹⁾
N-Gehalt des Mycels	0,7020 mg = 0,4%	1,3338 mg = 0,41%
N-Gehalt der Nährlösung	3,7908 "	1,5444 "
Gesamtgehalt an N	4,4928 mg	2,8782 mg
N-Gehalt des Kontrollversuches	0,5616 "	0,5616 "
N-Gewinn	3,9312 mg	2,3166 mg
Verarbeitete Dextrose	1009,6 mg	1065,5 mg
N-Gewinn pro 1 g verarbeit. Dextrose .	3,99 "	2,17 "

Die einzelnen *Phoma*-Arten entwickeln sich in der angegebenen N-freien Nährlösung so ungleich, daß die Verschiedenheit der Spezies — mit zwei Ausnahmen — mit bloßem Auge leicht erkennbar ist. *Phoma rad. Oxycoeci* (1) und *Phoma rad. Tetraticis* (4) bilden schon nach 3 Wochen dichte, schwarze, gallertige Watten; doch weist die erstere Art sehr zahlreiche, letztere relativ wenig oder auch gar keine Pykniden auf. *Phoma rad. Tetraticis* (4) ist überdies viel stärker gallertig, als die anderen Arten.

Phoma rad. Andromedae (2) und *Phoma rad. Vacc.* (3) bilden ein bedeutend schwächeres, hellbraunes Mycel, das ganz submers bleibt, aber eine große Zahl von Pykniden aufweist. Diese beiden Arten lassen sich unter den gegebenen Kulturbedingungen makroskopisch nicht voneinander unterscheiden.

Phoma rad. Ericae (5) endlich bildet einen hellbraunen Mycelschleier, in welchem sehr zahlreiche, schwarzbraune Knötchen eingelagert sind, die sich bei mikroskopischer Untersuchung als lose Conglomerate von Pykniden herausstellen.

Phoma rad. Tetraticis (4) und *Phoma rad. Ericae* (5) scheinen übrigens unter den gegebenen Bedingungen und in der gegebenen Kulturzeit (4 Wochen) die Sporen nicht ausreifen zu können (vgl. S. 368).

Der Tabelle VIII entnehmen wir folgende Ergebnisse:

1. Alle 5 *Phoma*-Arten gedeihen in N-freier Nährlösung, doch bestehen bezüglich der Bildung von Trockensubstanz sehr bedeutende Unterschiede²⁾.

1) Trockengewicht etwas zu hoch, da leider nicht alle Dextrose ausgewaschen worden war.

2) Das Trockengewicht von *Ph. rad. Vacc.* (3) ist abnormal niedrig, da sonst in 4 Wochen 70—90 mg Trockensubstanz erzielt werden. Die Ursache ist jedenfalls in der geringen bakt. Verunreinigung zu suchen, gegen welche der Pilz, wie die übrigen *Phoma*-Arten, sehr empfindlich ist.

2. Je höher das Trockengewicht ist, umso niedriger fällt im allgemeinen sein prozentualer Stickstoffgehalt aus.

3. Die Menge des gesamten assimilierten Stickstoffes ist unabhängig von der gebildeten Trockensubstanz. Die beiden *Phoma*-Arten, die das höchste Trockengewicht aufweisen, haben am wenigsten Stickstoff gebunden.

4. Der assimilierte Stickstoff ist stets nur zum kleinsten Teil im Mycel enthalten; der Hauptertrag findet sich in der Nährlösung.

5. Der absolute Stickstoffgewinn ist, wie der Dextroseverbrauch, nur gering.

Nach den in Tabelle VIII zusammengestellten Ergebnissen kann ich der Ansicht von J. Vogel¹⁾ und B. Heinze²⁾ nur beistimmen, daß von der Üppigkeit des Wachstums in N-freien Nährlösungen nicht ohne weiteres auf die stickstoffbindende Energie des betreffenden Organismus geschlossen werden darf.

Der im allgemeinen sehr niedrige Stickstoffgehalt der Mycelien und der relativ große Stickstoffreichtum der Nährlösungen rührt davon her, daß die sehr kleinen Pykno sporen das Filter passieren und in die Nährlösung übertreten³⁾. Dadurch wird natürlich das Mycel seiner stickstoffreichsten Teile beraubt. Denn wie bei *Azotobacter*⁴⁾, wird auch bei den untersuchten Pilzen der assimilierte Stickstoff lediglich im Körper des Organismus festgelegt. Wenn daher der Stickstoffgehalt in Prozenten des Trockengewichtes ausgedrückt werden soll, so ist der gesamte gebundene Stickstoff in Betracht zu ziehen. Dann ergeben sich sogar noch wesentlich höhere Zahlen, als bei den Bakterien. Bei *Azotobacter* beträgt der Stickstoffgehalt 10—12% des Trockengewichtes, bei *Phoma rad. Andromedae* und *Phoma rad. Oxycocci* unter den gegebenen Bedingungen 17 und 18%.

In Tabelle IX (S. 388) finden wir die untersuchten Pilze mit einigen der stickstoffbindenden Bakterien zusammengestellt.

Ein Blick auf die fünfte Zahlenreihe der Tabelle IX ergibt die große Überlegenheit von *Clostridium Pastorianum* und *Azotobacter*

1) J. Vogel, Centralbl. f. Bakt. 1906, II. Abt., Bd. 15, S. 175.

2) B. Heinze, Annales Mycologici. 1906, Bd. 4, S. 52.

3) Ch. Ternetz, a. a. O., S. 272.

4) Gerlach und Vogel, Centralbl. f. Bakt., 1902, II. Abt., Bd. 9.

5) B. Heinze, a. a. O., S. 60.

chroococcum bezüglich der Fähigkeit, den atmosphärischen Stickstoff zu binden. *Clostridium Americanum* nähert sich in dieser Beziehung ganz der *Phoma rad. Andromedae*, die unter den untersuchten Arten punkto Stickstoffbindung etwa die Mitte hält.

Tabelle IX.

Name des assimilierenden Organismus	1.	2.		3.	4.	5.	6.	Bemerkungen
	Dauer des Versuches Tage	Gebotene Dextrose		Verarbeit. Dextr. g	N-Gewinn mg	Ass. N pro 1 g verarb. Dextr. mg		
		g	%					
<i>Clostrid. Pastorianum</i> ¹⁾	20	40	4	40	53,6	1,34		
" " ¹⁾	20	20	2	20	24,4	1,22		
<i>Clostrid. Americ.</i> ²⁾ . . .	30	1,25	0,25	1,25	4,6	3,7		
" " ²⁾ . . .	30	5	1	3,01	8,2	3,01		
<i>Azotobacter chrooc.</i> ³⁾ . .	35	5	0,5	5	42,7	8,56	Mittel aus 2 Best.	
" " ³⁾ . .	35	12	1,2	12	127,9	10,66		
<i>Aspergillus niger</i> ⁴⁾ . . .	28	7	7	1,1	1,9	1,71		
<i>Penicillium glauc.</i> ⁴⁾ . .	28	7	7	0,7	2,8	3,8		
<i>Phoma rad. Oxyc.</i> ⁵⁾ . . .	28	7	7	0,85	15,3	18,08		
<i>Phoma rad. Andr.</i> ⁵⁾ . . .	28	7	7	0,67	7,3	10,92		
<i>Phoma rad. Vacc.</i> ⁵⁾ . . .	28	7	7	0,71	15,7	22,14	nicht ganz bakterienfrei	
<i>Phoma rad. Tetr.</i> ⁵⁾ . . .	28	7	7	1	4	3,99		
<i>Phoma rad. Ericac.</i> ⁵⁾ . .	28	7	7	1,1	2,3	2,17		

Betrachten wir aber das Verhältnis des assimilierten Stickstoffes zur verarbeiteten Dextrose, wofür sich der zahlenmäßige Ausdruck jeweilen in der sechsten Kolonne findet, so ändert sich die Sachlage sehr wesentlich: Drei von den untersuchten *Phoma*-Arten stehen obenan, dann folgt erst *Azotobacter chroococcum*, während *Clostridium Pastorianum* am Ende der Reihe steht, also sogar noch hinter den Schimmelpilzen zurückbleibt.

Die untersuchten Pilze arbeiten demnach weit weniger energisch, als die typischen Stickstoffsammler, *Clostridium Pastorianum* und *Azotobacter chroococcum*, während sie dem *Clostrid. Americanum* zum Teil überlegen sind.

1) Winogradsky, Centralbl. f. Bakt., 1902, II. Abt., Bd. 9, S. 53 u. 54.

2) H. Pringsheim, Centralbl. f. Bakt., 1906, II. Abt., Bd. 16, S. 795.

3) Gerlach u. Vogel, Centralbl. f. Bakt., 1902, II. Abt., Bd. 9, S. 818.

4) Vgl. Tabelle VII dieser Arbeit.

5) Vgl. Tabelle VIII dieser Arbeit.

Von den drei angeführten Bakterien arbeitet *Azotobacter chroococcum* weitaus am ökonomischsten; doch steht ihm in dieser Beziehung eine der fünf *Phoma*-Arten gleich und zwei weitere übertreffen ihn sogar ganz bedeutend. Am ungünstigsten stellt sich das Verhältnis des assimilierten Stickstoffes zur verarbeiteten Dextrose bei *Clostridium Pastorianum*, was ohne Zweifel mit der streng anaëroben Lebensweise dieses Bakteriums zusammenhängt. Alle übrigen in Tabelle IX angeführten Organismen, auch *Clostr. Americanum*, wachsen aërob, verstehen es also, den Sauerstoff der Luft als Energiequelle zu benutzen. *Clostr. Past.* dagegen schöpft die zur Stickstoff-Assimilation erforderliche Energie einzig aus der Spaltung des gebotenen Zuckers. Es ist daher erklärlich, daß dieses anaërobe Bakterium bei der Festlegung von 53,6 mg Stickstoff 40 g Dextrose verarbeitet, während *Azotob. chrooc.* zur Bindung von 128 mg Stickstoff mit 12 g Dextrose auskommt. *Azotobacter* deckt eben seinen Energiebedarf z. T. durch die Sauerstoff-Atmung, was natürlich eine entsprechende Ersparnis an Zucker bedeutet.

Noch ökonomischer in bezug auf den Zuckerverbrauch als *Azotob. chrooc.* arbeitet ein anderer, ebenfalls streng aërober Organismus, der *Bacillus raditicola*. Nach den schönen Untersuchungen von Mazé¹⁾ assimilieren die Knöllchenbakterien in Reinkulturen auf festem Substrat und bei Darbietung von ca. 3,5 g Saccharose in 15 Tagen durchschnittlich 44 mg Stickstoff²⁾. In Nährlösungen werden pro 1 g verarbeiteter Saccharose im günstigsten Fall 11,6 mg Stickstoff gebunden³⁾. Allerdings muß dabei betont werden, daß die Verbrennungswärme des Rohrzuckers größer ist, als die des Traubenzuckers, ferner, daß Mazé der Nährlösung Eiweiß zugesetzt hat, das vermutlich kohlehydrat-sparend wirkte. Aber auch im Vergleich mit diesem sparsamsten unter den stickstoffbindenden Bakterien behaupten zwei der Pyknidenpilze den Vorrang: *Phoma rad. Oxyc.* assimiliert 18 mg, *Phoma rad. Vacc.* sogar 22 mg⁴⁾ Stickstoff pro 1 g verarbeiteter Dextrose.

1. M. Mazé, Fixation de l'azote libre par le bacille des nodosités des légumineuses. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1897, t. 11, p. 44. Derselbe, Les microbes des nodosités des légumineuses. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1898, t. 12, p. 1, 128.

2) Mittel aus Experiment I u. II, Mazé a. a. O., 1897, p. 48 u. 49.

3) Nach Mazé a. a. O., 1898, p. 7, berechnet.

4) Der durch *Phoma rad. Vacc.* erzielte hohe N-Gehalt ist möglicherweise unter Mithilfe von Bakterien zustande gekommen; die bez. Zahlen sind also mit Vorbehalt aufzufassen. Daß aber *Phoma rad. Vacc.* tatsächlich zu relativ hoher N-Bindung befähigt ist, beweisen die später (S. 391) zu besprechenden einwandfreien Versuche.

Die relativ günstige Stellung der *Phoma*-Arten und der Schimmelpilze in Kolonne 6, Tabelle IX erklärt sich aus dem sehr geringen Dextroseverbrauch (Tabelle IX, Kolonne 4). Von den in der Nährlösung enthaltenen 7 g Dextrose werden nur 9—15% verarbeitet, während die Bakterien im günstigsten Fall 60—68% (*Clostr. Amer.*, *Bacill. rad.*), meistens aber die gesamte zur Verfügung stehende Zuckermenge zersetzen. Dieses verschiedene Verhalten erklärt sich leicht aus dem Umstande, daß die Pilze, im Gegensatz zu den Bakterien, die Dextrose nicht vergären.

Nun wird man aber mit Recht fragen, warum denn den Pilzen in den Nährlösungen überhaupt so viel Zucker geboten wurde, da sie doch offenbar sehr haushälterisch damit umgehen. Der Grund hierfür liegt in dem Umstand, daß die Dextrosekonzentration den absoluten Stickstoffgewinn wesentlich beeinflußt. Als Beweis diene Tabelle X.

Tabelle X. Nährlösung.

100 ccm NH₃-freies dest. Wasser.

Dextrose 2, 4, 6, 8, 10%	CaCO ₃ 0,01%	} Spuren
KH ₂ PO ₄ 0,5%	NaCl	
MgSO ₄ 0,01%	FeSO ₄	

Kulturzeit 28 Tage.

Von N-Verbindungen freie Luft in langsamem Strom durchgeleitet.

Nr. 1.	<i>Phoma rad. Oxyococi</i>	2%	Dextrose	
" 2.	"	"	4 "	} Resultate wertlos, da nicht alle Dextrose aus dem Mycel gewaschen wurde.
" 3.	"	"	6 "	
" 4.	"	"	8 "	
" 5.	"	"	10 "	
" 6x.	"	"	5 "	vor dem Sterilisieren geimpft.

Resultate.

Kontrollversuch 6x = 1,6848 mg N (19)

	Nr. 1 (20)	Nr. 4 (21)	Nr. 5 (22)
Trockengew. des Mycels	30 mg	74,2 mg	79 mg
N-Gehalt des Mycels . .	0,3510 mg = 1,17%	1,4742 mg = 1,99%	1,8954 mg = 2,4%
N-Gehalt der Nährlösg.	<u>5,0544 "</u>	<u>13,8996 "</u>	<u>8,3117 "</u>
Gesamtgehalt an N . .	5,4054 mg	15,3738 mg	10,2071 mg
N-Geh. d. Kontrollvers.	<u>1,6848 "</u>	<u>1,6848 "</u>	<u>1,6848 "</u>
N-Gewinn	3,7206 mg	13,6890 mg	8,5223 mg
Verarbeitete Dextrose .	181 mg	845,6 mg	720 mg
N-Gew. f. 1 g verarb. Dext.	20,55 "	16,2 "	11,83 "

Von den fünf in Tabelle X angeführten Parallelkulturen trat die rascheste Entwicklung ein bei Nr. 3 (6% Dextrose), die langsamste bei Nr. 5 (10% Dextrose). Nach 3 Wochen aber hatte eine Verschiebung stattgefunden in dem Sinne, daß mit zunehmendem Zuckergehalt auch die Mycelmasse mächtiger geworden war. Die Kulturen Nr. 1 und

Nr. 2 (2 und 4% Dextrose) blieben ganz submers; in den übrigen bildete sich trotz der Durchlüftung Oberflächenmycel und zwar um so mehr, je höher die Dextrosekonzentration war. Pyknidenbildung trat besonders reichlich bei Nr. 4 (6% Dextrose) und Nr. 5 (8% Dextrose) ein.

Der Tabelle X entnehmen wir folgende Tatsachen:

1. Die Bildung von Trockensubstanz nimmt, ceteris paribus und innerhalb der gegebenen Grenzen mit steigender Dextrosekonzentration zu.

2. Die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes erreicht bei ca. 8% Dextrose ihr absolutes Maximum¹⁾.

3. Das relative Maximum der Stickstoffbindung fällt mit dem niedrigsten Dextrosegehalt zusammen. Je weniger Zucker dem Pilz geboten wird, um so haushälterischer geht er damit um.

Daß solche Versuchsreihen zuweilen auch von den obigen abweichende Ergebnisse zutage fördern können, liegt auf der Hand. Bei geringerem Phosphatgehalt z. B. verschiebt sich die optimale Konzentration der Dextrose nach oben (10%). Auch die individuellen Schwankungen sind manchmal recht fühlbar, wie aus Tabelle XI hervorgeht.

Tabelle XI. Nährlösung.

100 ccm NH₃-freies dest. Wasser.

Dextrose 5%	Ca CO ₃ 0,01%
KH ₂ PO ₄ 0,1%	NaCl } Spuren
MgSO ₄ 0,5%	FeSO ₄ }

Kulturzeit 28 Tage.

Von N-Verbindungen befreite Luft in langsamem Strom durchgeleitet.

- Nr. 1. *Phoma rad. Vaccinii*
- " 1a. " " "
- " 1x. Kontrollversuch, vor dem Sterilisieren geimpft.

Resultate.

Kontrollversuch 1x während des Durchlüftens verunglückt. Es wird daher der höchste bisher in einem Kontrollversuch gefundene N-Gehalt in Abzug gebracht.

	Nr. 1 (23)	Nr. 1a (24)
Trockengewicht des Mycels	97,5 mg	104,2 mg
N-Gehalt des Mycels	0,5616 mg = 0,6%	0,6318 mg = 0,6%
N-Gehalt der Nährlösung	10,8280 "	8,0200 "
Gesamtgehalt an N	11,3896 mg	8,6518 mg
N-Gehalt des Kontrollversuches	1,6848 "	1,6848 "
	<u>9,7048 mg</u>	<u>6,9650 mg</u>
Dextroseverbrauch	—	464 mg
Assim. N pro 1 g verarbeit. Dextrose	—	15 "

1) Die Kulturen Nr. 2 und Nr. 4 hatten bedeutend weniger N gebunden.

Die Stickstoff-Assimilation ist also verhältnismäßig recht beträchtlich, sodaß der in Tabelle VIII verzeichnete Ertrag von 15,6 mg N angesichts der höheren Dextrosekonzentration der Nährlösung möglicherweise doch durch den Pilz allein, ohne Mithilfe der geringen bakteriellen Verunreinigung erzielt worden ist. Nach allen bisher gemachten Erfahrungen ist *Phoma rad. vaccinii* diejenige Art, die den Stickstoff am energischsten assimiliert. Bei einer Dextrosekonzentration von 5% vermag der am genauesten untersuchte Pyknidenpilz, *Phoma rad. Oxyococi*, in 28 Tagen bloß etwa 4 mg Stickstoff zu binden, während *Phoma rad. Vaccinii* in derselben Zeit durchschnittlich 8 mg fixiert.

Es erübrigt nun noch zu untersuchen, ob eine geringe Zugabe von gebundenem Stickstoff zu der Nährlösung die Entwicklung der Pilze und die Bindung des Luftstickstoffes beeinflusst.

Um diese Frage zu lösen, wurde der N-freien Nährflüssigkeit noch eine bestimmte Menge Rhododendronblätter-Dekokt zugesetzt. Die Ergebnisse dieses Versuches finden sich in Tabelle XII zusammengestellt.

Tabelle XII. Nährlösung.

50 ccm NH₄-freies dest. Wasser. 50 ccm Rhododendronblätter-Dekokt.

Dextrose 7%	MgCO ₃ 0,01%
KH ₂ PO ₄ 0,5%	NaCl } Spuren
MgSO ₄ 0,01%	FeSO ₄ }

Kulturzeit 28 Tage.

Von N-Verbindungen freie Luft in langsamem Strome durchgeleitet.

- Nr. 1. *Phoma rad. Oxyococi*,
 „ 2. *Phoma rad. Vaccinii*,
 „ 3a. Kontrollversuch, vor dem Sterilisieren geimpft.

Resultate.

Kontrollversuch Nr. 3x = 1,9374 mg N (25).

	Nr. 1 (26)	Nr. 2 (27)
Trockengewicht des Mycels	105,5 mg	74,2 mg
N-Gehalt des Mycels	1,5865 mg = 1,5 %	1,1653 mg = 1,6 %
N-Gehalt der Nährlösung	6,6268 „	3,0326 „
Gesamtgehalt an N	8,2133 mg	4,1979 mg
N-Gehalt des Kontrollversuches	1,9374 „	1,9374 „
N-Gewinn	6,2759 mg	2,2605 mg
Dextroseverbrauch	872 mg	980,8 mg
Assim. N pro 1 g verarbeit. Dextrose	7,2 „	2,3 „

Aus Tabelle XII entnehmen wir, daß der Zusatz von kleinen Stickstoffmengen in Form von Rhododendronblätter-Dekokt die

beiden *Phoma*-Arten entschieden ungünstig beeinflußt: Die Stickstoff-Assimilation wird wesentlich herabgedrückt und der Zuckerverbrauch gesteigert (vgl. Tabelle VIII).

Damit ist natürlich nicht gesagt, daß Stickstoff-Verbindungen in anderer Form nicht doch eine Steigerung der Stickstoff-Assimilation bewirken können.

Wenden wir uns noch kurz zur Besprechung der anaëroben Kulturen. Sie wurden mit Pyknidenpilzen ausgeführt, lediglich um zu ermitteln, ob sich die Bindung von molekularem Stickstoff auf diese Weise steigern lasse, und ob dabei die Zuckerarten vergoren würden.

Die ersten Versuche wurden derart angestellt, daß durch die Kulturen statt eines Luftstromes ein Strom von Stickstoff strich. Der Stickstoff war nach der von Harcourt und Lupton¹⁾ angegebenen Methode hergestellt worden. Die Pilze entwickelten sich außerordentlich üppig; doch dürfen die Resultate nicht verwertet werden, da eine Nachprüfung des Gasometerinhaltes nach dem Liebigschen Verfahren²⁾ noch Beimengungen von Sauerstoff ergab. Bei den späteren Versuchen kamen die Kulturen unter große Glocken, die dem Rezipiententisch einer Wasserstrahlpumpe luftdicht aufsaßen und deren Sauerstoffgehalt durch Pyrogallol in alkal. Lösung absorbiert wurde.

Die Versuchsanordnung ergibt sich aus umstehender schematischer Zeichnung (Fig. 6).

Unter der dem Rezipiententisch luftdicht aufsitzenden Glocke befinden sich zwei Kulturen (*AA*) und ein Gefäß mit einer abgemessenen wässerigen Lösung von Pyrogallol (*B*). Die Glocke ist oben mittels eines durchbohrten Gummistopfens verschlossen, durch den ein Glasrohr in die Pyrogallol-Lösung hinabführt. Dieses Glasrohr ist oberhalb der Glocke rechtwinklig umgebogen und durch ein Gummistück mit einem zweiten Glasrohr verbunden, das bis auf den Grund eines mit KOH-Lösung gefüllten Zylinders (*C*) eintaucht. Der Zylinder ist graduiert und enthält etwas mehr KOH-Lösung, als der Pyrogallol-Lösung in der Glocke entspricht. — Der Rezipiententisch ist einerseits mit der Wasserstrahlpumpe, andererseits mit zwei Halbliter-Erlenmeyerkolben verbunden, von denen der eine (*B*) wässrige Pyrogallol-Lösung, der andere (*C*) eine entsprechende Menge Kalilauge enthält. Die beiden Erlenmeyerkolben sind mit doppelt durchbohrten Korken verschlossen, durch die je eine lange und eine kurze Glasröhre führen. Die beiden langen Röhren sind durch einen Kautschukschlauch verbunden. Sämtliche Verschlüsse werden mit einem Gemisch von gelbem Wachs und Kolophonium zugegossen.

1) Harcourt and Lupton, Referat. Arch. d. Pharmacie, 3. Reihe, Bd. 11, S. 453. Original: The Chicago Pharmacist, 1876, Vol. IX, Nr. 6, S. 196.

2) Fresenius, Quantitative chem. Analyse II, S. 770 ff.

Nun schließt man den Hahn 2 des Rezipienten, sowie den Quetschhahn 3 und evakuiert mit der Pumpe durch den geöffneten Hahn 1 bis auf $\frac{1}{10}$ Atmosphäre (Manometer in die Pumpe eingeschaltet), um die in der Nährlösung und in den Kolben eingeschlossene Luft auszutreiben. Dann wird Hahn 1 geschlossen und Quetschhahn 3 geöffnet, wodurch natürlich die Kalilauge des Zylinders *C* in die Pyrogallollösung überfließt. Wenn soviel Lauge übergetreten ist, als der Pyrogallollösung unter der Glocke entspricht, wird Quetschhahn 3 geschlossen und Hahn 2 des Rezipiententisches ein wenig geöffnet. Der Luftdruck treibt nun die Kalilauge des Kolbens *C* langsam in den mit Pyrogallol beschickten Kolben *B* und sämtliche Luft, die in die Glocke eintritt, muß durch diese nun alkalische, d. h. absorptionsfähige Pyrogallol-Lösung streichen.

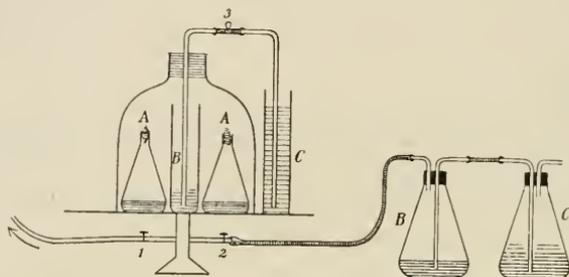


Fig. 6.

Dem angegebenen Versuch liegen folgende Berechnungen zugrunde: Nach Hempel¹⁾ ist der zulässige Absorptionswert²⁾ eines Gemisches von 5 g Pyrogallol in 15 ccm Wasser + 120 g KOH in 80 ccm Wasser = $2 - \frac{2}{4}$ Volumen, d. h. 1 ccm der obigen Pyrogallol-Lösung absorbiert $2 - \frac{2}{4}$ ccm Sauerstoff, bei Temperaturen von nicht unter 15° C.

Inhalt der Glocke 4500 ccm, darin 21 Vol.-% O = 945 ccm. Um diese zu absorbieren, sind 472,2 ccm der von Hempel angegebenen Mischung notwendig. Es werden verwendet: 50 ccm Pyrogallol-Lösung, worin 17 g Pyrogallol und 450 ccm 60 %-ige Kalilauge, zusammen also 500 ccm.

Die auf $\frac{1}{10}$ Atmosphäre evakuierte Glocke enthält 450 ccm Luft mit 94,5 ccm Sauerstoff. Zur Absorption sind also erforderlich 47,25 ccm des Pyrogallol-Gemisches. Es werden 95 ccm verwendet (15 ccm Pyrogallol + 80 ccm KOH). Der Rest wird auf die beiden Erlenmeyerkolben verteilt: *B* erhält 35 ccm Pyrogallol-Lösung, *C* 370 ccm Kalilauge.

An Stelle des absorbierten Sauerstoffes treten bei Atmosphärendruck natürlich 945 ccm Stickstoff, die in rund 1200 ccm Luft enthalten sind. Damit werden dem Pyrogallol weitere 252 ccm Sauerstoff zugeführt, also im ganzen $945 + 252 = 1197$ ccm. Unter Annahme des äußersten zulässigen Absorptionswertes von $\frac{2}{4}$ Vol. absorbieren die gebotenen 500 ccm Pyrogallol aber nur 1125 ccm N. Der Versuch ist also nicht einwandfrei und es läßt sich daraus mit Sicherheit nur auf sehr geringes Sauerstoff-

1) W. Hempel, Gasanalytische Methoden. 3. Aufl., 1900.

2) Zulässiger Absorptionswert = der vierte Teil des empirisch bestimmten Wertes.

bedürfnis, nicht aber auf vollständige Anaërobie schließen, trotzdem der Stickstoff in der Glocke etwas niedriger als Atmosphärendruck (ca 700 mm Hg) gehalten wurde und der empirisch gefundene Absorptionswert das Vierfache des den Berechnungen zugrunde gelegten theoretischen Wertes beträgt.

Derartige nichtdurchlüftete „anaërobe“ Kulturen wurden nur in geringer Zahl angelegt, da sich schon bei den ersten Versuchen herausstellte, wie unvergleichlich viel besser die Pilze bei Sauerstoffzutritt gedeihen. So bildete z. B. *Phoma radiceis Oxye.* in 8 Wochen bloß ca. 40—50 mg Trockensubstanz, während bei Luftzutritt das Trockengewicht 125 mg erreichte. *Phoma rad. Vacc.* wächst noch langsamer, vermag aber Pykniden zu bilden, was bei *Phoma rad. Oxye.* nicht der Fall ist. Die Stickstoffbindung in den „anaëroben“ Kulturen war eine äußerst geringe. Gärung trat niemals ein. Das gebotene CaCO_3 blieb unverändert.

C. Zusammenfassung.

Von den Wurzeln fünf verschiedener Ericaceen sind fünf Pyknidenpilze isoliert und in dieser Arbeit als vorläufige neue Arten unter folgenden Namen angeführt worden: *Phoma radiceis Oxycoeci*, *Ph. radiceis Andromedae*, *Ph. radiceis Vaccinii*, *Ph. radiceis Tetraticis*, *Ph. radiceis Ericae*.

Sämtliche fünf *Phoma*-Arten binden den atmosphärischen Stickstoff, jedoch in sehr verschiedenem Grade.

Die höchste Assimilationskraft besitzen *Phoma radiceis Vaccinii*, *Ph. radiceis Oxycoeci* und *Ph. radiceis Andromedae*.

Diese drei Arten arbeiten zwar weit weniger energisch, als die meisten stickstoffbindenden Bakterien, dafür aber viel ökonomischer: für 1 g verarbeiteter Dextrose werden 22, bzw. 18 und 11 mg Stickstoff fixiert. Von allen bekannten stickstoffbindenden Organismen liefern sie also den höchsten relativen Stickstoff-Gewinn.

Aspergillus niger und *Penicillium glaucum* sind ebenfalls zur Assimilation des freien Stickstoffes befähigt, jedoch nur in sehr geringem Grade. Sie stehen ungefähr auf gleicher Stufe mit den beiden übrigen *Phoma*-Arten: *Ph. radiceis Tetraticis* und *Ph. radiceis Ericae*.

Keiner der untersuchten Pilze bedarf zu seiner Entwicklung des gebundenen Stickstoffes.

V. Analytische Belege.

1. Die chemischen Methoden.

Wie aus dem vorhergehenden Abschnitt ersichtlich ist, sind die von den untersuchten Pilzen gebundenen Stickstoff-Mengen meist verschwindend klein im Vergleich zu dem durch Bakterientätigkeit erzielten Gewinn.

Es fragt sich nun, ob wir imstande sind, mittels der Kjeldahl'schen Methode so geringe Stickstoffmengen mit genügender Sicherheit nachzuweisen. Die Ansichten gehen in dieser Beziehung bekanntlich weit auseinander.

Da aber von dieser Frage alles abhängt, habe ich die Methode der Stickstoffbestimmung nach verschiedenen Richtungen hin auf ihre Genauigkeit geprüft und schicke den zu den Tabellen gehörigen analytischen Belegen eine Besprechung des angewendeten Verfahrens und der in Betracht kommenden Fehlerquellen voraus.

Die Stickstoffbestimmungen wurden ausnahmslos nach der in Hoppe-Seilers Phys. Chemie¹⁾ angegebenen Modifikation der Kjeldahl'schen Methode ausgeführt. Der Verbrennung der organischen Substanz ging auf offener Flamme im Kjeldahlkolben vor sich, unter Zusatz von 20 ccm (30 ccm) H_2SO_4 konz., 1 g CuSO_4 und 7—10 g K_2SO_4 . Flüssigkeiten wurden vor Zusatz der Salze mit 20 ccm H_2SO_4 konz. eingeengt. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit mit NH_3 -freiem Wasser auf ca. 200 ccm gebracht und quantitativ in den kupfernen Destillationskolben übergeführt, dann ein Stückchen reines Zink zugesetzt, mit 80—100 ccm 40%-iger NaOH alkalisch gemacht und in die mit $\frac{1}{10}$ Normal-Schwefelsäure beschickte Vorlage überdestilliert. Für jede Analyse wurde der in den Reagenzien enthaltene Stickstoff durch einen blinden Versuch ermittelt und in Abzug gebracht. Bei dieser Methode sind folgende Fehlerquellen denkbar:

1. Unvollständiges Überführen des Stickstoffes der organischen Substanz in NH_3 .
2. Absorption von NH_3 aus der Luft durch die Schwefelsäure und das destillierte Wasser.
3. Unvollständiges Überdestillieren des NH_3 .

1) Hoppe-Seilers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 7 Aufl., Berlin 1903.

4. Ungenaue Bestimmung des Titers der $\frac{1}{10}$ Normallösungen.
5. Fehler der Büretten.
6. Unscharfer Farbumschlag des Indikators.

Die erste Fehlerquelle kommt für die vorliegende Untersuchung kaum in Betracht, da der Stickstoff der Eiweißkörper sich leicht in NH_3 überführen läßt¹⁾. Vorsichtshalber wurde aber nach beendigter Verbrennung und vollständiger Klärung die Flüssigkeit stets noch $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde im Sieden erhalten.

Der Absorption von NH_3 durch die Schwefelsäure konnte nicht ganz vorgebeugt werden, trotzdem die H_2SO_4 , in der üblichen Säureflasche verschlossen, unter einer Glocke aufbewahrt wurde, die eine offene Schale mit Schwefelsäure enthielt. Der unvermeidliche Fehler wurde aber jeweilen durch einen blinden Versuch ermittelt und in Abzug gebracht.

Das destillierte Wasser wurde in Flaschen aufbewahrt, die mit eingeschliffenen Glasstöpseln verschlossen waren. Trotzdem ließ sich nach ein paar Tagen regelmäßig ein geringer NH_3 -Gehalt nachweisen, der aber nach längerem Auskochen des Wassers wieder verschwand.

Die nachfolgenden Versuche mögen als Belege dienen:

a) Zu 100 ccm unausgekohtem dest. Wasser, 2—4 Tage in verschlossener Flasche aufbewahrt, werden 15 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{H}_2\text{SO}_4$ gegeben; zurücktitriert mit 14,9 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{NaOH}$

$$0,1 \cdot 1,404 = 0,1404 \text{ mg N.}$$

100 ccm unausgekohten dest. Wassers enthalten also 0,1404 mg N, aus absorbiertem NH_3 stammend.

b) Zu 50 ccm ausgekohtem, in verschlossenem Gefäß erkaltetem Wasser (aus der gleichen Flasche, wie in Versuch a) werden 10 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{H}_2\text{SO}_4$ zugesetzt; zurücktitriert mit 10 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{NaOH}$.

Das ausgekochte Wasser ist also NH_3 -frei.

c) Zu 150 ccm frisch dest. Wasser (1^h in verschlossener Flasche aufbewahrt) werden 20 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{H}_2\text{SO}_4$ zugesetzt; zurücktitriert mit 20 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{NaOH}$.

Das frisch destillierte Wasser ist also NH_3 -frei.

Bei den Analysen wurde deshalb stets mit der Möglichkeit einer NH_3 -Absorption gerechnet, indem nur ganz frisch destilliertes Wasser zur Verwendung kam und die ersten Partien des Destillates verworfen wurden. In den relativ seltenen Fällen, wo ganz frisches

1) Fresenius, Quantitative chem. Analysen. 1901, 6. Aufl., Bd. II, S. 728 f.

Wasser nicht zur Hand war, erfolgte vor Gebrauch Austreibung des etwa vorhandenen NH_3 durch längeres Auskochen.

Dem unvollständigen Überdestillieren des NH_3 wurde durch starke Übersättigung mit Lauge und durch langes Destillieren vorgebeugt. Es wurden jeweilen mindestens $\frac{2}{3}$ der im Kupferkolben enthaltenen Flüssigkeit übergetrieben¹⁾. Das Destillat erkaltete, hermetisch verschlossen, unter einer Glocke, die eine Schale mit Schwefelsäure enthielt.

Ganz besondere Sorgfalt wurde auf die Herstellung der titrierten Flüssigkeiten verwendet. Titriert wurde anfänglich mit $\frac{1}{4}$, später ausnahmslos mit $\frac{1}{10}$ -Normallösungen. Schwefelsäure und Natronlauge wurden als $\frac{1}{1}$ normal von Kahlbaum bezogen, mit NH_3 -freiem Wasser auf das 10fache Volumen gebracht, der Titer der Schwefelsäure mit Na_2CO_3 ²⁾ in üblicher Weise nachgeprüft und event. korrigiert. Der Fehler betrug in der Regel 1—2 und nie mehr als 3—4 mg pro 1000 ccm, durfte also vernachlässigt werden. 1 ccm $\frac{\text{N}}{10} \text{H}_2\text{SO}_4$ entspricht = 1,404 mg Stickstoff. Die $\frac{\text{N}}{10}$ Natronlauge wurde mit der $\frac{\text{N}}{10}$ Schwefelsäure in genaueste Übereinstimmung gebracht.

Zum Titrieren verwendete ich geeichte Geißlersche Normalbüretten, die Ringgradierung und eine das Ablesen erleichternde Vorrichtung trugen. Vor Gebrauch wurden die Büretten natürlich mit einem Gemisch von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$ konz. sorgfältig gereinigt.

Als Indikator diente eine sehr verdünnte Lösung (1‰) von Methylorange, das die angenehme Eigenschaft hat, auf CO_2 nicht zu reagieren. Leider ist aber der Farbenumschlag, namentlich in Rot, kein scharfer, sodaß es zur exakten Titration einiger Übung bedarf.

Deshalb stellte ich jedesmal vor dem Titrieren 2 Farbenmuster her: NH_3 -freies destilliertes Wasser wurde mit einem, seiner Menge entsprechenden, Indikatorzusatz und 1—2 Tropfen $\frac{1}{10}$ Normalsäure resp. Lauge versehen und während des Titrierens in einem bis zum Verschuß gefüllten Kolben aufbewahrt.

Der Analyse der Pilzkulturen voraus gingen eine Anzahl Analysen mit Asparagin, von denen 2 als Beispiel angeführt werden mögen.

1) Fresenius, a. a. O., II, S. 730.

2) Vor Gebrauch jedesmal bei dunkler Rotglut im Pt-Tiegel erhitzt.

a) 0,6224 g Asparagin krist. enthalten nach Berechnung 116,463 mg N = 18,710%. Gefunden wurden nach der Kjeldahl'schen Methode 18,441%. Fehler — 0,269%.

b) 0,7191 g Asparagin krist. ergaben nach der Kjeldahl'schen Methode 18,450% N. Fehler — 0,26%.

Die Analysen stimmten unter sich gut überein, ergaben aber zu niedrige Resultate, was z. T. daher rühren mag, daß das Asparagin vor dem Abwägen nur im Exsikkator getrocknet wurde, also möglicherweise noch Luftfeuchtigkeit enthielt. Immerhin war das Resultat ein befriedigendes, zumal mittels der angewendeten Methode eher zu wenig als zuviel Stickstoff gefunden wurde.

Nun hat Asparagin aber einen ziemlich hohen Stickstoffgehalt und überdies waren viel ansehnlichere Quantitäten verwendet worden, als Kjeldahl empfiehlt¹⁾. Die ersten probeweisen Analysen der Pilzkulturen dagegen ergaben außerordentlich geringe Mengen von Stickstoff. Um festzustellen, ob auch diese sich mittels der Kjeldahl'schen Methode noch nachweisen lassen, wurde folgender Versuch gemacht: 0,0600 g Asparagin wurden mit der chem. Wage abgewogen und mit NH₃-freiem Wasser zu 200 ccm gelöst. Diese 0,03%-ige Lösung wurde hierauf in 6 Analysen untersucht, wie folgt:

- | | | |
|----|---|--|
| 1. | { | 1 a. 50 ccm Asparaginlösung mit 15 mg Asparagin = 2,8065 mg N |
| | | 1 b. 50 " " " 15 " " = 2,8065 " " |
| 2. | { | 2 a. 10 ccm Asparaginlösung mit 3 mg Asparagin = 0,5613 mg N |
| | | 2 b. 10 " " " 3 " " = 0,5613 " " |
| 3. | { | 3 a. 5 ccm Asparaginlösung mit 1,5 mg Asparagin = 0,28065 mg N |
| | | 3 b. 5 " " " 1,5 " " = 0,28065 " " |
| 4. | { | 4 a. Blinder Versuch mit den Reagenzien |
| | | 4 b. " " " " " |

Die Flüssigkeiten der Versuchsreihe a waren mittels Meßkolben (50 ccm) und Pipetten, die der Versuchsreihe b mit der Bürette abgemessen worden.

1 a. 50 ccm $\frac{N}{10}$ H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 47,3 ccm $\frac{N}{10}$ NaOH = 2,7 ccm gebund.

1 b. 50 " " " " " 47,2 " " = 2,8 " "

1. Mittel aus 2 Versuchen: 2,75 ccm gebunden.

2 a. 50 ccm $\frac{N}{10}$ H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,9 ccm $\frac{N}{10}$ NaOH = 1,1 ccm gebund.

2 b. 50 " " " " " 48,77 " " = 1,23 " "

2. Mittel aus 2 Versuchen: 1,165 ccm gebunden.

3 a. 50 ccm $\frac{N}{10}$ H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,05 ccm $\frac{N}{10}$ NaOH = 0,95 ccm gebund.

3 b. 50 " " " " " 49,1 " " = 0,9 " "

3. Mittel aus 2 Versuchen: 0,925 ccm gebunden.

1) Fresenius, II, a. a. O.

- 4 a. 50 ccm $\frac{N}{10}$ H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,35 ccm $\frac{N}{10}$ NaOH = 0,65 ccm gebund.
 4 b. 50 " " " " " " 49,2 " " = 0,8 " " ¹⁾
 4. Mittel aus 2 Versuchen: 0,725 ccm gebunden.

1. 2,75 — 0,725 ccm = 2,025 ccm:
 2,025 · 1,404 = 2,8431 mg N statt 2,8065 mg. Fehler + 0,0366 mg.
2. 1,165 — 0,725 ccm = 0,440 ccm:
 0,44 · 1,404 = 0,6177 mg N statt 0,5613 mg. Fehler + 0,0564 mg.
3. 0,925 — 0,725 ccm = 0,2 ccm:
 0,2 · 1,404 = 0,2808 mg N statt 0,28065 mg. Fehler + 0,00015 mg.

Aus diesen Versuchen folgt, daß sich mit der Kjeldahlschen Methode auch sehr kleine Mengen von Stickstoff mit annähernder Richtigkeit bestimmen lassen. Daß aber in diesem Fall peinlich genau gearbeitet werden muß, ist wohl selbstverständlich, da schon das kleinste Versehen relativ sehr große Fehler im Gefolge hat. Absolut sind die Fehler stets kleiner, als 0,1 mg.

Eine wichtige Rolle bei den Analysen spielt der blinde Versuch, der als Korrektiv für die stattgehabte NH₃-Absorption in Abrechnung gebracht werden muß.

Nun fragt es sich aber, ob das jeweilige Ergebnis des blinden Versuches ohne weiteres als fest angenommen werden darf, oder ob Schwankungen stattfinden und innerhalb welcher Grenzen sie sich bewegen.

Diese Frage sollten vier parallele Versuche mit den Reagentien entscheiden.

20 ccm H₂SO₄ konz., 1 g CuSO₄, 7 g K₂SO₄ wurden wie üblich im Kjeldahlkolben erhitzt, nach dem Erkalten auf 200 ccm gebracht, quantitativ in den Kupferkolben übergeführt, ein Stückchen Zink zugesetzt, die Flüssigkeit mit 80 ccm 40%-iger NaOH alkalisch gemacht und destilliert. Die Ergebnisse waren folgende:

1. 50 ccm $\frac{N}{10}$ H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,35 ccm $\frac{N}{10}$ NaOH
2. 50 " " " " " " 49,35 " "
3. 50 " " " " " " 49,35 " "
4. 50 " " " " " " 49,38 " "

In drei von den vier Fällen stimmten also die Resultate ganz überein, im vierten betrug die Abweichung 0,03 ccm der $\frac{1}{10}$ Normallösung.

Die Ergebnisse der blinden Versuche dürfen also unbedenklich verwertet werden.

1) Eine so große Differenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden blinden Versuchen war sonst nie zu beobachten (vgl. diese Seite, weiter unten).

Auf Grund der angestellten Versuche glaube ich mich zu dem Schlusse berechtigt, daß sich die Kjeldahlsche Methode bei gewissenhafter Ausführung sehr wohl zur Bestimmung geringer Stickstoffmengen eignet, daß aber die gefundenen Zahlen nur Näherungswerte sind.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Zahlen möchte ich nur in diesem Sinne aufgefaßt wissen.

Nach dieser eingehenden Erörterung der chemischen Methode wollen wir uns nun der Analyse der Pilzkulturen zuwenden.

Die in N-freien Nährlösungen gezogenen Kulturen wurden in der Regel nach 4 Wochen abgekoppelt, auf ihre Reinheit untersucht, dann mit ausgekochtem, siedendem Wasser übergossen und alle Kolben, bis auf den gerade zu untersuchenden, im Autoklav bei 120° sterilisiert. Nach dem Erkalten wurden die Kolben mit gleichzeitig sterilisierten Korkpfropfen verschlossen, mit dem schon erwähnten Gemisch von Wachs und Kolophonium zugeworfen und unter einer großen Glocke neben einer Schale voll H_2SO_4 aufbewahrt.

Aus der zu untersuchenden Kultur wurde die durch heißes Wasser verdünnte Nährlösung in einen wie üblich vorbereiteten Kolben abgegossen, das Mycel wiederholt mit heißem dest. Wasser gewaschen und dekantiert. Allfällig mitgerissene Mycelflöckchen wurden ruhig in der abdekantierten Flüssigkeit belassen. Wenn etwa 200–400 ccm (je nach dem Dextrosegehalt der Nährlösung) abgegossen waren, wurde das Mycel auf ein aschenfreies Filter gebracht, das zuvor bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden war. Dann wurde mit der Pumpe abgesogen und noch mit ca. 100 ccm dest. Wasser nachgewaschen. Während des Filtrierens wurde der Trichter mit einem Uhrglas bedeckt. Das Filtrat wurde der abdekantierten Flüssigkeit in der Regel beigemischt und das Ganze auf ein bestimmtes Volumen ergänzt. Der Erlenmeyerkolben war zu diesem Zweck vor Gebrauch graduiert worden.

Auf diese Weise erhielt ich einerseits die Hauptmasse des Mycels auf dem Filter, anderseits eine Art Filtrat, in dem aber kleine Mycelflöckchen nebst unzähligen Pyknosporen suspendiert waren.

Wenn das Filtrat nicht sofort untersucht werden konnte, wurde es in der oben angegebenen Weise sterilisiert, verschlossen und aufbewahrt. Auf diese Weise wurde sowohl der Absorption von

NH₃ aus der Luft, als auch der Verunreinigung durch Bakterien vorgebeugt¹⁾.

Das auf dem Filter aufgefangene Mycel wurde bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und sein Gewicht bestimmt. Daß aber die erhaltene Zahl nur einen Näherungswert darstellt, ist einleuchtend, angesichts der Methode, die zur Trennung von Nährlösung und Mycel angewendet wurde. Die kleinen Mycelflöckchen, die beim Abdekantieren mitgerissen wurden, und die Sporen, die das Filter passierten, verminderten das Trockengewicht. Andererseits ließen sich die in der Nährlösung entstandenen Niederschläge (Anwesenheit von Fe, Ca und Mg neben P₂O₅), sowie das gebotene CaCO₃ (MgCO₃) mit Wasser natürlich nicht wegschaffen²⁾.

Ein allfälliger Stickstoffgehalt des aschenfreien Filters, das mit dem Mycel analysiert wurde, ließ sich durch die Kjeldahlsche Methode nicht feststellen (vgl. Analyse 2).

Die Untersuchung der abdekantierten Nährlösung war sehr mühsam und zeitraubend, da der hohe Dextrosegehalt (5—10%) durch das Wachstum der Pilze nur ganz wenig vermindert worden war (S. 388). Die Nährlösungen überschäumten daher leicht und die Verbrennung beanspruchte viele Stunden. Deshalb wurde je-weilen nur in einem kleinen Bruchteil der Nährlösung der Stickstoffgehalt ermittelt und daraus der Gesamtgehalt berechnet, ein Verfahren, das nach meinen Untersuchungen über die Genauigkeit der Kjeldahlschen Methode durchaus zulässig ist.

Um das Verhältnis zwischen verarbeitetem Zucker und assimiliertem Stickstoff feststellen zu können, wie dies Winogradsky³⁾ für *Clostrid. Pastorianum*, Gerlach und Vogel⁴⁾ für *Azotobacter chroococcum*, Mazé⁵⁾ für *Bacillus radicolica* getan haben, wurde die vom Mycel abfiltrierte Nährlösung auf ihren Zuckergehalt ge-

1) Die Mycelien erschweren ihrer gallertigen Beschaffenheit wegen das Filtrieren ungemein; man kann einen ganzen Tag filtrieren, und doch noch Zucker im Rückstand finden. Daß dies der Fall ist, zeigt sich aber erst beim Trocknen (d. h., wenn es zu spät ist) durch das Braunwerden des Filters. Durch das Dekantieren mit heißem Wasser hingegen bringt man die Dextrose verhältnismäßig leicht und in kurzer Zeit weg. Natürlich ist auch die Gefahr der NH₃-Absorption bei stundenlangem Filtrieren größer, als wenn der ganze Prozeß bloß $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Stunde beansprucht.

2) Auswaschen mit verdünnten Säuren ist nach meiner Erfahrung der NH₃-Absorption wegen nicht zulässig.

3) Winogradsky, Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. 9, S. 43 ff.

4) Gerlach und Vogel, Centralbl. f. Bakt. 1902, II. Abt., Bd. 9.

5) Mazé, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1897, Bd. 11, 1898, Bd. 12.

prüft. Zu diesem Zweck wurden dem Filtrat 25 ccm entnommen, mit Bleiessig geklärt, Pb, Fe, Mg und Ca durch Na_2CO_3 ausgefällt und das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen ergänzt. Wo nicht viel ungelöste organische Substanz in der Nährlösung enthalten oder diese stark verdünnt war, wurde zuweilen auch nur durch ein doppeltes Filter filtriert. Je 25 ccm der so vorbereiteten Nährlösung wurden nach der gewichtsanalytischen Methode von Allihn¹⁾, meistens nach der Kehlhoferschen²⁾ Modifikation untersucht und aus dem Ergebnis der Dextrosegehalt der gesamten abfiltrierten Nährlösung berechnet. Bei Parallelkulturen mit verschiedenem Dextrosegehalt wurden die Nährlösungen derart verdünnt, daß alle prozentualiter annähernd gleichviel Zucker und stets weniger als 1% enthielten. Natürlich erheben aber auch die Dextrosebestimmungen keinen Anspruch auf absolute Genauigkeit, da die zu den Nährlösungen verwendeten Substanzen nur mit der Handwage abgewogen wurden. Zudem nimmt die Dextrose ziemlich viel Feuchtigkeit aus der Luft auf³⁾, wird also, je nach der Beschaffenheit der Luft, größeren oder geringeren Wassergehalt besitzen.

Über den Grad von Genauigkeit, den die angeführten Dextrosebestimmungen beanspruchen dürfen, geben die folgenden Versuche Aufschluß:

1. Allihnsche Methode⁴⁾.

0,5622 g luftfeuchte Dextrose zu 100 ccm gelöst. 25 ccm fällen 306,5 mg Cu_2O = 272,16 mg Cu = 141,1 mg Dextrose. 100 ccm enthalten also 564,4 mg statt 562,2 mg. Fehler = + 2,2 mg = 0,4%.

2. Kehlhofersche Modifikation⁴⁾.

25 ccm einer Dextroselösung fällen 104,8 mg Cu_2O . Daraus berechnet: 93,0 mg Cu = 47,4 mg Dextrose. Nach Reduktion und Erkalten im H-Strom gewogen = 92,8 mg Cu = 47,4 mg Dextrose.

2. Zahlenbelege.

Bemerkungen. Um einer unnötigen Verschwendung der titrierten Flüssigkeiten vorzubeugen, wurden zu dem vorgelegten Volumen von $\frac{1}{10}$ Normalsäure stets noch 50 bis 100 ccm (je nach größerem oder geringerem Quantum der Säure) NH_3 -freies dest.

1) Fresenius, a. a. O., II, S. 595.

2) G. Ambühl, Zur gewichtsanal. Zuckerbestimmung nach Fehling-Allihn. Chemiker-Zeitung, 1897, Nr. 16.

3) Luftfeuchte Dextrose = 1,9730 g, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet = 1,8331 g. Wasserverlust = 0,1399 g = 7% der luftfeuchten Dextrose.

4) Cu_2O -Ausfällung sehr gut auswaschen!

Wasser zugesetzt. — Der verschiedene N-Gehalt der blinden Versuche rührt z. T. daher, daß die konz. Schwefelsäure von verschiedenen Bezugsquellen stammt, z. T. aber daher, daß (in Übereinstimmung mit den Analysen) bald 20, bald 30 ccm H_2SO_4 zur Verbrennung im Kjeldahl-Kolben verwendet wurden. Sämtliche Zahlen, auch die Titerwerte, wurden vor der Drucklegung nochmals nachgerechnet.

1. Analyse der Nährstoffe. 4,5 g Dextrose, 0,15 g KH_2PO_4 , 0,03 g $MgSO_4$, 1,5 g $CaCO_3$, (NaCl + $FeSO_4$) Spuren.

20 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 19,8 ccm $N/_{10} NaOH$.

$$0,2 \cdot 1,404 = 0,2808 \text{ mg N}$$

$$\text{Blinder Vers.} = 0,2808 \text{ „ „}$$

$$\text{Nährstoffe} = 0,0000 \text{ mg N.}$$

2. Analyse der aschenfreien Filter.

20 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 19,8 ccm $N/_{10} NaOH$.

$$0,2 \cdot 1,404 = 0,2808 \text{ mg N}$$

$$\text{Blinder Vers.} = 0,2808 \text{ „ „}$$

$$\text{Filter} = 0,0000 \text{ mg N.}$$

3. Mycel = 106,3 mg, 10 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 9,1 ccm $N/_{10} NaOH$.

$$0,9 \cdot 1,404 = 1,2636 \text{ mg N}$$

$$\text{Blinder Vers.} = 0,5616 \text{ „ „}$$

$$\text{Mycel} = 0,7010 \text{ mg N.}$$

Nährlösung¹⁾: 35 ccm der auf 350 ccm gebrachten Flüssigkeit untersucht. 10 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 9,35 ccm $N/_{10} NaOH$. 35 ccm = $0,65 \cdot 1,404 = 0,9126$ mg N — $0,5616 = 0,3510$ mg N, 350 ccm = $3,5100$ mg N.

Dextrose. 50 ccm des auf 350 ccm gebrachten Filtrates werden auf 150 ccm ergänzt. 25 ccm davon fällen 175,8 mg Cu = 90 mg Dextrose. Filtrat = $7 \cdot 6 \cdot 90 = 3780$ mg Dextrose. Verarbeitet: $5000 - 3780$ mg = 1220 mg.

4. 10 ccm der auf 125 ccm gebrachten Flüssigkeit untersucht. 10 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 9,55 ccm $N/_{10} NaOH$. $0,45 \cdot 1,404 = 0,6318$ mg N — $0,5616 = 0,0702$ mg N²⁾. $12,5 \cdot 0,0702 = 0,8775$ mg N.

5. Mycel = 37,2 mg. 16 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 15,1 ccm. $0,9 \cdot 1,404 = 1,2636$ mg N — $0,7020 = 0,5616$ mg = $1,45\%$.

Nährlösung. 10 ccm der auf 150 ccm gebrachten Flüssigkeit untersucht. 12 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 11,5 ccm $N/_{10} NaOH$. $0,5 \cdot 1,404 = 0,7020$ mg N — $0,7722$ mg = 0. Nährlösung N-frei.

6. 10 ccm der unverdünnten Nährlösung (50 ccm) untersucht. 12 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 11,5 ccm $N/_{10} NaOH$. $0,5 \cdot 1,404 = 0,7020$ mg N — $0,7722 = 0$. Nährlösung N-frei.

7. Mycel = 75 mg. 20 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 18,9 ccm $N/_{10} NaOH$. $1,1 \cdot 1,404 = 1,5444 - 0,8420 = 0,7024$ mg N = $0,94\%$.

Nährlösung auf 300 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 20 ccm $N/_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 19,3 ccm. $0,7 \cdot 1,404 = 0,9828$ mg N — $0,7020 = 0,2808$ mg. 300 ccm = $12 \cdot 0,2808 = 3,3696$ mg N.

1) Um Platz zu sparen, wird der blinde Versuch ohne besondere Nennung einfach in Abzug gebracht.

2) Fällt eigentlich in die Fehlergrenze (vgl. S. 400).

Dextrose. $\frac{1}{12}$ (25 ccm) der auf 300 ccm gebrachten Nährlösung zu 100 ccm ergänzt, davon fallen 25 ccm = 124 mg Cu = 63,1 mg Dextrose. Filtrat = $4 \cdot 12 \cdot 63,1 = 3028,8$ mg Dextrose. Verarbeitet: $5000 - 3028,8 = 1971,2$ mg Dextrose.

8. 25 ccm der auf 125 ccm gebrachten Nährlösung untersucht. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,3 ccm N_{10} NaOH. $0,7 \cdot 1,404 = 0,9828 - 1,0530 = 0$. Nährlösung N-frei.

9. Mycel = 17,4 mg. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitr. mit 48,95 ccm N_{10} NaOH. $1,05 \cdot 1,404 = 1,4742$ mg N - $1,0530 = 0,4212$ mg N = 2,42 %.

Nährlösung auf 200 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,3 ccm N_{10} NaOH. $0,7 \cdot 1,404 = 0,9828 - 1,0530 = 0$. Nährlösung N-frei.

Dextrose. Von der auf 200 ccm gebrachten Nährlösung werden 50 ccm auf 100 ccm ergänzt; 25 ccm davon fallen 230,51 mg Cu = 119 mg Dextrose. Filtrat = $4 \cdot 4 \cdot 119 = 1904$ mg Dextrose. Verarbeitet: $2500 - 1904 = 596$ mg Dextrose.

10. Mycel = 7,5 mg. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,1 ccm. $0,9 \cdot 1,404 = 1,2636$ mg N - $1,0530 = 0,2106$ mg N = 2,80 %.

Nährlösung auf 250 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,3 ccm. $0,7 \cdot 1,404 = 0,9828$ mg N - $1,0530 = 0$. Nährlösung N-frei.

Dextrose. Von der auf 250 ccm gebrachten Nährlösung fallen 25 ccm = 401,76 mg Cu = 214,1 mg Dextrose. Nährlösung = 2141 mg Dextrose. Verarbeitet: $2500 - 2141 = 359$ mg Dextrose.

11. Mycel = 48,8 mg. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitr. mit 48,55 ccm N_{10} NaOH. $1,45 \cdot 1,404 = 2,0358$ mg N - $0,9828 = 1,0530$ mg N = 2,15 %.

Nährlösung auf 400 ccm gebracht, davon 100 ccm untersucht. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,15 ccm N_{10} NaOH. $0,85 \cdot 1,404 = 1,1934$ mg N - $0,9828 = 0,2106$ mg N. 400 ccm = $4 \cdot 0,2106 = 0,8424$ mg N.

Dextrose. 25 ccm der auf 400 ccm gebrachten Nährlösung zu 100 ccm ergänzt; 25 ccm davon fallen 180,32 mg Cu = 92,1 mg Dextrose. Nährlösung = $4 \cdot 16 \cdot 92,1 = 5894,4$ mg Dextrose. Verarbeitet: $7000 - 5894,4 = 1105,6$ mg Dextrose.

12. Mycel = 28,3 mg. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,3 ccm N_{10} NaOH. $1,7 \cdot 1,404 = 2,3868$ mg N - $0,9828 = 1,4040$ mg N = 4,96 %.

Nährlösung auf 400 ccm gebracht, davon 100 ccm untersucht. 50 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitr. mit 49 ccm. $1 \cdot 1,404 = 1,4040$ mg N - $1,0530 = 0,3510$ mg N. 400 ccm = $1,4040$ mg N.

Dextrose. 25 ccm der auf 400 ccm gebrachten Nährlösung zu 100 ccm ergänzt; 25 ccm davon fallen 191,2 mg Cu = 97,8 mg Dextrose. Nährlösung = $4 \cdot 16 \cdot 97,8 = 6259,2$ mg Dextrose. Verarbeitet: $7000 - 6259,2 = 740,8$ mg Dextrose.

13. Mycel = 87,2 mg. 27 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 25,05 ccm. $1,95 \cdot 1404 = 2,7378$ mg N - $1,4742 = 1,2636$ mg N = 1,2636 mg N = 1,45 %.

Nährlösung auf 400 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 40 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 38,1 ccm. $1,9 \cdot 1,404 = 2,6676$ mg N - $1,7550 = 0,9126$ mg N. 400 ccm = $16 \cdot 0,9126 = 14,6016$ mg N.

Dextrose. Von der auf 400 ccm gebrachten Nährlösung 50 ccm auf 100 ccm ergänzt; 25 ccm davon fallen 364 mg Cu = 192,3 mg Dextrose. Nährlösung = $4 \cdot 8 \cdot 192,3 = 6153,6$ mg Dextrose. Verarbeitet: $7000 - 6153,6 = 846,4$ mg Dextrose.

14. Mycel = 41,3 mg. 25 ccm N_{10} H₂SO₄ vorgelegt, zurücktitriert mit 23,25 ccm N_{10} NaOH. $1,75 \cdot 1,404 = 2,4570$ mg N - $1,4742 = 0,9828$ mg N = 2,38 %.

- Nährlösung auf 350 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 30 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 28,4 ccm $N_{10} NaOH$. $1,6 \cdot 1,404 = 2,2464$ mg N — $1,7550 = 0,4914$ mg N. 350 ccm = $14 \cdot 0,4914 = 6,8796$ mg N.
- Dextrose. Von der auf 350 ccm gebrachten Nährlösung 50 ccm auf 125 ccm ergänzt; 25 ccm davon fallen 344 mg Cu = 180,9 mg Dextrose. Nährlösung = $5 \cdot 7 \cdot 180,9 = 6331,5$ mg Dextrose. Verarbeitet: 7000 — 6331,5 = 668,5 mg Dextrose.
15. Mycel = 21,6 mg. 25 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 23,6 ccm. $1,4 \cdot 1,404 = 1,9656$ mg N — $1,4742 = 0,4914$ mg N = 2,27%.
- Nährlösung auf 350 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 30 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 27,95 ccm $N_{10} NaOH$. $2,05 \cdot 1,404 = 2,8782$ mg N — $1,7550 = 1,1232$ mg N. 350 ccm = $14 \cdot 1,1232 = 15,7248$ mg N.
- Dextrose. Von der auf 350 ccm gebrachten Nährlösung 50 ccm auf 125 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 342 mg Cu = 179,8 mg Dextrose. Nährlösung = $5 \cdot 7 \cdot 179,8 = 6293$ mg Dextrose. Verarbeitet: 7000 — 6293 = 707 mg Dextrose.
16. Mycel = 177,2 mg. 25 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 23,45 ccm $N_{10} NaOH$. $1,55 \cdot 1,404 = 2,1762$ mg N — $1,4742 = 0,7020$ mg N = 0,4%.
- Nährlösung auf 450 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 25 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 23,6 ccm $N_{10} NaOH$. $1,4 \cdot 1,404 = 1,9656$ mg N — $1,7550 = 0,2106$ mg N. 450 ccm = $18 \cdot 0,2106 = 3,7908$ mg N.
- Dextrose. Von der auf 450 ccm gebrachten Nährlösung 50 ccm auf 100 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 317,56 mg Cu = 166,4 mg Dextrose. Nährlösung = $4 \cdot 9 \cdot 166,4 = 5990,4$ mg Dextrose. Verarbeitet: 7000 — 5990,4 = 1009,6 mg Dextrose.
17. Mycel = 324,6 mg. 25 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 23 ccm $N_{10} NaOH$. $2 \cdot 1,404 = 2,808$ mg N — $1,4742 = 1,3338$ mg N = 0,41%.
- Nährlösung auf 550 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 25 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 23,7 ccm $N_{10} NaOH$. $1,3 \cdot 1,404 = 1,8252$ mg N — $1,7550 = 0,0702$ mg N¹⁾. 550 ccm = $22 \cdot 0,0702 = 1,5444$ mg N.
- Dextrose. Von der auf 550 ccm gebrachten Nährlösung 50 ccm auf 125 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 210,34 mg Cu = 107,9 mg Dextrose. Nährlösung = $5 \cdot 11 \cdot 107,9 = 5934,5$ mg Dextrose. Verarbeitet: 1065,5 mg Dextrose.
18. 25 ccm der auf 200 ccm gebrachten Nährlösung untersucht. 26 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 24,9 ccm $N_{10} NaOH$. $1,1 \cdot 1,404 = 1,5444$ mg N — $1,4742 = 0,0702$ mg N¹⁾. 200 ccm = 0,5616 mg N.
19. 25 ccm der auf 150 ccm gebrachten Nährlösung untersucht. 20 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 19,25 ccm $N_{10} NaOH$. $0,75 \cdot 1,404 = 1,0530$ mg N — $0,7722 = 0,2808$ mg N. 150 ccm = 1,6848 mg N.
20. Mycel = 30 mg. 20 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 19,2 ccm $N_{10} NaOH$. $0,8 \cdot 1,404 = 1,1232$ mg N — $0,7722 = 0,3510$ mg N = 1,17%.
- Nährlösung auf 300 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 25 ccm $N_{10} H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 24,15 ccm $N_{10} NaOH$. $0,85 \cdot 1,404 = 1,1934$ mg N — $0,7722 = 0,4212$ mg N. 300 ccm = 5,0544 mg N.
- Dextrose. Von der auf 300 ccm gebrachten Nährlösung fallen 25 ccm = 291 mg Cu = 151,6 mg Dextrose. Nährlösung = $12 \cdot 151,6 = 1819,2$ mg Dextrose. Verarbeitet: 2000 — 1819,2 = 180,8 mg Dextrose.

1) S. Anm. 1, S. 404.

21. Mycel = 74,2 mg. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,45 ccm $N_{10}NaOH$. $1,55 \cdot 1,404 = 2,1762$ mg N — 0,7020 = 1,4742 mg N = 1,99%.
Nährlösung auf 550 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 20 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 19,05 ccm $N_{10}NaOH$. $0,95 \cdot 1,404 = 1,3338$ mg N — 0,7020 = 0,6318 mg N. 550 ccm = $22 \cdot 0,6318 = 13,8996$ mg N.
Dextrose. Von der auf 550 ccm gebrachten Nährlösung werden 50 ccm auf 150 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 211 mg Cu = 108,4 mg Dextrose. Nährlösung = $6 \cdot 11 \cdot 108,4 = 7154,4$ mg Dextrose. Verarbeitet: 8000 — 7154,4 = 845,6 mg Dextrose.
22. Mycel = 79 mg. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 47,85 ccm $N_{10}NaOH$. $2,15 \cdot 1,404 = 3,0186$ mg N — 1,1232 = 1,8954 mg N = 2,4%.
Nährlösung auf 400 ccm gebracht, davon 25 ccm untersucht. 25 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 24,13 ccm $N_{10}NaOH$. $0,87 \cdot 1,404 = 1,22148$ mg N — 0,7020 = 0,51948 mg N. 400 ccm = $16 \cdot 0,51948 = 8,3117$ mg N.
Dextrose. Von der auf 400 ccm gebrachten Nährlösung 25 ccm auf 100 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 278,9 mg Cu = 145 mg Dextrose. Nährlösung = $4 \cdot 16 \cdot 145 = 9280$ mg Dextrose. Verarbeitet: 10 000 — 9280 = 720 mg Dextrose.
23. Mycel = 97,5 mg. 11 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 10 ccm $N_{10}NaOH$. $1 \cdot 1,404 = 1,404$ mg N — 0,8424 = 0,5616 mg N = 0,6%.
Nährlösung auf 350 ccm gebracht, davon 17,5 ccm untersucht. 10 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 9,2 ccm $N_{10}NaOH$. $0,8 \cdot 1,404 = 1,1232$ mg N — 0,5818 = 0,5414 mg N. 350 ccm = $20 \cdot 0,5414 = 10,8280$ mg N.
Dextrose. $\frac{1}{20}$ der auf 325 ccm gebrachten Nährlösung auf 150 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 74 mg Cu = 37,8 mg Dextrose. Nährlösung = $6 \cdot 20 \cdot 37,8 = 4536$ mg Dextrose. Verarbeitet: 5000 — 4536 = 464 mg Dextrose.
24. Mycel = 104,2 mg. 10 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 9,25 ccm $N_{10}NaOH$. $0,75 \cdot 1,404 = 1,0530$ mg N — 0,4212 = 0,6318 mg N = 0,6%.
Nährlösung auf 325 ccm gebracht, davon 16,25 ccm untersucht. 10 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 9,3 ccm $N_{10}NaOH$. $0,7 \cdot 1,404 = 0,9828$ mg N — 0,5818 = 0,4010 mg N. 325 ccm = $20 \cdot 0,4010 = 8,0200$ mg N.
Dextrose. $\frac{1}{20}$ der auf 325 ccm gebrachten Nährlösung auf 150 ccm ergänzt; davon fallen 25 ccm = 74 mg Cu = 37,8 mg Dextrose. Nährlösung = $6 \cdot 20 \cdot 37,8 = 4536$ mg Dextrose. Verarbeitet: 5000 — 4536 = 464 mg Dextrose.
25. 25 ccm der auf 150 ccm gebrachten Nährlösung untersucht. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 49,07 ccm $N_{10}NaOH$. $0,93 \cdot 1,404 = 1,3057$ mg N — 0,9828 mg = 0,3229 mg N. 150 ccm = $6 \cdot 0,3229 = 1,9374$ mg N.
26. Mycel = 105,5 mg. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,25 ccm $N_{10}NaOH$. $1,75 \cdot 1,404 = 2,4570$ mg N — 0,8705 = 1,5865 mg N = 1,5%.
Nährlösung auf 400 ccm gebracht, davon 100 ccm untersucht. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,2 ccm $N_{10}NaOH$. $1,8 \cdot 1,404 = 2,5272$ mg N — 0,8705 = 1,6567 mg N. 400 ccm = $4 \cdot 1,6567 = 6,6268$ mg N.
Dextrose. Von der auf 400 ccm gebrachten Nährlösung 25 ccm auf 250 ccm ergänzt; davon fallen 25 = 74,79 mg Cu = 38,3 mg Dextrose. Nährlösung = $10 \cdot 16 \cdot 38,3 = 6128$ mg Dextrose. Verarbeitet: 7000 — 6128 = 872 mg Dextrose.
27. Mycel = 74,2 mg. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,55 ccm $N_{10}NaOH$. $1,45 \cdot 1,404 = 2,0358$ mg N — 0,8705 = 1,1653 mg N = 1,6%.
Nährlösung auf 450 ccm gebracht, davon 100 ccm untersucht. 50 ccm $N_{10}H_2SO_4$ vorgelegt, zurücktitriert mit 48,9 ccm $N_{10}NaOH$. $1,1 \cdot 1,404 = 1,5444$ mg N — 0,8705 = 0,6739 mg N. 450 ccm = $4,5 \cdot 0,6739 = 3,0326$ mg N.

Dextrose. Von der auf 450 cem gebrachten Nährlösung 25 cem auf 200 cem ergänzt; davon fallen 25 cem = 81,63 mg Cu = 41,8 mg Dextrose. Nährlösung = $8 \cdot 18 \cdot 41,8 = 6019,2$ mg Dextrose. Verarbeitet: 7000 — 6019,2 = 980,8 mg Dextrose.

Literatur-Verzeichnis.

1. Ambühl, G., Chemiker-Zeitung 1897, Nr. 16.
2. Behrens, W., Tabellen. 3. Aufl., 1898.
3. Beijerinck und van Delden, Centralbl. f. Bakt., 1902, II. Abt., Bd. 9.
4. Beijerinck, M. W., Centralbl. f. Bakt., 1901, II. Abt., Bd. 7.
5. Brefeld, 78. Jahresber. d. Schl. Ges. f. vaterl. Cult., zool.-bot. Sektion.
6. Christensen, H. R., Centralbl. f. Bakt., 1906, II. Abt., Bd. 17.
7. Fermi, C., Centralbl. f. Bakt., 1896, II. Abt., Bd. 2.
8. Fischer, A., Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl., 1903.
9. Fresenius, Quantitative chem. Analysen. 1901, Bd. 2.
10. Gerlach u. Vogel, Centralbl. f. Bakt., 1902, II. Abt., Bd. 9.
11. Dieselben, Centralbl. f. Bakt., 1903, II. Abt., Bd. 10.
12. Harcourt & Lupton, The Chicago Pharmacist, 1876, Vol. IX, Nr. 6. Referat, Arch. d. Pharmacie, 3. Reihe, Bd. 11.
13. Heinze, B., Annales mycologici, 1906, Bd. 4, Nr. 1.
14. Hellriegel, Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. 1888.
15. Hellriegel u. Wilfarth, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1889.
16. Hempel, W., Gasanalytische Methoden. 3. Aufl., 1900.
17. Hoppe-Seilers Handbuch d. Physiol. u. Pathol.-chem. Analyse. 7. Aufl., 1903.
18. Jakobitz, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 7.
19. Janse, M., Ann. du Jard. Bot. de Buitenzorg, Vol. XIV, 1, 1896.
20. Johow, Fr., Jahrb. f. wiss. Bot., 1889.
21. Keutner, J., Wissenschaftl. Meeresuntersuchungen, Abt. Kiel, Neue Folge, Bd. 8.
22. Klebs, G., Physiologie der Fortpflanzung.
23. Mazé, M., Ann. de l'Inst. Pasteur, 1897, t. 11 und 1898, t. 12.
24. Pfeffer, W., Pflanzenphysiologie, 1897, Bd. 1.
25. Pringsheim, H., Centralbl. f. Bakt., 1906, II. Abt., Bd. 16.
26. Puriewitsch, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1895.
27. Rabenhorst, Fungi imperfecti. 6. Abt., 1 u. 2.
28. Saida, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, Generalversammlungsheft.
29. Ternetz, Ch., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1904.
30. Vogel, J., Centralbl. f. Bakt., 1906, II. Abt., Bd. 15.
31. De Vries, Mutatationstheorie, II.
32. Winogradsky, Arch. des sc. biol. de St. Pétersbourg, 1895, t. III.
33. Derselbe, Centralbl. f. Bakt., 1902, II. Abt., Bd. 9.
34. Zopf, Die Pilze. 1890.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik](#)

Jahr/Year: 1907

Band/Volume: [44](#)

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

Artikel/Article: [Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch Pilze. 353-408](#)