

# Über die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze.

Von

S. Kostytschew und E. Tswetkowa.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität St. Petersburg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 18. September 1920.)

Nachdem durch klassische Untersuchungen Boussingaults<sup>1)</sup> nachgewiesen worden war, daß für Samenpflanzen Nitrate wohl die beste Stickstoffquelle vorstellen, tauchte die Frage auf, in welcher Weise sich der Übergang von Salpetersäure zur Aminogruppe des Eiweißes vollzieht? Gegenwärtig ist die Annahme vorherrschend, daß Salpetersäure über salpetrige Säure zu Ammoniak reduziert wird; erst danach soll die eigentliche Stickstoffresorption, die sich in der Synthese organischer Stickstoffverbindungen offenbart, zustande kommen<sup>2)</sup>. Doch schließen sich nicht alle Forscher dieser Meinung an; einige setzen voraus, daß eine vollkommene Reduktion der Salpetersäure nicht nötig ist und auch tatsächlich nicht zustande kommt. So behaupten z. B. Baudisch und Mayer<sup>3)</sup>, daß die Nitratreduktion in Samenpflanzen einen direkten photochemischen Vorgang vorstellt und nicht zur Ammoniakbildung fortschreitet. Zaleski<sup>4)</sup> und Suzuki<sup>5)</sup> haben zwar

<sup>1)</sup> J. B. Boussingault, *Agronomie, chimie agricole et physiologie* Bd. 1, S. 1—283 (1860).

<sup>2)</sup> Trier, *Über einfache Pflanzenbasen und ihre Beziehung zum Aufbau der Eiweißstoffe und Lezithine* S. 39 (1912).

<sup>3)</sup> O. Baudisch und E. Mayer, *Diese Zeitschr.* Bd. 89, S. 175 (1914).

<sup>4)</sup> W. Zaleski, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.* Bd. 15, S. 536 (1897); Bd. 27, S. 56 (1909).

<sup>5)</sup> U. Suzuki, *Bot. Centralbl.* Bd. 75, S. 289 (1898).

schon längst dargetan, daß grüne Pflanzen nicht nur am Lichte, sondern auch in Dunkelheit Nitrate assimilieren, wenn sie über fertige Kohlenhydrate verfügen, und diesen Angaben sind noch zahlreiche Ergebnisse verschiedener Forscher mit niederen Pflanzen anzureihen, doch weisen Baudisch und Mayer mit Recht darauf hin, daß alle diese Tatsachen der Annahme nicht widersprechen, daß direkte photosynthetische Nitratassimilation allenthalben einen natürlichen Vorgang vorstellt: Zaleski und Suzuki haben nur dargetan, daß Lichtstrahlen unter Umständen durch eine andere Energiequelle, namentlich durch eine gesteigerte Kohlenhydratverbrennung ersetzt werden können.

Es ist in der Tat sehr wahrscheinlich, daß grüne Pflanzen eine direkte photochemische Reduktion der Nitrate bewirken; zugunsten dieser Annahme spricht wohl auch der Umstand, daß bei Ausschluß der Lichtwirkung Nitrate von allen Pflanzen schlechter assimiliert werden als Ammoniumsalze, indes am Lichte Nitrate unstreitig die beste Stickstoffquelle für grüne Pflanzen vorstellen. Schimmelpilze, welche über keine photochemischen Induktoren verfügen, gedeihen immer besser auf Ammoniumsalzen als auf Nitraten. Laurent<sup>1)</sup> suchte zwar nachzuweisen, daß Nitrate für einige Schimmelpilze die beste Stickstoffnahrung bilden, doch sind seine Resultate durch Ritter<sup>2)</sup> widerlegt worden. Dieser Forscher hat klargelegt, daß bei richtiger Versuchsanordnung alle Pilze Ammoniumsalze bevorzugen, und nur einzelne Arten, wie z. B. *Mucor racemosus*, *Cladosporium herbarum* und *Aspergillus glaucus*, auf Nitraten ein fast ebenso gutes Wachstum wie auf Ammoniumsalzen zeigen. In Betreff der Samenpflanzen liefern interessante Vegetationsversuche von G. Petrow<sup>3)</sup> folgende Hinweise: Das Verhalten der in Dunkel-

<sup>1)</sup> E. Laurent, Ann. Inst. Pasteur Bd. 2, S. 593 (1888); Bd. 3 S. 362 (1889).

<sup>2)</sup> G. Ritter, Materialien zur Physiologie der Schimmelpilze S. 1 bis 17 (1916); Russisch.

<sup>3)</sup> G. Petrow, Stickstoffassimilation durch Samenpflanzen am Lichte und in Dunkelheit S. 209 und 293 (1917); Russisch.

heit auf Zuckerlösungen unter aseptischen Kautelen gezogenen Samenpflanzen ist demjenigen der chlorophyllfreien Organismen analog, indem Ammoniumsalze weit vollkommener als Nitrate ausgenutzt werden, wenngleich letztere an und für sich wohl assimilierbar sind, wie es Zaleski und Suzuki schon längst dargetan haben.

Was die chemische Seite der Nitratassimilation anbelangt, so setzen Baudisch und Mayer voraus, daß Nitrate über Nitrite nicht zu Ammoniak, sondern nur zu Nitrosyl reduziert werden. Der bei gleichzeitig stattfindender photosynthetischer Kohlenstoffassimilation entstehende Formaldehyd verbindet sich mit Nitrosyl zu Formhydroxamsäure, die also als erstes stickstoffhaltiges Assimilationsprodukt anzusehen wäre. Bei Einwirkung ultravioletter Strahlen auf Nitrate in Gegenwart von Methylalkohol haben die Verfasser in der Tat Hydroxamsäure erhalten und ziehen hieraus den Schluß, daß analoge Vorgänge auch in grünen Pflanzen am Sonnenlichte zustande kommen.

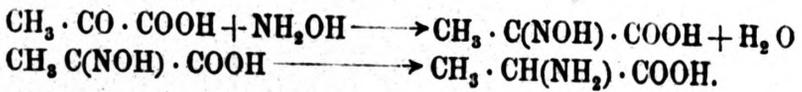
Wir wollen darauf hinweisen, daß die Assimilation des oxydierten Stickstoffs auch durch Vermittlung anderweitiger Reaktionen erfolgen könnte. Will man schon eine unvollkommene Reduktion der Salpetersäure annehmen, so ist die Voraussetzung naheliegend, daß die Nitratreduktion nur zur Bildung der Nitrite führt, denn durch direkte Einwirkung salpetriger Säure auf Ketone entstehen, wie bekannt,  $\alpha$ -Isosnitrosoketone<sup>1)</sup>; die Oximgruppe kann aber leicht zur Aminogruppe reduziert werden. Findet nun schließlich eine oxydative Spaltung der Kohlenstoffkette zwischen der Carbonylgruppe und dem benachbarten stickstofffreien C-Atom statt, so entsteht direkt eine  $\alpha$ -Aminosäure<sup>2)</sup>.

Außerdem könnte auch Hydroxylamin das Reduktions-

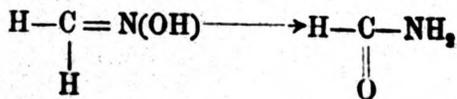
<sup>1)</sup> V. Meyer und Zublin, Chem. Ber. Bd. 11, S. 322 (1878); Claissen und Manass, ebenda Bd. 22, S. 526 (1889).

<sup>2)</sup> Dieser Reaktionsgang ist doch vielleicht wahrscheinlicher als die von Baudisch und Mayer in Betracht gezogenen Umwandlungen der Hydroxamsäuren, die zum Teil sehr problematisch sind, wie es die Verfasser selbst hervorheben.

produkt der Nitrate vorstellen: durch direkte Einwirkung von Hydroxylamin auf eine Carbonylgruppe wird ebenfalls die Isonitrosogruppe gebildet; andererseits liefert die Reaktion zwischen Hydroxylamin und Carbonsäuren die von Baudisch und Mayer in Betracht gezogenen Hydroxamsäure. Die weitere Reduktion der etwa gebildeten Isonitrosogruppe liefert direkt die Aminogruppe. Dieser Vorgang wäre also beinahe antagonistisch demjenigen, den Neubauer und Fromherz<sup>1)</sup> bei der biologischen Desaminierung der Aminosäuren annehmen. Auf diese Weise könnte z. B. Brenztraubensäure, ein ohne Zweifel öfters entstehendes Stoffumwandlungsprodukt der Pflanzen, glatt in Alanin übergehen.



Die Bildung der Aminogruppe aus der Isonitrosogruppe könnte auch durch Beckmannsche Umlagerung bewerkstelligt werden: sind doch zahlreiche Fälle eines Überganges der Isonitrosogruppe in Amido- bzw. Lactamgruppe bekannt. Eine analoge intramolekulare Umlagerung setzt auch Bach<sup>2)</sup> voraus, der wohl als Erster den Vorgang der Nitratassimilation der grünen Pflanzen chemisch zu erläutern versuchte. Das durch Reduktion der Salpetersäure entstandene Hydroxylamin liefert, nach Bachs Annahme, mit dem photosynthetisch gebildeten Formaldehyd Formaldoxim, welcher durch intramolekulare Umlagerung in Formamid übergeht.



Alle soeben erörterten, chemisch erklärbaren Fälle der möglichen Nitratreduktion haben wir erwähnt, um zu zeigen, daß vom chemischen Standpunkt aus verschiedenartige biologische Umwandlungen des oxydierten Stickstoffs annehmbar sind; nur direkte Experimente können darüber entscheiden, welcher Weg der richtige ist.

<sup>1)</sup> Neubauer und Fromherz, Diese Zeitschr. Bd. 70, S. 32 (1911).

<sup>2)</sup> A. Bach, Comptes rendus Bd. 122, S. 1496 (1896).

Nun wollen wir die bisher erhaltenen experimentellen Ergebnisse über Nitratreduktion durch grüne Pflanzen kurz zusammenfassen.

Nur Nitrite wurden als Reduktionsprodukt der Nitrate in Samenpflanzen aufgefunden. Laurent<sup>1)</sup> hat als Erster darauf hingewiesen, daß salpetrige Säure als ein Produkt der Nitratreduktion durch grüne Pflanzen anzusehen ist. Doch sind die Ergebnisse des genannten Forschers nicht ganz zuverlässig, da die Möglichkeit einer Mitwirkung der niederen Organismen in seinen Versuchen nicht ausgeschlossen war. Seitdem haben jedoch Godlewski und Polzeniucz<sup>2)</sup> Nitritbildung in reinen Kulturen der Samenpflanzen nachgewiesen, was bald darauf von Nabokich<sup>3)</sup> bestätigt wurde. Als dann haben verschiedene Forscher außer Zweifel gestellt, daß eine Reduktion von Salpetersäure zur salpetrigen Säure in Samenpflanzen nicht nur bei Sauerstoffzutritt, sondern auch bei Sauerstoffabschluß stattfindet<sup>4)</sup>.

Das weitere Schicksal der Nitrite konnte jedoch nicht verfolgt werden, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß bei dem gegenwärtigen Stande der biochemischen Methodik derartige Versuche mit Samenpflanzen kaum ausführbar sind. Dagegen erscheinen die Stoffumwandlungen der Schimmelpilze einer experimentellen Untersuchung weit zugänglicher; aus diesem Grunde haben wir unsere Untersuchungen vorläufig nur mit diesen Objekten ausgeführt. Die mit Schimmelpilzen erhaltenen Resultate können zwar auf Samenpflanzen nicht ungezwungen verallgemeinert werden, da die Nitratreduktion durch Schimmelpilze ohne Mitwirkung von Strahlenenergie vor sich geht, doch ist es wohl einleuchtend, daß bei gegen-

<sup>1)</sup> E. Laurent, *Ann. Inst. Pasteur* Bd. 4 (1890).

<sup>2)</sup> E. Godlewski und Polzeniucz, *Anz. d. Akad. d. Wiss. Krakau* S. 227 (1901).

<sup>3)</sup> A. Nabokich, *Ber. deutsch. bot. Ges.* Bd. 21, S. 398 (1903).

<sup>4)</sup> A. So, *Beih. z. bot. Cbl.* Bd. 15, S. 208 (1903); Moddermann, *Chem. Cbl.* S. 377 (1888); Giustiniani, ebenda S. 930 (1896); Kastle and Elvove, *Amer. chem. Journ.* Bd. 31, S. 606 (1904); Mazé, *Ann. Inst. Pasteur* Bd. 25, S. 289 und 369 (1911); Bach, *Biochem. Zeitschr.* Bd. 52, S. 412 (1913).

wärtigem Sachverhalt eine jede experimentell begründete Tatsache auf dem Gebiete der biologischen Nitratreduktion, wie überhaupt der Stickstoffassimilation, großes Interesse darbietet.

In Betreff der Nitratreduktion durch Schimmelpilze sind die Angaben verschiedener Forscher leider nicht immer zuverlässig, da die nicht selten gleichzeitig stattfindende Desaminierung der Aminosäuren unter Ammoniakabspaltung nur zu oft außer acht gelassen worden war. Bereits Schloesing und Muntz<sup>1)</sup> haben in Nitratkulturen der Schimmelpilze ganz geringe Ammoniakmengen entdeckt und ohne Bedenken auf eine Nitratreduktion zurückgeführt, da der Vorgang der Desaminierung zu jener Zeit noch gar nicht bekannt war. Es ist aber kaum zweifelhaft, daß die Ammoniakausbeuten der genannten Forscher namentlich das Resultat einer Desaminierung vorstellen. Aus eben demselben Grunde ist auch die Arbeit von Nägeli und Loew<sup>2)</sup> nicht beweiskräftig. Alsdann hat Laurent<sup>3)</sup> in einigen Nitratkulturen der Schimmelpilze Nitrite nachgewiesen, die aber ohne merkbare Regelmäßigkeit zum Vorschein kamen. So ergaben z. B. *Aspergillus niger* und *Aspergillus glaucus*, die mit Nitraten ganz gut auskommen, nicht die geringste Menge von Nitrit. K. Wolf<sup>4)</sup> hat ebenfalls eine Nitritbildung in Nitratkulturen von *Mucor Mucedo* wahrgenommen.

Vorstehend erwähnte ältere Arbeiten liefern uns meistens nur vereinzelte, beiläufig gemachte Beobachtungen. In neuerer Zeit hat Hagem<sup>5)</sup> darüber berichtet, daß in Nitratkulturen einiger *Mucoraceen* zuweilen Nitrite und Ammoniak entstehen. Doch hat der Verfasser bei scheinbar gleichen Verhältnissen in verschiedenen Versuchen entweder Bildung oder Abwesenheit von Nitrit verzeichnet. Solche Resultate können

<sup>1)</sup> Schloesing et Muntz, Comptes rendus Bd. 86, S. 892 (1878).

<sup>2)</sup> C. Nägeli und O. Loew, Sitzungsber. Bayer. Akad. Bd. 10, S. 277 (1880).

<sup>3)</sup> E. Laurent, Bullet. de l'Acad. de Belgique Bd. 20 S. 309 (1890).

<sup>4)</sup> K. Wolf, Hygien. Rundschau Bd. 9, S. 546 (1899).

<sup>5)</sup> Hagem, Untersuch. über norweg. Mucorineen (1910).

nicht ausschlaggebend sein, da die Bildung von normalen Zwischenprodukten der Nitratreduktion von leicht zu präzisierenden Regelmäßigkeiten abhängen soll. Ist nun keine Regelmäßigkeit der Nitritanhäufung vorhanden, so kann Nitritbildung als eine gelegentliche Nebenreaktion oder gar als eine pathologische Erscheinung betrachtet werden.

Noch zweifelhafter sind die Angaben des Verfassers über Ammoniakbildung, die er nur qualitativ mit Neßlers Reagens konstatierte, und zwar die Probe in Gegenwart von Zucker ausführte.

Auch die Arbeit von Kossowicz<sup>1)</sup> hat, unserer Meinung nach, keine Lösung der Frage herbeigeführt. Der Verfasser hat eine große Anzahl der Schimmelpilze untersucht und teilt mit, daß Pilze, die auf Nitraten zum guten Wachstum zu bringen sind, in einigen Fällen Nitrite und Ammoniak erzeugen. Auch dieser Forscher hat keine bestimmte Regelmäßigkeit von Nitrit- und Ammoniakbildung festgestellt, doch zieht er aus seinen Versuchen den Schluß, daß Nitrate von Schimmelpilzen über Nitrite zu Ammoniak reduziert werden und daß also nur Ammoniak mit organischen Stoffen Verbindungen eingeht. Es ist jedoch einleuchtend, daß diese Behauptung auf keiner soliden Unterlage fußt: hat doch Butkewitsch<sup>2)</sup> dargetan, daß Schimmelpilze sehr große Mengen von Aminosäuren unter Ammoniakbildung bei Zuckermangel desaminieren. Zum mindesten sollte Kossowicz Kontrollversuche bei Abwesenheit von Nitraten ausgeführt haben, bevor er sein Urteil fällte. Doch hat er dies vernachlässigt und selbst keine quantitativen Ammoniakbestimmungen ausgeführt; die ganze Frage der sekundären Ammoniakbildung hat er gar nicht erwähnt.

Nur die neueste Arbeit von G. Ritter<sup>3)</sup> lieferte eindeutige Resultate in Betreff der Nitritbildung durch Schimmelpilze. Der genannte Forscher hat nachgewiesen, daß in Nitratkulturen der Schimmelpilze immer Nitritbildung fest-

<sup>1)</sup> Kossowicz, Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 400 (1914).

<sup>2)</sup> Butkewitsch, Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 38, S. 147 (1902).

<sup>3)</sup> G. Ritter a. a. O.

gestellt werden kann, wenn man nur dafür sorgt, daß die Reaktion der Nährlösung alkalisch bleibt. Während der Ausführung unserer Untersuchungen, die mittels anderweitiger Kunstgriffe ebenfalls eine regelmäßige Anhäufung der Nitrite in Nitratkulturen der Schimmelpilze zum Vorschein gebracht haben, war die Rittersche Arbeit noch nicht veröffentlicht.

Von den späteren Stufen der Nitratassimilation glaubt Ritter annehmen zu dürfen, daß Nitrite zu Ammoniak reduziert werden; doch hält er eine experimentelle Bearbeitung dieser Frage für nicht möglich, da die primäre Ammoniakbildung von dem Resultate der Desaminierung maskiert sein soll. Unsere nachstehend beschriebenen Versuche zeigen jedoch, daß dieses pessimistische Urteil nicht berechtigt ist.

Eigene Versuche wurden mit Schimmelpilzen *Aspergillus niger* und *Mucor racemosus* ausgeführt. Es ist schon längst bekannt, daß beide Pilze auf Nitraten gut gedeihen. *Aspergillus niger* bietet den Vorteil, daß sein Mycelium ein beträchtliches Gewicht erreicht und also große Mengen von Nährstoffen verarbeitet. Andererseits ist *Mucor racemosus* in der Beziehung beachtenswert, daß er außerordentlich gut Nitrate assimiliert und auch auf Nitriten zum guten Wachstum zu bringen ist. Beide Pilze wurden auf flüssiger Lösung folgender Zusammensetzung gezogen.

In 1 Liter: Rohrzucker . . . . .	50 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1 g
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	1 g
$\text{FeSO}_4$ . . . . .	Spur.

Als Stickstoffquellen dienten verschiedene Mengen Kaliumnitrat oder Kaliumnitrit. Das Wachstum von *Aspergillus* wurde durch Zusatz einer Spur  $\text{ZnSO}_4$  sehr günstig befördert.

Ein jeder Kulturkolben enthielt 100 ccm Nährlösung und wurde im Autoklaven bei  $120^\circ$  im Verlaufe von 20 Minuten sterilisiert. *Aspergillus niger* wurde bei  $34^\circ$ , *Mucor racemosus* bei  $25^\circ$  gezogen. Das Wachstum der Pilze war immer ein ausgezeichnetes; so lieferte z. B. *Aspergillus niger* bereits nach  $2\frac{1}{2}$  Tagen üppige zusammenhängende Decken. Als ein höchst wichtiges Verfahren erwies sich der

Ersatz der Nährlösung unmittelbar vor Beginn des Versuches durch eine frische Lösung entsprechender Zusammensetzung. Nur dieser Methodik verdanken wir die Lösung einiger schwieriger Fragen. Durch besondere Einrichtungen, deren Beschreibung wir für überflüssig halten, ließ sich das Wechseln der Lösungen unter aseptischen Kautelen bewerkstelligen; unsere Kulturen waren immer rein geblieben, was auch die wiederholt ausgeführte Kontrolle bestätigte.

### 1. Versuche mit *Aspergillus niger*.

In erster Linie haben wir uns bemüht, die Regelmäßigkeit der Nitritbildung und den Ursprung des Ammoniaks in lange dauernden Kulturen aufzuklären. In allen unseren Versuchen wurden Ammoniakbestimmungen mittels Destillation bei vermindertem Druck in Gegenwart von Kalkhydrat ausgeführt<sup>1)</sup>. Eine Wiederholung der Butkewitschschen Versuche ergab, daß Peptonkulturen große Ammoniakmengen durch Desaminierung bilden:

Eine 7 tägige Kultur. Stickstoffquelle 2,5 g Pepton. Die Ammoniakbestimmung ergab:  $\text{NH}_3 = 18,6 \text{ mg}$ .

Eine 11 tägige Kultur, unter denselben Verhältnissen gezogen, ergab:  $\text{NH}_3 = 211,8 \text{ mg}$ .

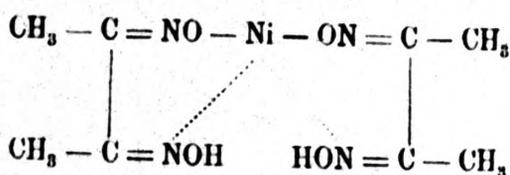
Es ist nun einleuchtend, daß auch in Nitratkulturen durch Desaminierung der Spaltungsprodukte der Plasmaeiweiße Ammoniak erzeugt werden kann.

In weiteren Versuchen wurde immer ein mehrmals umkristallisiertes Präparat von Kaliumnitrat als Stickstoffquelle verwendet. Eine jede Kultur erhielt immer 0,75 g  $\text{KNO}_3$ , also 0,103 g Nitratstickstoff.

Die erste Versuchsserie hatte den Zweck, die Bedingungen der Nitritanhäufung festzustellen. Es wurden nur qualitative Proben auf Nitrit nach Griess ausgeführt. Außerdem haben wir auch Proben auf Hydroxylamin und auf Hydroxamsäuren angestellt. Für den Nachweis von Hydroxylamin bedienten

<sup>1)</sup> P. Rona, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 3, S. 771 (1910).

wir uns der modifizierten Tschugajew'schen Dioximinreaktion, die äußerst empfindlich und vollkommen zuverlässig ist. Tschugajew<sup>1)</sup> hat diese Reaktion als eine scharfe Probe auf Nickelsalze empfohlen, doch kann sie auch für den Nachweis von Hydroxylamin in folgender Modifikation dienen. Versetzt man sehr verdünnte Lösung von einem Hydroxylaminsalz mit etwas Diacetylmonoxim  $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{C}(\text{NOH}) \cdot \text{CH}_3$  und Spur eines Nickelsalzes, so entsteht bei schwach alkalischer Reaktion der charakteristische hochrote Niederschlag der komplexen Dimethylglyoximnickelverbindung:



Die Betrachtung der charakteristischen Kristalle unter dem Mikroskop sichert vor jedem Irrtum. Dies ist zweifellos die beste Probe auf Hydroxylamin. Nach Hydroxamsäuren haben wir mit Ferrichlorid gefahndet. Unsere Versuche ergaben ganz eindeutig, daß in Gegenwart von Zucker gar keine Anhäufung von Nitrit und Ammoniak stattfindet, was wohl auf ein Überwiegen synthetischer Vorgänge zurückzuführen ist.

Um eine regelmäßige Bildung von Nitrit zu erzielen, haben wir folgenden Weg eingeschlagen. Vom Gedanken ausgehend, daß Hemmung synthetischer Vorgänge eine Bildung von intermediären Produkten der Nitratverarbeitung zur Folge haben soll, ließen wir unsere Kulturen eine Zeitlang entweder bei Abwesenheit von Zucker oder bei Sauerstoffabschluß verbleiben, was auch in der Tat immer Nitritanhäufung hervorrief. Besonders deutliche Resultate lieferten Versuche ohne Zuckergabe. Zu diesem Zweck haben wir zwei gleichzeitig gezogene Kulturen auf folgende Weise behandelt: die Nährlösung wurde abgegossen, die untere Fläche der Pilzdecken mit destilliertem, sterilisiertem Wasser wiederholt abgspült

<sup>1)</sup> L. Tschugajew, Zeitschr. f. analyt. Chemie Bd. 46, S. 144 (1905); Chem. Ber. Bd. 39, S. 2692 (1906); Bd. 40, S. 3498 (1907); Bd. 41, S. 2246 (1908).

und alsdann frische Lösungen eingegossen. Die eine Kultur erhielt Nitratlösung mit 5% Zucker, die andere aber erhielt Nitratlösung ohne Zucker. Nach einigem Stehenlassen haben wir in der zuckerfreien Kultur jedesmal Nitrit nachweisen können, indes in der Zuckerkultur gar keine Spur von Nitrit vorhanden war. Daß Nitrit ein Umwandlungsprodukt des Nitrats vorstellt, beweisen Versuche, in denen die ursprüngliche Nährlösung durch destilliertes Wasser ersetzt worden war. In diesem Falle war gar keine Nitritbildung zu verzeichnen. Bei Sauerstoffabschluß bildete sich Nitrit auch in Gegenwart von Zucker, da der streng aerobe Pilz an Mangel der für synthetische Vorgänge notwendigen Energie litt.

Proben auf Hydroxamsäuren und Hydroxylamin fielen immer negativ aus. Auch Versuche, die etwa gebildete Isonitrosogruppe mit Salzsäure zu verseifen und dann Hydroxylamin zu entdecken, ergaben in verschiedenen Fällen durchaus negative Resultate.

Die zahlreichen Versuche über Nitritbildung ergaben vollkommen eindeutige Resultate. In der Tabelle 1 sind einige Ergebnisse mit Kulturen von verschiedenem Alter zusammengestellt.

Die Resultate der in Tabelle 1 zusammengestellten Versuche erlauben wohl den Schluß zu ziehen, daß Salpetersäure regelmäßig zur salpetrigen Säure reduziert wird.

In der zweiten Versuchsserie haben wir den Ursprung des Ammoniaks in lange dauernden Kulturen aufgeklärt. Mit voller Bestimmtheit ergab es sich, daß eine beträchtliche Ammoniakanhäufung in alten, bereits an Zuckermangel leidenden Kulturen mit der Nitratreduktion gar nichts zu tun hat und auf eine Desaminierung der Eiweißabbauprodukte zurückzuführen ist. Dafür sprechen folgende schlagende Tatsachen:

1. Nicht nur in Gegenwart von Nitrat, sondern auch auf reinem Wasser entstehen immer große Ammoniakmengen. In einigen Fällen waren die Ammoniakausbeuten auf Wasser größer als auf Nitrat- oder Nitritlösungen. Die Schwankungen der Ammoniakmengen in verschiedenen Kulturen sind nur auf



ungleiche Üppigkeit und ungleichen Stickstoffgehalt der Pilzdecken zurückzuführen.

2. Beim dauernden Verweilen der Pilzkulturen auf zuckerfreien Lösungen sind Aminosäuren als Material für die Ammoniakbildung in der Lösung vorhanden.

3. Wo beträchtliche Ammoniakmengen bzw. Aminosäuren im Substrate nach dauerndem Zuckermangel auftreten, sind die Mycelien immer erschöpft und enthalten auffallend wenig Stickstoff; es findet also unter derartigen Umständen eine starke Autolyse statt. So haben wir im Versuche 22 (Tabelle 2) gezeigt, daß eine Kontrollkultur, die mit den Versuchskulturen gleichzeitig gezogen wurde, 55 mg Stickstoff im Micelium enthielt, indes der Stickstoffgehalt der beiden im Verlaufe von 7 Tagen auf Wasser bzw. Nitratlösung belassenen Mycelien gleich 17,8 resp. 10,6 mg war. Im Versuche 24 haben wir ebenfalls in Kontrollkulturen 39 resp. 41 mg, in Versuchskulturen aber 15 resp. 10 mg Stickstoff im Mycelium gefunden.

4. Die Ammoniakbildung auf reinem Wasser ist keineswegs darauf zurückzuführen, daß die schon früher in Hyphen aufgespeicherten Nitrate einer Reduktion anheimfallen, denn im Mycelium ist niemals Nitrat oder Nitrit zu entdecken und die Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl und nach Jodlbauer ergeben immer ganz gleiche Resultate. Wir haben wiederholt folgende Prüfungen ausgeführt: junge, auf Nitrat gezüchtete Pilzdecken wurden aufgehoben, mit Wasser gründlich ab gespült, dann entweder mit Quarzsand zerrieben und in Buchnerscher Presse abgepreßt, oder mit Wasser abgekocht. Weder Preßsaft noch Kochsaft gaben die äußerst empfindlichen Proben auf Salpetersäure, salpetrige Säure und Hydroxylamin.

Aus Versuchen der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß bereits nach 7 tägigem Verweilen auf zuckerfreien Lösungen eine sehr beträchtliche Autolyse der Mycelien nebst ausgiebiger Ammoniakbildung zustande kommt. Bedenkt man nun, daß bei normaler Pilzentwicklung auf allgemein üblichen Nährlösungen der Zucker in wenigen Tagen vollkommen verbraucht wird, so muß man zur Überzeugung gelangen, daß sämtliche Ammoniakbe-

stimmungen in alten Nitratkulturen, die von Kossowicz<sup>1)</sup> und anderen Forschern ausgeführt waren, in keinem Falle eine primäre Nitratreduktion beweisen können<sup>2)</sup>. Alle diese Forscher hatten zweifellos nur mit sekundärer Ammoniakbildung zu tun; eine primäre Reduktion der Nitrate zu Ammoniak wurde bisher noch niemals dargetan.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß nach 4 tägigem Verweilen auf zuckerfreien Lösungen die Ammoniakbildung geringer ist als nach 7 tägigem Hungerzustande. Nach 3 tägigem Zuckerhunger ist noch gar keine Ammoniakbildung zu verzeichnen. Das Verhalten der auf Nitritlösung belassenen Kulturen ist dasselbe wie bei Nitratkulturen.

In unseren Versuchen wurden die Bestimmungen des Gesamtstickstoffs in Mycelien nach Jodlbauer und nach Kjeldahl, die Bestimmungen des Stickstoffs der Aminogruppen im Substrate nach der Formolmethode von Sörensen<sup>3)</sup> ausgeführt. Im Versuche 28 wurden auch Bestimmungen des Nitritstickstoffs nach der kolorimetrischen Methode von Griess<sup>4)</sup> gemacht. Diese Methode haben wir kontrolliert und empfehlenswert gefunden. Es ergab sich, daß sowohl in Gegenwart als bei Abwesenheit von Zucker beträchtliche  $\text{HNO}_2$ -Mengen assimiliert wurden. Die Zuckerkultur hat 35 mg, die zuckerfreie aber 12,9 mg Nitritstickstoff verbraucht. Neben dem Versuch 28 haben auch andere Versuche, auf deren Wiedergabe wir verzichten, außer Zweifel gestellt, daß nach 2- bis 3 tägigem Verweilen auf zuckerfreien Lösungen noch keine Desaminierung eintritt. Sollte es also gelingen, in sehr kurzdauernden Versuchen eine Ammoniakanhäufung zu erzielen, so wäre es höchst wahrscheinlich, daß eine primäre Ammoniakbildung vorliegt. Diese Wahrscheinlichkeit würde zur Gewißheit erhoben, wenn die

<sup>1)</sup> Kossowicz a. a. O.

<sup>2)</sup> Unsere Pilzkulturen auf 100 ccm 5% iger Zuckerlösung haben immer die Gesamtmenge von Zucker nach 5 Tagen vollkommen verbraucht.

<sup>3)</sup> S. P. L. Sörensen, Comptes rendus des trav. du labor. de Carlsberg Bd. 7, S. 1 (1907); H. Jessen-Hansen, Abderhald. Handb. d. bioch. Arb. Bd. 6, S. 262 (191.).

<sup>4)</sup> Illosway, Bull. soc. chim. [2], Bd. 2, S. 317 (1902).

Ammoniakbildung in Gegenwart von Zucker erfolgte, da wir durch zahlreiche Versuche festgestellt haben, daß in Gegenwart von Zucker auch spurenweise Desaminierung in jungen Kulturen nicht zustande kommt<sup>1)</sup>.

Diese Betrachtungen dienten uns als Leitfaden bei der Ausführung von Versuchen, deren Zweck war, die primäre Bildung von Ammoniak- und Aminostickstoff aus oxydiertem Stickstoff zu erläutern. In diesen Versuchen wurden immer Nitratkulturen auf Lösungen von Kaliumnitrit übertragen. Da salpetrige Säure sich als Zwischenprodukt der Nitratverarbeitung erwies, so erachteten wir es als empfehlenswert, vom Nitrit auszugehen. Eine jede Versuchslösung (100 ccm) enthielt immer Nitrit und war entweder zuckerhaltig (5 g in 100 ccm) oder zuckerfrei. Die neutrale Reaktion der Lösung wurde durch Zusatz von Calciumcarbonat in Überschuß gesichert. Unter diesen Verhältnissen wird Nitrit durch Nitratkulturen von *Aspergillus niger* kräftig assimiliert, und es ist also durchaus nicht nötig, auf Nitritlösungen gezogene Kulturen zu verwenden. Das Wachstum von *Aspergillus niger* auf Nitritlösungen ist ein sehr langsames, und durch Experimentieren mit Nitratkulturen haben wir viel Zeit erspart.

Die Resultate von dieser Versuchsserie sind in Tab. 3 zusammengestellt. Sie ergaben folgendes:

1. Kulturen, die im Verlaufe von 48 Stunden auf Nitritlösungen belassen worden waren, haben in Gegenwart von Zucker fast die Gesamtmenge von Nitrit verbraucht (bei Abwesenheit von Zucker war der Nitritverbrauch ein viel geringerer). Doch scheint die größte Menge von Nitritstickstoff bereits von den Pilzhyphen aufgenommen zu sein, da der Stickstoffgehalt der Lösung ein ganz geringer ist. Ammoniak ist in der Lösung gar nicht aufgefunden worden, Aminostickstoff entsteht nur in Gegenwart von Nitrit, nicht aber auf reinem Wasser. Diese Ergebnisse zeigen, daß nach Ablauf von 48 Stunden die Stickstoffassimilation bereits so weit vorgeschritten ist, daß die Frage nach der primären Ammoniak-

<sup>1)</sup> Eine Wiedergabe dieser Kontrollversuche halten wir für überflüssig.

Tabelle 2. Versuche über sekundäre Ammoniakbildung (*Aspergillus niger*).

Nr. des Versuchs	Alter der Kultur in Tagen	Ver-suchsdauer in Tagen	Pilzdecke im Verlaufe des Versuchs auf folgendem Substrat	NH <sub>3</sub> -Stickstoff in mg	Stickstoff der Aminogruppen in mg	Gesamt-N des Myceliums in mg nach Jodlbauer	Gesamt-N des Myceliums in mg nach Kjeldahl
18	7	21	100 ccm Wasser + 0,75 g KNO <sub>3</sub> . . . . .	32,8	—	10,4	—
18	7	21	100 ccm Wasser + 0,63 g KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	48,7	—	—	—
18	7	21	100 ccm Wasser . . . . .	38,7	—	11,5	—
19	7	21	100 ccm Wasser + 0,75 g KNO <sub>3</sub> . . . . .	64,8	—	—	—
19	7	21	100 ccm Wasser + 0,63 g KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	82,2	—	—	—
19	7	21	100 ccm Wasser . . . . .	50,9	—	—	—
20	12	7	100 ccm Wasser + 0,75 g KNO <sub>3</sub> . . . . .	68,0	54,6	—	—
20	12	7	100 ccm Wasser + 0,63 g KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	47,7	46,2	—	—
20	12	7	100 ccm Wasser . . . . .	26,1	26,5	—	—
21	11	7	100 ccm Wasser + 0,75 g KNO <sub>3</sub> . . . . .	20,3	26,2	—	—
21	11	7	100 ccm Wasser + 0,63 g KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	85,5	66,7	—	—
21	11	7	100 ccm Wasser . . . . .	48,9	44,7	—	—
22	7	7	100 ccm Wasser + 0,75 g KNO <sub>3</sub> . . . . .	59,8	—	16,0	17,8
22	7	7	100 ccm Wasser . . . . .	49,1	—	11,8	10,6
22	7	0	Kontrollkultur <sup>1)</sup> . . . . .	—	—	56,7	55,0

23	7	100 ccm Wasser + 0,75 g $\text{KNO}_3$	56,2	—	15,9	16,2
23	7	100 ccm Wasser	38,7	—	14,5	15,1
24	11	100 ccm Wasser + 0,75 g $\text{KNO}_3$	22,9	16,8	17,2	15,0
24	11	100 ccm Wasser + 0,75 g $\text{KNO}_3$	24,1	24,3	18,0	10,0
24	11	Kontrollkultur I <sup>1)</sup>	—	—	39,2	38,9
24	11	Kontrollkultur II <sup>1)</sup>	—	—	41,2	40,8
25	8	100 ccm Wasser + 0,75 g $\text{KNO}_3$	11,5	—	23,2	—
25	8	100 ccm Wasser	10,5	—	16,2	—
26	8	100 ccm Wasser + 0,75 g $\text{KNO}_3$	12,2	—	27,7	—
26	8	100 ccm Wasser	14,0	—	15,4	—
27	10	100 ccm Wasser + 0,75 g $\text{KNO}_3$	7,2	—	15,6	—
27	10	100 ccm Wasser	4,8	—	19,6	—
28	4	100 ccm $\text{H}_2\text{O}$ + 0,63 g $\text{KNO}_3$ + $\text{CaCO}_3$ + 5 g Zucker	0	17,8	—	—
28	4	100 ccm Wasser + 0,63 g $\text{KNO}_3$ + $\text{CaCO}_3$	0	12,6	—	—

<sup>1)</sup> Die Kontrollkulturen wurden nicht auf frische Lösungen übertragen, sondern direkt analysiert.

bildung durch so lange dauernde Versuche nicht gelöst werden kann.

2. Auch 24stündige Versuche ergaben analoge Resultate. In diesen Versuchen wurde Ammoniak gar nicht, Aminostickstoff nur in Gegenwart von Nitrit gebildet. Die größte Menge von Nitritstickstoff wurde aber bereits vom Mycelium assimiliert, wie es besonders deutlich die Ergebnisse des Versuches 34 zeigen. In diesem Versuche haben wir eine vollkommene Stickstoffbilanz ermittelt. Die Kulturen wurden auf Nitratlösungen gezogen, deren Stickstoffgehalt analytisch bestimmt worden war. Am Anfang des Versuches haben wir die Nährlösung quantitativ von der Pilzdecke getrennt und den Stickstoffgehalt der Lösung wiederum nach Jodlbauer ermittelt. Die Differenz der beiden Stickstoffbestimmungen ergibt die Menge des Myceliumstickstoffs am Anfang des Versuches. Der Stickstoffgehalt der frischen Nitritlösung war ebenfalls analytisch festgestellt. Nach 24stündigem Verweilen der Pilzdecke auf dieser Lösung haben wir Bestimmungen des Gesamtstickstoffs in Mycelium und Lösung ausgeführt und außerdem den Ammoniakstickstoff, Aminostickstoff und Nitritstickstoff in Lösung ermittelt. Es ergab sich, daß in Gegenwart von Zucker der größte Teil des verbrauchten Nitritstickstoffs sich im Mycelium wiederfindet. Im Versuch 32 erhielten wir dasselbe Resultat durch eine indirekte Methode, namentlich durch Vergleich des Stickstoffgehaltes der Zuckerkultur mit demjenigen der beiden Kontrollkulturen, die gleich am Anfang des Versuches aufgehoben und analysiert wurden. Auch 24stündige Versuche sind also von zu langer Dauer.

3. Dagegen haben 12stündige Versuche eine vollkommene Lösung der Frage herbeigeführt. Bereits die ersten Versuche ergaben ganz deutliche Resultate. Nach 12stündigem Verweilen der Pilzdecken auf Nitritlösungen ist in der Lösung Ammoniakstickstoff und Aminostickstoff nachweisbar, und zwar in Gegenwart von Zucker. Beachtenswert ist der Umstand, daß der Verbrauch des Nitritstickstoffs der Summe der Mengen von gebildetem Ammoniak- und Aminostickstoff ziemlich genau entspricht. Weder auf reinem Wasser noch

auf nitritfreien Zuckerlösungen war auch eine Spur von Ammoniak und Aminostickstoff aufgefunden.

Die im Versuch 37 auf vorstehend beschriebene Weise ausgeführte Bestimmung der gesamten Stickstoffbilanz ergab in der Tat, daß die Menge des Myceliumstickstoffs im Verlaufe des Versuches unverändert bleibt. Bedenkt man, daß der Stickstoffgehalt des Myceliums am Anfang des Versuches auf Grund von zwei gesonderten Bestimmungen berechnet wird, so wird man wohl die Zahlen des Myceliumstickstoffs als gut übereinstimmende betrachten. Der Verbrauch des Nitritstickstoffs deckt sich mit der Summe des Ammoniak- und Aminostickstoffs.

4. Auch ganz kurzdauernde, 5 stündige Versuche ergaben dieselben Resultate; nur war in diesem Falle sowohl Nitritverbrauch als Bildung von Ammoniak und Aminostickstoff schwächer als in 12 stündigen Versuchen. Selbst nach 2 stündigem Verweilen auf zuckerhaltigen Nitritlösungen haben wir sowohl Nitritkonsum als Ammoniakbildung festgestellt; doch war in diesen Versuchen noch keine Bildung von Aminostickstoff zu verzeichnen.

Durch alle diese Ergebnisse wurde dargetan, daß Nitratstickstoff über Nitritstickstoff in Ammoniakstickstoff und in Aminostickstoff übergeht. Vergleicht man die Resultate verschiedener Versuche aus Tabellen 2 und 3, so wird man wohl ersehen, daß in unseren Versuchen eine Verwechslung der primären Ammoniakbildung mit der sekundären Desaminierung ausgeschlossen war, da beide Vorgänge nicht zu gleicher Zeit hervortreten und in Gegenwart von Zucker eine Desaminierung überhaupt ausbleibt.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, haben wir einige Bestimmungen des Aminostickstoffs nicht nur nach der Formelmethode, sondern auch nach dem volumetrischen Verfahren von van Slyke<sup>1)</sup> ausgeführt. Beide Methoden ergaben gut übereinstimmende Resultate.

<sup>1)</sup> D. D. van Slyke, Journ. of Biolog. Chemistry Bd. 9, S. 185 (1911); Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 5, S. 995 (1912); Bd. 6, S. 278 (1912).

Tabelle 3.  
Versuche über primäre Bildung von Ammoniak und Aminosstoffen (*Aspergillus niger*).

Nr. des Versuchs	Alter der Kultur in Tagen	Verweildauer in Stunden	Pilzdecke im Verlaufe des Versuchs auf folgendem Substrat	NH <sub>3</sub> -N in mg	N der NH <sub>2</sub> -Gruppen in mg	N des Myceliums vor dem Versuche	N des Myceliums nach dem Versuche	Nitrit-N zugesetzt in mg	Nitrit-N verbraucht in mg	Gesamt-N der Lösung in mg nach Jodbauer
29	3	48	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	0	8,2	—	—	36,8	28,5	—
29	3	48	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	0	6,2	—	—	36,6	10,6	—
30	3	48	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	0	5,2	—	—	36,8	36,8	5,5 <sup>1)</sup>
30	3	48	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	0	12,6 <sup>2)</sup>	—	—	36,8	21,3	—
30	3	48	CaCO <sub>3</sub> + Zucker . . . . .	0	0	—	—	—	—	—
31	4	48	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	0	7,5 <sup>3)</sup>	—	—	46,0	41,7	—
31	4	48	CaCO <sub>3</sub> + Zucker . . . . .	0	0	—	—	—	—	—
32	4	24	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	0	Spur	—	63,1	46,0	44,9	8,2
32	4	24	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	0	15,3	—	35,7	46,0	32,2	—
32	4	24	CaCO <sub>3</sub> in Wasser . . . . .	0	0	—	29,4	—	—	—
32	4	0	Kontrollkultur I . . . . .	—	—	—	30,2	—	—	—
32	4	0	Kontrollkultur II . . . . .	—	—	—	34,6	—	—	—
33	3	24	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	0	15,7	—	—	38,6	20,0	—
33	3	24	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	0	14,2	—	—	38,6	10,0	—

34	3	24	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	0	0	62,3	91,8	41,4	38,9	8,3
34	3	24	CaCO <sub>3</sub> in Wasser . . . . .	0	0	46,5	39,4	—	—	—
35	3	12	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	15,9	10,5	—	—	46,0	27,4	—
35	3	12	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	14,2	14,7	—	—	—	—	—
36	3	12	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	13,3	13,6 <sup>4)</sup>	—	—	47,3	25,2	—
36	3	12	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	10,6	15,7	—	—	47,3	22,5	—
36	3	12	CaCO <sub>3</sub> in Wasser . . . . .	0	0	—	—	—	—	—
37	3	12	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	13,4	13,5	39,9	42,8	47,8	28,5	—
37	3	12	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	9,8	14,7	36,0	34,9	47,8	25,7	—
37	3	12	CaCO <sub>3</sub> in Wasser . . . . .	0	0	50,9	51,8	—	—	—
38	3	5	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	6,3	9,7	—	—	47,18	17,5	—
38	3	5	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	4,5	2,1	—	—	—	—	—
38	3	5	CaCO <sub>3</sub> in Wasser . . . . .	0	0	—	—	—	—	—
39	3	5	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	3,8	5,8	48,9	47,7	36,8	9,2	—
39	3	5	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	3,8	5,2	49,1	50,5	36,8	10,3	—
40	3	2	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> + Zucker	2,7	0	—	36,8	3,7	—	—
40	3	2	KNO <sub>2</sub> + CaCO <sub>3</sub> . . . . .	1,8	0	—	36,8	4,6	—	—

<sup>1)</sup> Die N-Bestimmung nach Kjeldahl ergab ebenfalls 5,5 mg.

<sup>2)</sup> Nach van Slyke 11,9 mg.

<sup>3)</sup> Nach van Slyke 7,0 mg.

<sup>4)</sup> Nach van Slyke 10,8 mg.

Aus Resultaten der Tabelle 3 ist der Schluß zu ziehen, daß Nitritstickstoff zu Ammoniakstickstoff reduziert wird. Auch wurde zum erstenmal eine primäre Bildung von Aminostickstoff aus anorganischem Stickstoff durch Pilze nachgewiesen und hierdurch die von verschiedenen Verfassern aufgeworfene Frage nach dem Mechanismus der Eiweißsynthese in Pflanzen in dem Sinne gelöst, daß nicht direkt Eiweiß gebildet wird, wie es einige Autoren annehmen<sup>1)</sup>, sondern daß zunächst Aminosäuren entstehen<sup>2)</sup>, durch deren Verkettung alsdann größere Molekülkomplexe aufgebaut werden. Vom chemischen Standpunkte aus ist auch dieser Weg der theoretisch einzig mögliche.

Es ist leicht einzusehen, daß der Erfolg unserer Versuche einzig und allein der Methode der frischen Lösungen nebst sehr kurzer Versuchsdauer zu verdanken ist. Die ursprünglichen Nährlösungen enthalten oft verschiedene Produkte der Desaminierung und erlauben also keine eindeutigen Schlüsse zu ziehen.

Merkwürdig ist der Umstand, daß die aus Nitrit entstandenen Ammoniak- und Aminostoffe ausschließlich in der Lösung enthalten sind und die Menge des Myceliumstickstoffes im Verlaufe des Versuches unverändert bleibt. Entweder findet Reduktion des oxydierten Stickstoffs und gar auch Synthese organischer Stickstoffverbindungen unter Vermittelung extrazellulärer Fermente außerhalb der Hyphen statt, oder werden zwar sowohl Reduktion als synthetische Vorgänge innerhalb der Pilzzellen bewerkstelligt, doch ist die Geschwindigkeit der Nitritverarbeitung eine so beträchtliche, daß die Reaktionsprodukte nicht sogleich weiter assimiliert werden können und in die Lösung herausdiffundieren. Die Lösung dieser Frage bleibt dahingestellt. Schon jetzt können wir jedoch den Umstand hervorheben, daß innerhalb der Pilzzellen nicht die geringste Menge von Ammoniak nachweisbar ist. Mehrmals haben wir folgende Versuche ausgeführt: die Pilzdecken wurden zerrieben und mit heißem Wasser extrahiert. Weder Ammo-

<sup>1)</sup> Vgl. Pfeffer, Pflanzenphysiologie Bd. 1, S. 464 (1897).

<sup>2)</sup> Eine Isolierung der Aminostoffe hat der eine von uns ausgeführt. Diese Untersuchungen sollen den Inhalt einer gesonderten Mitteilung bilden.

niak noch Amidostickstoff (nach Sachsse) vermochten wir in Extrakten aufzufinden. Der größte Teil des Myceliumstickstoffes ist in Verbindungen enthalten, die nach Stutzer mit Kupferhydroxyd fällbar sind. Dies ist z. B. aus folgenden Bestimmungen zu ersehen.

Zwei dreitägige Kulturen.

Nr. 1. Trockengewicht 399,2 mg.	
Gesamtstickstoff nach Jodlbauer . . .	21,7 mg
„Proteinstickstoff“ <sup>1)</sup> nach Stutzer . . .	18,7 mg.
Nr. 2. Trockengewicht 262,2 mg.	
Gesamtstickstoff nach Jodlbauer . . .	15,5 mg
„Proteinstickstoff“ <sup>1)</sup> nach Stutzer . . .	12,0 mg.

Hydroxylamin und Hydroxamsäuren waren bei keiner Versuchsdauer nachweisbar. Auch wir haben keinmal Amidostickstoff wahrgenommen, obgleich die Prüfungen bei verschiedenartigen Kulturverhältnissen ausgeführt worden waren.

2. Versuche mit *Mucor racemosus* —<sup>2)</sup>.

Versuche mit *Mucor racemosus* ergaben im allgemeinen dieselben Resultate wie diejenigen mit *Aspergillus niger*, nur findet die Verarbeitung des oxydierten Stickstoffs bei *Mucor racemosus* viel langsamer statt. Auch ist der Vorgang der Desaminierung bei *Mucor racemosus* weniger stark ausgeprägt als bei *Aspergillus niger*. Außerdem war der Unterschied zwischen Kulturen auf Zuckerlösungen und denjenigen auf zuckerfreien Substraten bei *Mucor racemosus* bedeutend schärfer als bei *Aspergillus niger*, da der erstgenannte Pilz über keine nennenswerten Vorräte der Nährstoffe verfügt. Auf Nitrit als einziger Stickstoffquelle entwickeln sich schnell üppige Mycelien von *Mucor racemosus*, indes *Aspergillus niger* auf Nitriten nur äußerst langsames Wachstum zeigt.

In der ersten Versuchsserie haben wir festgestellt, daß Nitritbildung in Nitratkulturen nur bei Abwesenheit von Zucker

<sup>1)</sup> In Wahrheit war es freilich nicht lauter Proteinstickstoff.

<sup>2)</sup> Nach Kostytschew und Eliasberg (eine gleichzeitig zu publizierende Mitteilung) ist nur Rasse *Mucor racemosus* — imstande, Rohrzucker zu invertieren, *Mucor racemosus* + enthält dagegen keine Invertase.

stattfindet; die Regelmäßigkeit der Nitritbildung ist also dieselbe wie bei *Aspergillus niger*. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4.

Versuche über Nitritbildung (*Mucor racemosus*).

Nr. des Versuchs	Alter der Kultur in Tagen	Versuchsdauer in Tagen	Pilz im Verlaufe des Versuchs auf folgendem Substrat	Reaktion auf HNO <sub>2</sub>	Reaktion auf Zucker
41	7	—	Urspr. Nährlösung . . . . .	—	+
42	7	—	" " . . . . .	—	+
43	6	—	" " . . . . .	—	+
44	16	—	" " . . . . .	—	+
44	16	—	" " . . . . .	—	+
45	10	5	100 ccm H <sub>2</sub> O + 0,75 g KNO <sub>3</sub>	+	—
45	10	5	100 " " + 0,75 " "	+	—
46	6	7	100 " " + 0,75 " "	+	—
47	7	4	100 " " + 0,75 " " mit CaCO <sub>3</sub> . . . . .	sehr stark	—

Analoge Versuche wurden in großer Zahl ausgeführt und lieferten immer ein und dasselbe Resultat. Auch bei *Mucor racemosus* ist also salpetrige Säure als das erste Reduktionsprodukt von Salpetersäure anzusehen. In der zweiten Versuchsserie haben wir die Ammoniak- und Aminostickstoffbildung in lange dauernden Versuchen studiert. Die Kulturen wurden sowohl auf KNO<sub>3</sub> als auf KNO<sub>2</sub> als Stickstoffquelle gezogen. Die Nitritkulturen haben wir immer mit Calciumcarbonat versetzt, wodurch das Wachstum des Pilzes sehr günstig beeinflusst war.

Nitratkulturen, auf zuckerfreien Nitrat- oder Nitritlösungen im Verlaufe von mehreren Tagen belassen, erzeugten immer eine geringe Ammoniakmenge nebst ziemlich beträchtlichen Mengen von Aminosäuren. Auf reinem Wasser kommt eben dieselbe Ammoniak- und Aminosäurenbildung zustande. Auch bei *Mucor racemosus* wird also nach mehrtägigem Hungerzustande Desaminierung eingeleitet, und eine Verwechslung

der primären Ammoniakbildung mit der sekundären Ammoniakabspaltung ist durchaus nicht ausgeschlossen. Nach 5 tägigem Stehenlassen auf zuckerfreien Lösungen haben wir noch keine sekundäre Ammoniakbildung wahrgenommen.

Einige Versuche über sekundäre Ammoniak- und Aminosäurebildung in Nitratkulturen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Zahlreiche Resultate über diese Frage mitzuteilen, hielten wir für überflüssig.

Tabelle 5.

Versuche über sekundäre Ammoniakbildung in Nitratkulturen.

Nr. des Versuchs	Alter der Kultur in Tagen	Versuchsdauer in Tagen	Pilz im Verlaufe des Versuchs auf folgender Lösung	NH <sub>2</sub> -N in mg	NH <sub>2</sub> -N in mg	Trock.-Gew. des Myceliums in g	N des Myceliums in mg
48	15	12	100 ccm H <sub>2</sub> O + 0,75 g KNO <sub>3</sub>	2,1	12,1	0,235	—
48	15	12	100 ccm H <sub>2</sub> O . . . . .	2,9	10,5	0,253	—
49	6	7	100 ccm H <sub>2</sub> O + 0,75 g KNO <sub>3</sub>	1,7	5,3	0,196	11,6
49	6	7	100 ccm H <sub>2</sub> O + 0,63 g KNO <sub>2</sub>	8,3	3,1	0,175	11,4
49	6	7	100 ccm H <sub>2</sub> O . . . . .	0	6,1	0,210	13,5
50	10	5	100 ccm H <sub>2</sub> O + 0,75 g KNO <sub>3</sub>	0	—	—	—
50	10	5	100 ccm H <sub>2</sub> O + 0,63 g KNO <sub>2</sub>	0	—	—	—
50	10	5	100 ccm H <sub>2</sub> O . . . . .	0	—	—	—

Auch Versuche mit Nitritkulturen ergaben analoge Resultate in Betreff der Desaminierung. Beachtenswert ist der Umstand, daß Nitrit bei Abwesenheit von Zucker gar nicht reduziert wird, indes die Reduktion von Nitrat zu Nitrit namentlich bei Zuckerabschluß stattfindet. Auf Lösungen von Milchsäure, Brenztraubensäure, Glycerin, Mannit und Chinasäure war eine Nitritreduktion ebensowenig wie auf reinem Wasser zu verzeichnen, während ein Zuckerzusatz sofort bedeutenden Nitritverbrauch bewirkte. Wir glauben annehmen zu dürfen, daß auch *Aspergillus niger* Nitrite nur in Gegenwart von Zucker reduziert. Da aber im Mycelium des genannten Pilzes immer vorrätige Kohlenhydrate in bedeutender Menge vorhanden sind, so können zuckerfreie Kulturen eine

Tabelle 6. Versuche über Nitritreduktion und sekundäre Bildung von Ammoniak und Aminosäuren in Nitritkulturen (*Mucor racemosus*).

Nr. des Versuchs	Alter der Kultur in Tagen	Ver-suchsdauer in Tagen	Pilzdecke im Verlaufe des Versuchs auf folgendem Substrat	NH <sub>3</sub> -N in mg	Amino-stickstoff in mg	Nitrit-N zugesetzt in mg	Nitrit-N verbraucht in mg	N des Myceliums nach Jodlbauer	N des Myceliums nach Kjeldahl
52	16	9	KNO <sub>3</sub> + 1% Zucker	10,2	7,0	—	—	19,1	19,6
52	16	9	Wasser	2,6	8,8	—	—	12,9	—
53	23	9	KNO <sub>3</sub> + 5% Zucker + CaCO <sub>3</sub>	21,3 <sup>1)</sup>	19,0 <sup>1)</sup>	34,9	29,0	24,9	23,1
53	23	9	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub>	2,9 <sup>2)</sup>	7,3 <sup>2)</sup>	34,9	0	18,5	17,5
54	9	7	KNO <sub>3</sub> + 5 g Zucker + CaCO <sub>3</sub>	6,4 <sup>3)</sup>	—	36,8	36,5	—	—
54	9	7	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub>	4,8 <sup>3)</sup>	—	36,8	0,4	—	—
54	9	7	CaCO <sub>3</sub> im Wasser	3,9	—	—	—	—	—
55	8	6	KNO <sub>3</sub> + 5 g Zucker + CaCO <sub>3</sub>	Spur	19,4	33,1	25,8	11,0	—
55	8	6	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub>	6,4	3,7	33,1	0	8,0	—
56	11	6	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 1 g Zucker	0	Spur	33,7	13,0	—	—
56	11	6	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g Milchsäure	Spur	8,2	33,7	0	—	—
56	11	6	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g Brenztraubensäure	0	11,2	33,7	3,3	—	—
56	11	6	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub>	6,2	10,5	33,7	1,0	—	—
57	7	3	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 2 g Zucker	—	—	25,7	10,5	—	—
57	7	3	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 1 g Glycerin	0	2,5	29,4	1,2	—	—
57	7	3	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g Milchsäure	Spur	4,8	29,4	0,8	—	—
57	7	3	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub>	—	—	25,7	0	—	—
58	10	4	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 1 g Glycerin	0	5,1	34,9	1,0	—	—
58	10	4	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 1 g Mannit	0	3,1	34,9	0	—	—
58	10	4	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g Brenztraubensäure	0	5,2	34,9	1,8	—	—
58	10	4	KNO <sub>3</sub> + CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g Chinasäure	0	4,2	34,9	0,3	—	—

<sup>1)</sup> Gesamtstickstoff in der Lösung nach Jodlbauer 45,5 mg.

<sup>2)</sup> Gesamt-N in der Lösung nach Ausscheidung des Nitrites 10,2 mg.

<sup>3)</sup> N der Amide nach Sachsse 0 mg.

kleine  $\text{HNO}_2$ -Menge auf Kosten des im Mycelium aufgespeicherten Zuckers assimilieren.

Die Ergebnisse der lange dauernden Versuche zeigen, daß auch bei *Mucor racemosus* die primäre Ammoniak- und Aminosäurebildung von den sekundären Vorgängen getrennt werden muß. Dies haben wir wiederum durch kurzdauernde Versuche erzielt. Es ergab sich jedoch, daß der Vorgang der Nitritverarbeitung bei *Mucor racemosus* langsamer als bei *Aspergillus niger* vor sich geht. So war in Versuchen, die weniger als 48 Stunden dauerten, noch keine nennenswerte Verarbeitung der salpetrigen Säure durch *Mucor racemosus* zu verzeichnen. In 3- und 4 tägigen Versuchen haben wir aber ebenso deutliche Resultate erhalten, wie mit *Aspergillus niger* in 12 stündigen Versuchen. Wir wollen nur einige Resultate wiedergeben. Sie sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7.

Versuche über primäre Bildung von Ammoniak- und Aminostoffen in Nitritkulturen (*Mucor racemosus*).

Nr. des Versuchs	Alter der Kultur in Tagen	Versuchsdauer in Tagen	Pilzdecke im Verlaufe des Versuchs auf folgendem Substrat	Ammoniak-N in mg	N der Aminogruppen in mg	Nitrit-N zugesetzt in mg	Nitrit-N verbraucht in mg
59	7	4	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3 + 5\text{g Zucker}$	3,2	5,8	36,8	9,2
59	7	4	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3$ . . . . .	0	0	36,8	Spur
60	7	3	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3 + 5\text{g Zucker}$	4,5	7,8	36,8	12,0
60	7	3	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3$ . . . . .	0	0	36,8	Spur
60	7	3	5g Zucker in 100ccm Wasser	0	0	—	—
61	8	2	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3 + 5\text{g Zucker}$	0	Spur	35,0	1,1
61	8	2	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3$ . . . . .	0	0	35,0	Spur
62	6	1	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3 + 5\text{g Zucker}$	0	0	40,5	2,1
62	6	1	$\text{KNO}_2 + \text{CaCO}_3$ . . . . .	0	Spur	40,5	0
62	6	1	$\text{CaCO}_3$ in 100 ccm Wasser .	0	0	—	—

Die Übereinstimmung der Analyseergebnisse ist eine sehr befriedigende: In Zuckerkulturen ist die Summe der

Mengen von Ammoniak- und Aminostickstoff genau gleich der Menge des verbrauchten Nitritstickstoffs. Die Beweiskraft dieser Zahlen wird noch durch den Umstand erhöht, daß ohne Zuckergabe, also bei nicht stattgefundenener Nitritreduktion, gar keine Bildung von Ammoniak- und Aminostoffen zu verzeichnen ist. In Versuchen mit *Aspergillus niger* war dieser Zusammenhang durch Gegenwart von Reservekohlenhydraten maskiert.

Mehrmals haben wir Proben auf Hydroxylamin und Hydroxamsäuren ausgeführt, und zwar immer mit negativem Resultate. Ebenso wenig vermochten wir Amidostickstoff (nach Sachsse) in der Lösung nachzuweisen.

Trotzdem sind wir geneigt anzunehmen, daß Nitritreduktion in beiden Pilzen durch die Zwischenstufe von Hydroxylamin bewerkstelligt wird. Der Nachweis von Hydroxylamin ist wahrscheinlich nur infolge großer chemischer Aktivität dieser Substanz bisher mißlungen. Es müssen also spezielle Kunstgriffe zur Entdeckung dieser Zwischenstufe verwendet werden. Unsere Ansicht wird wohl bekräftigt durch die Resultate von Neuberg und Welde<sup>1)</sup>, die über Zwischenstufen der biologischen Reduktion von Nitrobenzol zu Anilin durch Hefe Aufschluß geben. Schon längst hat Pozzi-Escot<sup>2)</sup> auf diese merkwürdige Reaktion hingewiesen. Es könnten entweder Azoxybenzol und Azobenzol oder Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin als Zwischenprodukte der Reduktion vorausgesetzt werden. Neuberg und Welde haben dargetan, daß Hefe nicht imstande ist, Azoxybenzol und Azobenzol zu verarbeiten, aber Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin leicht zu Anilin reduziert. Letztere Stoffe sind also als Zwischenprodukte der Reduktion von Nitrobenzol anzusehen. Die genannten Vorgänge kommen zwar in der Natur nicht vor, da organische Nitroverbindungen in Pflanzen, wie bekannt, gar nicht gebildet, und also anorganische Nitrate

<sup>1)</sup> C. Neuberg und Welde, Biochem. Zeitschr. Bd. 60, S. 472 (1914) und Bd. 67, S. 18 (1914).

<sup>2)</sup> Pozzi-Escot, Etat actuel de nos connaissances sur les oxydases et les reductases (1902).

direkt reduziert werden, doch scheint uns dieser Umstand vom chemischen Standpunkte aus unwesentlich zu sein, da es doch höchst unwahrscheinlich ist, daß der Mechanismus der Nitratreduktion sich von demjenigen der Reduktion von Nitrogruppen unterscheidet.

Durch eine weitere Ausarbeitung unserer Methode hoffen wir nicht nur weitere Zwischenstufen der Nitratreduktion zu entdecken, sondern auch einige Seiten des Problems des biologischen Aufbaues von Aminosäuren und komplizierteren Stickstoffverbindungen aufzuklären.

### Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

1. Die Methoden des Nachweises der Nitratreduktion durch Pilze, die bisher von verschiedenen Forschern verwendet wurden, namentlich aber der Nachweis der primären Ammoniakbildung, können keine befriedigenden Resultate liefern, da der sekundäre Vorgang der Desaminierung ebenfalls Ammoniak liefert und folglich die Herkunft des Ammoniaks unbekannt bleibt. Die in vorliegender Arbeit in Anwendung gebrachte Methode ermöglicht jedoch, primäre Vorgänge von den sekundären zu trennen.

2. Schimmelpilze *Aspergillus niger* und *Mucor racemosus* reduzieren Nitrate zu Nitriten und Ammoniak und synthetisieren alsdann Aminoverbindungen auf Kosten der genannten anorganischen Stickstoffverbindungen und des Zuckers. Als Zwischenstufen der Nitratassimilation und des Eiweißaufbaues haben wir in beiden Pilzen mit Sicherheit salpetrige Säure, Ammoniak und Aminostoffe aufgefunden.

3. Obige Zwischenprodukte der Nitratassimilation, Aminostoffe eingeschlossen, sind immer nur in Lösung vorhanden. Oxydierter Stickstoff ist im Mycelium auch qualitativ nicht nachweisbar. In kurzdauernden Versuchen wird Nitritstickstoff außerhalb der Hyphen in Ammoniak- und Aminostickstoff übergeführt, aber nicht assimiliert: die Gesamtmenge des Myceliumstickstoffes bleibt im Verlaufe des Versuches unverändert.

4. Die Reduktion von Salpetersäure zur salpetrigen Säure vollzieht sich in beiden Pilzen ohne Zuckergabe. Die weitere Verarbeitung der salpetrigen Säure ist aber, wenigstens bei *Mucor racemosus*, nur in Gegenwart von Zucker ausführbar.

5. Ob die photosynthetische Nitratassimilation der Samenpflanzen auf dieselbe Weise wie die Nitratverarbeitung durch Schimmelpilze stattfindet, bleibt dahingestellt.