

teig ist das Gewichtsmischungsverhältnis Kalkteig zu Zuschlag 1:1,6. Unter Benutzung der spezifischen Gewichte von 1,3 für Kalkteig, 1,6 für Quarzsand, 1,0 für Ziegelmehl und 1,6 für den lockeren vulkanischen Gesteinssand ergibt sich das Mischungsverhältnis für den U. P. in Raumteilen zu rd.

1:1,5.

Es werden Raunteile angegeben, da in der Praxis niemals nach Gewichtsteilen gemischt wurde. Dieses Mischungsverhältnis ist also fetter als die von Biehl gegebenen Mauermörtel der Hadriansburg und des Forums zu Rom (1:2,6 bzw. 1:2,7), aber erinnert an die Ergebnisse des gleichen Forschers bei Mauermörteln der Saalburg. Die Korngrößenverteilung des Zuschlages vom U. P. ist der ausgezogenen Kurve der Abb. 1 zu entnehmen. Für den O. P. ergibt sich bei gleicher Berechnung und unter Benutzung des spezifischen Gewichtes von 1,6 für den lockeren Calcitzuschlag das Mischungsverhältnis in Raunteilen zu rd.

1:1.

Die Korngrößenverteilung des Calcitzuschlages gibt die gestrichelte Kurve der Abb. 1.

Den Z. P. ist das gleiche Mischungsverhältnis wie dem O. P. zuzuordnen, nur daß der Calcitzuschlag feiner im Korn ist.

Es handelt sich hier also um ausgesprochen fette Putze, die mit einem hochwertigen Weißkalk angemacht sind. Während es heute zur Gewohnheit geworden ist, die Zuschlagskörnung in den einzelnen Lagen von der Wand bis zur Malsschicht kontinuierlich feiner werden zu lassen, war im Gegenteil dazu die Reihenfolge im alten Rom: Mittel (U. P.) — Fein (Z. P.) — Grob (O. P.) — Fein (Malschicht). Auch verdienen die Marmorsandputze, ihrer großen Härte und Rißfreiheit wegen, größeres Interesse von seiten der modernen Wandmalerei.

Für die Möglichkeit, am Polarisationsmikroskop und Integrationstisch die Messungen auszuführen, bin ich dem Direktor des Mineralogischen Instituts der T. H. Berlin, Prof. Dr. W. Schmidt, zu bestem Dank verpflichtet.

Prof. M. Kutschmann, dem Direktor der Staatlichen Hochschule für die bildenden Künste, Berlin, danke ich für sein stetes Interesse an dieser Untersuchung und für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel.

Eingeg. 21. August 1939. [A. 76.]

Die Assimilation atmosphärischen Stickstoffs durch Bodenbakterien

Von Dr. RUDOLF HÜTTEL, Chem. Universitätslaboratorium München.

Wenn man die Wege überblickt, auf denen der Stickstoff im Stoffwechselgeschehen der belebten Natur auf- und abgebaut wird, so kann man diese zu einem Kreislauf ordnen, dessen wichtigste Angelpunkte das Eiweiß einerseits, Salpetersäure, salpetrige Säure und Ammoniak anderseits sind. Hinzu kommt als wichtige Ergänzung die Vermehrung des Gesamtvorrrats der Natur an gebundenem, allgemein verwertbarem Stickstoff durch Assimilation des molekularen Stickstoffs der Luft. Zu dieser Leistung sind nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse nur einige wenige Mikroorganismen befähigt. Von ihnen sind drei Arten genauer untersucht worden. Die eine, Azotobacter chroococcum, lebt aerob frei im Boden. Die andere, Clostridium pasteurianum, lebt ebenfalls frei, ist aber anaerob und erzeugt ihre Lebensenergie im wesentlichen durch Buttersäuregärung. Da der Chemismus dieses Bakteriums noch wenig untersucht ist, wird es im folgenden uns nicht mehr beschäftigen. Die dritte stickstoffbindende Bakterienart sind die bekannten Knöllchenbakterien, deren zahlreiche, morphologisch nicht oder nur sehr schwer zu unterscheidende Rassen unter dem Namen Bacterium radicicola (in der angelsächsischen Literatur Rhizobium) zusammengefaßt sind. Sie leben mit Leguminosen in Symbiose und bilden an deren Wurzeln völlig mit Bakterien angefüllte Knöllchen.

Auch bei Nichtleguminosen, z. B. an den Wurzeln von Alnus und Elaeagnus und auf den Blättern einiger tropischer Rubiaceen kommen solche Knöllchen vor, für die von einigen Beobachtern Stickstofffixation nachgewiesen wurde. Die in ihnen lebenden Mikroorganismen sind noch wenig charakterisiert, ebenso wie auch über das Stickstoffbindungsgeschehen einiger niederer Pilze noch keine völlige Klarheit herrscht.

Die Bedeutung der Stickstoffsammler für die Landwirtschaft soll durch einige Zahlen gekennzeichnet werden. Am leichtesten und einwandfreiesten läßt sich der Stickstoffzuwachs bei den symbiotischen Leguminosabakterien messen. Kultiviert man eine Leguminose auf einem Felde 1, auf dem vorher eine andere Pflanze gewachsen war, so bleibt ihre Entwicklung hinter der auf einem Vergleichsfelde 2, auf dem schon bisher die gleiche Hülsenfrucht kultiviert wurde, zurück. Dies röhrt davon her, daß im Boden des Feldes 2 bereits die spezifischen Knöllchenbakterien, die die Leguminose braucht, vorhanden sind, während das Feld 1 anfänglich davon praktisch frei ist. Bei sonst gleichen äußeren Bedingungen gibt die Differenz der beiden Erträge also ein Maß für das Wirken der Bakterien. Das Ergebnis solcher Versuche bringt Tabelle 1¹⁾.

Tabelle 1.

Kilogramm Stickstoff je Jahr und Hektar in ober- und unterirdischer Pflanzenmasse	
1. Serradella nach Serradella	216,9 kg
Serradella nach Senf	51,8 kg
Stickstoffgewinn der Bakterien	165,1 kg
2. Lupinen nach Serradella	225,9 kg
Lupinen nach Erbsen	75,3 kg
Stickstoffgewinn der Bakterien	150,6 kg

¹⁾ Schneidewind: Die Ernährung der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, 6. Aufl., Berlin 1928.

Versuch 2 zeigt außerdem, daß die „Serradellarasse“ der Knöllchenbakterien vertretbar ist durch die „Lupinenrasse“.

Auch bei Impfversuchen hat man mit Kuöllchenbakterien, nicht aber anscheinend mit den frei lebenden Stickstoffsammlern, Erfolg gehabt, besonders bei Fruchtwechsel und auf jungfräulichen Böden. Auf einem frisch kultivierten Hochnooroden wurden geerntet²⁾:

Tabelle 2.

	Frischsubstanz je Hektar
Ohne Impfung	1475 kg
Nach Impfung mit dem Impfpräparat „Azotogen“	17900 kg
Nach Impfung mit Impferde	19100 kg

Die chemische Bearbeitung des wissenschaftlich und wirtschaftlich gleich wichtigen Problems der Stickstofffixation hat im Gegensatz zur biologischen und agrikulturchemischen erst verhältnismäßig spät zu einwandfreien Ergebnissen geführt. Die Schwierigkeiten der Aufgabe sind außerordentlich groß, nicht nur infolge der innerhalb der Versuchszeiten minimalen Stoffumsätze, sondern vor allem, weil die Stickstoffbindung einen Vorgang darstellt, der mit energieliefernden Prozessen eng gekoppelt und an die intakte Zelle gebunden ist.

Mit Hilfe der Warburg-Technik kamen Meyerhof u. Burk³⁾ 1928 zu den ersten genauen und reproduzierbaren Erkenntnissen über die Kinetik von Atmung, Stickstoffbindung und Wachstum bei Azotobacter. Auffallend ist besonders die große Atmungsintensität. Als deren Maß hat man die Atmungsgröße Q_{O_2} eingeführt, die den stündlichen Sauerstoffverbrauch der Zelle pro mg Trockengewicht in ml/hr angibt. Sie kann bei jungen, 1 bis 2 Tage alten Azotobacterkulturen bis zu 2000 betragen, während die betreffenden Zahlen für Essigsäurebakterien 200, für Milchsäurebakterien 20 sind. Mit zunehmendem Alter aber sinkt die Atmungsgröße rasch ab und beträgt nach 5 Tagen nur noch 550. Wachstum und Stickstoffbindung gelten unter allen untersuchten Bedingungen parallel. Dies bedeutet, daß in der Azotobacterzelle der fixierte Stickstoff unmittelbar zum Aufbau der Leibessubstanz verwendet wird. Eine zweite merkwürdige Erscheinung findet man in der Abhängigkeit der Azotobacteratmung vom Sauerstoffdruck der Atmosphäre, was bisher bei streng aeroben Bakterien noch nicht beobachtet worden ist. Das Maximum des Sauerstoffverbrauchs liegt bei 15—20% O_2 und sinkt nach beiden Seiten stark ab. Mit abnehmendem Sauerstoffdruck fällt die Atmung umso stärker ab, je höher der Q_{O_2} -Wert der Kultur ist. Man kann dies am besten mit der Annahme erklären, daß das Atmungsferment je nach der absoluten Größe der Atmung bei niedrigem Sauerstoffdruck mehr oder weniger ungesättigt an Sauerstoff ist. Die Sauerstoffkonzentration hat auch Einfluß auf die Stickstofffixation derart, daß das Maximum

²⁾ v. Feilitzen, Z. Bakteriologie II, 29, 198 [1911].

³⁾ Z. physik. Chem. Abt. A 139, 117 [1928]; Meyerhof u. Schulz, Biochem. Z. 250, 35 [1934]; Burk, J. physik. Chem. 34, 1174, 1195 [1930].

der Bindungsgeschwindigkeit bei 4—5% O₂ liegt. Das Verhältnis Mol N₂ fixiert aber wird bei noch kleineren Sauerstoff-Mol O₂ veratmet, aber wird bei noch kleineren Sauerstoffkonzentrationen immer größer, da die Fixation viel weniger stark absinkt als die Atmung. Die Energieausbeute der Oxidation steigt daher mit abnehmendem Sauerstoffdruck. Biologisch muß man diese Erscheinung als Anpassung an die Verhältnisse in den tieferen Bodenschichten deuten, wo der Sauerstoffdruck weit niedriger ist als in der Atmosphäre. Die Hemmung der Atmung bei hohen Sauerstoffdrucken ist reversibel, und es scheint sich dabei um eine Konkurrenzreaktion an aktiven Oberflächen, also um eine Verdrängungshemmung zu handeln⁴⁾. Wenn man den Einfluß des Stickstoffdrucks auf die Fixation messend verfolgen will, und von 0 beginnend zu immer höheren Stickstoffkonzentrationen aufsteigt, so findet man, daß die Fixation bei etwa 5% N₂ einsetzt und bei 20% denselben Wert erreicht wie in Luft.

Im Hinblick auf die Mineralstoffdüngung des Bodens ist ferner die Beobachtung von Endres interessant, daß das Atmungssystem des Azotobacter außerordentlich Ca-empfindlich, d. h. Ca-bürdig ist. Zugleich besteht ein Antagonismus zwischen den Alkali- und Erdalkalikationen. Es ist der Wirkungsgrad der aktiven Zelloberfläche oder das Permeabilitätsoptimum der Zellgrenzschichten an eine äquilibrierte Salzlösung gebunden, in der die vorhandenen Alkalionen durch Calciumionen „entgiftet“ werden.

Es ist eine lange bekannte Tatsache, daß der Azotobacter die N₂-Fixation völlig einstellt, wenn ihm gebundener Stickstoff (Ammoniumsalze, Nitrate, Nitrite, Harnstoff, Asparagin usw.) in ausreichender Menge im Substrat geboten wird. Durch Vergleich der Assimilation molekularen Stickstoffs einerseits und gebundenen anderseits unter verschiedenen Bedingungen kam Burk⁵⁾ zu weiteren Aussagen über die von ihm — weil ihre Wirksamkeit an das Wachstum gebunden ist — „Phyoenzyme“ genannten Aktivatoren der Stickstoffbindung. Burk, Lineweaver u. Horner⁶⁾ fanden für beide Assimulationsprozesse verschiedene pH-Abhängigkeit. Die Fixation verläuft maximal bei pH 7,8 und wird durch pH 6,0 bereits völlig unterbunden. Die Assimilation gebundenen Stickstoffs hat zwar das gleiche Maximum, sinkt aber bei kleinerem pH asymptotisch ab und ist noch bei pH 5,0 meßbar. Calcium ist nach Burk u. Lineweaver⁷⁾ nur dann für Azotobacter eine unbedingte Notwendigkeit, wenn er auf die Bindung elementaren Stickstoffs angewiesen ist, wobei es nur durch Strontium ersetzbar ist. Die Hemmung, die Oxalat oder Fluorid auf das Wachstum ausüben, beruht auf der Ausfällung dieser Erdalkalien und betrifft also ebenfalls nur die Assimilation freien Stickstoffs, während diejenige gebundenen Stickstoffs wenig oder nur kurz gehemmt wird. 1930 entdeckte Bortels⁸⁾, daß geringe Mengen Molybdänsalze das Wachstum des Azotobacter stimulieren. Nach Burk⁵⁾ liegt auch hier wieder eine spezifische Katalyse der N₂-Fixation vor, während das Wachstum in gebundeneem Stickstoff (mit einer Ausnahme, nämlich wenn Amid-N vorliegt^{9, 10)}) kaum beeinflußt wird. Die nötigen Molybdänmengen sind äußerst gering; etwa 100 Teile auf eine Trillion bewirken die höchstmögliche Wachstumssteigerung um 250%. Alle diese Verschiedenheiten in der Beeinflußbarkeit der N₂-Fixation einerseits und der Assimilation gebundenen Stickstoffs anderseits machen es wahrscheinlich, daß beide Reaktionen über zum mindesten teilweise verschiedene Enzymsysteme verlaufen. Aus der Summe dieser komplizierten Zusammenhänge (und ihrer Temperaturfunktionen) versuchte Burk⁵⁾ den Primärakt der Stickstoffbindung, die Vereinigung von N₂ mit einem „Nitrogenase“ genannten Enzym zu einer dissoziierbaren Additionsverbindung, näher zu präzisieren.

Endres u. Kaufmann¹¹⁾ haben in einer Arbeit die Nitrit- und Nitratassimilation des Azotobacter studiert, da sich auf diese Weise die Möglichkeit bot, den Stickstoffumsatz quantitativ zu verfolgen und in Beziehung zu Wachstum und Atmung der Bakterien zu setzen. Derartige Vergleiche sind bei Anwendung von molekularem Stickstoff als N-Substrat nicht möglich, da die stündlich von den Bakterien gebundene Menge

⁴⁾ Endres, Liebigs Ann. Chem. 512, 54 [1934].

⁵⁾ Ergeb. Enzymforschung 3, 23 [1934].

⁶⁾ J. Bacteriol. 27, 325 [1934].

⁷⁾ Arch. Mikrobiol. 2, 155 [1931].

⁸⁾ Ebenda 1, 333 [1930].

⁹⁾ Burk u. Horner, Trans. 3rd Int. Congr. Soil Science 1, 152 [1935].

¹⁰⁾ Hieraus wird der Schluß gezogen, daß irgendein Amid Zwischenprodukt der Stickstoffbindung sei.

¹¹⁾ Liebigs Ann. Chem. 535, 1 [1938].

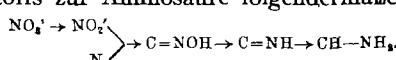
Luftstickstoff infolge ihrer Kleinheit nicht meßbar ist. Endres u. Kaufmann finden mit Hilfe eigens ausgearbeiteter Mikromethoden einen parallelen Gang für Atmung und N-Verbrauch geniessen durch den Quotienten $\frac{\text{Mol N assimiliert}}{\text{Mol O}_2 \text{ veratmet}}$, der sowohl für NO₃-N als auch für NO₂-N etwa 0,07 beträgt. Für das Wachstum ist Nitrat die bessere Stickstoffquelle insofern, als 1 mg Zelltrockengewicht zu seiner Bildung 0,25 mg NO₃-N, aber nur 0,14 mg NO₂-N benötigt. Diese verhältnismäßig hohen verbrauchten Stickstoffmengen weisen darauf hin, daß ein Teil in Form von Ablagerungsprodukten liegen bleibt und nicht zur Synthese von Zellsubstanz verwendet wird. Wichtig ist der Befund, daß während der Nitratreduktion im Substrat Nitrit nachzuweisen ist. Seltsamerweise ist die Menge dieses Zwischenprodukts (es verschwindet wieder, wenn alles Nitrat verbraucht ist) von der Art des Substrats abhängig. In Lactatkulturen beträgt der Nitritspiegel 10—14 γ NO₂-N pro 10 cm³, in Glucosekulturen gewöhnlich nur 2—3 γ. Wahrscheinlich hängen diese Unterschiede mit der Notwendigkeit zusammen, daß die Zelle aus ihrem Nährmedium spezifische Aczeptoren bilden muß, die die Aufgabe haben, die Zwischenprodukte der Assimilation zu binden und abzufangen.

Die thermodynamischen Diskussionen des Fixationsproblems^{3, 12)} haben wenig weiter geführt, sie kranken vor allem an der Unkenntnis des Reaktionsmechanismus. Der seit längerem bestehenden und auch neuerdings immer wieder geäußerten Meinung, daß Ammoniak ein primäres Zwischenprodukt der Stickstoffbindung sei¹³⁾, konnten die experimentellen Grundlagen entzogen werden¹⁴⁾, und dadurch verloren auch die thermodynamischen Überlegungen, die auf dieser Annahme beruhten, viel von ihrem Wert.

1934 konnte nun Endres¹⁵⁾ einen wesentlichen Einblick in den Mechanismus der Stickstoffbindung gewinnen. Es gelang ihm, in Azotobacterkulturen die Anwesenheit von Oximgruppen nachzuweisen und nach der Verseifung des Oxims durch Schwefelsäure das entstandene Hydroxylamin einwandfrei zu identifizieren. Im Gegensatz zu experimentell nicht belegten Angaben von Blom¹⁶⁾ findet Endres kein freies Hydroxylamin, sondern nur gebundenes in Form von „Oxim“. Burk u. Horner¹⁷⁾ bezweifelten die Endressche Annahme und glaubten, daß das gefundene Hydroxylamin ein Abbauprodukt des Zellstoffwechsels sei. Da aber die Entstehung des Oxims ausbleibt, wenn man Azotobacter in Argon-Sauerstoff-Gemischen unter Ausschluß von Stickstoff hält, so ist dieser Einwand widerlegt¹⁸⁾. Der Oximgehalt ist abhängig vom Substrat, er beträgt in Lactat bis zu 14 · 10⁻⁵ Mol/l, in Glucose höchstens 3 · 10⁻⁶ Mol/l. In 3 Tage alten Lactatkulturen sind etwa 10% des insgesamt fixierten Stickstoffs als Oxim in der Nährlösung vorhanden. Nitrit wurde nicht gefunden. Das Oxim ist ein Nebenprodukt, welches nicht oder nur sehr langsam weiterverarbeitet wird. Nur diesem Umstand ist es zu verdanken, daß es sich in analytisch erfassbarer Menge anreichert. Es ist also wahrscheinlich kein Zwischenprodukt, sondern es gibt lediglich für den Mechanismus der N₂-Fixation einen Fingerzeig, der in dem Auftreten dieser biologisch ungewöhnlichen Oxydationsstufe des Stickstoffs begründet ist.

Auch in Nitrit- und Nitratkulturen ist Oxim nachweisbar, u. zw. in etwa der gleichen Menge, als wenn die Bakterien auf molekularem Stickstoff angewiesen sind. In diesem Fall entsteht das Oxim natürlich auch bei Ausschluß von elementarem Stickstoff mittels Argon-Sauerstoff.

Da freies Hydroxylamin, das — wie schon erwähnt — bei Azotobacter nicht nachzuweisen ist, d. h. in einer Konzentration, die größer ist als 5 · 10⁻⁷ Mol/l, in den Kulturlösungen nicht vorhanden sein kann, und diese Verbindung zudem ein starkes Zellgift darstellt, welches in spezifischer Weise die Enzyme der N₂-Fixation hemmt, glaubt Endres, daß der Weg des molekularen Stickstoffs zur Aminosäure folgendermaßen verläuft:



¹²⁾ Burk, J. gen. Physiol. 10, 559 [1927]; Buchanan u. Fulmer, Physiology and Biochemistry of Bacteria, 1928—1930; Wilson u. Peterson, Chem. Reviews 8, 469 [1931]; Fulmer, Ergeb. Enzymforschung 1, 18 [1932].

¹³⁾ Kostytschew, Ryskaltschuk u. Schucezora, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 154, 1 [1926]; Kostytschew, Ryskaltschuk u. Schulezora, ebenda 198, 105 [1931]; Winogradsky, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 190, 661 [1930]; Ann. Inst. Pasteur 48, 269 [1932]; Z. Bakteriologie II 97, 399 [1937].

¹⁴⁾ Burk u. Horner, Trans. 3rd Int. Congr. Soil Sci. 1, 148 [1935]; Soil Sci. 41, 81 [1936].

¹⁵⁾ Naturwiss. 22, 662 [1934].

¹⁶⁾ Z. Bakteriologie II 84, 60 [1931].

¹⁷⁾ Naturwiss. 23, 259 [1935].

¹⁸⁾ Endres, Liebigs Ann. Chem. 518, 109 [1935].

Charakteristisch an dieser Formulierung ist, daß während der Stickstoffbindung kein freies Hydroxylamin auftritt, sondern daß sich die >CNOH-Gruppierung direkt während der Reduktionsvorgänge ausbildet.

Ob die Knöllchenbakterien allein — also ohne ihre Wirtspflanzen — Stickstoff fixieren können, war eine lange umstrittene Frage, die aber nach dem heutigen Stande unserer Kenntnis zu verneinen ist^{19, 20)}. Anderseits wurde die Fähigkeit vor allem keimender Leguminosenpflanzen zur Stickstoffbindung auch unter sterilen Bedingungen noch in allerjüngster Zeit behauptet²¹⁾; doch ist auch diese Möglichkeit heute sehr unwahrscheinlich geworden^{20, 22)}. Man muß also, um bei Rhizobium die Fixation messend verfolgen zu können, das ganze System Pflanze + Bakterien studieren, wozu erst gewisse experimentelle Schwierigkeiten überwunden werden mußten.

An mit Rhizobium geimpftem Rotklee erhielt Wilson folgende Ergebnisse: Der Stickstoffdruck beeinflußt die N₂-Aufnahme nur bei Werten unter 0,1 at, es liegen also etwa dieselben Verhältnisse wie bei Azotobacter vor²³⁾. Die Fixation in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck zeigt ein ziemlich breites Maximum bei 0,05—0,4 at und sinkt nach beiden Seiten schnell ab, u. zw. sowohl für elementaren als auch für gebundenen Stickstoff als Substrat²⁴⁾. Aus dieser letzteren Tatsache kann man schließen, daß der Sauerstoff keine direkte Beziehung zur Stickstoffbindung besitzt, sondern nur eine indirekte, wohl durch Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels. Merkwürdigerweise werden die Knöllchenbakterien in ihrer N-Assimilation auch durch molekularen Wasserstoff gehemmt, u. zw. nur, wenn sie auf elementaren Stickstoff angewiesen sind, nicht aber, wenn dieser ihnen in gebundener Form zur Verfügung steht^{20, 25)}. Dieses Verhalten ist ohne Analogie bei Azotobacter.

Virtanen^{26, 27)} gelang es in den letzten Jahren, das Problem der Stickstoffbindung der Symbionten einer überraschend weitgehenden Klärung zuzuführen. Er fand, daß Erbsen, die mit Bacterium radicicola geimpft worden waren und auf Sandkulturen gezogen wurden, stickstoffhaltige Stoffe in das Medium ausschieden²⁸⁾. Bis zu 80% des total fixierten Stickstoffs konnten bei jungen Kulturen aus dem Sand extrahiert werden. Bei der Aufarbeitung zeigte sich, daß fast der gesamte Stickstoff als L-Asparaginsäure und β-Alanin vorliegt²⁹⁾; letzteres entsteht aus der Asparaginsäure durch die decarboxylierende Wirkung der Knöllchenbakterien³⁰⁾, so daß also im Laufe der Vegetationsperiode der Prozentgehalt an Asparaginsäure allmählich abnimmt zugunsten des β-Alanins. Weiter hat Virtanen festgestellt, daß Asparaginsäure für im übrigen stickstofffrei und steril gehaltene Leguminosen eine ausgezeichnete Stickstoffquelle darstellt. Da nun der Gesamtstickstoffgehalt des Sandes der geimpften Erbsenkulturen zuerst zu-, dann aber abnimmt, so liegt der Schluß nahe, daß die Knöllchen den zunächst im Überschuß gebundenen Stickstoff ausscheiden, den die Wurzeln dann später, wenn die fixierende Fähigkeit der Bakterien nachgelassen hat, wieder aufnehmen. Diese Verhältnisse werden durch Tabelle 3 belegt²⁷⁾.

Tabelle 3.

Alter in Tagen	Vegetationszustand	Im Wasserextrakt	
		mg N	% des Asparaginsäure-N im Extrakt
24	vor dem Blühen	28,8	63,2
33	bei Blühbeginn	118,3	51,7
43	in voller Blüte	56,1	47,0
58	Schoten entwickelt	33,1	35,7

Die Asparaginsäure scheint in den Leguminosen dieselbe Rolle zu spielen wie die Glutaminsäure in tierischen Geweben. Sie

¹⁹⁾ Wilson, Hopkins u. Fred, Arch. Mikrobiol. 3, 322 [1932]; Wilson, Bot. Rev. 3, 365 [1937].

²⁰⁾ Wilson, Ergebn. Enzymforschung 8, 13 [1939].

²¹⁾ Vitz, ebenda 6, 209 [1937].

²²⁾ Smyth u. Wilson, Biochem. Z. 282, 1 [1935]; 287, 418 [1936]; Burk, Plant Physiol. 2, 83 [1927].

²³⁾ J. Amer. chem. Soc. 58, 1256 [1936].

²⁴⁾ Wilson u. Fred, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 23, 503 [1937].

²⁵⁾ Wilson u. Umbreit, Arch. Mikrobiol. 8, 440 [1937]; Wilson, Umbreit u. Lee, Biochemical J. 32, 2084 [1938].

²⁶⁾ Cattle Fodder and Human Nutrition, Cambridge 1938.

²⁷⁾ Virtanen u. Laine, Biochemical J. 33, 412 [1939].

²⁸⁾ Virtanen u. v. Hansen, Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde Abt. A 21, 57 [1931]. Biochem. Z. 282, 1 [1931]; Virtanen, v. Hansen u. Karström, ebenda 258, 106 [1933].

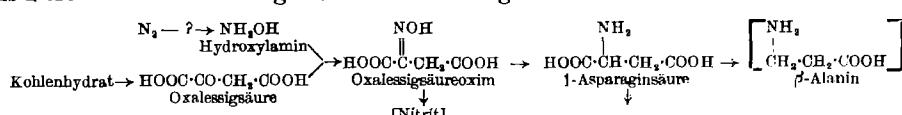
²⁹⁾ Virtanen u. Laine, Nature 138, 756 [1935].

³⁰⁾ Dieselben, Enzymologia 3, 266 [1937].

kann ihren Aminostickstoff auf α-Ketosäuren übertragen und nimmt deshalb wahrscheinlich eine zentrale Stellung in der Eiweißsynthese ein³⁰⁾. Bemerkenswert ist noch, daß Nichtleguminosen in Gemeinschaftskultur mit geimpften Hülselfruchtlern auch auf stickstofffreien Nährböden gedeihen, d. h. also, die von letzteren ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen offensichtlich zur Zellsynthese verwendet können.

Nachdem Endres in Azotobacterkulturen Oximstickstoff entdeckt hatte, erhoben Virtanen u. Laine^{31, 32)} 1936 für die Symbiontenkulturen den gleichen Befund. Wegen der hier höheren Stoffumsätze gelang es ihnen, dieses Oxim zu isolieren, nachdem sie das Kulturmödium Sand durch die leichter extrahierbare Cellulose ersetzt hatten. Es erwies sich als Oxalessigsäureoxim³³⁾. Außerdem wurden geringe Mengen Nitrit nachgewiesen, das durch Zersetzung des wenig beständigen Oxiims entsteht. In älteren Kulturen, wo die N₂-Bindung aufgehört hat, ist kein Oxim nachzuweisen, in jüngeren beträgt die Summe von Oxim-N und Nitrit-N meist 1—2% des total ausgeschiedenen Stickstoffs.

Diese Experimentalbefunde verband Virtanen zu einer Theorie der Stickstoffbindung bei Symbionten, die in folgendem Schema ausgedrückt ist:



Der atmosphärische Stickstoff soll demnach über noch unbekannte Zwischenstufen durch die Bakterien in Hydroxylamin übergeführt werden. Dieses verbindet sich mit Oxalessigsäure, welche dem Kohlenhydratstoffwechsel der Pflanze entstammt, zum Oxim, und dieses wird dann zur L-Asparaginsäure hydrat. Die Pflanze deckt ihren Stickstoffbedarf durch Aufnahme von Asparaginsäure.

Gestützt werden konnte diese Theorie durch den Nachweis ausreichender Mengen Oxalessigsäure in Leguminosen³⁴⁾ und durch den Befund, daß Hydroxylamin auch in sehr verdünnter Lösung gerade mit dieser α-Ketosäure augenblicklich und vollständig in Reaktion tritt³⁴⁾. Ja noch mehr: Wenn man herausgeschnittene Knöllchenbakterien mit Oxalessigsäure versetzt, so erlangen sie die Fähigkeit zur Stickstoffbindung. Daß sie diese vorher nicht besaßen, ist also auf das Fehlen des spezifischen Acceptors Oxalessigsäure zurückzuführen³⁵⁾. Dadurch erhält der Begriff der Symbiose im Falle der Leguminosen und Knöllchenbakterien seine chemische Deutung.

Virtanen u. Laine³⁶⁾ fanden auch in Azotobacterkulturen L-Asparaginsäure auf, aber kein β-Alanin, da dieses Bakterium Asparaginsäure nicht decarboxylieren kann. Im Verein mit dem Oximnachweis von Endres macht dies einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie bei Rhizobium wahrscheinlich. Im Prinzip sind die von Virtanen u. Endres vorgeschlagenen Formulierungen des Fixationsprozesses ähnlich, mit dem Unterschied, daß Endres — vorsichtiger — das Auftreten von freiem Hydroxylamin in der Zelle verneint und glaubt, daß die enzymatische Reduktion des Stickstoffs mit einer gleichzeitig stattfindenden CN-Bindung gekoppelt ist.

Bisherige Versuche, die Ergebnisse Virtanens in anderen Laboratorien zu reproduzieren, sind uneinheitlich verlaufen. Dies ist zum Teil sicherlich auf die Kulturbedingungen zurückzuführen. Die Größe der Exkretion der Stickstoffverbindungen durch die Knöllchen ändert sich mit der Veränderung dieser Bedingungen, wobei Bakterienrasse, Wirtspflanze, Knöllchenanzahl, das Medium und dessen Nitratgehalt die wichtigste Rolle spielen³⁷⁾. Außerdem scheinen aber auch noch unbekannte oder unbeherrschbare Faktoren beteiligt zu sein.

Die überraschende Feststellung von Endres, daß die Bindung des molekularen Stickstoffs nicht über Ammoniak, sondern über die Stufe des Hydroxylamins verläuft, hat eine Reihe neuer Fragen aufgeworfen. Burk hat berechnet, daß die Ammoniakbildung unter den Bedingungen der lebenden Zelle durchaus ohne großen Energieverbrauch, vielleicht sogar unter geringer Energieleistung vor sich gehen könnte. Demgegenüber benötigt die Hydroxylaminbildung einen großen

³¹⁾ Nature 141, 748 [1938].

³²⁾ Suomen Kemistilehti B, 9, 5 [1936].

³³⁾ Nature 142, 165 [1938].

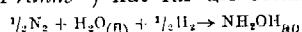
³⁴⁾ Virtanen u. Laine, Suomen Kemistilehti B, 10, 35 [1937]; 11, 25 [1938].

³⁵⁾ Dieselben, ebenda 10, 24 [1937].

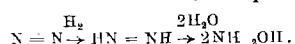
³⁶⁾ Dieselben, ebenda 10, 6 [1937].

³⁷⁾ Virtanen, Saastamoineen u. Laine, ebenda B 10, 28 [1937].

Energieaufwand. Franke³⁸⁾ hat für die Reaktion



bei konstantem Druck eine Wärmetonung von 47,6 kcal berechnet, d. h. diese Wärmemenge wird pro g-Atom umgesetzten Stickstoffs verbraucht. Daraus ergibt sich, daß Hydroxylamin wahrscheinlich nicht das primäre Reduktionsprodukt sein kann. Virlanen diskutiert die Möglichkeit, daß es aus primär gebildetem Diimin entstehe, entsprechend dem Schenks



Ob dieses „Primärprodukt“ nun wirklich Diimin ist oder nicht,

³⁸⁾ Tabulae Biol. 11, 120 [1935].

so bleibt seine Bildung doch schwer verständlich. Man kennt bis heute keine organische oder anorganische Verbindung, die in wässriger Lösung bei gewöhnlicher Temperatur mit molekularem Stickstoff reagiert. Aus diesem Grunde sind alle Modellsversuche, welche z. B. die Erforschung der Atmung so belebt und gefördert haben, nicht möglich. Es scheint hier ein neuer Typ der Enzymwirkung vorzuliegen, eine „Acceptoraktivierung“³⁹⁾, wie man sie heute für die Hydrierung von Nitrat als bewiesen annimmt und auch für die Reduktion von Nitrit, Sulfat, Thiosulfat oder elementarem Schwefel anzunehmen geneigt ist.

Eingeg. 20. November 1939. [A. 109.]

³⁹⁾ Vgl. Franke in Nord-Weidenhagen: Handbuch der Enzymologie, im Druck.

Probleme der Acetatseide und Acetatzellwolle*

Von K. W. ZACHRICH, Freiburg

Die Celluloseacetate haben schon von jener die chemische Technik stark beschäftigt, da sie sich sehr vielseitig für die Herstellung von celluloidähnlichen Massen, für photographische Filme, biegsame Überzüge, Streich- und Tauchlacke, sowie die Herstellung von Kunstfasern und -bändern und anderes mehr verwenden lassen. Ihre besonderen Eigenschaften sind die weitgehende Unbrennbarkeit, die Plastizität bei höheren Temperaturen, die Löslichkeit in einer Reihe von Lösungsmitteln, die chemische Widerstandsfähigkeit und die Beständigkeit gegen Witterungseinflüsse.

Das durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid und Essigsäure auf reine Cellulose in Gegenwart eines Katalysators, z. B. Schwefelsäure oder Zinkchlorid, entstehende Cellulosetriacetat mit einem Essigsäuregehalt von 62,5% ist nur in sehr wenigen, technisch unangenehmen Lösungsmitteln löslich, während das durch teilweise Verseifung mit verdünnter Essigsäure hergestellte Celluloseacetat mit einem Essigsäuregehalt von 54% wesentlich günstigere Eigenschaften aufweist und sich vor allen Dingen in dem technisch häufig verwendeten Aceton auflösen läßt.

Heute wird hauptsächlich dieses acetonlösliche sog. Diacetat, eigentlich 2,5-Acetat — der Essigsäuregehalt des Diacetats beträgt 48,8% —, industriell hergestellt; es hat vor allem bei der Erzeugung von Kunstfasern aus Acetylcellulose große Bedeutung erlangt. Nach wie vor finden jedoch die Celluloseacetate mit hohem Essigsäuregehalt bis zu etwa 61% größtes Interesse, da sie chemisch noch widerstandsfähiger sind als die 2,5-Acetate, und gerade in letzter Zeit sind z. B. bei der Herstellung von Filmen und auch von Kunstseide Fortschritte erzielt worden. In diesem Bericht werden ausschließlich die Probleme der Acetatseide und -zellwolle aus acetonlöslicher Acetylcellulose behandelt.

Im Rahmen des Vierjahresplanes ist die Versorgung der Textilindustrie mit Acetatkunstseide und Acetatzellwolle von ebensolcher Wichtigkeit wie mit anderen Textilfasern, vor allem, wenn man berücksichtigt, daß pro Kilo Acetatkunstseide und -zellwolle nur ~650 g Cellulose benötigt werden.

Von der Weltproduktion der hauptsächlichen Textilrohstoffe von 8–11 Mill. t pro Jahr fallen nach einer Statistik vom Jahre 1937¹⁾ auf

Baumwolle	~62%	Flachs	5 %
Jute	~12%	Kunstseide ohne Zell-	
Wolle	~ 8%	wolle	~4 %
Hanf	6%	Naturseide	~0,4%.

Die Produktion der Acetatkunstseide beträgt ~12% der gesamten Kunstseide und ist demnach etwa so groß wie die der Naturseide.

Die Zellwolle wurde in dieser Tabelle nicht erwähnt. Heute haben sich durch den Vierjahresplan in Deutschland diese Zahlen weitgehend zugunsten der Zellwolle verschoben, die schon mehr als 30% des Baumwolle- und Wollverbrauchs ausmacht. Die Acetatzellwolle spielt produktionsmäßig keine große Rolle, da sie nur für Spezialzwecke verwendet werden kann. Die Produktion der Acetatfaser — darunter ist Kunstseide und Zellwolle verstanden — hat sich in den letzten Jahren ständig erhöht, u. zw. in den verschiedenen Ländern je nach den Voraussetzungen unterschiedlich. So beträgt z. B.

¹⁾ Vorgeschen als Vortrag auf der 52. Hauptversammlung des VDCh in Salzburg, gehalten zur Vortragveranstaltung des VDCh in München am 10. Februar 1940.
Handb. d. Int. Kunstseide- u. Zellwolle-Industrie 1938/39, Berlin, Finanzverlag, S. 24

die Herstellung von Acetatseide in Deutschland 12% der Gesamtseideherstellung an Kunstseide, während sie in den Vereinigten Staaten ~30% beträgt.

Diese Unterschiede beruhen auf den verschiedenen Herstellungskosten bzw. Verkaufspreisen in den beiden Ländern, die Verfasser auf einer längeren Studienreise in den USA eingehend studieren konnte. Die Rohstoffe bei der Erzeugung von Acetylcellulose sind Essigsäureanhydrid bzw. Essigsäure und Linters bzw. Edelzellstoff. Die Herstellung der Essigsäure erfolgt bekanntlich über das Carbid. Kohle und Strom sind in den Vereinigten Staaten infolge des vorherrschenden Tagabbaus der Kohle und der billigen Wasserkraft wesentlich billiger als in Deutschland, und so ist die Essigsäure zu einem günstigen Preis herzustellen. Das gleiche gilt für die Cellulose, die in den Vereinigten Staaten, sei es in Gestalt von Baumwolle bzw. Baumwollinters oder Holzzellstoff, vorteilhaft zur Verfügung steht.

Acetatseide und -zellwolle werden nun vorwiegend nach dem Trockenspinngverfahren versponnen, d. h., die Acetylcellulose wird in Aceton aufgelöst, das beim Spinnen im Trockenspinnschacht verdampft und wiedergewonnen wird. Auch der Gestehungspreis für Aceton, das meist über Essigsäure erzeugt wird, ist aus den erwähnten Gründen in den Vereinigten Staaten günstiger. Aus dieser Lage heraus war es möglich, die Verkaufspreise der Acetatseide in den Vereinigten Staaten sogar teilweise tiefer als die Viscosepreise festzusetzen. Es gelang auch in Deutschland erst dann die Acetatkunstseide stärker an dem Gesamtfaserverbrauch zu beteiligen, als es möglich war, die Herstellungspreise in den niederen und mittleren Titern denen der Viscose anzupassen. Diese Anpassung an die Viscosepreise ist möglich geworden durch Senkung der Rohstoffpreise und durch eine rationell durchgeführte Rückgewinnung der Lösungsmittel mit Ausbeuten bis zu 99,5%. Weiter trägt das Trockenspinngverfahren als solches zur Verbilligung bei, da mit großen Geschwindigkeiten bis zu 1000 m/min gesponnen werden kann, während nach dem Naßspinnverfahren Geschwindigkeiten von 100 m wohl schwierlich überschritten werden können. Hierdurch ist der Lohnanteil bei der Herstellung von Acetatseide hauptsächlich in den niederen Titern sehr gering.

Bei der Acetatzellwolle liegen diese Verhältnisse, infolge des geringen Lohnanteils der Zellwolle überhaupt, viel ungünstiger. Es wird daher nie möglich sein, die Verkaufspreise denen der übrigen Zellwollen anzupassen. Zurzeit sind diese etwa doppelt so hoch wie die der Viscosezellwolle und liegen in Höhe der Wollpreise. Glücklicherweise kommt Acetatzellwolle infolge ihrer Eigenschaften hauptsächlich für die Verarbeitung in der Wollindustrie in Frage.

Eigenschaften und Vorteile.

Worin liegen nun die Vorteile der Acetatkunstfaser, durch die ihr Verbrauch so zunahm?

Sie beruhen in den spezifischen Eigenschaften der Acetylcellulose, die in mancher Hinsicht durch ihre chemische Natur als Ester zwischen den aus Cellulose bestehenden Fasern, wie Baumwolle, Viscose- und Kupferseide, und den tierischen Fasern, wie Wolle und Naturseide, steht. Diese Eigenschaften unterteilt man am besten:

1. in die äußereren, sinnfälligen Eigenschaften der Acetatkunstfaser und
2. die inneren Eigenschaften.