

# Ueber die Entbindung freien Stickstoffs bei der Fäulniss und Nitrification.

Von

**Dr. O. Kellner** (Referent) und **T. Yoshii**.

(Der Redaction zugegangen am 16. August 1887.)

Bei Untersuchungen über die Veränderungen wasserhaltiger Futtermittel beim Einsäuern in Mieten unter Anwendung von Gefässen mit luftdichtem Verschluss hatte ich früher beobachtet<sup>1)</sup>, dass neben einer tiefeingreifenden Zersetzung der Eiweissstoffe sehr bedeutende Verluste an gebundenem Stickstoff auftreten, und auch bei späteren Arbeiten von M. Märcker<sup>2)</sup>, J. König<sup>3)</sup>, A. Stutzer<sup>4)</sup>, Ad. Mayer<sup>5)</sup>, J. Fittbogen<sup>6)</sup>, H. Weiske<sup>7)</sup> u. A. war dasselbe Ergebniss zu Tage getreten. Als ich dann vor 3 Jahren in Gemeinschaft mit J. Sawano das Zustandekommen dieser befremdlich hohen Verluste, welche bis zu 25% des angewandten Stickstoffs betragen, näher studirte<sup>8)</sup>, stellte sich heraus, dass dieselben nur scheinbare waren: beim Trocknen des gesäuerten Materials zum Zweck der chemischen Analyse wird trotz der Gegenwart eines grossen Ueberschusses freier, nicht flüchtiger organischer Säuren Ammoniak durch Dissociation in Freiheit gesetzt und an die Luft abgegeben. Das beim

1) Landw. Versuchsstationen, 25. Bd. (1880), S. 447.

2) Journal f. Landwirthschaft, 30. Bd., S. 413.

3) Biedermann's Centralbl. f. Agriculturchemie, 13. Jahrg., S. 677.

4) Ebendasselbst, S. 679.

5) Journal f. Landw., 32. Bd., S. 357.

6) Landw. Jahrbücher, 13. Bd., S. 291.

7) Journal f. Landw., 32. Bd., S. 81.

8) Landw. Vers.-Stat., 32. Bd. (1885), S. 57.

Trocknen entweichende Ammoniak deckte sich vollkommen mit dem vermeintlichen Stickstoffdeficit. Es liess sich also unseren Untersuchungen der Schluss entnehmen, dass bei der durch Milchsäure-Ferment hervorgerufenen Gährung wasserreicher organischer Substanzen unter Luftabschluss eine Entbindung freien Stickstoffs nicht stattfindet.

Bei der Ausführung dieser Arbeiten hatten wir bemerkt, dass zugleich mit dem Ammoniak aus den gegohrenen Substanzen flüchtige Säuren an die Luft abgegeben werden und man deshalb das entweichende Ammoniak nicht einfach durch Auffangen in Säuren und Titration bestimmen kann. Da letztere Methode jedoch thatsächlich bei einer Anzahl von Fäulnissversuchen in Anwendung gekommen ist und somit zu kleinen Fehlern, die dann als Stickstoffverlust gedeutet werden, Veranlassung gegeben haben kann, — da ferner die bei Beginn unserer Arbeiten vorliegenden Untersuchungen über die Entbindung freien Stickstoffs bei der Fäulniss nicht einwurfsfrei waren, wie ja die kürzlich erschienene Arbeit von A. Ehrenberg<sup>1)</sup> in ihrem historischen Theil zur Genüge nachweist, so habe ich in Gemeinschaft mit T. Yoshii es versucht, einige Beiträge zur Lösung dieser wichtigen Frage zu liefern. Wir haben dabei unsere Aufmerksamkeit insbesondere auch auf die Nitrification gerichtet.

Zu den ersten Versuchen wurden feingemahlene Sojabohnen, Milch und Fischmehl verwendet und die Fäulniss durch Zusatz von 10 cem. gefaultem Harn eingeleitet; die Bohnen und das Fischmehl, 20 gr. für je einen Versuch, wurden ausserdem mit je 33 cem. Wasser angefeuchtet. Zu einigen dieser Gemische war Gips als ammoniakbindendes Mittel in geringen Mengen zugesetzt worden. Die Mischung der Substanzen wurde in kleinen weithalsigen Fläschchen vorgenommen und letztere mit paraffinirten Kautschukstopfen verschlossen, welche je 2 gekrümmte Glasröhren trugen, durch deren eine das Innere des Gefässes mit einer titrirte Schwefelsäure enthaltenden Vorlage in Verbindung stand; die andere

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, 11, Bd. (1887), S. 145—155.

Röhre, das Gaszuleitungsrohr, sowie die Vorlage waren mit kleinen Gaswaschflaschen verbunden, welche mit Schwefelsäure gefüllt, den Eintritt atmosphärischer Stickstoffverbindungen verhinderten. In 3tägigen Zwischenräumen wurden durch jedes Gefäß und die damit verbundenen Apparate langsam 2 Liter Luft getrieben. Für qualitative Prüfungen wurde eine Anzahl gleicher Mischungen zur selben Zeit angesetzt und mit Baumwolle lose verschlossen gehalten; dieselben dienten zur Beobachtung über die Veränderung der Reaction und über das etwaige Auftreten von salpetriger oder Salpetersäure. Die Versuche begannen am 4. März 1885 und wurden beendet in der Zeit vom 5.—11. Mai.

### Versuchsreihe I.

#### a) Sojabohnen.

##### Angewandte Substanzen:

1. 20 gr. Bohnen, 10 chem. Harn und 33 chem. Wasser.
2. Dieselbe Mischung + 2.5 gr. Gips.
3. Dieselbe Mischung wie No. 2.

##### Stickstoffgehalt:

20 gr. Bohnen = 19,154 gr. wasserfreie Substanz	
mit 4,255% N. . . . .	= 0,8150 gr. N.
10 chem. gefaulter Harn. . . . .	= 0,0208 „ „
Gesamt-N vor der Fäulniss	= 0,8358 gr.

Nach der Fäulniss hatten die Mischungen eine schwach saure Reaction und einen höchst unangenehmen Geruch. Sie waren mit einem dicken Mycel von Schimmelpilzen überzogen und in eine breiige Masse verwandelt. Nitrification war nicht eingetreten. Nach dem Befeuchten mit starker Salzsäure wurde die Substanz eingetrocknet, pulverisirt und der Stickstoffbestimmung (durch Verbrennen mit Natronkalk) unterworfen, wobei folgende Ergebnisse erhalten wurden:

	1.	2.	3.
Dauer der Fäulniss, Tage . . . . .	62	65	68
Lufttrockene Substanz in gr. . . . .	15,1555	18,2325	17,9820
Darin Stickstoff in % . . . . .	5,546	4,733	4,746
„ „ „ gr. . . . .	0,8405	0,8629	0,8534
Stickstoff in der Vorlage . . . . .	0	0	0
Mehr (+) oder weniger (—) als angewandt	+ 0,0047	+ 0,0271	+ 0,0176

## b) Milch.

Zu jedem Versuch wurden 50 ccm. fettarme Milch mit einem Stickstoffgehalt von 0,494% abgewogen und No. 1 nur mit 10 ccm. gefaultem Harn, No. 2 und 3 noch mit je 1 gr. Gips versetzt. Nachdem No. 1 69, No. 2 71 und No. 3 74 Tage gefault hatten, war die Mischung ganz missfarbig geworden, zeigte jedoch keine Mycelbildung auf der Oberfläche und hatte eine schwach saure Reaction angenommen. Salpetrige oder Salpetersäure war weder während des Verlaufs, noch am Schluss des Versuchs nachweisbar. Die gefaulte Milch wurde unter Zusatz von Salzsäure auf ausgeglühtem Gips zur Trockne gebracht und mit Natronkalk verbrannt. Die Resultate sind in Nachstehendem verzeichnet:

	1.	2.	3.
Angewandt frische Milch in gr. . . . .	51,612	51,158	51,862
Darin Stickstoff in gr. . . . .	0,2553	0,2537	0,2562
In 10 ccm. Harn Stickstoff in gr. . . . .	0,0208	0,0208	0,0208
Gesamt-N vor der Fäulniss	0,2761	0,2745	0,2770
Nach der Fäulniss:			
	1.	2.	3.
Lufttrockene Substanz incl. Gips in gr. . . . .	11,823	20,1175	19,589
Darin Stickstoff in % . . . . .	2,353	1,361	1,443
Stickstoff in der Vorlage . . . . .	0	0	0
Gesamt-N nach der Fäulniss . . . . .	0,2781	0,2738	0,2827
Mehr (+) oder weniger (-) als angewandt	+ 0,0020	- 0,0007	+ 0,0057

## c) Fischmehl.

Für jeden der beiden Versuche wurden je 20 gr. Fischmehl (fein gemahlene getrocknete Sardinen), 10 ccm. gefaulter Harn und 33 ccm. Wasser verwendet; zu der Mischung No. 2 wurden noch 2,5 gr. Gips zugesetzt. Nach 79tägigem Faulen hatte die Mischung eine alkalische Reaction angenommen und war sehr stark zersetzt.

Die Luft, welche durch den Apparat getrieben wurde, hatte trotz ihres Durchganges durch die Vorlage und Waschflasche bei ihrem Austritt noch einen starken fauligen Geruch. Die Prüfungen auf Salpeter- und salpetrige Säure ergaben auch hier nur negative Resultate.

Der Stickstoffgehalt der angewandten Substanzen war folgender:

In 20 gr. lufttrockenem Fischmehl (16,449 gr. Trockensubstanz mit 13,570% N) <sup>1)</sup> . . . . .	2,2321 gr.
In 10 cbcm. gefaultem Harn . . . . .	0,0208 »
Gesamt-N vor der Fäulniss . . . . .	2,2529 gr.

Die gefaulte Substanz wurde zunächst mit Salzsäure angesäuert, mit salzsäurehaltigem Wasser extrahirt, das Filtrat auf 500 cbcm. gebracht, je 100 cbcm. in Hoffmeister'schen Glasschälchen eingedampft und der Stickstoff nach Kjeldahl's Methode bestimmt. Der gesammte Rückstand mitsammt dem Filter wurde getrocknet, ebenfalls nach Kjeldahl's Verfahren oxydirt, die dabei erhaltene Lösung auf 500 cbcm. verdünnt und der Stickstoff in je 100 cbcm. durch Destillation bestimmt. Hierbei wurde gefunden:

N im ungelösten Rückstand . . . . .	0,1446 gr.	0,1337 gr.
N im Filtrat . . . . .	2,0782 »	2,0952 »
N in der Vorlage . . . . .	0,0078 »	0,0031 »
Gesamt-N nach der Fäulniss . . . . .	2,2306 gr.	2,2320 gr.
Weniger als vor der Fäulniss . . . . .	0,0223 »	0,0209 »

In keinem der angeführten 8 Fälle hatte sich ein irgendwie erheblicher Stickstoffverlust bemerkbar gemacht, obwohl überall die Fäulniss sehr weit vorgeschritten, zum Theil unter Schimmelbildung, zum Theil ohne solche, und offenbar in sehr verschiedener Richtung erfolgt war, indem die Endreaction in einigen Mischungen (Bohnen, Milch) schwach sauer, in anderen (Fischguano) alkalisch war. Die grössten Differenzen, welche auf der Verlustseite liegen, betragen weniger als ein Procent; in einigen Fällen (Bohnen, No. 2 und 3) macht sich eine kleine Zunahme (bis zu 3%) bemerkbar, welche ich jedoch keineswegs im Sinne Dehérain's oder Berthelot's deuten möchte. — Nitrification war in keinem der Versuche beobachtet worden, ein Umstand, der angesichts der B. Dietzell'schen Hypothesen über den Process der Entbindung freien Stickstoffs bei der Fäulniss von Wichtigkeit ist.

<sup>1)</sup> Nach Kjeldahl's Methode bestimmt.

Eine zweite Versuchsreihe hatte den Zweck, festzustellen, ob bei der Fäulniss mit nachfolgender Nitrification ein Verlust an gebundenem Stickstoff eintritt. Da die salpetrige Säure am leichtesten mit Amidosäuren freien Stickstoff entwickelt, so benützten wir für einen Theil dieser Versuche Asparagin. Ein anderer Theil derselben wurde wiederum mit Sojabohnen ausgeführt. Zur Einleitung der Fäulniss wurde auch diesmal gefaulter Harn benützt, und um nitrificirendes Ferment in die Mischung einzuführen, wurde einem Theil der Versuche an der Luft getrockneter, fein gesiebter Ackerboden aus der obersten Schicht der Krume zugesetzt. Im Uebrigen war die Ausführung der Versuche dieselbe wie früher, nur wurden diesmal die Gefässe zur Abhaltung des Lichtes, welches der Nitrification ungünstig ist, in schwarzes Glanzpapier gehüllt und sämtliche Bestimmungen nach der Kjeldahl'schen Methode ausgeführt.

Folgende Grundmischungen wurden am 5. October 1885 in die oben beschriebenen Apparate gefüllt:

### Versuchsreihe II.

- a) 2 gr. Asparagin + 20 gr. Wasser + 2 ccm. gefaulter Harn.  
 b) 20 » Sojabohnen + 20 » » + 2 « » »

Hierzu kamen die nachstehenden Zusätze:

A. Asparagin.		B. Bohnen.	
No. 1.	ohne Zusatz.	No. 1.	ohne Zusatz.
» 2.	1 gr. Gips.	» 2.	2,5 gr. Gips.
» 3.	1 » Calciumcarbonat.	» 3.	2,5 » Calciumcarbonat.
» 4.	1 » Gips + 1 gr. Boden.	» 4.	2,5 » Gips + 1 gr. Boden.
» 5.	1 » Calciumcarbonat + 1 gr. Boden.	» 5.	2,5 » Calciumcarbonat + 1 gr. Boden.

Ausserdem erhielt noch jede Mischung der Reihe a 0,004 gr. Monocalciumphosphat, 0,2 gr. präcipitirtes Tricalciumphosphat und 0,004 gr. Magnesiumsulfat, um die Entwicklung der organisirten Fermente sicher zu stellen<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Vergl. R. Warrington, On nitrification. Journal of the Chem. Society, London, 45. Bd., S. 637.

Eine Anzahl gleicher Mischungen diene, wie früher, zu Prüfungen auf die Reaction und den Eintritt der Nitrification.

Das Asparagin löste sich durch die Fäulniss allmählig auf und wurde zersetzt, die Lösungen färbten sich schnell dunkelbraun mit Ausnahme derjenigen, welche Gips erhalten hatten; letztere nahmen zunächst nur einen gelblichen Farbenton an, der nur allmählig in Braun überging. Nach ungefähr 2 Monaten hatte sich eine schleimige Decke auf den Lösungen gebildet, aber auch hier wirkte der Gips verzögernd. Die Reaction wurde in allen Fällen sehr bald schwach alkalisch und blieb so bis zum Schluss der Versuche. Bei den Bohnen machte sich der Fäulnissprocess ebenfalls sehr rasch bemerkbar, doch traten diesmal Schimmelpilze nicht besonders hervor. Es bildete sich langsam eine schwach saure Reaction aus, welche bis zum Schluss des Versuchs bestehen blieb.

Nach mehrfachen Beobachtungen Anderer<sup>1)</sup> war eine Bildung von Salpeter- oder salpetriger Säure in den an organischer Substanz so reichen Sojabohnen nicht zu erwarten. Dagegen hatten wir gehofft, durch Zusatz nitrificirenden Fermentes (Boden) in den Asparaginlösungen eine rasche Nitrification hervorzurufen. Als aber nach 5 Monaten — vielleicht in Folge ungeeigneter Beschaffenheit unseres Bodens, wahrscheinlicher aber in Folge der zu starken Concentration der entstandenen Ammoniaksalze — die Reactionen mit Diphenylamin und Metaphenylendiamin noch immer negative Resultate ergaben, so entschlossen wir uns, die Versuche abzuberechen und eine neue Reihe unter besseren Bedingungen für die Nitrification zu beginnen. Die gefaulten Substanzen der Versuchsreihe II wurden in folgender Weise analysirt:

Der Inhalt der mit Asparagin beschiekten Gefässe wurde zunächst innerhalb der letzteren mit Kalkmilch vermischt und das entweichende Ammoniak nach Schlösing bestimmt. Der Rückstand wurde mit Schwefelsäure versetzt, in Gläschälchen getrocknet und der Stickstoffbestimmung unter-

<sup>1)</sup> Z. B. J. König, Landw. Versuchsstationen, 30. Bd. (1884), S. 431, und A. Morgen, ebendasselbst, S. 203.

worfen. — Die gefaulten Bohnen wurden sofort mit Schwefelsäure und darauf mit einer grossen Menge gebranntem Gips versetzt, in Schälchen eingetrocknet, pulverisirt und nach Kjeldahl behandelt. In die Vorlagen war kein Ammoniak übergegangen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Nachstehendem verzeichnet:

### A. Asparagin<sup>1)</sup>.

Stickstoff vor der Fäulniss:

	No. 1.	2.	3.	4.
In 2 gr. Asparagin . . . . .	0,3744 gr.	0,3744 gr.	0,3744 gr.	0,3744 gr.
In 2 chem. Harn . . . . .	0,0164 »	0,0164 »	0,0164 »	0,0164 »
In 1 gr. Boden . . . . .	— »	— »	— »	0,0066 »
Gesamt-N . . . . .	0,3908 gr.	0,3908 gr.	0,3908 gr.	0,3974 gr.

Stickstoff nach der Fäulniss:

Durch Aetzkalk ausgetrieben . . . . .	0,0447 gr.	0,0370 gr.	0,0254 gr.	0,1868 gr.
Im Rückstande . . . . .	0,3446 »	0,3548 »	0,3647 »	0,2127 »
Gesamt-N . . . . .	0,3893 gr.	0,3918 gr.	0,3899 gr.	0,3995 gr.
Mehr (+) oder weniger (—) als angewandt — 0,0015 » + 0,0010 » — 0,0009 » + 0,0021 »				

### B. Bohnen.

Stickstoff vor der Fäulniss:

	1.	2.	3.	4.	5.
In 20 gr. Bohnen . . . . .	0,8291 gr.				
In 2 chem. Harn . . . . .	0,0164 »	0,0164 »	0,0164 »	0,0164 »	0,0164 »
In 1 gr. Boden . . . . .	— »	— »	— »	0,0066 »	0,0066 »
Gesamt-N . . . . .	0,8455 gr.	0,8455 gr.	0,8455 gr.	0,8521 gr.	0,8521 gr.
Stickstoff nach der Fäulniss . . . . .	0,8459 »	0,8426 »	0,8431 »	0,8531 »	0,8531 »
Mehr (+) oder weniger (—) als angewandt + 0,0004 » — 0,0029 » — 0,0024 » + 0,0010 » + 0,0010 »					

Sämmtliche vorgeführte Versuche beweisen in Uebereinstimmung mit den Arbeiten von J. König<sup>2)</sup> und A. Morgen<sup>3)</sup>,

1) No. 5 dieser Reihe verunglückte bei der Bestimmung.

2) J. König, Der Kreislauf des Stickstoffs, (Münster) 1878, S. 19.

3) Landw. Versuchsstationen, 30. Bd., S. 213.

dass bei der Fäulniss nitrat- und nitritfreier Medien in Gegenwart von reichlichen Wassermengen eine Entbindung freien Stickstoffs nicht stattfindet. Die Frage, ob elementarer Stickstoff aus faulenden wasserarmen Gemischen entbunden werden kann, ist bekanntlich zuerst von J. König aufgeworfen und bejaht worden; er fand in einem Gemisch von 250 gr. Knochenmehl und 500 gr. Boden bei einer Wasserzufuhr von 600 cbem., d. i. bei einem Wassergehalt der ganzen Mischung von ca. 50%, keinen Stickstoffverlust, bei Zusatz von 300 cbem., d. i. ca. 30% Wasser im Gemisch, jedoch ein Deficit von 5,48% des angewandten Stickstoffs nach 8monatlichem Faulen. Im gleichen Sinne, wie König, und unabhängig von demselben ausserte sich auch später Morgen auf Grund eigener Versuche. Beide nehmen an, dass bei unzureichender Feuchtigkeit der faulenden Medien dem Sauerstoff Zutritt zu der porösen stickstoffhaltigen Substanz gestattet und das Ammoniak oxydirt würde, wobei Wasser und freier Stickstoff entstehen. Diese Auffassung erhielt kürzlich<sup>1)</sup> eine wesentliche Stütze in einer Angabe J. König's, nach welcher in ganz verdünnten Ammoniaklösungen (0,7 pro Mille) Oxydation stattfände, wenn dieselben auf grosse Flächen (Asbest, Filtrirpapier) vertheilt werden.

Eine Oxydation des Ammoniaks wird nun bekanntlich auch noch durch einen niederen Organismus vermittelt, namentlich in solchen Fällen, in denen die gleichzeitig anwesenden Kohlenstoffverbindungen den Sauerstoff nicht mehr ausschliesslich für sich in Anspruch nehmen. In faulenden organischen Substanzen können daher diese Organismen gewöhnlich erst dann nitrificirend wirken, wenn die organische Substanz grösstentheils zerstört ist, wie aus den Arbeiten von Alex. Müller<sup>2)</sup> und R. Warington<sup>3)</sup> hervorgeht. Vielleicht könnte die Nitrification jedoch schon nahe an der Oberfläche faulender Medien einsetzen, wo in Folge unbeschränkterer Sauerstoffzufuhr die Zersetzung rasch voran-

<sup>1)</sup> Landw. Versuchsstationen, 33. Bd., S. 467.

<sup>2)</sup> Ebendasselbst, 32. Bd. (1884), S. 285.

<sup>3)</sup> Journal of the Chem. Society, (London), 1884, 35. Bd., S. 667.

schreitet, während in tieferen Schichten noch reichliche Mengen fäulnissfähiger Substanzen vorhanden sein können. Ein solcher Process könnte aber sehr wohl Platz greifen in Gemischen fester oder schwer löslicher Stoffe bei beschränktem Wasserzusatz, z. B. im natürlichen Ackerboden, in welchem ja in der That die Luft der tieferen Schichten zumeist ärmer an Sauerstoff ist als nahe der Oberfläche.

Auf welchem Wege die Oxydation des Ammoniaks auch immer erfolgen mag, eine Grundbedingung derselben wird immer die Abwesenheit solcher organischer Substanzen sein, die eine stärkere Affinität zum Sauerstoff haben als das Ammoniak oder das nitrificirende Ferment. Faulende organische Stoffe bedürfen daher zumeist einer beträchtlichen Zeit, bevor in ihnen eine Oxydation des Ammoniaks eintreten kann. Diese Verhältnisse scheinen mir der Grund dafür zu sein, dass A. Ehrenberg in seinen mit so rühmlicher Sorgfalt ausgeführten Untersuchungen auch bei Anwendung sehr poröser wasserarmer Medien in einer Sauerstoffatmosphäre keine Entwicklung elementaren Stickstoffs beobachten konnte, wogegen B. Dietzell mit denselben Gemischen, aber nach einer Fäulnisdauer von etwa 12 Monaten, Verluste fand, die unter Umständen 15% des angewandten Stickstoffs betrug. Ehrenberg's Versuche dauerten eben höchstens etwa 6 Wochen. Zwar giebt der letztgenannte Forscher in der Beschreibung der mit automatischer Nachfüllung von Sauerstoff ausgeführten Versuche (No. VII, VIII und IX) an, dass am Schluss derselben der Sauerstoffverbrauch fast Null war, bezw. gänzlich aufhörte, doch bezieht sich dies offenbar nur auf den Uebertritt von Sauerstoff aus dem Gasometer in das mit dem Fäulnissgemisch beschickte Gefäss und nicht auf die wirkliche Sauerstoffaufnahme durch die faulende Substanz. Der Eintritt von Sauerstoff in die sich zersetzenden Stoffe und die Ausgabe von Kohlensäure können sich ja nach einer gewissen Frist so compensiren, dass das Gasvolumen in dem Zersetzungsgefäss nicht geändert wird, trotzdem der Fäulnisprocess noch lebhaft vor sich geht. Es besteht sonach ein fundamentaler Unterschied zwischen den Versuchen Dietzell's

und Anderer und den Ehrenberg's: während der Erstere seine Mischungen soweit faulen liess, dass die Zersetzung die Grenze des Möglichen wohl erreicht haben kann, schloss der Letztere seine Untersuchungen weit vor diesem Zeitpunkte ab. — Aus den Dietzell'schen Gesamtverlusten berechnete Ehrenberg<sup>1)</sup>, dass er bei Anwendung gleicher Gemische sehr bedeutende Gasvolumina pro Woche zu erwarten hatte, welche bei seiner gasanalytischen Behandlung der Frage unmöglich zu übersehen waren. Aus meinen obigen Auseinandersetzungen dürfte indessen hervorgehen, dass eine solche Rechnung auf nicht zutreffenden Annahmen beruht. Wollte man die Dietzell'schen Resultate auf ihre Richtigkeit prüfen, so würde es sich bei Anwendung gasanalytischer Methoden empfehlen, die Fäulnissgemische während des Beobachtungsjahres nur periodenweise auf die Entwicklung freien Stickstoffs zu untersuchen.

Die Beobachtungen Ehrenberg's, sowie auch die von uns ausgeführten oben beschriebenen Versuche beweisen sicherlich, dass die Träger der echten Fäulniss elementaren Stickstoff nicht in Freiheit zu setzen vermögen. Man würde sich aber auf unrechtem Wege befinden, wollte man auf Grund dieses Resultates sämtliche älteren Versuche, die ein Stickstoffdeficit ergaben, verwerfen oder gegen dieselben den Vorwurf erheben, sie seien nach unzulänglichen analytischen Methoden ausgeführt worden. Nicht die echte Fäulniss, sondern Vorgänge secundärer Natur, zu denen die Bedingungen nicht immer gegeben, sind nach Lage der bisherigen Forschungsergebnisse als die Ursachen der Entbindung freien Stickstoffs aufzufassen.

Von diesem Gesichtspunkte aus sind folgende Prozesse zur Erklärung beobachteter Stickstoffverluste heranzuziehen, resp. theilweise bereits herangezogen worden:

1. Die Oxydation des Ammoniaks durch den Sauerstoff der Luft, welche von J. König<sup>2)</sup> als die

<sup>1)</sup> A. a. O., S. 155.

<sup>2)</sup> J. König, Der Kreislauf des Stickstoffs, Münster (1878). S. 19.

Ursache der von ihm gefundenen Stickstoffverluste angesprochen, jedoch bereits früher schon von Th. Schlösing<sup>1)</sup> in demselben Sinne gedeutet worden ist. Letzterer nahm an, dass «die Verbrennung organischer Substanzen begleitet ist von einem Verlust an Stickstoff, mag derselbe erfolgen auf Kosten der Luft, wie in den Versuchen von Boussingault, oder auf Kosten der Nitrate, des Eisenoxyds oder des Sauerstoffs der Substanz selbst». Wie bereits bemerkt, kann diese Oxydation des Ammoniaks natürlich nur stattfinden, wenn organische, mit stärkerer Affinität zum Sauerstoff begabte Substanzen nicht mehr anwesend sind.

2. Die Nitrification durch organisirte Fermente kann vielleicht in derselben Weise, wie die Oxydation des Ammoniaks durch den Sauerstoff der Luft, direct von einer Entbindung freien Stickstoffs begleitet sein. Es dürfte indessen schwierig sein, diesen Process von dem sub 3 erwähnten experimentell auseinander zu halten.

3. Die Einwirkung freier salpetriger Säure auf stickstoffhaltige organische Verbindungen, ein Vorgang, den B. Dietzell<sup>2)</sup> annimmt. Nitrite sollen nach ihm bereits durch Kohlensäure unter Bildung freier salpetriger Säure zerlegt werden.

4. Die Reduction von Nitraten und Nitriten durch organische Substanzen liefert nach Th. Schlösing und älteren Autoren<sup>3)</sup> je nach der Natur des Mediums ein variables Gemisch von Stickstoff, Stickoxydul und Stickoxyd; Dehérain und Maquenne<sup>4)</sup> erhielten bei Versuchen mit Boden unter Luftabschluss Stickstoff und Stickoxydul, Tacke<sup>5)</sup> bei gährenden organischen Stoffen unter Salpeterzusatz freien Stickstoff und Stickoxyd; Ehrenberg beobachtete bei Sauerstoffabschluss und Zusatz von Salpeter jedoch weder eine

1) Jahresbericht f. Agriculturchemie, 16. u. 17. Jahrg. (1873), S. 116.

2) Biedermann's Centralbl. f. Agriculturchemie (1882), 11. Jahrgang, S. 417.

3) Jahresbericht f. Agriculturchemie (1873), 16. Bd., S. 115.

4) Der Naturforscher, 15. Jahrg. (1882), S. 473.

5) Tagebl. d. Naturf.-Vers. zu Berlin (1886), S. 290.

Entwicklung von Stickstoff, noch gasförmiger Oxyde desselben, sondern konnte nur eine Reduction der Nitate zu Ammonsalzen nachweisen.

5. Eine spontane Zersetzung von Ammoniumnitrit in verdünnten Lösungen, ähnlich derjenigen, welche das feste Salz beim Erwärmen erfährt.

Da eine Anzahl dieser Vorgänge selbst, sowohl als ihre Betheiligung an dem Zustandekommen eines Stickstoffdeficits durchaus hypothetischen Charakters sind, so haben wir einige derselben in den Bereich unserer Untersuchungen gezogen.

Ob der Nitrificationsprocess als solcher mit einem Verlust an gebundenem Stickstoff verknüpft ist, lässt sich aus den Angaben der Literatur über diesen Gegenstand nicht mit Sicherheit schliessen. Boussingault<sup>1)</sup>, der mit Boden operirte, fand eine Ackererde, die 11 Jahre in einem grossen Volumen Luft eingeschlossen war, das man nicht erneuerte, stark salpeterhaltig geworden. «Die Gesamt-Menge an Stickstoff jedoch, welche am Anfang und am Ende der Beobachtung bestimmt wurde, hatte sich nicht merkbar verändert; die Analysen schienen sogar anzuzeigen, dass dieselbe in der salpeterhaltigen Erde um ein Geringes vermindert war.» In einem Gemisch (100 gr. Erde und 300 gr. Sand) waren von 0,4722 gr. N nach den 11 Jahren 0,0202 gr. verschwunden, in einem anderen (100 gr. Erde, 300 gr. Sand und 5 gr. Cellulose) betrug der Verlust nur 0,0082 gr. von der gleichen Menge (0,4722 gr.) angewandeten Stickstoffs; dabei hatte sich die Salpetersäure von 0,0029 gr. auf 0,6178 bzw. 0,5620 gr. vermehrt. — Einige quantitative Bestimmungen in Flüssigkeiten (Salmiaklösungen), welche, der Nitrification unterworfen, zuerst starke Reaction auf salpetrige Säure gaben und am Schluss kein Ammoniak und als Oxydationsproduct nur Salpetersäure erkennen liessen, erhielt R. Warrington<sup>2)</sup> von dem in Form von Ammoniak angewandten Stickstoff 96,7 — 95,1 — 94,9 — 92,9 Procent in der Form von Salpetersäure

<sup>1)</sup> Compt. rend., 82. Bd. (1876), S. 447.

<sup>2)</sup> A. a. O., 35. Bd. (1879), S. 449.

wieder. Was aus dem übrigen Theil des Stickstoffs geworden war, lässt der genannte Forscher unentschieden und weist nur darauf hin, dass wenigstens eine geringe Menge der stickstoffhaltigen Substanz in die Constitution der Mikroorganismen eingetreten sein musste. — Eine fast vollständige Umwandlung von verdünntem Ammoniak, das mit Holzasche und Essigsäure versetzt und mit nitrificirendem Ferment inficirt war, in Salpetersäure ohne Stickstoffverlust beobachtete Alex. Müller<sup>1)</sup>, der wohl überhaupt als der Erste die Beteiligung der kleinsten Organismen an den Nitrificationsprocess erkannt hat<sup>2)</sup>. Er legt jedoch selbst ausdrücklich seinem Versuch eine absolute Beweiskraft nicht bei.

Unsere Versuche wurden mit verdünntem filtrirtem frischem Menschenharn (20 ccm. + 480 ccm. Wasser) ausgeführt und das nitrificirende Ferment in der Form an der Luft getrockneter fein gesiebter Ackererde (10 gr. pro Versuch) zugesetzt. Die Mischung wurde in cylindrischen Flaschen vorgenommen, die mit Korken und Paraffin verschlossen und mit Vorlagen zur Abhaltung atmosphärischer Stickstoffverbindungen, sowie zum Auffangen etwa entweichenden Ammoniaks verbunden waren. Jede Woche wurden etwa 3 Liter Luft durch den Apparat und die Flüssigkeit getrieben. Nach 5 Monaten, Anfang April 1887, wurden in einem zur Controlle aufgestellten gleichen Gefäss die ersten Spuren von salpetriger und sehr bald auch Salpetersäure nachgewiesen. Die Nitrification ging darnach mit grosser Intensität von Statten. Nach 6 Monaten wurde der Stickstoffgehalt in einem der Gefässe bestimmt. Bei der Beschreibung der dabei befolgten Methoden muss ich etwas weiter ausholen.

Bei Untersuchungen über den Gehalt verschiedener Pflanzen an stickstoffhaltigen, nicht-eiweissartigen Substanzen hatte ich gefunden<sup>3)</sup>, dass die Gegenwart von Salpetersäure beim Eindampfen an sich saurer oder angesäuerter Pflanzensäfte zu Stickstoffverlusten Veranlassung geben kann, indem

1) Landw. Vers.-Stat., 32. Bd. (1884), S. 285.

2) Ebendasselbst, 16. Bd. (1873), S. 263.

3) Ebendasselbst, 24. Bd. (1879), S. 447.

hierbei leicht salpetrige Säure entsteht, welche alsdann mit den stets vorhandenen Amidosubstanzen in Wechselwirkung tritt, — eine Beobachtung, die auch später von U. Kreuzler<sup>1)</sup> bei Anwendung von Gemischen von Asparaginsäure, Kalisalpeter und Essigsäure etc. bestätigt wurde. Der störende Einfluss, den Nitrate und Nitrite auch bei der Bestimmung des Stickstoffs nach Will-Varrentrapp und Kjeldahl hervorrufen, lässt sich, wie ich damals nachwies, umgehen durch reichlichen Zusatz von Eisenchlorür, darauffolgendes Ansäuern mit Salzsäure und Eindampfen der Lösung, bezw. Trocknen der Substanz; in dem Rückstande kann man alsdann den Stickstoff, excl. des in der Salpetersäure enthaltenen Betrages, nach einfachen Methoden bestimmen. Bei einer Prüfung dieses Verfahrens an Mischungen von Asparaginsäure und Salpeter erhielt Kreuzler<sup>2)</sup> indessen vor einiger Zeit unbefriedigende Resultate. Es ist um so befremdender, als der genannte Forscher in einem anderen Theil seiner Arbeit den Nachweis führt, dass Amidosubstanzen, selbst wenn in erheblicher Menge vorhanden und von sonstigen organischen Stoffen (Zucker) begleitet, die Genauigkeit der Salpetersäurebestimmung nach dem Schlösing-Tiemann'schen Verfahren kaum merklich beeinflussen. Auch nach E. Bosshard<sup>3)</sup> bedingt die Anwesenheit von Amidn den keinen Fehler bei der Ermittlung des Salpetersäure-Stickstoffs. Nun beruht aber mein Vorschlag zur Entfernung der Salpetersäure aus amidhaltigen Flüssigkeiten auf genau demselben Princip, wie die Schlösing-Tiemann'sche Methode, nämlich auf der Reduction der Salpetersäure zu Stickoxyd durch Eisenchlorür. Würden bei

1) Landw. Vers.-Stat., 31. Bd. (1884), S. 292.

2) Ebendasselbst, S. 293. Nach der Entfernung der Salpetersäure durch Eisenchlorür und Salzsäure bediente sich Kreuzler der Sachsse-Kormann'schen Methode zur Bestimmung des in organischer Verbindung (Asparaginsäure) vorhandenen Stickstoffs. Das von mir in Vorschlag gebrachte Verfahren hatte nach meinen Angaben (a. a. O., S. 447) hauptsächlich den Zweck, pflanzliche Extracte so vorzubereiten, dass man dieselben unter Zusatz einer starken Säure durch Eindampfen zur Verbrennung mit Natronkalk tauglich machen konnte.

3) Landw. Vers.-Stat., 33. Bd. (1886), S. 144.

meinem Verfahren die Amidverbindungen in Mitleidenschaft gezogen, so dass Stickstoff in Freiheit gesetzt würde, dann müssten auch die Salpetersäurebestimmungen beeinflusst werden oder das zu messende Gas müsste — falls es mit dem nach der Theorie zu erwartenden Volumen Stickoxyd zufällig übereinstimmt — Beimengungen (Stickstoff) enthalten, die von Eisenvitriol-Lösungen nicht absorbiert werden. Nach Kreuzler's Zahlenreihen war aber dieser nicht absorbierbare Gasrest bei Anwendung von Amiden und Kalisalpeter durchaus nicht grösser, als bei Bestimmungen mit reinem Salpeter.

Obgleich somit der Einwand Kreuzler's gegen die früher von mir geübte Methode kaum zutreffend sein konnte, so haben wir es dennoch nicht unterlassen, dieselbe nochmals zu prüfen. In eine Reihe von Hoffmeister'schen Glasschälchen wurden je 3 gr. Eisenchlorür gebracht, mit starker Salzsäure versetzt, auf dem Wasserbade erhitzt und 5 ccm. menschlicher Harn, welcher mit etwas Natronlauge alkalisch gemacht und darnach mit verschiedenen Mengen Kaliumnitrat und -Nitrit versetzt worden war, tropfenweise in die heisse Mischung des Schälchens gebracht. Nach dem Eindampfen und gelindem Trocknen wurde der Stickstoffgehalt in dem Rückstande nach Kjeldahl's Methode ermittelt und folgende Zahlen erhalten:

Zusatz:	N-Gehalt in 5 ccm. Harn:
1. 0. . . . .	0,06038 gr.
2. 0. . . . .	0,06091 »
3. 0,1 gr. $\text{KNO}_3$ . . . . .	0,06025 »
4. 0,2 » » . . . . .	0,05997 »
5. 0,1 » $\text{KNO}_2$ . . . . .	0,06106 »
6. 0,2 » » . . . . .	0,05997 »

Da diese Resultate eine recht befriedigende Uebereinstimmung unter einander zeigen und auch R. Warrington<sup>1)</sup>, ohne, wie es scheint, meinen früheren Vorschlag zu kennen, bei Befolgung derselben Methode zu brauchbaren Ergebnissen gekommen ist, so haben wir das in Rede stehende Verfahren bei der Untersuchung des Harns nach der Nitrification beibehalten.

1) Chemical News, 52. Bd. (1885), S. 163.

Je 100 chem. des Filtrates (s. w. o. S. 108) wurden in der angegebenen Weise von salpetriger und Salpetersäure befreit, eingedampft und nach Kjeldahl weiter behandelt. Zur Bestimmung der Nitrificationsproducte wurden je 100 chem. des Filtrats mit verdünnter Kalilauge stark alkalisch gemacht und eine Lösung von übermangansaurem Kali so lange zugesetzt, bis Entfärbung auch bei längerem Stehen nicht mehr eintrat; alsdann wurde die Mischung auf ein kleines Volumen gebracht und die Salpetersäure nach dem Schlösing-Tiemann'schen Verfahren bestimmt. Der ausgewaschene Rückstand, hauptsächlich aus Boden bestehend, wurde mit Natronkalk verbrannt.

In den angewandten Substanzen fand sich vor der Fäulniss und Nitrification:

in 20 chem. Harn . . . . .	0,2764 gr. N
in 10 gr. Boden . . . . .	0,0602 » »
	<hr/>
	0,3366 gr. N.

I. Nach 6 monatlicher Versuchsdauer wurde wiedergefunden:

Im Filtrat	) in Form von $\text{NH}_3$ u. organ. Verbindungen	0,1204 gr. N
		) » » » $\text{N}_2\text{O}_3$ u. $\text{N}_2\text{O}_5$ . . . . .
Im ausgewaschenen Boden . . . . .		0,0691 » »
		<hr/>
		0,3053 gr. N
Verlust durch die Nitrification. . . . .		0,0323 » »

II. Nach 8 Monaten wurde in dem nitrificirten Harn wiedergefunden:

Im Filtrat	) in Form von $\text{NH}_3$ u. organ. Verbindungen	0,1231 gr. N
		) « » » $\text{N}_2\text{O}_3$ u. $\text{N}_2\text{O}_5$ . . . . .
Im ausgewaschenen Boden . . . . .		0,0677 » »
		<hr/>
		0,3027 gr. N
Verlust bei der Nitrification . . . . .		0,0339 » »

Da in die Vorlagen nur unbestimmbare Spuren von Ammoniak übergegangen waren, so ergibt sich aus vorstehenden Bestimmungen, dass unter den von uns eingehaltenen Bedingungen der Nitrificationsprocess von einem erheblichen Stickstoffverlust begleitet war. Letzterer betrug nach 6 monatlicher Versuchsdauer  $9.6\%$ , nach 8 Monaten  $10.1\%$ .

Wir müssen uns damit begnügen, obiges Factum festgestellt zu haben, und können über den chemischen Vorgang, durch welchen bei der Nitrification Stickstoff in gasförmiger Gestalt entweicht — ob durch directe oder indirecte Oxydation des Ammoniaks, Wechselwirkung zwischen Nitriten und organischen Stickstoffverbindungen oder Reduction — zur Zeit nur Vermuthungen anstellen. — Das Ammoniumnitrat scheint sich nicht spontan zu zersetzen, sondern ist in verdünnten sterilisirten Lösungen sehr constant. Wir haben einprocentige Lösungen des reinen Salzes längere Zeit hindurch aufbewahrt und den Ammoniakgehalt wiederholt bestimmt, ohne eine Verminderung desselben zu beobachten. Eine Wechselwirkung zwischen den Nitriten und anderen Stickstoffverbindungen dürfte ebenfalls in unseren Versuchen ausgeschlossen gewesen sein, da vor dem Eintritt der Nitrification die saure Reaction des verdünnten Harns in eine alkalische übergegangen war, später neutral wurde und sich im weiteren Verlauf des Versuchs nicht mehr änderte. Es scheint indessen sehr wohl möglich zu sein, dass in den tieferen Flüssigkeitsschichten oder in dem sehr humusreichen Ackerboden, dessen wir uns bedient hatten, ein Theil der Nitrite oder Nitrate wieder reducirt worden ist und hierin vielleicht — in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen Schlösing's, Dehérain's und Maquenne's, sowie Tacke's<sup>1)</sup> — die Erklärung für den Stickstoffverlust liegt. Unter natürlichen Verhältnissen dürfte überhaupt, wie bereits hervorgehoben, der Nitrification häufig eine Reduction in den tieferen Lagen der dem Zerfall unterliegenden organischen Stoffe folgen und diese Ansicht in Anbetracht der grossen Löslichkeit und der leichten Beweglichkeit der Nitrate und Nitrite in erdigen Gemischen auf keine Schwierigkeiten stossen. Wir hoffen, über die Ergebnisse hierauf gerichteter Arbeiten später berichten zu können.

<sup>1)</sup> S. w. o. Seite 106. No. 4.