

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE CRACOVIE.
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES.

N° 8.

Octobre

1906.

- Sommaire: 44. M. G. SMOLEŃSKI. Le Sénonien inférieur de Bonarka. I. Les Céphalopodes et les Inocéraminés.
45. MM. J. MEKUNOWICZ et J. ZALEWSKI. Sur la réduction des dérivés de la matière colorante du sang par Zn et HCl.
46. M. M. RACIBORSKI. Sur l'assimilation des composés d'azote par les champignons.

Séance du lundi 15 Octobre 1906.

PRÉSIDENCE DE M. K. OLSZEWSKI.

44. M. GEORGES SMOLEŃSKI. Dolny senon w Bonarce. I. Głównogi i inoceramy. (*Das Untersenon von Bonarka. I. Cephalopoden und Inoceramen*). (*Le Sénonien inférieur de Bonarka. I. Les Céphalopodes et les Inocéraminés*). Mémoire présenté par M. J. Niedźwiecki m. c.

(Planche XXVI, XXVII, XXVIII).

Zwischen Bonarka und Wola-Duchaacka — etwa zwei km südlich von Podgórze bei Krakau — befindet sich ein großer Steinbruch, der das Material für die nahe Zementfabrik in Bonarka liefert. Die hier aufgeschlossenen Kreidemergel wurden längst als südlichstes Vorkommen der außerkarpatischen Kreide der Gegend von Krakau bekannt. Zareczny erwähnt sie in seiner vortrefflichen Arbeit¹⁾, er schreibt ihnen ein senones Alter zu — ihr paläontologischer Inhalt ist aber bisher nicht geprüft worden.

Petrographisch zerfallen die hier vorkommenden Kreidebildungen in drei Teile. Zuerst liegt weißer, harter Kreidemergel (die sog. „Opoka“⁴⁾) mit *Belemnitella mucronata*, der im Steinbruch zwar nicht vertreten ist, dessen Reste aber in der Nähe und auf den Schutthalden leicht zu finden sind. Unter ihm befindet sich ein — im Steinbruch 2—3 m mächtiger — grau-gelblicher Mergel mit *Actinocamax quadratus*. Diesen unterlagert endlich ein grünlicher oder brauner, etwas sandiger Glaukonitmergel (bis 4 m stark).

¹⁾ 1894. Atlas Geologiczny Galicyi. Zeszyt III. Tekst str. 177.

Das Liegende bildet jurassischer Felsenkalk, auf welchem man hier und da spärliche Reste von quarzigem Konglomerat bemerken kann.

Die beiden erstgenannten Mergelkomplexe bieten in paläontologischer Hinsicht weniger Interesse, da sie den beiden schon bei Krakau bekannten Senonstufen entsprechen, nämlich der Mukronaten- und der Quadratenkreide. Es bleiben die glaukonitischen Mergel. Sie enthalten eine reiche Fauna. Wir haben hier: Fischschuppen und Fischzähne (*Oxyrhina*, *Ptychodus*, *Lamna*, *Notidanus* etc.); unter den Cephalopoden sehr zahlreiche Belemniten und einige große aber sehr schlecht erhaltene Ammoniten; — Muscheln (am häufigsten die *Inoceramen*); — Brachiopoden, Schnecken (vorwiegend *Pleurotomariensteinkerne*); — unter den Krinoiden schöne Marsupitenexemplare, — Seeigel (*Ananchytes* und *Micraster*), — endlich Wurmspuren und zahlreiche Korallen und Schwämme.

Da ich vor allem ein stratigraphisches Ziel vor Augen hatte, habe ich mich zuerst diesen Versteinerungsgruppen zugewandt, welche viele Leitfossilien enthalten und deshalb besonders geeignet sind, eine Grundlage stratigraphischer Spekulationen zu bilden. Hier sind es die Cephalopoden (und zwar fast ausschließlich die Belemniten, da die Ammoniten wegen schlechten Erhaltungszustandes größtenteils undefinierbar sind) und die *Inoceramen*. Die so zusammengestellte Fossilienliste sieht folgendermaßen aus:

Actinocamax veras

- „ *westfalicus*
- „ *westfalicus-granulatus*
- „ *granulatus*
- „ *granulatus-quadratus*
- „ *quadratus* typ. ¹⁾
- „ „ *var. gracilis*
- „ „ *var. ampullacaea*

Inoceramus involutus

- „ *Haenleini*
- „ *Brancoi*
- „ *robustus* n. sp.
- „ *crassus* (?)

¹⁾ *Act. quadratus* kommt nur in den obersten Schichten des Glaukonitmergels vor; sein eigentlicher Sitz sind die höher liegenden grauen Mergel.

<i>Inoceramus</i>	<i>crassus</i>	var.	<i>planior</i>	v. n.
„	<i>Cuvieri</i>	var.	<i>cripsiioides</i>	(?)
„	<i>lobatus</i>			
„	„	var.	<i>cancellata</i>	
„	<i>lingua</i>			
„	<i>Cracoviensis</i>			n. sp.
„	<i>Cripsi</i>	var.	<i>typica</i>	
„	„	var.	<i>regularis</i>	
„	„	var.	<i>decipiens</i>	
„	„	var.	<i>alata</i>	

Dazu kommt noch: *Marsupites ornatus*, und der einzige definierbare Ammonit: *Pachydiscus dülmensis*.

Die Formen, die ich als *Pachydiscus dülmensis* Schlüter sp. bestimmt habe, sind stark involut und sehen aufgebläht aus. Die Maximalbreite der Umfänge liegt dem Nabel näher als dem Rücken und ist etwas größer als ihre Höhe. Der Nabel ist klein und tief, die Rippen etwas nach vorne gekrümmt. Die Größe des besterhaltenen Exemplares von Bonarka entspricht ganz den Angaben von Schlüter¹⁾, sein Aussehen dagegen erinnert mehr an die Abbildungen von Grossouvre²⁾. Wie bei diesen sind hier die Rippen auch an den Steinkernen sichtbar.

Actinocamax verus Müller (Taf. XXVI. Fig. 1—6.) erscheint in Bonarka in zwei Formen, einer schlanken und einer keulenartigen, zwischen denen es aber Übergänge gibt. Die keulenförmige kann als Typus betrachtet werden. Die Länge des Rostrums beträgt ca 34 mm, die Maximaldicke befindet sich in $\frac{2}{3}$ Höhe von oben gemessen. Infolge der seitlichen Depression ist die Keulenform dorsoventral besonders ausgeprägt. Ein durchschnittliches Exemplar hat, dorsoventral gemessen, eine Maximaldicke von 6 mm, lateral 4 mm. Das Alveolarende hat sich in keinem Fall erhalten. Es ist gewöhnlich stumpf („actinocamaxartig“) abgestutzt (Fig. 5.), manchmal aber kommt eine Abschälung vor, wodurch das Rostrumende eine konusartige, spitze Form bekommt (Fig. 3.). Die Oberflächenverzierung (bei Schlüter gut abgebildet) ist besonders am obersten

¹⁾ 1872. Schlüter: Cephalopoden der oberen deutschen Kreide. Paläontogr. XXI. S. 52.

²⁾ 1893. A. de Grossouvre: Recherches sur la craie sup. Vol. II: Les Ammonites de la craie supérieure. S. 199. Taf. XX. Fig. 1. 2.

Drittel des Rostrums sichtbar. Ich halte diese feine Runzelung für das wichtigste Merkmal beim Unterscheiden der schlanken Form des *Act. verus* von den jungen Belemniten anderer Gattungen (z. B. *Act. westfalicus*).

Actinocamax westfalicus Schlüter (Taf. XXVI. Fig. 7—9.) befindet sich in Bonarka nur in den untersten Schichten des Glaukonitmergels. Seine Form und Größe¹⁾ stimmt gut mit den Angaben von Schlüter²⁾, Moberg³⁾ und Stolley⁴⁾. Er ist glatt, höchstens sehr schwach granuliert. Deutliche Granulation halte ich für ein Symptom der Annäherung an den verwandten und jüngeren *Act. granulatus*⁵⁾. Als das wichtigste Merkmal der Gattung betrachte ich hier (wie bei der ganzen phylogenetischen Reihe *westfalicus-granulatus-quadratus*) nach Stolley die Tiefe der Alveole im Vergleich mit der Länge des Rostrums. Sie beträgt bei *Act. westfalicus* ca $\frac{1}{10}$, sie kann aber noch viel kleiner sein ($\frac{1}{11}$ — $\frac{1}{12}$).

Größere Formen mit etwas seichterer Alveole ($\frac{1}{8}$ — $\frac{1}{8}$ = *Act. westfalicus-granulatus* und *granulatus-westfalicus* Stolley) führen zu *Actinocamax granulatus* Blainville sp. emend. Schlüter über. Dieser stratigraphisch wichtige Belemnit ist in Bonarka reichlich vertreten. Starke Granulation, ausgeprägte Zylinderform (Fig. 10.) und vor allem die seichtere Alveole (bei den typischen Formen $\frac{1}{7}$ — $\frac{1}{8}$ der Rostrumlänge. Vergl. Fig. 11.) lassen die Gattung leicht von der vorigen unterscheiden. Die Alveolarmündung ist hier vierseitig oder oval, — was mit der Annäherung einerseits an *Act. quadratus*, andererseits an *Act. westfalicus* in Abhängigkeit zu stehen scheint.

¹⁾ Hier einige Zahlen:

	a	b	c	d	e	f
1)	53	4.5	9	7.5	8.5	27 mm
2)	55	4.5	9	8	9.5	25
3)	60	6	11	10	11	30
4)	57	5.5	10	9	9.5	28

a) Länge des Rostrums, b) Tiefe der Alveole, a) Durchmesser der Alveolarmündung, dorso-ventral gemessen, d) Dasselbe, lateral, e) Maximaldurchmesser des Rostrums, 7) Entfernung desselben von der Rostrumspitze.

²⁾ l. c. XXIV.

³⁾ 1884. Moberg: Cephalopoderna i Sveriges Kritsystem II. S. 51. S. 188 sq.

⁴⁾ Arch. f. Anthropol. u. Geol. Schleswig-Holsteins. B. I. (1896). S. 20. sq.

und ibid. B. II. (1897). S. 276.

⁵⁾ Vergl. Grossouvre: Quelques observations sur les Belemnites etc. Bull. Soc. Géol. de France. III. B. 27. S. 131.

Der durch Übergangsformen mit *Act. granulatus* verbundene *Actinocamax quadratus* Blainville sp. (Taf. XXVI. Fig. 12—15.) erscheint vereinzelt auch in den obersten Schichten des glaukonitischen Mergels. Außer den normalen zylindrischen Formen konnte ich hier die schlanke var. *gracilis* Stolley (Fig. 12.) und die keulenartige var. *ampullacea* Stolley (Fig. 15.) unterscheiden. Die Alveole ist tief; folgende Zahlen zeigen es deutlich:

Länge des Rostrums: 77 66 62 64 62 72 mm

Tiefe der Alveole: 17 15 15 16 16 22.

Gewöhnlich beträgt das Verhältnis zwischen diesen Größen $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$.

Actinocamax westfalicus, *granulatus* und *quadratus*, welche untereinander durch Übergänge verbunden sind, bilden eine phylogenetische Reihe, wobei die allmähliche Vertiefung der Alveole das Hauptmerkmal der fortschreitenden Entwicklung ist. *Act. verus* ist ihnen verwandt. Seine direkte Abstammung von dem *Act. westfalicus* ist aber fraglich. Nach einer mündlichen Mitteilung von Herrn Bogdanowicz hat derselbe in der Kreide des Kaukasus Bellemniten gefunden, die Mittelformen zwischen *Act. plenus* und *verus* zu sein scheinen (*Act. plenus-verus* Bogd.).

Von *Inoceramus involutus* Soverby fand ich in Bonarka nur eine rechte (kleinere) Klappe. Sie stimmt gut mit den Abbildungen von Müller¹⁾ und Wollemann²⁾. Der Wirbel ist etwas nach der Mitte verschoben, die Rippen breit und treppenförmig. Eine leichte, wellenartige Umbiegung derselben in der Nähe des Schloßrandes ist ziemlich deutlich. Die radialen Streifen sind auch nur an dieser Schalenpartie sichtbar.

Bei *Inoc. Haenleini* G. Müller liegt der Wirbel ganz vorne, er überragt den Schloßrand, welcher mit der Vorderseite einen rechten Winkel einschließt. Zwischen den dicken, wulstartigen Rippen verlaufen feine Anwachsstreifen, welche denselben (wie bei *I. Cripsi*) nicht parallel sein können. Der charakteristische Längseindruck liegt in der Kreszenzachse. Das letzte Merkmal ist auch dem *I. Brancoi* Wegner eigen. Dieser unterscheidet sich von dem *I. Haenleini* durch den stumpfen Winkel zwischen der Vorderseite und dem Schloßrande — und durch die Differenzierung der Rippen,

¹⁾ Jahrb. preuß. geol. L. A. 1888.

²⁾ Abh. preuß. geol. L. A. 25. (1902).

welche in der Nähe des Wirbels fein und regulär sind, weiter jedoch zu unregelmäßigen Wulsten anwachsen. Radiale Striemen kann man an beiden Gattungen beobachten.

Der Unterschied zwischen dem Wirbel und dem Rest der Schale ist besonders bei *Inoc. robustus n. sp.* (Taf. XXVIII. Fig. 23, 24.) stark ausgeprägt. Die Grenze bildet eine rückenartige Erhebung, welche zugleich dem Maximum der Wölbung entspricht. Oberhalb dieser Grenze ist der Wirbel wie eingedrückt. Der Schloßrand bildet mit der Vorderseite einen rechten Winkel, mit der Achse einen Winkel von 35°. Die Schale ist sehr dick — besonders in der Nähe des Schlosses.

Die Bestimmung des *Inoc. Cuvieri var. cripsioides* Elbert halte ich nicht für sicher, erstens weil die Beschreibungen der Art bei Elbert¹⁾ und Petrascheck²⁾ nicht übereinstimmen — zweitens, weil meine Exemplare verdrückt sind. Ich sehe mit Elbert Fig. 13 bei Geinitz³⁾ als Typus des *I. Cuvieri var. crips. an*; meine Formen sind der genannten sehr ähnlich.

Auch bei *Inoc. crassus Petrascheck* habe ich ein Fragezeichen gesetzt. Die Inoceramen, welchen ich diesen Namen beilegte, zeigen zwar die typische, regulär-langgestreckte Berippung, den einförmigen Umriß und die starke Wölbung der Petrascheck'schen Form — doch konnte ich an ihnen die wichtige Einschnürung in der Nähe des Schlosses nicht wahrnehmen, da alle meine Exemplare oberhalb der eventuellen Einschnürungsfläche abgebrochen waren. Einige von ihnen unterscheiden sich durch mehr flache Wölbung. Ich habe sie unter dem Namen „*var. planior*“ sondergestellt.

Der stratigraphisch so wichtige *Inoceramus lobatus Münster* (Taf. XXVII. Fig. 16—18.) wurde in Bonarka in einigen gut erhaltenen Exemplaren gefunden. Zu den Beschreibungen von Schlüter⁴⁾, Müller⁵⁾ und Wegner⁶⁾ kann ich noch folgendes hinzufügen. Der Schloßrand ist lang, er bildet mit der Achse der Schale einen Winkel von 35—40°. Sowohl die Haupt- wie die Nebenrippen

¹⁾ Verh. d. naturh. Vereins d. preuß. Rheinlande u. Westf. LVIII. (1901).

²⁾ Jahrb. k. k. geol. R. A. 53. (1903).

³⁾ Unter dem Namen *I. Cripsi*. Paläontogr. XX. 2. Taf. XIII.

⁴⁾ Paläontogr. XXV. 275.

⁵⁾ l. c.

⁶⁾ 1095. Wegner: die Granulatenkreide des westl. Münsterlandes. Z. d. q. G. 57. S. 164.

ändern ihren Verlauf in der Schaleneinbuchtung. — sie werden gerade oder wenden sogar die konvexe Seite des Bogens dem Wirbel zu. Die knotenverzierte Grenzkante verlassend, durchlaufen sie den Flügel in geraden Linien. Längs des Flügelrandes befindet sich eine demselben parallele Erhebung. Die Rippen bilden hier kleine Bogen oder Knoten. Jenseits dieser Erhebung ist der Flügelrand flach. Die Inoceramen dieser Art erreichen manchmal eine ansehnliche Größe. In Bonarka habe ich u. a. einen unvollständigen Abdruck gefunden, der 24 cm mißt. Die ganze Länge der Schale mußte ca 40 cm betragen. Ähnliche Riesen hat auch Holzapfel¹⁾ und Stolley²⁾ gefunden. An diesem Abdrucke blieben einige Schalenreste erhalten. Feine Anwachsstreifen, die an ihrer Oberfläche verlaufen, sind deutlich gefranst (Fig. 17.). Dieses Merkmal wurde bisher nur bei dem *Inoc. Brogniarti* wahrgenommen und als für diese Art typisch betrachtet. Bei kleinen Exemplaren des *Inoc. lobatus* sah ich diese Linien nicht, ich habe sie aber an vielen losen Bruchstücken beobachtet und einige von ihnen waren Teile der dem Schloß nahegelegenen Partien (Fig. 18.). Die dem Flügelrande parallele Erhebung wächst hier zu einem kräftigen Wulste an. Die ihn durchkreuzenden Hauptrippen bilden hier Knoten, denen an der Unterseite Einhöhungen entsprechen³⁾. Die Schloßgrübchen stehen dicht nebeneinander und reichen nicht zu der unteren Kante der Ligamentarfläche. Ähnlich sieht auch das Schloß des *I. Brogniarti* (non cordiformis em. Airaghi!) aus, wo aber die Grübchen etwas breiter sind.

Feine radiale Streifen, die bei *Inoc. lobatus* kaum merklich sind, werden bei der *var. cancellata Goldfuss* (Taf. XXVII Fig. 19) zu deutlichen Striemen, was der Schalenoberfläche ein gitterartiges Aussehen verleiht. Bei *Inoceramus lingua Goldfuss* verschwinden die radialen Streifen vollständig, die Einbuchtung wird flacher, der Unterschied zwischen den Haupt- und Nebenrippen geringer.

Inoceramus Cracoviensis n. sp. (Taf XXVIII. Fig. 21, 22) hat einen schräg-eiförmigen Umriß. Der Winkel zwischen dem Schloßrande und der Vorderseite ist stumpf. Die konzentrischen Rippen

1) Die Mollusken der Aachener Kreide. Paläontogr. XXXV. S. 223.

2) l. c.

3) Es erinnert sehr an die Schloßpartie des *I. Lamarcki* auf der Abbildung d'Orbigny's. Pal. fr. terr. créét. III. Taf. 412.

verlaufen sehr regelmäßig und treffen den Schloßrand unter einem konstanten Winkel, der 30—40° beträgt. Charakteristisch ist für diese Formen die Wölbung der Schale. Ihr Maximum bildet einen Bogen, dessen konvexe Seite dem Schloßrande zugewendet ist. Etwas ähnliches kann man bei dem japanischen *Inoc. eozoënsis* Yok. beobachten¹⁾, wo aber die Rippen mehr kreisförmig sind und der Rücken näher der Mitte der Schale verläuft. Beide Gattungen sind dem *Inoc. Cripsi* ähnlich.

Eine ganze Fülle von Formen habe ich unter dem Namen des *Inoc. Cripsi* Mantell zusammengefaßt, da sie der Beschreibung dieser Art bei Schlüter²⁾ und Zittel³⁾ ziemlich genau entsprechen. Ich bin zwar keineswegs von der Zusammengehörigkeit dieser Formen überzeugt, — ich hatte aber wegen schlechter Erhaltung der Schloßpartien keinen Grund dazu, sie auseinanderzuhalten. Um sich in der Mannigfaltigkeit der Formen zu orientieren, habe ich mich der alten Zittel'schen Variationsnamen bedient.

Wir haben hier also zuerst die *var. typica*. Es sind niedrige, stark in die Länge verzogene Formen, die dem obersenen *Inoc. Cripsi* am ähnlichsten sind. Von diesem unterscheiden sie sich gewöhnlich durch kräftigere und nicht so regelmäßige Rippen. Zur *var. regularis* zähle ich flache Exemplare, die fast so hoch wie breit sind und bei welchen die sehr regelmäßigen Rippen kreisrund verlaufen. Inoceramen, für welche Wegner einen neuen Namen *Inoc. cycloides* ersonnen hat, wurden von mir auch dieser Varietät zugewiesen. Der *var. decipiens* entsprechen labiatoidal verlängerte Formen, die manchmal an den turonen *Inoc. labiatus-mytiloides* oder an gewisse schmale Abarten des *Inoc. lingua* erinnern können.

Die starke Erweiterung der Vorderseite führt zur *var. alata*.

Charakteristisch ist das Fehlen der im Obersenen so häufigen *var. impressa*. Es gibt hier zwar Formen, die einen mehr oder weniger deutlichen Eindruck haben, — dieser sieht aber anders aus und ähnelt eher gewissen flachen Inoceramen aus der Verwandtschaft des *Inoc. Haenleini*. Am häufigsten ist in Bonarka die *var. regularis* vertreten.

Die Inoceramen von Bonarka kann man in einige Gruppen

¹⁾ Matajira Yokoyama: Verst. der jap. Kreide. Palaeontogr. XXXVI. Taf. XVIII. Fig. 6, 7.

²⁾ l. c.

³⁾ Denkschr. k. Akad. d. Wiss. Wien XXV (1864—66) 95.

zusammenfassen, die durch Verwandtschaft verbunden sind. *Inoc. cancellatus-lobatus-lingua* scheinen eine phylogenetische Reihe zu bilden, als ihre Vorfahren können *Inoc. subcardissoides* und *cardissoides* betrachtet werden. Der letztgenannte steht dem in Bonarka vorhandenen *Inoc. cancellatus* sehr nahe. Die Beobachtungen, welche ich an manchen Exemplaren des *Inoc. lobatus* gemacht habe, lassen vermuten, daß diese ganze Reihe dem turonen *Inoc. Brogniarti* verwandt ist und von ihm ihren Stammbaum ableitet. Eine ähnliche Ansicht fand ich bei v. Haenlein¹⁾.

Der zweiten Gruppe gehört *Inoc. Haenleini*, von Müller von dem *Inoc. involutus* abgeleitet. Dieser Emschertypus zerfällt in der unteren Granulatenkreide in zwei Formen, indem er einerseits dem hochgewölbten *Inoc. Brancoi*, anderseits den flachen, den an *Inoc. Cripsi* erinnernden Formen den Anfang gibt. *Inoceramus crassus*, dem turonen *Inoc. Cuvieri* verwandt, und *Inoc. Cuvieri* var. *crispioides* bilden die dritte Gruppe. Eine ganz besondere Stellung besitzt *Inoc. Cripsi*. Nach Wegner und Petrascheck ist es ein Kollektivtypus, eine Folge der Konvergenz mehrerer Entwicklungsreihen. Es scheint auch dafür die Mannigfaltigkeit der hier gehörenden Formen im Untersenon (also zur Zeit der Erscheinung der „Art“) im Gegensatz zu ihrer Konstanz in jüngeren Schichten zu sprechen.

Es ist möglich, daß hier die Endglieder aller drei erwähnten Gruppen münden, denn auch der Übergang von *Inoc. lobatus-lingua* zu *Inoc. Cripsi* ist wahrscheinlich, da man an den jüngsten Gliedern dieser Reihe allmähliche Verflachung der Einbuchtung und Verschwinden der Rippendifferenzierung beobachten kann.

Wenn wir — zu stratigraphischen Spekulationen übergehend — das Vorkommen der Belemniten in Bonarka mit der Stolley'schen Senongliederung²⁾ vergleichen, sehen wir, daß hier alle Senonstufen mit Ausnahme der obersten vertreten sind, wobei auf den Glaukonitmergel die zwei unteren — Emscher und Granulatenkreide — entfallen. *Actinocamax quadratus*, welcher in den höher liegenden grauen Mergeln häufig ist, kommt hier nur vereinzelt in den obersten Schichten vor.

¹⁾ 1893. Schr. nat. Ver. Harz-Wernigerode VIII.

²⁾ 1897. Stolley: Über die Gliederung des norddeutschen und baltischen Senon sowie die dasselben charakterisierenden Belemniten. Arch. für Anthrop. und Geol. Schlesw.-Holst. II. 2.

Der Hauptkomplex des glaukonitischen Mergels bildet die Granulatenkreide. Daß sie hier der gleichen Stufe Westfalians entspricht, zeigt der in seinen unteren Schichten nicht seltene *Marsupites ornatus*, welcher für die untere Granulatenkreide höchst charakteristisch ist, (Stufe *Placenticeras bidorsatum* von Grossouvre), — in den höheren *Pachydiscus dülmensis*, welcher nur der oberen Granulatenkreide eigen ist (Stufe *Placenticeras bidorsatum* von Grossouvre).

Weniger sicher ist hier die Anwesenheit des Emschers. Zwar befindet sich sein Leitfossil — *Act. westfalicus* — in den untersten Schichten des glauk. Mergels, man kann ihn aber bekanntlich auch in der unteren Granulatenkreide finden, da die Übergangsformen keine scharfe Grenze zwischen den Stolley'schen Stufen zu ziehen gestatten. Der zusammen vorkommende *Act. verus* ist sowohl der Granulaten wie der Westfalicuskreide eigen. Hier können nur die *Inoceramen* helfen.

Wenn wir von ihnen einerseits neue, anderseits nicht sicher bestimmte (und zugleich nicht charakteristische) Formen beiseite lassen, bleibt uns eine Reihe, die aus lauter Leitfossilien besteht:

<i>Inoceramus</i>	<i>Cripsi et var.</i>
„	<i>lingua</i>
„	<i>lobatus</i>
„	<i>cancellatus</i>
„	<i>Brancoi</i>
„	<i>Haenleini</i>
„	<i>involutus.</i>

Zum Vergleiche bedienen wir uns der Senongliederung, welche G. Müller¹⁾ hauptsächlich auf Grund der *Inoceramen* durchgeführt hat. Der oberen Granulatenkreide entspricht hier die Stufe mit den *Inoceramen*: *lobatus*, *lingua*, *Cripsi*, und *Ammoniten*: *bidorsatus*, *dülmensis* und *Sc. binodosus*. In Bonarka erscheinen dieselben *Inoceramen* zusammen mit *Pach. dülmensis*, sie besitzen hier also dieselbe stratigraphische Stellung (Stufe *Plac. bidorsatum*).

Der die untere Granulatenkreide bei Müller repräsentierende *Inoc. cardissoides* wurde in Bonarka nicht gefunden. Ihm entspricht

¹⁾ 1900. G. Müller: Gliederung der Actinocamaxkreide im nordwestlichen Deutschland. Z. d. g. G. Band LII.

hier der verwandte *Inoc. cancellatus* und der — nur aus der untersten Granulatenkreide *Westfalicus* bekannte — *Inoc. Brancoi*.

Inoc. Haenleini und *involutus* charakterisieren in der Müllerschen Gliederung den oberen und den mittleren Emscher (*Grossouvre's* Stufen: *Mortoniceras texanum* und *Mort. Emscheris*). Ihr Vorkommen zusammen mit *Act. westfalicus* genügt als Beweis für die Anwesenheit dieser Stufe.

Aus allen diesen Erörterungen ergibt sich also der Schluß, daß in dem Glaukonitmergel von Bonarka die ganze Granulatenkreide und ein Teil des Emschers vertreten sind.

Untersenenon ist bisher in der Gegend von Krakau nicht erforscht worden. Nach allgemeiner Ansicht, die auf den Schriften¹⁾ von Zaręczny basiert, liegt in den vollständigsten Kreideaufschlüssen der Umgebung von Krakau (*Giebułtów*, *Sudół*) die obersenone „Opoka“ unmittelbar auf dem Mittelurcon. Die Lücke soll einer Meeresregression entsprechen. Prof. Siemiradzki, der einerseits die Altersbestimmungen Zaręczny's unangefochten läßt, andererseits keinen Meeresrückzug annehmen will, vermutet die Anwesenheit von Oberturcon und Untersenenon in den unteren Schichten der Opoka²⁾. Bei dem raschen Fazieswechsel in der Krakauer Kreide halte ich es für ganz möglich, daß auch diese Stufen durch die Opoka irgendwo vertreten sein können, doch nicht in den genannten Aufschlüssen, wo auch in den untersten Schichten dieses weißen Kreidemergels der typische *Act. quadratus* vorkommt. Hier muß ein anderer Weg gewählt werden und das Untersenenon — wenn es hier existiert — nicht in, sondern unter der Opoka gesucht werden. Ich will nachweisen, daß es die bisher zum Mittelurcon gezählten „Inoceramenmergel“ sind, die hier die Rolle der Äquivalente des Glaukonitmergels von Bonarka spielen.

Es sind graue oder grünliche, sandig-glaukonitische Mergel, die

¹⁾ 1877. Zaręczny: O średnich warstwach kredowych w krakowskim okręgu. Spraw. Kom. Fizyogr. Akad. Um. XII.

1894. Idem: Atlas geol. Galicyi, Tekst do zeszytu trzeciego. Wyd. Kom. Fizyogr. Akad. Um.

²⁾ 1905. Siemiradzki: O utworach górnokredowych w Polsce. „Kosmos“, VIII—XII.

1906. Idem: Die obere Kreide in Polen. Verh. k. geol. R. A. Nr. 2.

in Giebultów und Sudół zwischen den „oberen“ Kreidekonglomeraten und der Opoka liegen. Sie wurden auf Grund der in ihnen vorkommenden Inoceramenbruchstücke der turonen Brogniarti-Stufe zugezählt. Die Schalenreste zeigen gefranste Anwachsstreifen — wie bei Inoc. Brogniarti. Dieses Merkmal, welches bisher als charakteristisch gelten konnte, habe ich aber auch bei unteren Formen aus der Gruppe lobatus-lingua bemerkt — ich halte also die Bestimmung für unsicher. Wirklich bezeichnend ist dagegen die Belemnitenfauna, welche in denselben Schichten gefunden wurde.

Ich habe hier folgende Formen bestimmt.

Actinocamax granulatus

„ *granulatus-westfalicus*

„ *verus*.

Die „Inoceramenmergel“ entsprechen also der Granulatenkreide, folglich muß die Grenze zwischen Turon und Senon in der Kreide von Krakau nach unten verschoben werden.

Erklärung der Tafeln.

Taf. XXVI.

Fig. 1. *Actinocamax verus* Miller. Ein keulenförmiges Individuum von vorne und von der Seite gesehen.

Fig. 2. Ein anderes Individuum (von vorne).

Fig. 3. Ein anderes Individuum von vorne und von der Seite. Konusartige Abschälung des Alveolarendes.

Fig. 4. Ein junges, schlankes Individuum.

Fig. 5. Ein typisch abgestutztes Alveolarende.

Fig. 6. Ein Alveolarende mit deutlicher Seitendepression.

Fig. 7. *Actinocamax westfalicus* Schlüter. Ein typisches Individuum.

Fig. 8. Ein größeres Exemplar, gespalten.

Fig. 9. Querschnitt des Alveolarendes bei einem anderen Individuum.

Fig. 10. *Actinocamax granulatus* Blainville em. Schlüter. Ein typisches Individuum.

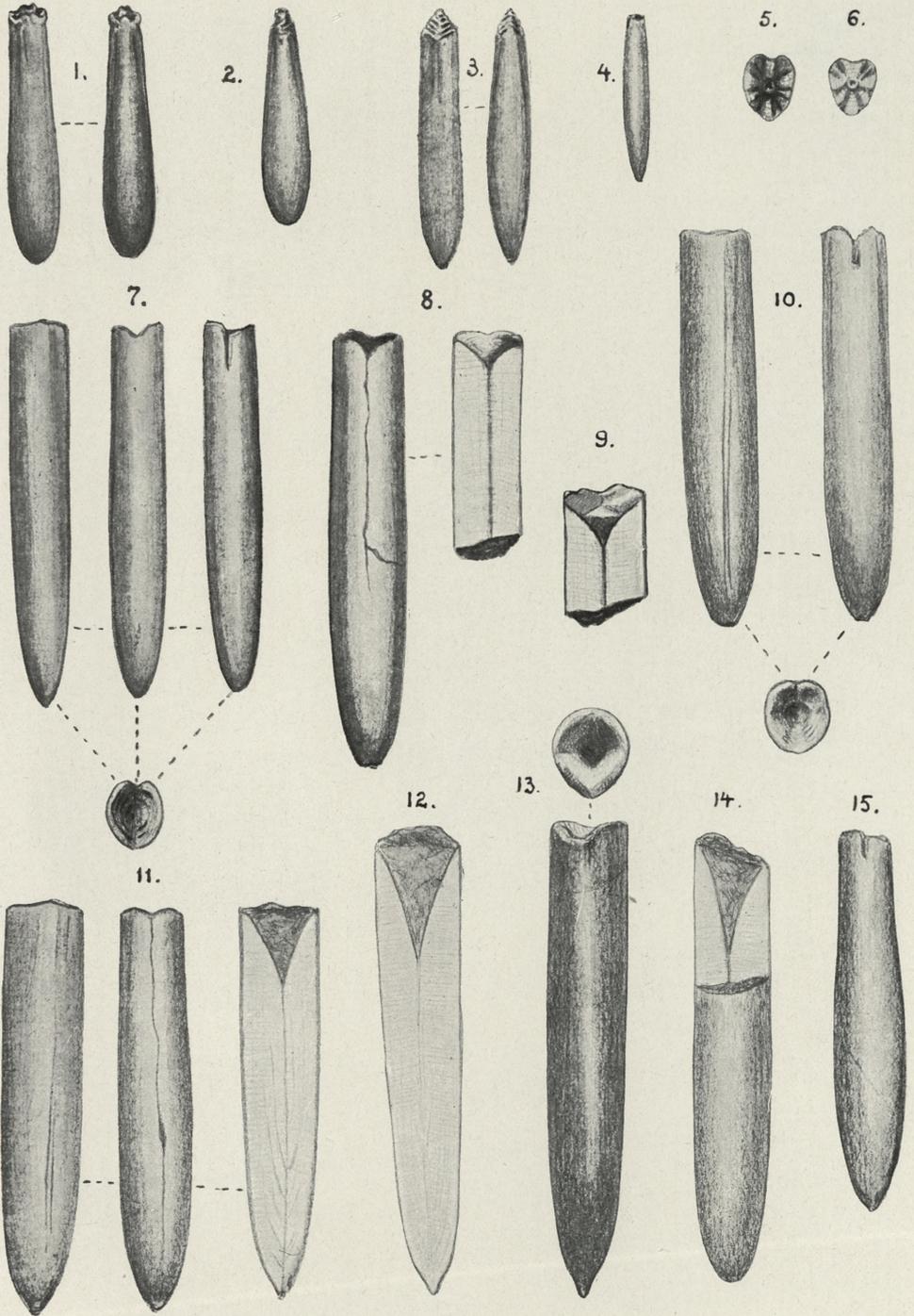
Fig. 11. Ein anderes Exemplar, gespalten.

Fig. 12. *Actinocamax quadratus* Blainville. Querschnitt eines schlanken Exemplars.

Fig. 13. Ein anderes Exemplar von vorne und von oben.

Fig. 14. Längsdurchschnitt.

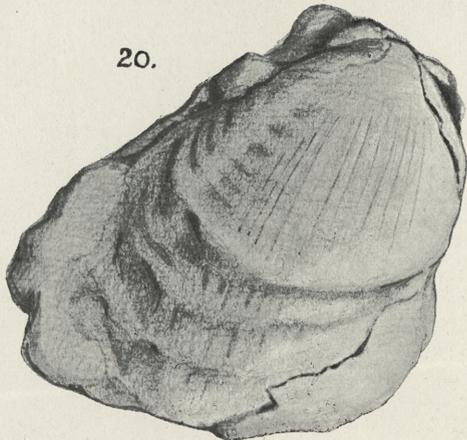
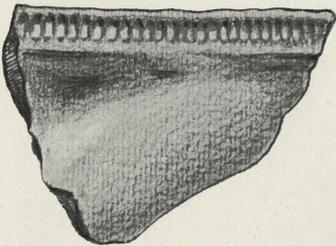
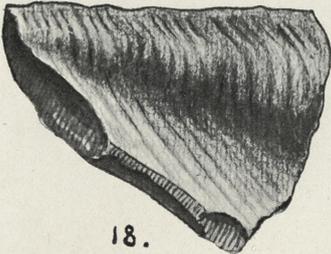
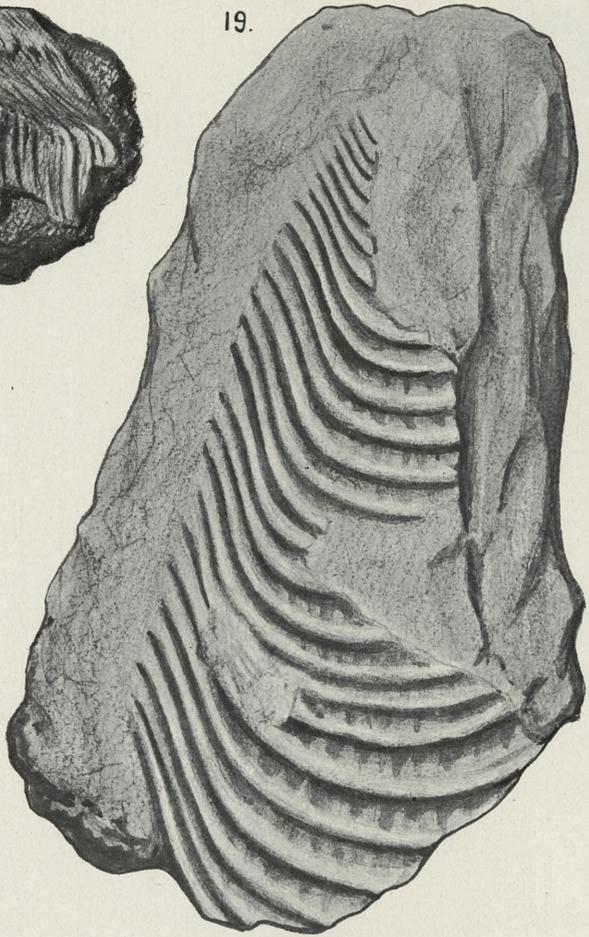
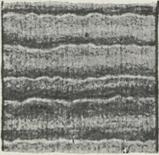
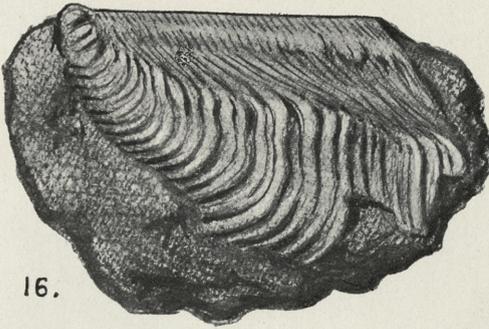
Fig. 15. Ein keulenförmiges Individuum (var. ampullacea Stolley).



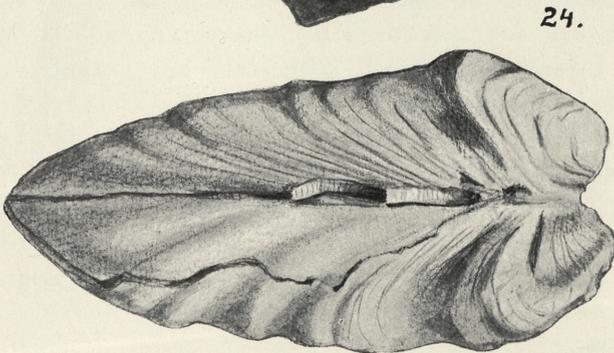
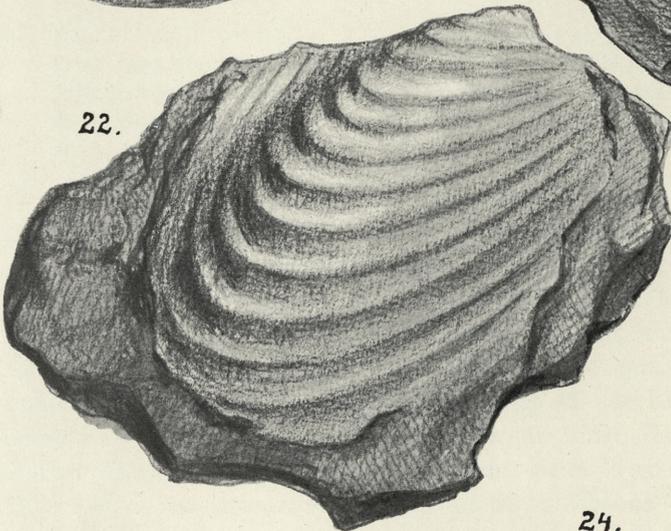
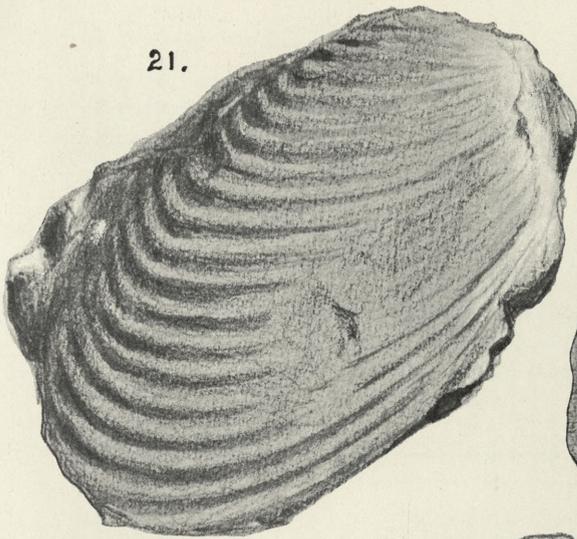
Georg Smoleński.

Druk. Univ. Jagiell.









Georg Smoleński.

Druk. Univ. Jagiell.



Taf. XXVII.

- Fig. 16. *Inoceramus lobatus* Münster. Ein gut erhaltenes Exemplar ($\frac{3}{4}$).
 Fig. 17. Anwachsstreifen an der Oberfläche eines großen Exemplars 1×4 .
 Fig. 18. Ein Teil des Schlosses eines großen Exemplars.
 Fig. 19. *Inoceramus lobatus* var. *cancellata* Goldfuss. Ein Teil der Schale.
 Fig. 20. *Inoceramus Brancoi* Wegner ($\frac{3}{4}$).

Taf. XXVIII.

- Fig. 21. *Inoceramus Cracoviensis* n. sp. Ein Exemplar mit dichter Berippung.
 Fig. 22. Ein anderes Individuum mit breiteren Rippen.
 Fig. 23. *Inoceramus robustus* n. sp. (von oben).
 Fig. 24. Derselbe von der Seite gesehen.

-
45. MM. J. MERUNOWICZ et J. ZALESKI. *Redukcja pochodnych barwika krwi zapomocą Zn i HCl. (Über die Reduktion der Derivate des Blutfarbstoffes mittelst Zn und HCl). (Sur la réduction des dérivés de la matière colorante du sang par Zn et HCl)*. Mémoire présenté par M. L. Marchlewski m. t.

Wie schon Hoppe-Seyler und Nencki¹⁾ beobachtet haben, geht das Hämatoporphyrin in sauren Lösungen unter dem Einflusse des Wasserstoffs in statu nascendi in einen gelben Farbstoff über, der eine große Ähnlichkeit mit dem Urobilin zeigt. Unter den Eigenschaften, die diesen Farbstoff von dem echten, aus Harn stammenden Urobilin unterscheiden dürften, wurde seine leichte Veränderlichkeit hervorgehoben. Beim Stehen an der Luft geht zwar seine Farbe ins Rotbraun oder Violettbraun über; doch sind diese Farbstoffe nicht näher untersucht worden. Beim Wiederholen dieser Reaktionen mit Hämato- und Mesoporphyrin haben wir bemerkt, daß die Farbenänderung am leichtesten vor sich geht, wenn zur Entwicklung von Wasserstoff Zinkstaub gebraucht wird.

Folgende Verhältnisse haben sich als die zweckmäßigsten erwiesen: 1 gr Hämato- oder Mesoporphyrin wird in 100 ccm 50%-iger Essigsäure gelöst, worauf etwa 50—70 ccm Salzsäure (1. 19) und etwa 20—30 gr Zinkstaub zugesetzt werden. Man kann auch ein

¹⁾ Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 117.

Nencki u. Sieber, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 24, 430.

Gemisch von aliquoten Teilen von Weingeist, Essig- und Salzsäure anwenden.

Schon in der Kälte wird die Lösung in etwa 10—30 Sekunden ganz schwach gelb, sogar farblos, insbesondere in dem Falle, wenn das Kölbchen, in welchem die Reaktion ausgeführt wird, nicht zu groß ist und der sich entwickelnde Wasserstoff die Luft gänzlich verdrängt, oder aber wenn dasselbe vor der Reaktion mit irgend welchem neutralen Gase gefüllt worden war. Nach Abfiltrieren nimmt die farblose Lösung alsbald an der Luft eine intensive Färbung an; sie färbt sich erst gelb, dann gelbbraun und zuletzt braunrot. Bei spektroskopischer Untersuchung zeigen die gelben Lösungen den Urobilinstreifen, in braunroten treten deutlich außerdem auch Absorptionsstreifen von saurem Porphyrin auf. Wird das Filtrat nach dem Entfärben mit Überschuß von Lauge versetzt, so ändert sich die Färbung in ähnlicher Weise (vielleicht noch schneller); natürlich aber erhält man in diesem Falle im Spektroskop neben dem Urobilin das Spektrum des alkalischen Porphyrins. Das Resultat der spektroskopischen Analyse hat uns bewogen, das Porphyrin, welches aus einer farblosen „Leukoverbindung von reduziertem Porphyrin“ durch Oxydation an der Luft entsteht, näher zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke haben wir nach oben angegebener Weise 1 gr Mesoporphyrin entfärbt, filtriert und das Filtrat eine Woche lang in offenen Gefäßen stehen gelassen. Dann wurde NaOH in Überschuß zugesetzt und mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ gefällt; das Filtrat mit HCl angesäuert und nach Verdrängen von H_2S wurde der Farbstoff mit Lauge gefällt und mit Wasser gewaschen. Da im Farbstoffe größere Mengen von Urobilin vorhanden waren, mußte er noch zweimal in schwacher Lauge gelöst und mit Essigsäure gefällt werden. Man kann auch ohne Anwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ den Farbstoff durch Lösen in schwachem und durch Fällern mit starkem Ammoniak reinigen. Auf diese Weise erhält man einen roten Farbstoff, der sich bei spektroskopischer Untersuchung als frei von Urobilin erweist. Dieser Farbstoff löst sich leicht in schwacher Salzsäure; nach Zusatz von stärkerer Säure krystallisiert er in Form von kleinen Nadeln mit gerader Lichtauslöschung. Die Identität dieser Krystalle mit Mesoporphyrin ist bewiesen worden, indem wir daraus seinen Äthyläther erhalten haben, welcher in der für ihn charakteristischen

Form von dünnen Plättchen auskrystallisierte und bei 203—204° schmolz ¹⁾.

Die sauren Lösungen von Mesoporphyrin lassen sich also durch Behandeln mit Zinkstaub entfärben, worauf in den erwähnten entfärbten Filtraten unter Einwirkung des Sauerstoffs der Luft das Mesoporphyrin wieder regeneriert. Selbstverständlich kann nur ein gewisser Teil des Mesoporphyrins auf diesem Wege wieder gewonnen werden, ca 30%, denn der größte Teil geht in Urobilin und andere noch nicht näher untersuchte Produkte über.

Auch das Hämatoporphyrin, in gleicher Weise mit Zinkstaub in sauren Lösungen behandelt, wird gleichfalls entfärbt, worauf unter der Einwirkung der Luft ein Gemisch von farbigen Körpern entsteht. Aus diesem Gemisch läßt sich das rote Porphyrin isolieren, dessen sowohl saure, als auch alkalische Lösungen bei spektroskopischer Untersuchung Absorptionsstreifen zeigen, welche mit denen des Hämatoporphyrins und nicht, wie man es erwarten sollte, mit denen des mehr reduzierten Mesoporphyrins identisch sind. Doch wurde der zweimal wiederholte Versuch, Krystalle vom salzsauren Hämatoporphyrin zu erhalten, nicht von Erfolg gekrönt. Es ist uns nur gelungen, den an der Luft regenerierten Farbstoff mittelst HJ und NH_4J in Mesoporphyrin überzuführen und daraus seinen Äthyläther zu erhalten.

Es wurden auch Versuche mit dem Entfärben der Lösungen des Hämins angestellt. Wegen seiner geringen Löslichkeit in sauren Lösungen sind solche Versuche schwer durchzuführen. Die verhältnismäßig am stärksten gefärbten Häminlösungen haben wir beim Erwärmen desselben in einem Gemisch von Weingeist und Essigsäure erhalten. Solche Lösungen entfärben sich leicht unter der Einwirkung von Zinkstaub; abfiltriert, färben sie sich allmählich an der Luft. Die spektroskopische Untersuchung ergibt Urobilin und Hämatoporphyrin. Wird der Essigsäure der die Lösung des Hämins befördernde Jodwasserstoff zugesetzt, so ist das an der Luft sich regenerierende Porphyrin Mesoporphyrin.

Wir sehen also, daß die einzelnen Reduktionsmittel in einer ganz spezifischen und äußerst charakteristischen Weise auf den Blutfarbstoff wirken; das Mesoporphyrin ist ein eigentliches Produkt

¹⁾ Bulletin de l'Acad. de Cracovie 1902.
Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 64.

der mäßigen Einwirkung von Jodwasserstoffsäure auf das Hämin. Diese Wirkung besteht aller Wahrscheinlichkeit nach darin, daß die Doppelbindungen im Molekül zerstört werden, wogegen 4 Wasserstoffatome eintreten. Dagegen greift der sich aus Zinkstaub entwickelnde Wasserstoff diese Bindungen gar nicht an. Nichts näher Bestimmtes können wir bis jetzt über diese Frage sagen, denn die bisherigen Versuche, irgend welche Derivate aus diesen Leukoverbindungen der Porphyrine zu gewinnen, sind erfolglos geblieben. Die farblosen Filtrate bilden zwar mit Jod und viel leichter noch mit Brom amorphe Niederschläge, die sich in Alkohol leicht, in Wasser aber nicht lösen; jedoch, wie die Analysen ergeben haben, sind diese Körper nicht homogen.

Es wurden auch einige Versuche angestellt, um die Quantität des durch das entfärbte Filtrat der Luft entnommenen Sauerstoffs zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurde ein abgemessenes Volumen eines solchen Filtrates, das genau einer bestimmten Quantität des reduzierten Porphyrins entsprach, in eine hermetisch geschlossene Flasche gebracht, deren Volumen genau bekannt war (etwa $\frac{1}{2}$ Liter); alsdann wurde nach Verlauf einer gewissen Zeit das Gas in diesem geschlossenen Gefäß der Analyse unterworfen. Diese Versuche haben folgende Resultate ergeben:

a) die Hauptmenge des Sauerstoffs wird in den ersten 2 Tagen absorbiert; nach Verlauf von 4 Tagen hat die Absorption ihr Ende erreicht;

b) inbetreff der Quantität des absorbierten Sauerstoffs haben einzelne Versuche folgende Zahlen ergeben:

1. Es wurden 0·5223 gr HCl-Mesoporphyrin verwendet
0·0229 gr Sauerstoff absorbiert.
2. — 0·386 gr HCl-Mesoporph. — 0·0146 gr Sauerstoff.
3. — 0·2073 gr HCl-Mesoporph. — 0·0114 gr Sauerstoff.

Das heißt, auf 639 Teile HCl-Mesoporphyrin (sein Molekulargewicht) wurden 28·0, 24·2 und 35·1, durchschnittlich 29·1 Gewichtsteile Sauerstoff absorbiert; also ein Molekül von Mesoporphyrin absorbierte nach Entfärben durchschnittlich 1·8 Atome Sauerstoff aus der Luft. Es enthalten also wahrscheinlich die neuen Leukoverbindungen im Verhältnis zu den entsprechenden Porphyrinen, aus welchen sie entstanden sind, je 2 Wasserstoffatome weniger, oder aber, was wahrscheinlicher ist, 4 Wasserstoffatome mehr. Natürlich

muß man dabei bemerken, daß die obigen Angaben nur relativen Wert haben, da bei der Oxydation nicht die ganze Quantität des zur Reduktion verbrauchten Porphyrins regeneriert, sondern nur ein gewisser Teil desselben (30%).

Die durch Reduktion entfärbten Filtrate wurden auch der Untersuchung im Polarisationsapparate unterworfen. 0·8—1% Lösungen haben in 20 cm langen Röhren keine Drehung der Polarisations-ebene gezeigt.

Dublany, Juli 1906.

Chemisches Laboratorium der Landwirtschaftlichen Akademie.

46. M. M. RACIBORSKI m. c. **O asymilacyi związków azotowych przez grzyby.** (*Über die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze*). (*Sur l'assimilation des composés d'azote par les champignons*).

Auf dem gut erforschten Gebiete der Assimilation der Stickstoffverbindungen erschien es mir erwünscht, näheres über zwei Punkte zu erfahren. Es handelte sich darum, ob nämlich die chemisch so verschieden gebauten und doch assimilationsfähigen Stickstoffverbindungen durch verschiedene, chemische Außenbedingungen des Wachstums in ihrer Assimilationsfähigkeit beeinflußt werden, und zweitens ob bei der Assimilation chemisch verschiedener Stickstoffverbindungen die normalen Stoffwechselprodukte der Pflanze Differenzen zeigen. Experimentiert wurde mit Pilzen. Die gesammelten Erfahrungen teile ich in fünf getrennte Kapitel ein, und zwar:

- I. Assimilation der Nitrite;
- II. Assimilation des Nitrats und Ammonstickstoffes;
- III. Assimilation der Hydroxylamin- und Hydrazinsalze.
- IV. Assimilation der aliphatischen Aminosäuren;
- V. Assimilation der aromatischen Aminosäuren.

In methodischer Hinsicht möchte ich bemerken, daß die meisten Versuche in speziell aus Jenaglas bei Schott & Comp. hergestellten, sehr breiten, jedoch niedrigen Kolben durchgeführt wurden. Bei gleichen Versuchsbedingungen kann jedoch die Trockenernte der Schimmelpilze in ziemlich weiten Grenzen variieren, besonders aber in den Fällen, wo nicht alle Kolonien eines Kolbens oberflächlich

wachsen, oder wo keine zusammenhängende Pilzdecke gebildet wird. Es kommt vor, daß in manchen Kolben die Pilze anfangs nicht wachsen wollen und nachträglich doch üppige Ernte erzielt werden. Hier handelt es sich um oligodynamische Wirkungen, welche nicht näher untersucht wurden.

I. Assimilation der Nitrite.

Es wurde schon öfters die Ansicht ausgesprochen, daß der Stickstoff der Nitrite durch Schimmelpilze nicht assimilierbar sei. Doch haben S. Winogradzky u. Omeliańskij (Zentrbl. f. Bakteriologie, II. Abt. Band V, 1899, S. 341—342) einen Schimmelpilz erwähnt, welcher die Nitrite assimiliert, ohne deren Oxydation zu bewirken. Daß *Basidiobolus ranarum* in 1% KNO_2 -Lösung, als ausschließlicher Stickstoffquelle, sehr kümmerlich wächst, habe ich im Jahre 1896 (Flora Bd. 82, S. 120) bewiesen. O. Treboux teilt (Berichte d. d. bot. Ges. 1905. Bd. XXII, S. 570) in einer vorläufigen Mitteilung mit, daß Nitrite für verschiedene Chlorophyllpflanzen (ebenso auch für Pilze) meist eine gute N-Quelle abgeben und im Vergleich mit den Nitraten gleichen oder (so häufig bei Chlorophyceen) einen etwas besseren Nährwert enthalten, falls nur die Reaktion der Nährlösung alkalisch ist.

Vor zwei Jahren habe ich, um Nitritpilze zu finden, die Methode der elektiven Kultur angewandt. Eine gewöhnliche Nährlösung mit 5% Sakcharose als C-Quelle, mit 2% Natriumnitrit als Stickstoffquelle wurde in offenen, flachen Schalen offenstehen gelassen. Nach einigen Tagen war in den Schalen eine gemischte, meistens rötlich gefärbte Pilzvegetation zu sehen. Von dieser Nitritflora wurden zwei üppig wachsende Arten, nämlich die gewöhnliche Rosehefe, und eine nur spärliche Konidien bildende, in älteren Stadien schön rot gefärbte, üppig wachsende *Cylindrotrichum*-Art isoliert und längere Zeit in Nitritlösungen kultiviert. Eine Kulturreihe dieses Nitritpilzes, welche in großen Kolben in 1000 ccm Flüssigkeit mit 5% Sakcharose und verschiedenen Stickstoffquellen angestellt war, ergab am 6. VII. 1906 folgende Ernte-Gewichte (bei 100° getrocknet).

Mit 1% Ammoniumsulfat	. . .	1.498 gr
mit 1% Natriumnitrit	. . .	1.193 gr
mit 1% Natriumnitrat	. . .	6.073 gr.

Unsere *Cylindrotrichum*art hat also — unter den Bedingungen der Versuchsanstellung eine viermal größere Ernte mit Hilfe der Nitrate als mit Ammonsalzen geliefert.

Eine andere Versuchsreihe (28. IV. 1906) wurde mit gleichen Stickstoffmengen in je 200 ccm Flüssigkeit und 5% Sakcharose angestellt und zwar

- A. mit 0.66% Ammoniumsulfat
- B. mit 0.69% Natriumnitrit
- C. mit 0.85% Natriumnitrat.

Die Kolben wurden am 12. IX. mit folgendem Resultat untersucht: Die Reaktion der Kulturen im Anfangsstadium war neutral.

	A.	B.	C.
1) Trockenernte	0.74 gr	2.724 gr	1.725 gr
2) Reaktion	sauer,	alkalisch	alkalisch
3) Zur Neutralisation gebraucht für je 10 ccm Lösung	8 ccm $\frac{n}{50}$ KOH (Kongo)	24 ccm $\frac{H_2SO_4}{50}$ (Methylorange)	3.8 ccm $\frac{n}{50} H_2SO_4$ (Methylorange)
4) Oxalsäure	negativ	negativ	negativ
5) Reaktion Millon	+++	+++	+++
6) Bromwasser	keine Trübung	schwache Trüb. dunkel violett grau	weiße Trübung
7) Eisenchlorid	violett grau		violett grau
8) Ammonium- vanadat	grau	schwarz violett	violett
9) Ammoniakalischer Silber- nitrat	ohne Reduktion	ohne Reduktion	ohne Reduktion
10) Nessler R.	+++	negativ	negativ.

Die in der Tabelle zusammengestellten Befunde möchte ich kurz besprechen. Die höchste Ernte wurde mit Nitrit (in alkalischer Lösung) erzielt. Die Nitraternte (alkalische Lösung) ist höher als die Ammoniumernte (saure Lösung). Doch bildet der Ammoniumpilz keine Decke, wie es die beiden anderen tun, sondern wächst in kugeligen Aggregaten untergetaucht. Nitrate und Nitrite werden zu Ammonium nicht reduziert, dagegen in allen drei Lö-

sungen ist ein reduzierender Sekretkörper entstanden, wie sich dies aus der Vanadatreaktion ergibt. Oxalsäure wird nicht gebildet, dagegen findet sich in allen drei Nährlösungen ein aromatischer Exkret (Millonsche Reaktion), welcher sich mit Bromwasser trübt, jedoch die ammoniakalische Silberlösung nicht reduziert. Die aromatischen Verbindungen werden als Exkrete der Pilze, welche auf Kohlehydrate als die einzige Kohlenstoffquelle angewiesen sind, nach längerer Vegetation derselben sehr häufig gebildet, wahrscheinlich als Abbauprodukte der Reserveproteine. Mit der Vanadatreaktion werden wir uns in der vorliegenden Abhandlung nicht beschäftigen, über aromatische Abbauprodukte der Pilze bringen wir manche Experimente in dem letzten Kapitel.

Der Nitritjon ist also als Stickstoffquelle und zwar als eine gute Stickstoffquelle durch Pilze, welche keine (stärkeren) organischen Säuren (also nur CO_2) bilden, assimilierbar. Der Nitritjon wird dabei weder oxydiert noch zu Hydroxylamin reduziert. Die Nährflüssigkeit B mit Karbamid-Überschuß in schwach (mit Essigsäure) angesauerter Lösung bis zum Verschwinden der Jodkaliumstärkereaktion erhitzt, ergab keine Reaktion mit Diphenylamin und Schwefelsäure, es hat sich also kein Salpeter gebildet. Das Fehlen der Reduktion und der Gasbildung mit der Silberlösung beweist die Abwesenheit der Hydroxylaminsalze, auch entstand mit Nessler's Reagens keine Ammoniakreaktion. Es wird also der Nitritjon als Stickstoffquelle verwertet

Aspergillus niger wächst in der gewöhnlichen Nährlösung mit 5% Sakcharose und mit 1% Natriumnitrit gar nicht. Die Kulturflüssigkeiten des *Aspergillus* mit Kohlehydraten, als alleiniger C-Quelle, werden jedoch bei dem Wachstum des *Aspergillus* sauer, und es ist klar, daß die saure Reaktion der Nährlösung, welche die Bildung der freien, sehr giftigen salpetrigen Säure aus Nitriten zur Folge hat, die Unverwendbarkeit der Nitrite bedingt. Zur experimentellen Entscheidung der Frage wurde den Kulturflüssigkeiten Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, Kalziumkarbonat, Magnesiumkarbonat zugesetzt und nach 12 Tagen erhielten wir folgende Resultate.

Nährlösung: 5% Sakcharose, 1% Natriumnitrit, 200 ccm Flüssigkeit.

	Wachstum	Trockenernte	Fruchtifikation	Reaktion der Flüssigkeit am Ende des Versuches
A. 0.25% Na_2CO_3 . . .	+	0.0045 gr	0	Eine Spur von saurer Reaktion
B. 0.25% NaHCO_3 . . .	+	0.0125 gr	0	alkalisch
C. 1% CO_3Ca	0	0	0	neutral
D. 1% Magnesia alba . . .	++	0.025 gr	0	alkalisch
E. Ohne Zusatz	0	0	0	neutral

Ich bemerke, daß die Natriumkarbonatkultur, welche anfangs gut gedieh, in den letzten Tagen aus Mangel an Karbonat aufgehört hat zu wachsen. In der Kalkkarbonatkultur ist offenbar die Unlöslichkeit des Karbonats die Ursache des negativen Resultats. In der Magnesiakarbonatkultur wächst der *Aspergillus* üppiger als in den übrigen Kolben und zwar nicht nur auf der Oberfläche der Flüssigkeit, sondern besonders auf der Oberfläche der Magnesiastücke, welche von Pilzhyphen so fest umspinnen waren, daß bei der Ernteberechnung ein kleiner Verlust unvermeidlich war.

Durch die beschriebenen Versuche wurde erwiesen, daß die Nitrite, solange die Nährlösung durch Karbonate neutralisiert wird, zwar eine Stickstoffquelle für *Aspergillus niger* sind, jedoch bei dieser Art der Neutralisation nur sehr geringe Ernten ergeben und die Sporenbildung verhindern. In der Magnesiakultur finde ich neben ganz normalen, schmalen, langzelligigen Hyphen auch viele fast isodiametrische, dicke, jedoch kurze Zellen, wie solche bei *Aspergillus* bei verschiedenen schädlichen Eingriffen der Außenwelt entstehen. Eine Azidität der Nährlösung, welche in Ammonium- oder Nitratkulturen ganz unschädlich ist, wirkt dagegen in Nitritkulturen tödlich.

Aspergillus niger verträgt in gewöhnlichen Nährlösungen sowohl eine gewisse Alkaleszenz sowie auch eine gewisse Azidität ganz gut. Es sind dagegen Organismen bekannt, welche nur in sauren Lösungen gedeihen. Zu solchen Sauerorganismen zählen wir z. B. die Hefearten oder die Essigbakterien. Es ist klar, daß ein nur saure Nährlösungen vertragender Organismus nicht nur Nitrite nicht assimilieren kann, sondern sogar bei anderer zusagenden Stickstoffquelle die eventuelle Anwesenheit der Nitrite als Gift — infolge der Bildung der salpetrigen Säure — empfinden muß.

Zur Prüfung der Richtigkeit dieser Schlußfolgerung wurden zwei Hefearten benutzt, nämlich *Willia anomala* Hansen, für deren freundliche Zusendung ich Prof. C. Hansen in Kopenhagen bestens danke, sowie eine Reinkultur des *Saccharomyces Cerevisiae*, welche ich aus der Preßhefe der podolischen Hefenfabrik isoliert habe. Es wurden für jede Kultur je 200 ccm Nährlösung benutzt, als Kohlenstoffquelle diente 5%o Sakcharose, als Stickstoffquelle in den einzelnen Kolben 1%o Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammoniumsulfatlösung und zwar einmal mit, einmal ohne Zusatz von Magnesiumkarbonat. Die Alkaleszenz wurde mit $\frac{n}{50}$ H₂SO₄ und Rosolsäure, die Azidität mit $\frac{n}{50}$ HOH und Kongo untersucht. Versuchsdauer 6 Tage. Temperatur 30° C.

Willia anomala Hansen.

	Wachstum	Reaktion	Zur Neutralisation nötige Menge	
			$\frac{n}{50}$ H ₂ SO ₄	$\frac{n}{50}$ KOH
A. Natriumnitrat	+++	sauer	—	6.5 ccm
A ₁ „ mit Magnesia	++	alkalisch	6 ccm	—
B. Natriumnitrit	0	neutral	—	—
B ₁ „ mit Magnesia	++	alkalisch	3.8 ccm	—
C. Ammoniumsulfat	+++	sauer	—	17 ccm
C ₁ „ mit Magnesia	0	alkalisch	10 ccm	—

Die Besprechung der Ammoniumversuche im Zusammenhang mit manchen Ergebnissen der Flüssigkeitsanalyse soll bei anderer Gelegenheit erfolgen, hier interessiert uns nur die Tatsache, daß Anomalushefe (Nitrat als Stickstoffquelle) kein Sauerpilz in dem oben postulierten Sinne ist und Nitrite in alkalischer Nährlösung assimiliert.

(Tabelle Seite 739).

Der Pilz wächst zwar in Natriumnitrat, doch nur äußerst schwach und scheint sich zuletzt nicht mehr zu vermehren. Laurent hat nämlich gezeigt, daß Hefe zu salpeterreduzierenden Organismen gehört, und diese Reduktion hat Pozzi-Escot (Oxydases & les re-

Saccharomyces Cerevisiae.

	Wachs- tum	Reaktion	Zur Neutralisation verbrauchte Menge	
			$\frac{n}{50}$ H ₂ SO ₄	$\frac{n}{50}$ KOH
A. Natriumnitrat	+	schwach sauer	—	2 ccm
A ₁ „ mit Magnesia	0	alkalisch	3·7	—
B. Natriumnitrit	0	neutral	—	—
B ₁ „ mit Magnesia	0	alkalisch	3·1 ccm	—
C. Ammoniumsulfat	+++	sauer	—	13·5 cm
C ₁ „ mit Magnesia	0	alkalisch	11 cm	—

ductases pag. 95) mit dem Hefeextrakt (Philotion) außerhalb der Zelle durchgeführt. Ein salpeterreduzierender Organismus kann natürlich bei saurer Reaktion der Nährlösung nicht leben. Doch liefert die Lösung A keine Reaktion mit angesäuerter Jodkalistärke- und mit dem Reagens von Griess nur eine sehr schwache Färbung.

Jedenfalls haben wir in der untersuchten Hefeart einen Organismus vor uns, welcher sogar in schwach alkalischen Lösungen nicht wachsen kann und der zugleich die Nitrite nicht assimiliert.

II. Über die Assimilation des Nitrat- und Ammonstickstoffes.

Viele Pflanzen assimilieren ebenso den Stickstoff der Nitratsalze wie denjenigen der Ammonsalze, und speziell über das Verhalten der Pilze gibt es eine verhältnismäßig reiche Literatur. Weniger informiert sind wir dagegen über die verschiedene Beeinflussung der Assimilation des oxydierten Stickstoffes in Salpeter und des reduzierten Stickstoffes in Ammonsalzen durch äußere Bedingungen des Wachstums. Von der reichen Fülle solcher, — einer experimentellen Prüfung würdigen — Bedingungen hat uns, — eben in Anbetracht der chemischen Differenz des NO₃ und NH₃, — die Wirkung der oxydierenden und der reduzierenden Körper auf die Stickstoffassimilation interessiert. Die Differenzen der Wirkung in den parallelen NH₃- und NO₃-Kulturen können auf verschiedene Weise zustande kommen. Infolge der rein chemischen Wirkung, also ganz extrazellulär, kann ein sonst unschädlicher Reduktionskörper aus Nitraten freie salpetrige Säure bilden und so das Wachstum in Salpeterkulturen hemmen oder das Leben vernichten, während

Ammoniumkulturen normal weiter wachsen. Es wäre aber auch ein anderer Fall denkbar, daß nämlich ein zugesetzter Oxydans oder Redukans extrazellulär keine Wirkung auf die NO_3^- , resp. NH_3 -Salze ausüben, dagegen in ungleichem Maße die Kuppelungsfähigkeit der Stickstoffkomponenten an das lebende Plasma beeinflussen oder sogar die Assimilation einer Stickstoffform verhindern würde. Physiologisch wären die letzten Fälle von Interesse, in Praxis dürften auch die zuerst genannten schwer wiegen. Experimentiert wurde mit *Aspergillus niger*, als Kohlenstoffquelle diente immer 5% Sakcharose, als Stickstoffquelle in der einen Reihe von Versuchen 1% Natriumnitrat, in der anderen 1% Ammoniumsulfat, die Flüssigkeitsmenge betrug immer 200 ccm. Eisen wurde nicht zugesetzt, was ich betonen will, da bei Oxydationen schon eine ganz geringe Eisenmenge als Überträger eine große Rolle spielen und die zu erforschende Wirkung möglicherweise dadurch verstärkt oder ganz anders gestaltet werden könnte. Ohne Zweifel würde es sich jedoch lohnen, wenigstens einige von den Versuchen bei Eisengegenwart zu wiederholen. Ich habe seinerzeit vergleichende Versuche mit und ohne Eisen über die Nitrifikation des Ammoniaks durch Nitrosomonaden gemacht und war von der äußerst langsamen Nitrifikation in den Fe-freien Kolben so überrascht, daß ich sogar eine Prüfung der Nitrifikationsschnelligkeit in möglichst eisenfreien Kulturen aus theoretischen Gründen für angezeigt halte.

Was die geprüften Oxydations- und Reduktionsmittel anbelangt, so konnten aus der langen Liste derjenigen, welche Lassar-Cohn (Arbeitsmethoden S. 791 ff.) angegeben hat, begrifflicherweise nur wenige untersucht werden und auch diese nur in neutraler Lösung. Untersucht wurden von den Oxydationsmitteln: Wasserstoffsuperoxyd, Kaliumsuperoxyd, Kaliumchlorat, Kaliumperchlorat, Kaliumbromat, arsensaures Natrium, Ammoniumvanadat, Bleisuperoxyd; von den Reduktionsmitteln: Aluminiumpulver, Zinkpulver, Schwefelpulver, Natriumthiosulfat, Kaliumphosphit, Kaliumhypophosphit, arseniksaures Kalium, ameisensaures Kali, Glukose.

1. Wasserstoffsuperoxyd. Benutzt wurde eine Lösung, von welcher 1 ccm 18·4 ccm $\frac{n}{10}$ Permanganatlösung brauchte. Zu je 200 ccm Flüssigkeit wurden von dieser Lösung je 10, 20 und 50 ccm zugesetzt. Die Kulturen wurden nach 5 Tagen untersucht. Die Flüssigkeit reagierte überall schwach sauer.

	auf je 10 cem Permanganat wurden anfangs verbraucht:	auf je 10 cem Permanganat nach 5 Tagen:	Ernte
1 a. $\text{NaNO}_3 + 10 \text{ cem H}_2\text{O}_2$.	9.2	7 cem	0.03 gr
1 b. $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4 + 10 \text{ cem H}_2\text{O}_2$	9.2	0.75 "	0.131 "
2 a. $\text{NaNO}_3 + 20 \text{ cem H}_2\text{O}_2$.	18.4	15 "	0.0085 "
2 b. $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4 + 20 \text{ cem H}_2\text{O}_2$	18.4	5.1 "	0.229 "
3 a. $\text{NaNO}_3 + 50 \text{ cem H}_2\text{O}_2$.	46	34.45 "	Spur
3 b. $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4 + 50 \text{ cem H}_2\text{O}_2$	46	15.8 "	0.220 "

Die Sporen keimten in allen Kulturen, jedoch in Salpeterlösungen später als in Ammoniaklösungen. In den letzteren wachsen die Hyphen ungemein üppig, die Lufthyphen sind anormal bis 1.5 cm lang, prachtvoll weiß und bilden lockere, enorm hohe, kissenförmige Kolonien, welche dann normal fruktifizieren. An der Oberfläche der untergetauchten Hyphen bilden sich — als Folge der Katalasewirkung — viele große Sauerstoffblasen, wodurch eine Verarmung der Nährlösung an H_2O_2 eintritt

In Salpeterkulturen dagegen wird das Wachstum verlangsamt und zwar mit steigender Konzentration des verwendeten H_2O_2 immer stärker, so daß in einer Lösung, welche 50 cem H_2O_2 auf 200 Flüssigkeit enthält, die Sporen zwar noch keimen, jedoch kein Wachstum zeigen. Die Ursache der hemmenden Wirkung der Salpeter- H_2O_2 -Kulturen darf nicht etwa in der (unbewiesenen) Hemmung der Zerfalls des Wasserstoffsperoxyds in Salpeterlösung gesucht werden, weil doch am Ende des Versuches die H_2O_2 -Mengen in der Salpeterkultur 2 a und in der Ammonkultur 3 b gleich sind, während der Ernteertrag der Ammonkultur 25-fach die Gewichtsmenge desjenigen der Salpeterkultur übertrifft. Oxalsäure fehlt in allen Kulturen. Es wird also durch einen Zusatz von H_2O_2 die Assimilierbarkeit des Salpeterstickstoffs (im Gegensatz zu Ammonstickstoff) herabgedrückt, ohne jedoch bei kleineren Dosen des Oxydans vollständig zu verschwinden.

2. Kaliumpersulfat. In der Abhandlung über „Einige Chemomorphosen des *Aspergillus niger*“ habe ich auf S. 765 kurz erwähnt, daß 1% Lösungen des stark oxydierenden Salzes für *Aspergillus niger* ohne Bedeutung sind. Ich habe diesen Satz unrichtig, nämlich zu allgemein formuliert. Nur schwache Konzentrationen der Per-

sulfate zeigen keine sichtbare Wirkung auf die Lebensweise, die Assimilation des Stickstoffes und die Sporenbildung des *Aspergillus niger*, in stärkeren Lösungen wird die Sporenbildung unterdrückt, das Wachstum stark retardiert und anomale Zellen gebildet.

Erwähnen will ich noch, daß alle benutzten Persulfate mit Diphenylamin und Schwefelsäure eine blaue Reaktion geben, also nitrathaltig sind und dadurch in meinen Ammoniakkulturen mit Persulfaten auch oxydierter Stickstoff vorhanden war. Von einer Gasbildung, wie solche in Wasserstoffsperoxydkulturen als Folge der Katalasewirkung sehr intensiv aufgetreten war, ist in Persulfatkulturen keine Spur zu finden. Kaliumpersulfat wurde benutzt in 0.25, 0.5, 1, 2% Lösung. Die Kulturen wurden 8 Tagen nach der Aussaat untersucht.

	Ernte	Sporenbildung	Zur Neutralisation der 10 ccm nötige Menge $\frac{n}{50}$ KOH
A ₁ NaNO ₃ + 0.25% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	0.627	+++	21 ccm
A ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 0.25% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	0.559	+++	28 "
B ₂ NaNO ₃ + 0.5% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	0.4935	+++	21 "
B ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 0.5% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	0.474	+++	26 "
C ₁ NaNO ₃ + 1% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	0.422	+	12 "
C ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 1% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	0.332	+	22.5 "
D ₁ NaNO ₃ + 2% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	? ¹⁾	0	?
D ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 2% S ₂ O ₈ K ₂ . . .	? ¹⁾	Spuren	?

Obwohl augenscheinlich Ammonkulturen üppiger als Nitratkulturen zu wachsen scheinen, zeigen doch die Trockenerntegewichte eine Hemmung der ersten²⁾. Gegen Erwarten zeigen die beiden Versuchsreihen keine stärker ausgeprägten Differenzen.

3. Kaliumchlorat. Eine Zusammenstellung des bisher über die Wirkung des KClO₃ auf die Pflanzen Bekannten ist bei Loev (Giftwirkungen, 17) zu finden. Nach Manassein werden Schimmelvegetationen sogar bei Zusatz von 7% ClO₃K zur Nährlösung

¹⁾ Die beiden Pilzdecken wurden zu mikroskopischen Zwecken fixiert.

²⁾ In einer 28 Tage alten Kultur mit 1.5% S₂O₈K₁ und 1% NaNO₃ wog die Ernte 0.768 gr, in der Parallelkultur mit 1% (NH₄)₂SO₄ und Persulfat nur 0.388 gr.

(Rohrzucker, weinsaures Ammoniak und Hefeasche) nicht geschädigt, selbst nicht bei saurer Reaktion!

Auf die Assimilation des Ammoniakstickstoffs sind Chlorsäurejonen tatsächlich ohne Einfluß, dagegen wird durch ihre Anwesenheit, sogar in starker Verdünnung, die Assimilation des Nitratstickstoffs fast vollständig unterdrückt. Die Hemmung des Wachstums in den Salpeter-Chloratkulturen ist — wie durch spezielle Versuche festgestellt wurde — die Folge des Stickstoffhungers und nicht die einer Giftwirkung.

In Ammon-Chloratkulturen keimen die Sporen, und die Hyphen wachsen ganz normal; in den Salpeter-Chloratkulturen keimen viele Sporen nicht, und die gekeimten wachsen entweder gar nicht, oder einige von ihnen bilden sehr dünne, lange, inhaltsarme Hyphen, welche typische Hungerhyphen darstellen, wie wir solche in den s. g. stickstofffreien Lösungen der chemischen Laboratorien finden. Diese Hungerhyphen wachsen in 5%o Šakharoselösung.

Weitere Forschungen sollen uns über die Ursache der so schwachen Azidität der Salpeter-Chloratkulturen Aufklärung geben. Offenbar findet infolge des „Minimumgesetzes“ in diesen Kolben trotz der Anwesenheit des Salpeters nur ein äußerst beschränkter Šakharoseverbrauch statt.

	Ernte in Gramm	Zur Neutralisation der 10 ccm Lösung verbrauchte ccm der $\frac{n}{50}$ KOH
A ₁ NaNO ₃ + 0.5%o KClO ₃	0.014	3
A ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 0.5%o KClO ₃	1.129	29
B ₁ NaNO ₃ + 1%o KClO ₃	0.014	2.5
B ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 1%o KClO ₃	0.717	22
C ₁ NaNO ₃ + 2%o KClO ₃	0.0085	2.5
C ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 2%o KClO ₃	1.4	35
D ₁ NaNO ₃ + 5%o KClO ₃	0.006	1.5
D ₂ SO ₄ (NH ₄) ₂ + 5%o KClO ₃	1.562	37

Die Kulturkolben wurden 9 Tage nach der Aussaat untersucht. Nur in der Kultur A₂ und B₂ hatten sich kaum wahrnehmbare Spuren der Oxalsäure gebildet. Alle Ammonkulturen liefern mit Ammonvanadat eine grauviolette, mit Eisenchlorid eine rötli-

che Färbung, während diese in Salpeterkulturen vollständig fehlen. Nitrite oder Hydroxylaminsalze sind in keiner Kultur zu finden (die Reaktionen: nach Griess; JK + Stärke + Essigsäure, Kupfersulfat, ammoniakalische Silberlösung sind alle ohne Erfolg).

Daß sich in den Salpeterkulturen durch Zusatz von Chlorat kein Giftstoff bildet, ist klar, da die Keimlinge und die dünnen Hyphen zwar nicht weiter wachsen, jedoch am Leben bleiben. Zwei weitere Versuche sollten den Sachverhalt klären. Es wurden drei Kolben mit je 200 ccm 5%o Sakcharoselösung mit je 2%o KClO_3 beschickt. Als Stickstoffquelle diente in

- 1) 1%o NaNO_3
- 2) 1%o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$
- 3) 1%o NaNO_3 + 1%o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Die Kulturen wurden nach 5 Tagen unterbrochen und die bei 200° getrockneten Pilzdecken gewogen.

	Azidität mit $\frac{n}{50}$ KOH in ccm gemessen	Ernte
1. Kultur	2 ccm	0.004 gr
2. "	22 "	1.412 "
3. "	6.5 "	0.342 "

In der Mischkultur Nr. 3. wächst *Aspergillus* im Vergleich mit der reinen Ammonkultur verspätet und schwächer, doch sonst ganz normal, fruktifiziert ebenso normal, nur etwa 24 Stunden später.

Das gleiche Resultat wurde erzielt, wenn einer von beiden fünf Tage alten Salpeter-Chloratkulturen, in welchen *Aspergillus* fast nicht gewachsen hat, ein wenig Ammoniumsulfat zugesetzt wurde. Der Pilz wächst jetzt, natürlich nur in dem NH_3 -Kolben sehr stark.

Die gleichzeitige Anwesenheit der Nitrat- und Chloratjonen verhindert also die Assimilation des Ammoniumstickstoffes nicht, doch schwächt sie die Intensität derselben.

Aus praktischen Gründen wäre es angezeigt zu untersuchen, ob bei den Phanerogamen die Assimilation des Salpeterstickstoffes bei Gegenwart der Chlorate vor sich geht. Die Chlorate finden sich doch in Chilisalpeter, werden jedoch im Gegensatz zu den Per-

chloraten in der Kaufwaare durch die Versuchsstationen nicht speziell beanstandet.

4. Kaliumperchlorat wurde in 0.5% Lösung versucht, und die Kulturen nach 9 Tagen untersucht. Beide Kulturen wachsen ganz normal und üppig, fruktifizieren normal und zeigen augenscheinlich keine Differenzen. Die stark sauren Kulturflüssigkeiten zeigen mit Eisenchlorid intensiv rote Reaktion der Essigsäure, mit Ammoniumvanadat Violettfärbung, mit dem Reagens von Griess auf Nitrite verhalten sich beide negativ; die amoniakalische Silberlösung zeigt weder Reduktion noch Gasentwicklung. Die Azidität war stärker in der Salpeterlösung, als in der Ammonflüssigkeit, 10 ccm von der ersten verbrauchten 131 ccm von $\frac{n}{50}$ KOH (auf Kongo), die gleiche Menge von der zweiten dagegen nur 109 ccm.

5. Kaliumbromat wurde in 0.5% Lösung gebraucht, die Kulturen wurden nach 9 Tagen untersucht. Beide Kulturen wachsen gleich gut, fruktifizieren, und keine von ihnen zeigt irgend welche Anomalien. Mit Eisenchlorid, Ammoniumvanadat, Millon'schem Reagens, Griess'schem Reagens, amoniakalischer Silberlösung zeigen sie keine Reaktion. Oxalsäure wurde nicht gebildet. Je 10 ccm der Lösung brauchten zur Neutralisation bei der Salpeterkultur 23 ccm, bei der Ammonkultur 18.5 ccm von $\frac{n}{50}$ KOH (Indikator: Kongo).

6. Ammoniumvanadat wurde in 0.5% Lösung gebraucht. Zwei Tage nach der Aussaat verfärbt sich in beiden Kulturflüssigkeiten die unmittelbar an die Hyphen grenzende Flüssigkeitsschicht infolge der Säurebildung und Reduktion grün, bald darauf erscheinen die beiden Kulturen schwarzgrün. Beide Kulturen wachsen stark und normal, jedoch ist in der Ammonkultur nach 2 Wochen die Sporenbildung bedeutend spärlicher als in der Salpeterkultur. Wegen der intensiv dunklen Farbe der Nährlösung konnten die gewöhnlichen Reaktionen nicht gemacht werden.

7. Arsensaures Natrium wurde in verschiedenen Konzentrationen angewandt, da jedoch die Kulturen durch andere Pilze und Bakterien verunreinigt waren, so will ich nur kurz bemerken, daß in 0.1%, 0.25% und 0.5% Lösungen, sowohl in der Salpeter- wie in der Ammonkultur *Aspergillus* wächst und fruktifiziert.

8. Bleisuperoxyd und 9. Braunstein verhindern, den

Nährlösungen zugesetzt, weder das Wachstum noch die Fruktifikation. Zwischen den Ammon- und den Salpeterkulturen bemerke ich keine ausgeprägte Differenz.

Von den Reduktionsmitteln wurde mit folgenden Körpern experimentiert:

1. Zinkpulver wirkt, der Nährlösung zugesetzt, auf das Wachstum des *Aspergillus niger* ganz anders in der Salpeter- als in der Ammonlösung. In beiden Nährlösungen keimen die Sporen, doch in der Salpeterlösung wachsen sie gar nicht weiter, in der Ammonlösung wachsen sie zwar gut; doch solange Zinkpulver noch nicht oxydiert ist und als Reduktionsmittel wirkt, fruktifiziert *Aspergillus* nicht. Die ersten Sporenträger bilden sich erst in nicht mehr reduzierenden Lösungen.

Neun Tage alte Kulturen lieferten folgendes:

	Ernte	Azidität ¹⁾	Alkalität ¹⁾	Reaktion nach Griess	IK + Stärke + Essigsäure
A ₁ 1% Na NO ₃ + 1% Zn	0	—	—	+++	+++
A ₂ 1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + „	0.672 gr	24 ccm	0.3 ccm	0	0
B ₁ 1% Na NO ₃ + 2% Zn	0	—	—	+++	+++
B ₂ 1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + „	0.602 gr	16 ccm	0.2 ccm	0	0
C ₁ 1% Na NO ₃ + 5% Zn	0	—	—	+++	+++
C ₂ 1% (NH ₄) ₂ SO ₄ + „	0.578 gr	9.5 ccm	0.18 ccm	0	0

Es wird also durch Zinkpulver Salpeter zu Nitrit reduziert und es liegt die Vermutung nahe, daß die Hemmung des Wachstums in Salpeterkulturen eben durch Gegenwart des Nitrits verursacht wird. Wir haben deswegen einer Kultur mit 2% Zink noch 1%

¹⁾ Die Azidität wurde mit $\frac{n}{50}$ KOH gemessen, angegeben ist die Zahl der ccm, welche 10 ccm Kulturflüssigkeit (Indikator: Kongo) neutralisierten; Alkalität in $\frac{n}{50}$ H₂ SO₄ (Indikator: Phenolphthalein).

Magnesiumkarbonat zugesetzt, doch auch in diesem Kolben wuchs *Aspergillus* gar nicht. Möglicherweise ist die zu hohe Alkalität des letztgenannten Kolbens daran schuld.

2. Aluminiumpulver, in 1⁰/₀-ger Menge den Kulturlösungen zugesetzt, schwimmt zunächst als silberne Decke auf deren Oberfläche. Die ausgesäten *Aspergillus*sporen keimen und ihre Hyphen wachsen. In den ersten Tagen ist augenscheinlich das Wachstum der Hyphen in der Ammonflüssigkeit stärker als in der Nitratkultur. Im weiteren Verlaufe, während der starken Reduktion, ändert sich jedoch die Wachstumsweise so, daß endlich die Nitratkultur eine ungemein üppige, sehr intensiv sporenbildende Decke bildet, während die Decke der Ammonkultur weniger dick und deren Sporenbildung retardiert erscheint. Nach 16 Tagen wurde Aluminium noch nicht (besonders in der Ammoniumkultur) oxydiert, und die geernteten Pilzdecken von dem metallischem Aluminium, welches das Erntegewicht ein wenig (besonders in der Ammonkultur) erhöht, nicht zu befreien. Sonst wurde folgendes ermittelt:

	Trockenernte	Azidität mit $\frac{n}{50}$ KOH gemessen (Kongo)	Reaktion nach Griess	IK + Stärke + Essigsäure	Oxalsäure
1 ⁰ / ₀ NaNO ₃	3·1 gr	1·8 ccm	+	Spur	+++
1 ⁰ / ₀ (NH ₄) ₂ SO ₄	1·06 gr	19 ccm	0	0	Spur

Trotz der schwachen Nitritreaktion in der Salpeterkultur beschwach saurer Reaktion wächst der *Aspergillus* sehr gut.

3. Schwefelblumen, in 2⁰/₀ Menge zugesetzt, schwimmen auf der Oberfläche der Flüssigkeit, sind später von den Pilzmassen nicht zu trennen, weswegen die letzteren nicht gewogen wurden. H₂S bildet sich in beiden Kulturen in geringen Mengen, Bleiazetatpapier wird jedoch oberhalb der Ammonkultur dunkler gefärbt als oberhalb der Nitratkultur. *Aspergillus* wächst in beiden Kulturen sehr gut, in der Ammonkultur augenscheinlich üppiger als in der Salpeterkultur. Nach 16 Tagen sind beide Flüssigkeiten stark sauer, 10 ccm Salpeterkultur verbraucht zur Neutralisation (auf Kongo) $68 \text{ ccm } \frac{n}{50} \text{ KOH}$, 10 ccm Ammonkultur nur klein wenig

mehr, nämlich 79 ccm. Die Oxalsäure ist in beiden Flüssigkeiten sehr reichlich vorhanden, speziell in der Salpeterkultur bildet sich ein so reicher Kalkoxalatniederschlag, wie ich es in anderen Saccharosekulturen noch nicht beobachtet habe. Sie ergibt mit Eisenchlorid in der Salpeterkultur eine graugelbe, in der Ammonkultur eine rote, mit Ammoniumvanadat in den beiden Flüssigkeiten, besonders aber in der Ammonkultur, eine dunkelviolette Reaktion, mit dem Reagens von Millon in beiden die Rotfärbung der Flüssigkeit.

In der Salpeterkultur wurde — womit ich mich aber nicht näher beschäftigen wollte — ein Körper gebildet, welcher mit dem Reagens von Griess (Sulfanilsäure, α -Naphthylamin, Essigsäure) eine tiefblaue, nach der Alkalisierung eine gelbliche Farbe, mit dem Reagens von Nessler eine prachtvolle, im Reagens lösliche rote Farbe liefert.

4. Natriumthiosulfat hat in Ammonkulturen, wie ich schon früher publiziert habe (Chemomorphosen des *Aspergillus niger*, Bulletin de l'Acad., Décembre 1905), die Bildung des intrazellulären Schwefels zur Folge und verhindert dadurch die Sporenbildung. Dieselben Wirkungen verursacht er in Nitratkulturen. Bei geringen Zugaben (0.5%, 0.25%) fängt der Salpeterpilz an, in drei Tagen schwarze Sporen zu bilden, doch hört die Sporenbildung nach 1 bis 2 Tagen ganz auf, die Sporenträger werden von weißen, schwefelsammelnden Hyphen bedeckt und dann kommt es nicht mehr zur Sporenbildung.

5. Kaliumphosphit in 1% Lösung verhindert nicht die Keimung der Sporen. In der Salpeterlösung wachsen Hyphen in den ersten Tagen sehr wenig und stellen endlich ihr Wachstum ganz ein, ohne zu fruktifizieren. In der Ammonlösung wächst dagegen der *Aspergillus* ungemein üppig und bildet dicke, gut fruktifizierende Kahmhaut. Nach 16 Tagen wurden die Kulturen untersucht.

(Tabelle Seite 749).

In der Nitratlösung wurden also Nitrite durch Reduktion gebildet.

6. Kaliumhypophosphit in 0.5% Lösung ist in beiden Lösungen ohne sichtbare Wirkung auf Wachstum und Fruktifikation des Pilzes. Vier Tage nach der Aussaat wurde in der Salpeterlösung 0.265 gr, in der Ammoniumlösung 0.436 gr Trockenernte er-

	Azidität ¹⁾	Oxalsäure	Reaktion nach Griess	IK + Stärke + Essigsäure	Ammonium- vanadat
Nitratlösung . .	10.5	0	+++	++	0
Ammonlösung .	75	+	0	0	violett

zielt. In den Kulturen, denen 1% Hypophosphit zugesetzt wurde, trat eine noch stärkere Verminderung der Salpeterernte ein. Nach 4 Tagen wog der Ernteertrag in der Salpeterflasche 0.18 gr, in der Ammoniumflasche 0.448 gr. Mit dem Reagens von Griess ergaben alle Kulturen negative Resultate.

7. Arseniksaures Kali wurde in verschiedenen Konzentrationen versucht, doch kann ich darüber wegen deren Verunreinigung durch Bakterien nur berichten, daß in 0.1% Lösungen *Aspergillus* sowohl in Salpeter- wie in Ammoniumlösungen gut fruktifiziert.

8. Ameisensaures Natrium zeigt in 0.5% Lösung keine sichtbare Wirkung. Der Ammon- und der Salpeterpilz wachsen sehr üppig und bilden massenhaft Sporen. In beiden Kulturlösungen wurde (nach 14 Tagen) Oxalsäure in sehr reichlicher Menge gefunden.

Endlich will ich erwähnen, daß nach Zusatz von 2% Dextrose keine sichtbare Differenz zwischen dem Wachstum des Salpeter- und des Ammonpilzes erzielt wurde.

Zur Beurteilung der oben zitierten Wirkungen der zugesetzten Oxydations- und Reduktionsmittel mögen einige Resultate der Analyse der Flüssigkeiten dienen, in welchen *Aspergillus niger* 10 Tage lang ohne jeden Zusatz gewachsen hat.

	Millon	Vanadat	IO ₃	Zur Neutralisation von 10 ccm Lösung nötige Menge $\frac{n}{50}$ KOH	Oxalsäure
Salpeterpilz	0	dunkel violett	Spur	78 ccm	+++
Ammonpilz	0	dunkel violett	+	39 ccm	+

¹⁾ Die Azidität wurde mit der Zahl der ccm der $\frac{n}{50}$ KOH gemessen, welche zur Neutralisation von 10 ccm Lösung (auf Kongo) nötig sind.

Bei der Assimilation der Ammonsalze bleiben die Anionen in der Lösung, bei der Assimilation des Salpeters dagegen die Kationen. Ist die Assimilation der beiden — so verschiedenen — Stickstoffverbindungen gleich stark, dann soll nach einer Wachstumsperiode die Ammoniakkultur an anorganischen Anionen, die Salpeterkultur an anorganischen Kationen reich werden. Die Aziditätsverhältnisse werden jedoch durch Bildung der organischen Anionen stark und wie im vorliegenden Fall in entgegengesetzter Richtung verschoben.

III. Über den Nährwert der Hydroxylamin- und der Hydrazinsalze.

„Diamid (Hydrazin) $N_2 H_4$ und Hydroxylamin $NH_2 OH$ wirken selbst bei erstaunlichen Verdünnungen giftig auf alles Lebendige“, schreibt O. Loew (S. 38). Da jedoch Ammoniak (NH_3), salpetrige Säure (NO_2) und Salpetersäure (NO_3), alles ebenfalls heftige Gifte in ihren Salzen assimilationsfähig sind, so habe ich einige Versuche angestellt, ob die Hydrazin- und Hydroxylaminsalze wirklich unbedingt alles Lebendige töten oder nicht. Die nützlichen Ammoniaksalze, die Nitrite und die Nitrate werden doch durch Entjionisierung zu heftigen Giften für alles Lebendige und die chemischen Rücksichten darauf, daß „das Diamid selbst in stärkst saurer Lösung jede Aldehydgruppe festlegt“ (Loew, Giftwirkungen, S. 39), machen die Fragestellung nur noch interessanter.

Leider konnte ich die Nährlösungen, um die labilen Stickstoffverbindungen nicht zu zerstören, auch nicht sterilisieren, und so war die Erforschung der Bedingungen unter welchen $N_2 H_4$ und $NH_2 OH$ für das Leben giftig, eventuell nicht assimilationsfähig sind, bei gemischten Vegetationen bei meinem Zeitmangel nicht durchführbar.

In mehrere Glasschalen wurde eine Nährlösung mit 5% Saccharose als C-Quelle und mit 0.5% Hydroxylaminchlorhydrat, resp. 0.5% Hydrazinsulfat als N-Quelle gegossen, offen im Laboratorium und in dem botanischen Garten einige Stunden stehen gelassen, auch mit verschiedenen Erden und Strohproben infiziert und nach Bedeckung in den Laboratoriumsschrank gestellt. In Hydroxylaminschalen waren bald reichliche, wachsende Schimmelkolonien sichtbar, in den Hydrazinlösungen dagegen zeigte sich in den ersten Tagen nichts Wachsendes, später aber keimten auch hier einige Pilzarten, und eine graubraune Penicilliumart fruktifizierte gut. Nach-

dem festgestellt wurde, daß in den Lösungen Hydroxylamin- resp. Hydrazin noch vorhanden war, wurden einige üppiger wachsende Pilzrasen in ebensolche Lösungen übertragen. Doch waren auf diese Weise keine Reinkulturen zu bekommen. Am 28. IV wurden in Kolben folgende Nährlösungen gemacht (in 5% Sakcharose).

- 1) 0.695% Hydroxylaminchlorhydrat,
- 2) 0.82% Hydroxylaminsulfat,
- 3) 0.75% Hydrazinsulfat, also Lösungen, welche einer 0.66% Ammonsulfatlösung gleiche Stickstoffmenge besaßen. In diese Kolben wurden Schimmelpilze aus den erwähnten Schalen übertragen. Da auch jetzt die Pilze gut wuchsen, wurden am 2. VI. weitere 5% Sakcharoselösungen angefertigt mit

- 4) 1.4% Hydroxylaminchlorhydrat,
- 5) 2.8% " "
- 6) 4% " "
- 7) 1.5% Hydrazinsulfat,
- 8) 3% " "

Bei der Untersuchung am 7. VII. wurde folgendes notiert. In der Kultur 1, 2, 3 wachsen die Fadenpilze sehr gut. In der Kultur 4 wächst ein rotgefärbter Schimmelpilz sehr üppig. In den Kulturen 5 und 6 leben die eingebrachten Fadenpilze nicht mehr, dagegen vermehrt sich noch eine kuglige Hefe. In der Kultur 7 (1.5% Hydrazinsulfat) wachsen verschiedene Pilze ganz üppig. In der Kultur 8 (3% gesättigte Hydrazinsulfatlösung) wächst eine Verticilliumart in zahlreichen, etwa 1 mm dicken kugeligen Kolonien am Boden des Gefäßes! In der Lösung 1 und 2 (1 Mol. Stickstoff als Hydroxylaminsalz geliefert) wächst sogar und fruktifiziert der spontan angesiedelte *Aspergillus niger*.

Es waren lauter Mischkulturen, doch wurde in manchen (200 ccm Nährlösung) die Trockenernte bestimmt.

1 a	=	1.801	gr
1 b	=	2.087	"
1 c	=	1.974	"
1 d	=	1.565	"
2 a	=	1.896	"
2 b	=	1.731	"
3 a	=	0.098	"

Um über die Zersetzung der dargebotenen Stickstoffsalze während der längeren Wachstumszeit Aufschluß zu erhalten, habe ich Herrn Dr. Niklewski ersucht, die Nährlösungen am Schluß der Versuche zu analysieren. Hydrazin wurde nach H. Rimini (Chem. Zentralblatt 1899, II, 455), in ähnlicher Weise auch Hydroxylamin gemessen, wobei die Fehlerquellen (wegen Dextrose) innerhalb der Fehlergrenze liegen. Es wurde in 1 = 0.26%; in 2 a = 0.17%; in 2 b = 0.19%; in 4 = 1.18% Hydroxylamin (als Chlorat); in 3 a = 0.36%; in 3 b = 0.38%; in 7 = 1.48%; in 8 = 3.03% Hydrazin (als Sulfat) gefunden. Die Vermutung, es habe sich in der Flüssigkeit ein Hydrazon gebildet (O. Loew, Hofmeisters Beiträge IV, S. 248) ist also nicht stichhältig.

IV. Über die Assimilation der aliphatischen Aminosäuren und Amide.

Zwei verschiedene Fragen, die trotz aller bisherigen Arbeiten einer weiteren Klärung bedürfen, sollten durch die vorliegenden Versuche — wenn auch nur teilweise — Beantwortung finden. Die aliphatischen Aminosäuren gehören bekanntlich zu den besten Stickstoff- und Kohlenstoffnähren der Pilze. Ob sie jedoch als ganzes assimiliert, oder aber vorher in zwei Molekel, ein N-haltiges und ein C-haltiges gespalten werden, ob im letzten Fall die Spaltung in Ammoniak und eine entsprechende Oxysäure im Momente der Assimilation als notwendige Folge der Assimilation der N- oder der C-Komponente erfolgt, oder aber vorher, von der Assimilation unabhängig, sich vollzieht, wäre die erste Frage.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren sind wir über die Art der Assimilation des Stickstoffes der Amide viel besser unterrichtet. Dank den Arbeiten Pasteurs, Miquels, van Thieghems und einiger anderer Forscher wissen wir, daß sehr viele Bakterien, Pilze, ferner einzelne Organe höherer Tiere ein Enzym, „Urease“, ausscheiden, welches Harnstoff in NH_3 und CO_2 spaltet. Wir sprechen in solchen Fällen von einer ammoniakalischen Gärung. Doch nicht nur der Harnstoff, sondern auch andere Säureamide (Azetamid, Asparagin, Glutamin) unterliegen durch enzymatische Tätigkeit der Verseifbarkeit (Gonnermann, Pflügers Archiv 89, S. 493; Bd. 95, S. 278), und man kann in allen diesen Fällen von ammoniakalischer Gärung sprechen. K. Shibata (Hofmeisters Beiträge zur chem. Physiologie, V, 384) konnte mit toten Aspergillusdecken Karbamid, Biuret, Azetamid verseifen, er nennt jedoch das betreffende Enzym

„Amidase“, weil die Identität desselben mit der Urease zur Zeit noch nicht festgestellt ist. Auch von der Alaninsäure (α -Aminopropionsäure) wird auf dieselbe Weise ein wenig NH_3 abgespalten, dagegen tritt diese Erscheinung bei den anderen Aminosäuren (Glykokoll, Leuzin, Asparaginsäure) nicht auf. Mit lebendem *Aspergillus niger* wird der Aminostickstoff des Leuzins, Tyrosins, Amido- und Aminosäurestickstoffs des Asparagins abgespalten (Butkewitsch, Pringsheims Jahrbücher 1903, Bd. 38, S. 192). Durch zerkleinerte tierische Organe konnte S. Lang von Glykokoll (Darm und Pankreas), Tyrosin (Nebenniere), Leuzin und Cystin (Leber), Ammoniak abspalten (Hofmeisters Beiträge V, S. 321). Meine biologische Versuchsanstellung, die ich nur qualitativ prüfte, sollte feststellen, ob durch Kohlenstoff, respektive durch Stickstoffhunger die Ammoniakabspaltung beeinflußt wird.

Die andere Frage, welche mit der vorigen bei solcher Versuchsanstellung im engen Zusammenhange steht und über welche Kontroversen in der Literatur existieren, betrifft die Bildung der Oxalsäure. Zur Orientierung darüber möchte ich zunächst folgendes betonen. Bei der Spaltung der Aminosäuren unter Anlagerung eines Moleküls Wasser muß Ammoniak und eine entsprechende Oxysäure resultieren. Also sollte sich bei der Assimilation des Glykokolls Glykollsäure bilden, bei der des Alanins Milchsäure, bei derjenigen der Asparaginsäure Äpfelsäure, bei der Spaltung der Glutaminsäure Oxyglutarsäure u. s. w. Bei dem Stickstoffhunger und Kohlenstoffüberschuß wird Ammoniak assimiliert und Oxysäure könnte sich in der Kulturflüssigkeit des *Aspergillus* ansammeln (wie bei Sukkulenten). Bei eintretendem Stickstoffüberschuß sollten jedoch die Oxysäuren verbraucht werden und zwar zur Vermehrung des Kohlenstoffs in der lebendigen Substanz und ferner sollten sich durch Oxydation höher oxydierte Säuren, also Oxalsäure und Kohlendioxyd, bilden. In den Kulturen des *Aspergillus* in Pepton sollen sich aus den infolge der tryptischen Spaltung entstandenen zahlreichen Aminosäuren die Oxysäuren der aliphatischen Reihe, der Benzol- und der Benzopyrrolreihe bilden. Aber ebenso müssen bei Phanerogamen in den Vegetationspunkten und in Meristemen, wo auf Kosten der Zersetzungsprodukte der Eiweißreserven neue Zellen gebildet werden, ähnliche Prozesse stattfinden, also Ammoniakbildung, Bildung der Oxysäuren der aliphatischen, der Benzol- und der Benzopyrrolreihe. Diese Oxysäuren werden hier zum Teil

verbraucht, zum Teil weiter oxydiert und haben — um der Nomenklatur W. Schimpers zu folgen — die primäre Oxalatbildung, aber auch die primäre ¹⁾ „Gerbstoff“-Bildung und die primäre Bildung der Pyrridin und Indolderivate zur Folge. Leider sind mir keine Untersuchungen über den chemischen Mechanismus der Assimilation des Stickstoffs der Aminosäuren bei den aeroben oder anaeroben Organismen bekannt. Daß dieser Prozeß durch H₂O-Anlagerung erfolgt, ist noch nicht experimentell erwiesen. Daß dabei bei den Aeroben keine Reduktion stattfindet, scheinen die zahlreichen Versuche mit Methyl-, resp. Äthylaminen zu beweisen, wobei Methan- (resp. Äthan-)Bildung nicht beobachtet wurde. Ebenso wenig wurde experimentell bewiesen, daß diese Assimilation mit einer Oxydation des Kohlenstoffradikals verbunden ist. Im letzten Sinne scheinen zwar die Befunde Emmerling's zu sprechen.

O. Emmerling (Zentralblatt für Bakteriologie, X, 1903, S. 273) hat bei dem Wachstum des *Aspergillus niger* auf Glykokoll, α -Serin, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylamin, Prolin stets Oxalsäure nachweisen können, wenn auch bei Phenylalanin nur in Spuren. Ebenso fanden E. Abderhalden und Yutaka Teruchi Oxalsäure in ihren Kulturen des *Aspergillus* in synthetischen Polypeptiden (Zeitschrift für phys. Chemie 1905, Bd. 47, S. 394). Dagegen konnte Emmerling, entgegen den älteren Angaben Wehmers, keine Oxalsäurebildung enthalten mit allen dreizehn von den untersuchten Kohlehydraten.

Aus oben erwähnten Gründen wurden mit jedem der untersuchten Körper vier Versuche mit je 100 cem Flüssigkeit angestellt, und zwar: erstens (I) ohne andere C- und N-quellen, um auf diese Weise zu ermitteln, ob die Verbindung als C- und N-quelle dienen kann; zweitens (II) mit 1%, Zugabe von Natronsalpeter als Stickstoffquelle, da in solchen stickstoffreichen, jedoch wohl kohlenstoffarmen Kulturen am meisten die Möglichkeit der Ansammlung von Ammoniak vorhanden war; drittens (III) mit 1% Ammonsulfat, einerseits zur Wachstumskontrolle der Versuche II, andererseits um sie auf Oxalsäure zu prüfen; und viertens (IV) mit 5% Sakcharose um stickstoffarme, jedoch kohlenstoffreiche Kulturen zu haben. Wird in diesen kohlenstoffreichen Kulturen Ammoniak aus den Aminosäuren

¹⁾ G. Kraus hat eben diese Gerbstoffbildung im Gegensatz zu der „primären“ (bei der Lichtassimilation) sekundär genannt. Es ist also die (Oxalat)-Nomenklatur Schimpers der (Gerbstoff)-Nomenklatur Kraus entgegengesetzt!

nicht nur gebildet, sondern trotz der reichen C-quelle in der Nährlösung unverwertet gefunden, so soll dieser Befund (falls nur die entsprechende Oxysäure bei der Elektion der C-quelle die Sakcharose nicht deckt) als Beweis dienen, daß die Spaltung der Aminosäuren primär, vor der Assimilation verläuft.

Die qualitative Prüfung auf Oxalsäure wurde mit Essigsäure und mit Kalkazetat gemacht. Falls keine momentane Trübung und Fällung eintrat, wurde noch 1 Stunde gewartet. Ammoniak wurde mit Nessler nachgewiesen, in negativen Fällen habe ich die Reaktion von Trillal und Turchet (Comptes rend. de l'Acad. des Scienc. CXXXX, 1906 S. 374.), also einige Tropfen der KI-Lösung und einige Tropfen von Eau de Javelle angewandt, doch will ich gleich hier bemerken, daß in keiner mit Nessler negativ reagierenden Kulturflüssigkeit die Bildung des Jodstickstoffs gelang.

1. Glykokoll in 2% Lösung. Die Kultur IV mit Sakcharose wächst sehr üppig und fruktifiziert bald, wurde auch nach 10 Tagen analysiert, in den Kulturen I—III wächst Aspergillus sehr dürftig, fruktifiziert später und wenig, die Kulturen wurden deswegen erst nach 17 Tagen analysiert. In der Kultur I und II fand eine sehr starke Ammoniakreaktion, eine deutliche, jedoch schwächere in der Kultur IV statt, Oxalsäure bildete sich nur in der Kultur IV. Die Flüssigkeit der Kultur IV gibt mit KIO_3 eine starke Reduktion ohne Ansäuerung, mit Millon eine schwach rote, mit Eisenchlorid eine graue Reaktion. 10 ccm von dieser brauchen $23 \text{ ccm} \frac{n}{50}$ KOH zur Neutralisation (auf Kongo).

2. Glykokollchlorhydrat in 2% Lösung. In allen Lösungen wächst der Pilz und fruktifiziert, jedoch in der Lösung IV (mit Sakcharose) so üppig, daß die Kultur schon am zehnten Tage untersucht wurde, während dies bei den drei anderen schwach wachsenden erst am 17-ten Tage geschehen konnte. Sehr schwach wächst die Kultur in dem Kolben II.

	Ammoniak	Oxalsäure	Azidität in ccm $\frac{n}{50}$ KOH für je 10 ccm Flüssigkeit
I.	+ + +	0	76
II.	?	0	93
III.	—	0	77
IV.	+ +	0	94

3. Alanin in 2% Lösung. Alle vier Kulturen wachsen sehr üppig, bedeutend besser als in den Glykokollkolben. Alle wurden nach 6 Tagen analysiert.

	Trockenernte	Azidität in ccm $\frac{n}{50}$ KOH für je 10 ccm Flüssigkeit	Ammoniak	Oxalsäure
I.	0.03 gr	0	++	0
II.	0.09 "	0	+++	++
III.	0.09 "	0	—	+
IV.	0.58 "	28	++	Spur.

4. Leuzin (synthetisch) in 1% Lösung. Nur die Sakcharosekultur wächst gut, alle anderen, besonders aber die Nitratkultur wachsen sehr schlecht und bilden typisch verhungerte Kolonien. Die Sakcharosekultur wurde nach 10, drei andere erst nach 17 Tagen analysiert.

	Ammoniak	Oxalsäure	Azidität gemessen wie oben
I.	?	0	0.2
II.	?	0	0
III.	—	0	0
IV.	+	0	15.5.

Die Flüssigkeit Nr. IV gibt mit Eisenchlorid eine rote Färbung, ebenso mit Millon. Die mit Millon reagierende Verbindung ist mit Äther extrahierbar.

5. 1%-ige Asparaginsäure. Alle Kulturen wachsen und fruktifizieren sehr gut, ähnlich wie die Alaninkulturen, am besten aber die Sakcharosekultur. Untersucht wurde nach 6 Tagen.

	Ernte	Azidität gemessen wie früher	Ammoniak	Oxalsäure
I.	0.285	16 ccm	+++	0
II.	0.149	7 "	+++	0
III.	0.045	14 "	—	++
IV.	1.05	24 "	0	Spur.

6. Asparagin in 1% Lösung. Analyse nach 8 Tagen.

	Azidität	Ammoniak	Oxalsäure
I.	4 ccm	+++	0
II.	3 "	+++	++
III.	3 "	—	++
IV.	29 "	0	0

7. Propionamid 1%. Die Kulturen ohne Sakcharose zeigen nur Spuren des Wachstums, die Sakcharosekultur wächst und fruktifiziert normal, jedoch nicht besonders üppig. Analyse der Kultur IV erfolgte nach 10, die I—III nach 28 Tagen.

	Ammoniak	Oxalsäure
I.	+++	0
II.	+++	0
III.	—	0
IV.	++	+++ : Azidität = 15 cem.

8. Butyramid 1%. Kulturen 1—3 weisen fast kein Wachstum auf. Die Sakcharosekultur wächst und fruktifiziert schwach. Alle wurden nach 28 Tagen untersucht. In allen ist Ammoniak vorhanden, in keiner Oxalsäure. In der Kultur IV wäre vielleicht das Fehlen der Oxalsäure durch deren Verschwinden zu erklären, doch ist die Kulturflüssigkeit vorher nicht untersucht worden.

9. Valeramid 1%. Aspergillus wächst nur in der Sakcharosekultur. In dieser ist nach 28 Tagen Ammoniak vorhanden, Oxalsäure dagegen fehlt.

10. Palmitinamid 1%. In der Sakcharosekultur sind nur Spuren des Wachstums (vielleicht auf fremde Stoffe zurückführbar), in anderen Kolben kein Wachstum zu finden. In keinem Kolben fand sich Ammoniak.

Keine Ammoniakabspaltung wurde in 1% Äthylaminsulfat + Rohrucker, in 1% Guanidinchlorhydrat + Rohrucker trotz des üppigen Wachstums ebenfalls keine, dagegen eine intensive in Karbamidkulturen gefunden. In der Kultur, welche Harnstoff + Rohrucker enthielt, fand sich auch Oxalsäure. Endlich will ich noch die Resultate der Versuche mit 0.5% Succinimid nach 23-tägiger Kultur anführen.

	Ammoniak	Oxalsäure
Succinimid allein	+++	0
„ + 5% Sakcharose	Spur	+++

Auf Grund der vorliegenden Versuche dürfen wir annehmen, daß durch *Aspergillus niger* von denjenigen Aminosäuren, welche normale Abbauprodukte der enzymatischen Eiweißverdauung darstellen, Ammoniak abgespalten wird oder daß Eiweißstickstoff erst als Ammoniak assimiliert wird. Zwischen der Stickstoffassimilation der Aminosäuren und der Oxalsäurebildung ist bei *Aspergillus ni-*

ger kein Zusammenhang zu finden. Oxalsäure entsteht dabei eventuell erst sekundär durch Oxydation und kann weiterer Oxydation unterliegen. Daß die Oxalsäure einer Aspergilluskultur mit der Zeit sogar verschwinden kann, hat K. Wehmer bewiesen.

V. Über Assimilation der aromatischen Aminosäuren.

Aus der reichen Fülle der aromatischen Stickstoffverbindungen haben mich begreiflicher Weise nur die wenigen interessiert, welche zu den normalen Produkten der tryptischen Eiweißspaltung gehören, in jeder Pflanze gebildet und bei der Verarbeitung der eigenen Reserveproteide auch abgebaut werden. Zu diesen gehören Phenylalanin, Tyrosin (Oxyphenylalanin), Tryptophan und Prolin. Die beiden letzteren standen mir leider nicht zur Verfügung, so daß meine Ernährungsversuche sich nur auf die beiden ersten beschränkten. Bevor ich zu eigenen Resultaten komme, möchte ich über die bisherigen Erfahrungen auf diesem Gebiet kurz referieren. Es gehört ja der Abbau der aromatischen Verbindungen im Tierkörper zu den bestbearbeiteten Partien der Tierchemie.

Phenylalanin und Tyrosin, einem Tierorganismus von außen zugeführt, unterliegen verschiedenen Umsetzungen. Noch vor der Resorption können sie bei Darmfäulnis angegriffen werden, jedoch solche durch Bakterien verursachten Verwandlungen sollen weiter unten besprochen werden. Mehrfach wurde nach Einführung aromatischer Aminosäuren keine Vermehrung der Benzolderivate im Harn bemerkt, woraus auf deren totale Spaltung geschlossen wird. Embden, Salomon und Schmidt (Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, 1906, S. 129) haben in ihren Versuchen eine vermehrte Azetonbildung beobachtet, ob diese jedoch einer Spaltung des Ringes oder einen Umbau der aliphatischen Seitenkette seinen Ursprung verdankt, wurde nicht entschieden. Normal werden die aromatischen Aminosäuren im Tierkörper desamidiert, nachträglich oxydiert und verlassen als verschiedene, mehr oder weniger oxydierte Oxysäuren, manchmal mit Glykokoll, manchmal mit Schwefelsäure gepaart im Harn den Organismus. Von den erwähnten Oxysäuren finden wir als normale Produkte des Eiweißabbaues im Tierorganismus die Oxyphenylpropionsäure, Oxyphenylelessigsäure und Oxybenzoesäure (alle wie in Phenylalanin und Tyrosin in der Position Para). Bei manchen Krankheiten tritt im Harn Oxy(p)phenylglykollsäure; nach starken Tyrosingaben isolierte Blendermann eine ungenügend

analyisierte Säure von dem Bau der p.-Oxyphenylmilchsäure, die er Oxyhydroparakumarsäure nennt.

Es gibt bei dem Menschen eine sehr seltene, wahrscheinlich erbliche Harnanomalie, bei welcher der Harn beim Stehen (also bei der Alkalisierung) tintenschwarz wird. Dieser s. g. Alkaptonharn tritt als Folge einer anderen Oxydation des desamidierten Tyrosins auf. Im Alkapton wurden bisher wenigstens zwei verschiedene Oxyphenylsäuren gefunden. Eine von ihnen, Homogentisinsäure (Dioxyphenylsäure 1 : 4 : 3) ist sehr genau bekannt, die andere Uroleuzinsäure, welche weniger bekannt ist, entspricht nach Huppert der Dioxyphenylmilchsäure, während früher auch die Trioxyphenylpropionsäureformel diskutiert wurde. Eine dritte Alkaptonsäure und zwar Uroxanthinsäure wurde bis heute nicht analysiert. Übrigens sind die letztgenannten von Kirk beschriebenen Säuren (Journ. of anat. and physiology. Vol. 23, 1889) von Beilstein nicht einmal erwähnt.

In der neueren tierchemischen Literatur wurde manchmal angenommen, daß die Homogentisinsäure zu den normalen Produkten des Abbaus des Tyrosins und Phenylalanins gehört, jedoch nur in anormalen Individuen ausgeschieden, normal dagegen unter Ringsprengung weiter oxydiert wird. Zwingende Beweise dafür finde ich nicht.

Auf eine andere Weise werden die aromatischen Eiweißbestandteile bei anaerober Atmung verarbeitet. M. Neneki, welcher mit den Reinkulturen der Rauschbrandbakterien, dem *Bacillus spinosus* und *B. liquefaciens magnus*, bei Sauerstoffabschluß arbeitete, konstatierte die Bildung der Phenylpropionsäure, Oxyphenylpropionsäure und Skatolessigsäure, die unter Ammoniakabspaltung und Anlagerung des H_2 aus den entsprechenden Aminosäuren entstanden waren.

Über den Abbau des Tyrosins (resp. Phenylalanins) bei aeroben Pflanzen wissen wir sehr wenig. M. Gonnermann (Pflügers Archiv. Bd. 82, 1900, S. 289; kurzes Resümee in den Berichten d. deutsch. bot. Gesellsch. 1903, S. 90), hat die direkten Färbungen der Rübensäfte, (welche G. Bertrand, als durch die oxydierende Wirkung einer Tyrosinase benannten Oxydase erkannt hat) der Anwesenheit der Homogentisinsäure zugeschrieben, welche durch Oxydation des Tyrosins entstanden ist. Zu ähnlichen Resultaten ist R. Bertel (Berichte d. d. bot. Gesell. 1902, S. 454) gelangt. In den Keimlingen des *Lupinus albus* soll aus Tyrosin durch Einwirkung einer Tyrosinase

Homogentisinsäure entstehen, die normalerweise durch „Spitzenoxydase“ weiter oxydiert und zerstört wird. Besonders intensiv ist die Tyrosinasewirkung in chloroformierten Wurzeln. In weiterer Folge wollte F. Czapek (Berichte d. d. bot. Gesell. 1903, S. 464). nachweisen, daß in tropisch gereizten Organen die Homogentisinsäure vermehrt und infolge der Bildung der Antifermente (Antioxydasen) von der Spitzenoxydase nicht zerstört wird (Berichte der deutsch. bot. Gesellsch. 1903, XXI, S. 229 und 243). Endlich haben E. Schultze und N. Castoro, schon nachdem die vorliegenden Untersuchungen abgeschlossen waren, nachgewiesen, daß bei *Lupinus albus* in den von R. Bertel untersuchten Keimungsstadien und unter dessen Versuchsanstellung sich keine Spur Homogentisinsäure fand (Zeitschrift für physiologische Chemie 1906, Bd. 48, Heft 5. S. 387 und 396—411, sowie Landwirtschaftliche Jahrbücher 1906, Bd. 35, S. 639). Zu der Überzeugung, daß weder die Dunkelfärbung der Rübensäfte, wie es Gonnermann meinte, noch die Reduktionserscheinungen der wachsenden Pflanzenteile in den Versuchen R. Bertels durch Anwesenheit der Homogentisinsäure verursacht sind, gelangen wir schon auf Grund der Lektüre der betreffenden Abhandlungen. Die Dunkelfärbung der sauer reagierenden Pflanzensäfte kann doch nicht durch Vorhandensein einer Säure verursacht werden, welche wohl nur in alkalischen, nicht aber auch in sauren Lösungen anfangs eine braune, dann eine braunschwarze Färbung liefert, während die betreffenden, sich verfärbenden Pflanzensäfte zunächst eine rötliche, dann schwarzviolette Färbung liefern. Wie F. Czapek die Silberbestimmung seiner Homogentisinsäure macht, finde ich nicht genau angegeben, R. Bertel versetzt die Flüssigkeit zuerst mit Ammoniak, „hierauf läßt man einige Kubikcentimeter der $\frac{1}{10}$ Normalsilberlösung zufließen und kocht die Probe auf. Nach dem Erkalten ist die Reduktion beendet“. Eine nicht äußerst verdünnte Homogentisinsäure reduziert dagegen die ammoniakalische Silberlösung in der Kälte so schnell, daß man keine Zeit haben wird, vor der Reduktion dieselbe aufzukochen. Nach dem Aufkochen wird dagegen eine ammoniakalische Silberlösung nicht nur durch die Gerbstoffe, sondern auch durch die Hexosen (Dextrose, Lävulose, Mannose), ja sogar durch die Polysakcharide (Maltose) reduziert, und so müssen die weiteren Forschungen entscheiden, welche von diesen oder anderen Körpern die so interessanten Reduktionen F. Czapeks verursachen.

Über die Tyrosinasewirkung will ich in der vorliegenden Abhandlung nicht ausführlicher berichten. Ihre Lokalisation habe ich schon vor längerer Zeit erforscht, über die Frage nach ihrer Wirkung dagegen bisher mit wenig Glück gearbeitet. Während die gewöhnliche Phanerogamenoxydase (Lakkase) von Tyrosinase frei ist, konnte ich noch keine Tyrosinase ohne Lakkasewirkung darstellen. Trotz gegenteiliger literarischer Angaben wurde auch keine Tyrosinase bei sehr vielen untersuchten Schimmelpilzen gefunden. Tyrosinase oxydiert Tyrosin sehr schnell, bildet dabei zunächst Betarot, später schwarze unlösliche Melanine. Alkali verhindert die Wirkung der Tyrosinase, und so ist die Melaninbildung durch Tyrosinase sehr leicht von Homogentisinsäure zu unterscheiden. Über den Mechanismus der Tyrosinasewirkung, ob dabei das Tyrosin desamidiert wird oder gar nicht, müssen erst weitere Forschungen mit reinen Lösungen Aufschluß geben. Die ausführlichste Abhandlung über Tyrosinasewirkung (— der Name war damals noch nicht geschaffen —) ist die alte Abhandlung von J. Reinke (Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. VI, 1882), die leider in enzymatischen Handbüchern nicht einmal erwähnt wird.

1. Tyrosinkulturen. Wird in einer Nährlösung, welcher Zucker zur Kräftigung des Wachstums zugesetzt worden ist, und welche Tyrosin als alleinige Stickstoffquelle bekommt, *Aspergillus niger* ausgesät, so wächst der Pilz üppig und fruktifiziert gut, während die anfangs ungelösten Tyrosinbüschel verschwinden. Es resultiert endlich unter der Decke des Pilzes eine saure, farblose (oder sehr schwach gelbliche) Flüssigkeit, welche die Eigenschaften des Alkaptonharnes in hohem Grade besitzt.

Die Flüssigkeit wird nach der Alkalisierung gebräunt und schwärzt sich nachher von der Oberfläche nach unten immer mehr. Ammoniakalische Silberlösung wird in der Kälte momentan reduziert, Eisenchlorid verursacht eine rasch vorübergehende Grünfärbung, Reagens von Millon eine Rotfärbung in der Kälte (rasch nach Erwärmen). Die Reaktionen stimmen mit denen der Homogentisinsäure und Uroleuzinsäure gut überein, werden jedoch auch durch mehrere andere Oxy- und Polyoxyphenylsäuren geliefert. Um unseren Tyrosinderivat sicher bestimmen zu können, soll außer der gewöhnlichen Analyse die Seitenkette, ebenso die Zahl und auch die Lage der Hydroxyle bestimmt werden. Es sind Arbeiten, welche in ein chemisches

Laboratorium gehören; ich mußte mich mit einigen einfachen Versuchen begnügen.

Aus der (mit H_2SO_4) angesäuerten (dagegen nicht auch der alkalisch gemachten) Flüssigkeit läßt sich die reduzierende Substanz durch Ausschütteln mit Äther ausziehen. Äther nimmt jedoch eine so geringe Menge von diesem Körper auf, daß erst nach vielfach wiederholtem Ausschütteln sich die Reduktionskraft der wäßrigen Flüssigkeit beseitigen ließ. Nach Abdestillieren des Äthers aus dem sehr spärlichen gelblichen sirupösen Rückstand krystallisieren gleich ohne weiteres flache und dünne bis über 5 mm flache Täfelchen, die sternförmig angeordnet sind und die obenerwähnten Reaktionen liefern. Da ich mit der Homogentisinsäure zu tun zu haben glaubte, so versuchte ich sie auf bekannte Weise mit 6% krystallinischem Bleiazetat in Form von Bleisalz darzustellen und zu reinigen, jedoch ohne Erfolg. Als die kochende Flüssigkeit abfiltriert wurde, zeigte der Niederschlag derselben nach Entfernen des Bleis keine Reduktionswirkungen. Als nun das Filtrat nach 24 Stunden abermals abfiltriert wurde, zeigte der Niederschlag nach Entfernen des Bleis gleichfalls keine Reduktionswirkungen, dagegen war die Säure in der Flüssigkeit vorhanden und konnte nach Entfernen des Bleis (mit H_2S) mit Äther extrahiert und in kristallinischer Form erhalten werden.

Die so erhaltenen Kristalle lösen sich leicht in kaltem Wasser. Alkohol und Äther und ihre wäßrige Lösung zeigt folgende Reaktionen: Ammoniakalische Silberlösung reduziert in der Kälte momentan, die Fehlingsche Lösung und die alkalische Wismutlösung werden nach dem Erwärmen, die Jodsäure momentan reduziert. Mit dem Reagens von Millon tritt in der Kälte sehr langsam, nach dem Erwärmen sofort eine intensiv rote Reaktion der Flüssigkeit ein, die jedoch nur rot, nicht rotschwarz wird; mit Eisenchlorid erhält man eine enorm rasch vorübergehende blaugrüne Färbung. Bei Erwärmung mit Bleisuperoxyd ist kein Geruch des Benzaldehyds bemerkbar, bei vorsichtiger trockener Destillation in einer breiten Reagenströhre (ebenso Kalischmelze) bleibt die blaue Hydrochinonreaktion aus. Mit der salpetrigen Säure behandelt, nimmt sie nach der Neutralisation intensiv rote Färbungen an.

Auf Grund der erwähnten Reaktionen konnte zwar unsere Säure nicht identifiziert werden, jedoch waren mehrere Phenylsäuren ausgeschlossen. Die Phenyllessig- und Phenylpropionsäure wirken we-

der reduzierend, noch krystallisieren sie so leicht, sind ja bei niedrigen Temperaturen schmelzbar. Die Oxyphenyllessigsäure und Oxyphenylpropionsäure haben keine so starke Reduktionskraft. Die Protokatechusäure (eine der Dioxybenzoesäuren) ist in kaltem Wasser schwer löslich und gibt mit Eisenchlorid die intensive blaugrüne (beständige) Färbung, welche nach Sodazusatz dunkelrot wird. Die übrigen Dioxybenzoesäuren sind in ihren Reaktionen von unserer Säure mehr verschieden. Was die Dioxyphenylfettsäuren anbelangt, so scheint unsere Säure von der Homogentisinsäure in der Bleisalzbildung und infolge der mangelnden Hydrochinonreaktion verschieden zu sein. Von den Para-Oxy- und Para-Dioxyphenyloxysäuren sind die Reaktionen der Para-Dioxyphenylmilchsäure (Uroleuzinsäure) mit unserer Säure fast identisch, die Paraoxyphenylmilchsäure, welche aus Tyrosin unter Desamidierung und Anlagerung eines Moleküls Wasser entstehen sollte, ist zwar dargestellt, jedoch in ihren Reaktionen leider nicht näher beschrieben worden. Die Oxyhydroparakumarsäure, welche Blendermann (Zeitschrift für phys. Chemie VI, 257) durch Tyrosinfütterung bei Kaninchen erhalten hat, verursacht mit Bromwasser eine Trübung (dasselbe bewirkt auch unsere Säure) und ist (Schmelzpunkt) von der Erlenmeyer'schen Oxyphenylmilchsäure trotz der sonst identisch erdachten Formel verschieden. Aus den positiven und den negativen Ergebnissen der erwähnten rein qualitativen Analyse ist der Schluß wahrscheinlich, daß unsere Säure an der Seitenkette eine Milchsäure trägt, die mit einem einfach (oder mehrfach) hydroxylierten Benzolring verbunden ist.

Der Aufmerksamkeit der Chemiker möchte ich dieses Tyrosinderivat aus folgenden Gründen empfehlen. Warscheinlich wird das Tyrosin auf ähnliche Weise nicht nur durch *Aspergillus niger*, sondern auch durch manche andere aerobe Pflanzen desamidiert. Dem *Aspergillus* wurde Tyrosin außerhalb der Zelle als Stickstoffnahrung dargeboten und stickstofflose Oxysäure blieb auch außerhalb der Zellen in der Nährlösung. Bei dem Überschuß der Kohlenstoffnahrung wird diese nicht weiter verarbeitet. Bei Pflanzen, welche auf Kosten eigener Reserveproteide wachsen, wird die bei der Desamidierung des Tyrosins entstehende entsprechende Säure in den Vakuolen bleiben, bei dem Kohlenstoffüberschuß sich wahrscheinlich ansammeln, oder unter weiterer Oxydation in die Exkretzellen und Schläuche versandt. Aromatische, stark reduzierende,

mit Eisenschlorid blau und grün reagierende, mit Millon sich rötende Körper entstehen auch immer in den wachsenden Pflanzenteilen und werden in der Pflanzenanatomie unter dem nicht korrekten Namen „Gerbstoffkörper“, nach Gr. Kraus als „sekundäre Gerbstoffkörper“ zusammengefaßt. Schon oben habe ich hervorgehoben, daß auf homologe Weise entstandene Oxalsäure von Schimper als „primär“ bezeichnet wurde, und deswegen wäre es besser eben solche Gerbstoffkörper auch als „primär“ zu bezeichnen. Unsere Säure stellt die Zwischenstufe zwischen dem Tyrosin und einem Teil dieser Gerbstoffkörper dar. Als Vorstufe der Gerbstoffbildung verdient sie Aufmerksamkeit und genauere chemische Bestimmung.

Von den Kulturversuchen mit Tyrosin will ich einige näher beschreiben. Am 22. VII wurden folgende vier Versuchsreihen angestellt, jede in drei Kolben. 1) 50 ccm gewöhnliche Nährlösung mit 2% Tyrosin; 2) der Lösung 1 wurde 2% Ammonsulfat zugesetzt; 3) wie 1) jedoch mit Zusatz von 4% Glukose; 4) wie 1) jedoch mit 2% Ammonsulfat und 4% Glukose. Bei der Analyse nach sechs Tagen wurde notiert: In den Kolben 4 wächst *Aspergillus* sehr üppig, in den Kolben 3 bedeutend schwächer, jedoch bildet er eine starke, fruktifizierende Decke; in 1 und 2 haben die Sporen gekeimt, jedoch ist das Wachstum fast kaum merklich. Von jedem Kolben wurden jetzt einige ccm Flüssigkeit in Reagenzgläsern mit NaOH alkalisiert. Nr. 3 bräunt sich gleich und wird bald an der Oberfläche schwarz, Nr. 1 und 2 zeigt keine Nachdunkelung, Nr. 4 eine äußerst schwach gelbe Reaktion. Die Trockenernten in 1 und 2 wurden nicht gewogen, in 3 a betragen sie 0.085 gr in 4 a = 1.190 gr. Zu je 10 ccm Flüssigkeit wurde 15 ccm von $\frac{1}{10}$ Normalsilberlösung und 3 ccm Ammoniak zugesetzt und nach etwa 5 Minuten wurde das Silber abfiltriert, gewaschen, getrocknet und gewogen. In 1 und 2 gab es keine Silberreduktion, in

Kultur 3 a = 0.027; 3 b = 0.023 gr; 3 c = 0.034 gr Ar.

Kultur 4 a = 0.007; 4 b = 0.016 gr; 4 c = 0.015 gr Ar.

Aus dieser Versuchsreihe ist ersichtlich, daß Tyrosin eine bedeutend schlechtere Stickstoffquelle als Ammoniak ist, daß sie auch eine Kohlenstoffquelle ist, wenn auch eine sehr schlechte, zeigen die eine längere Zeit dauernden Versuche. In vier Kolben mit je 200 ccm Flüssigkeit wurde 1) 0.2% Tyrosin; 2) 0.2 Tyrosin + NaNO₃; 3) 0.2 Tyrosin + 1% SO₄(NH₄)₂; 4) 0.2 Tyrosin + 5%

Sakcharose zugesetzt. Die Kulturen dauerten 32 Tage. Nach Beendigung der Versuche waren in dem Kolben 1, 2 und 3 noch reichliche ungelöste Tyrosinnadeln vorhanden, in der Kultur 4 waren diese seit 2 Wochen ganz verschwunden. *Aspergillus* wächst und fruktifiziert in allen Kolben, jedoch in Nr. 1, 2 und 3 sehr dürftig, in Nr. 4 sehr stark. Da jedoch in der Kultur 1—3 mit Tyrosin, als einziger C-Quelle, *Aspergillus* deutlich und normal, wenn auch dürftig, wächst und Sporen bildet, so kann dieses Wachstum nur auf Kosten der stickstofflosen Komponente des Tyrosins erfolgen, welche assimiliert wird und als Atmungsquelle dient. In der Nährlösung 1—3 ist die Reaktion neutral (in 2 sogar ein wenig alkalisch), im Kolben 4 dagegen sauer. 10 ccm der Flüssigkeit brauchen zur Neutralisation (auf Kongo) 43 ccm $\frac{1}{50}$ Normal Kalilauge. Vom Tyrosin wurde Ammoniak (was schon Butkewitsch beobachtet hat) abgespalten, mit Nessler erhält man in dem Kolben 1 und 2 eine sehr intensive Fällung, während in dem Kolben 4 nur eine Spur der Reaktion vorhanden ist und dabei Nessler's Reagens gleich nachher reduziert wird. Oxalsäure ist in der Kultur 4 sehr reichlich vorhanden, sonst aber in keiner anderen. Mit NOH wird nur die Kultur 4 gebräunt. Mit ammoniakalischer Silberlösung gibt die Kultur 4 eine momentane Reduktion, die Kultur 2 eine sehr schwache Reduktion nach 10 Minuten, die Kultur 1 und 3 keine Reduktion auch nach dem Kochen. Mit Eisenchlorid gibt Nr. 4 eine vorübergehende, grüne Färbung, die mit NaCO_3 ins Grauviolette übergeht. Eine ähnliche Reaktion bekomme ich in der Kultur 2, in der Kultur 1 und 3 dagegen keine.

Von der reinen Lösung der Nymphaea-Oxydase wird unsere Tyrosinsäure nicht angegriffen, sogar nach Zusatz von H_2O_2 , ebenso wenig von der Tyrosinase. Junge Kartoffelknollen und Rübenwurzeln, welche an Tyrosinase reich sind, verdunkeln nach Befeuchten mit Tyrosinsäure nicht mehr als sonst.

Da nun bewiesen wurde, daß bei dem Kohlenstoffhunger das Tyrosin durch *Aspergillus niger* anders als bei Anwesenheit der Sakcharose verwertet wird, so wollte ich wissen, ob durch Wechsel der Kohlenstoffquelle der uns interessierende Abbau des Tyrosins verändert wird oder nicht. Darüber wurde nur eine Versuchsreihe angestellt, nämlich mit der hydroaromatischen Verbindung der Chinasäure, von welcher wir seit Naegeli wissen, daß sie eine sehr gute, von allen aromatischen vielleicht die beste Kohlenstoffquelle

ist. O. Loew hat gezeigt, daß die Chinasäure durch manche Bakterien zu Protokatechusäure oxydiert, Emmerling und Abderhalden haben eine dieser aeroben Bakterien (*Micrococcus chinicus*) isoliert und näher untersucht (Zentrallblatt für Bakteriologie 1903, X, 337). Die Säure wurde in meinen Versuchen nicht neutralisiert. Die Kulturdauer betrug 12 Tage. Es waren 3 Kolben mit je 100 ccm Flüssigkeit beschickt; Nr. 1 enthielt 2% Chinasäure, 1% NaNO_3 ; Nr. 2. 2% Chinasäure, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Nr. 3. 2% Chinasäure, 0.2% Tyrosin.

In allen drei Kolben wächst *Aspergillus* sehr gut, anscheinend gleich und fruktifiziert üppig. Die Untersuchung der Flüssigkeiten zeigte einige Verschiedenheiten der Ernährungsweise. Auffällig ist zunächst die verschiedene Azidität. 10 ccm der Flüssigkeit brauchten zur Neutralisation in Nr. 1 — 1.3 ccm, in Nr. 2 — 11 ccm, in Nr. 3 — 38 ccm $\frac{\text{N}}{50}$ KOH. Oxalsäure wurde in Nr. 1 sehr reichlich gebildet, in Nr. 2 und 3 gar nicht. Mit Millons Reagens verhielt sich Nr. 1 negativ, in Nr. 2 setzte sich ein gelblich-brauner Niederschlag nach Erwärmen ab, Nr. 3 färbte sich nach Erwärmen dunkel kirschrot. Mit Eisenchlorid nahm Nr. 1 und Nr. 2 eine grauviolette, Nr. 3 eine beständige grünlichblaue Färbung an, welche mit NaOH intensiv rot wurde. Die angesäuerten Flüssigkeiten Nr. 1 und 2 wurden abdestilliert. Das Destillat von Nr. 1 reduzierte nach der Neutralisation keine ammoniakalische Silberlösung (keine Ameisensäure), wurde aber mit Eisenchlorid rot gefärbt (Essigsäure). Im Destillat von Nr. 2 fand nur eine schwache Reduktion der Silberlösung statt und diese färbte sich mit Eisenchlorid rot. Die ammoniakalische Silberlösung wurde durch die Flüssigkeit Nr. 1 und 2 nicht, durch die Flüssigkeit 3 in der Kälte sehr schnell reduziert. Diese Reaktionen beweisen, daß in den Kulturen 1 und 2 die Chinasäure zu Ameisen- und Essigsäure, nicht dagegen zu Protokatechusäure oxydiert wurde. Die Flüssigkeit Nr. 3 wurde mit H_2SO_4 angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach Abdestillieren des Äthers erhielt ich einige ölige Tropfen, jedoch keine Kristalle. Dieser Rückstand gab, in ein wenig Wasser gelöst, folgende Reaktionen: Millon nach Erwärmen fast schwarzrot; Eisenchlorid nimmt eine fast schwarzblaue, dauernde Färbung an, welche nach Zusatz von NaOH rotbraun wird; ammoniakalische Silberlösung wird momentan, Fehlingsche Lösung nach einigen Minuten in der

Kälte reduziert; Jodsäure wird gleichfalls reduziert, Ammoniumvanadat wird sofort intensiv grün, durch Bromwasser getrübt.

Alle Reaktionen stimmen mit Ausnahme der Bromwasserreaktion mit den Reaktionen der Protokatechusäure überein.

Ob andere Pflanzen auf dieselbe Weise Tyrosin abbauen wie *Aspergillus niger* oder nicht, sollte zunächst mit Hilfe der entsprechenden Agar-agarkulturen entschieden werden. Einer Agargallerte mit 5% Sakcharose wurde 0.1% Tyrosin zugesetzt, diese Agar-emulsion in Petri-Schalen gegossen, mit verschiedenen Pilzen geimpft und dann kleine Stücke der Agargallerte nach einigen Tagen geprüft. In den Kulturen des *Penicillium glaucum* und der *Alternaria tenuis* war eine die ammoniakalische Silberlösung reduzierende Substanz vorhanden, fehlte dagegen in den Kulturen des *Thamnidium elegans*, der *Saprolegnia* sp. und des *Basidiobolus ranarum*. Mit dem Reagens von Millon färbte sich die Gallerte der Kulturen des *Thamnidium* und der *Saprolegnia* in der Kälte intensiv rot, dagegen nicht diejenige des *Basidiobolus ranarum*. Das Plasma der Zellen des *Basidiobolus* wurde dabei natürlich intensiv rot gefärbt. Auf diese Weise wurden zwischen verschiedenen Pilzarten Differenzen im Abbau des Tyrosins bei aerober Lebensweise und gleicher Kohlenstoffquelle festgestellt. Etwas näher wurde die bekannte Kahlhauthefe *Willia anomala* untersucht.

Willia (*Saccharomyces*) *anomala* Hansen wurde in normaler Nährlösung, mit 5% Sakcharose als Kohlenstoffquelle, mit 0.2% des Tyrosins als Stickstoffquelle ausgesät, und die Temperatur zwischen 28—32° C gehalten. Als nach 10 Tagen das Tyrosin makroskopisch verschwunden war und sich mit der Reaktion Deniges in der Kultur nicht mehr nachweisen ließ, wurde die Kulturflüssigkeit abfiltriert. Der Pilz hat eine üppige Ernte gebildet. Die Kulturflüssigkeit verbrauchte 5 ccm von $\frac{n}{50}$ KOH-Lösung, Oxalsäure hatte sich nicht gebildet, Kaliumjodat (auch nach den Ansäuern), Methylenblau und ammoniakalische Silberlösung wurden nicht reduziert. Die Millonsche Reaktion färbte die Flüssigkeit in der Kälte momentan kirschrot, nach dem Erwärmen fast schwarzrot.

Die mit H_2SO_4 angesäuerte Kulturflüssigkeit wurde mit Äther extrahiert, der Äther dann abgedampft, der sehr spärliche, gelbliche sirupöse Rückstand, welcher nicht krystallisieren wollte, mit ein wenig Wasser versetzt und gab folgende Reaktionen:

- 1) mit Millon's Reagens in der Kälte momentan sehr intensiv kirschrot,
- 2) mit Eisenchlorid schmutzig grau grün,
- 3) mit Nessler's Reagens gelber Niederschlag ohne Reduktion des Quecksilbers,
- 4) mit ammoniakalischer Silberlösung keine Reduktion,
- 5) mit ammoniakalischer Kupferlösung grau grün.

Den Reaktionen nach zu urteilen, bildete sich aus Tyrosin Paraoxyphenylpropionsäure, welche Nencki (Opera omnia II, 109) als Produkt der Eiweißverdauung des *Bacillus liquefaciens magnus*, *B. spinosus* und der Rauschbrandbazillen, lauter Anaeroben, gefunden hat und die schon früher als Abbauprodukte des Tyrosins bei Fäulnis wie auch im Körper des Menschen von Baumann (Hoppe-Seyler's Zeitschrift IV. 304), Blendermann (Ebenda VI, 245) und andere konstatiert wurden.

2. Phenylalanin habe ich als Stickstoffquelle des *Aspergillus* benutzt, um zu erfahren, ob diese normal bei dem Abbau der Proteide entstehende, dem Tyrosin so nahe stehende aromatische Aminosäure, dieselben Abbauprodukte wie das Tyrosin liefert, oder andere. Es unterscheidet sich Phenylalanin (Phenylpropionsäure) nur durch den Mangel des Hydroxyls am Benzolring von dem Tyrosin. Es wurden 4 Kulturen gemacht: 1. mit 0.2% Phenylalanin; 2. mit 0.2% Phenylalanin + 1% NaNO_3 ; 3. mit 0.2% Phenylalanin + 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4. mit 0.2% Phenylalanin + 5% Sakcharose. *Aspergillus niger* wächst in allen und fruktifiziert, jedoch üppig nur in der Kultur 4. Diese Kultur wurde nach 10, die anderen nach 30 Tagen untersucht. In 1, 2 und 4 wurde Ammoniak abgespalten, jedoch in 4 nur schwach mit Nessler reagierend. Oxalsäure wurde nur in der Kultur 4 an der schwachen Trübung der Flüssigkeit erkannt. Mit amm. Silberlösung werden alle Lösungen zunächst gelblich, dann (nach etwa 10 Minuten) braungelb gefärbt, ungefähr nach einer halben Stunde tritt eine schwache Silberreduktion ein. Mit Eisenchlorid nehmen alle Lösungen eine grüne, mit jeder Sekunde intensiver werdende, dauerhafte Färbung an, welche nach Zusatz von Natriumkarbonat ins Braun übergeht, nach dem Ansäuern dagegen wiederkehrt.

Die angesäuerte Flüssigkeit der Kultur 4 wurde mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung abdestilliert. Nun bildeten sich in dem spärlichen sirupösen Rückstand sofort kleine und kurze,

lose liegende prismatische Kristalle der gesuchten Säure. Diese wurden in ein wenig Wasser gelöst und qualitativ geprüft. Die Fehlingsche Lösung wurde in der Wärme gleich, in der Kälte nach einiger Zeit reduziert, die ammoniakalische Silberlösung wurde gebräunt und bald in der Kälte reduziert. Mit Eisenchlorid färbte sich die Lösung ganz beständig dunkelblaugrün. Natronlauge verursachte eine wenig distinkte Nachdunkelung, Bromwasser eine starke Trübung.

Die beschriebenen qualitativen Reaktionen haben zu einer genauen Bestimmung der Säure nicht geführt, doch konnten auf Grund dieser Versuche einerseits mehrere von den chemisch bekannten Säuren aus dem Kreise der Betrachtung ausgeschlossen, andererseits deren Differenz von derjenigen, welche unter den gleichen Bedingungen aus Tyrosin entsteht, festgestellt werden. Unter Anlagerung von H_2O sollte Phenylalanin beim Desamidieren Phenylmilchsäure liefern, die starken Reduktionen scheinen jedoch auf eine weitere Oxydation, nämlich auf Hydroxylierung des Benzolringes hinzudeuten. Mit Homogentisinsäure ist auch diese Säure nicht identisch.

Dem Plane der Arbeit folgend, sollten ähnliche Abbauversuche mit Tryptophan und Prolin gemacht werden; Mangel an diesen Präparaten macht mir jedoch die Fortführung der Arbeit unmöglich. Daß Prolin als Stickstoffquelle dienen kann, zeigte Emmerling über Tryptophanverwertung durch die Pflanzen fehlen noch Experimente. Jedoch zeigte Czapek, daß Isatin sich als Stickstoffquelle eignet. Bei Desamidierung des Isatins durch *Aspergillus niger* wird eine Verbindung gebildet, welche die ammoniakalische Silberlösung ebenso intensiv in der Kälte reduziert wie die oben beschriebene Tyrosinsäure.

Zusammenfassung.

1. Nitrite werden durch verschiedene Pilze in neutraler Nährlösung assimiliert, wirken dagegen tötend auf Pilze, welche in saurer Lösung leben. Ebenso wirken natürlich Nitrate auf stark reduzierende, in saurer Nährlösung lebende Pilze.

2. Mit Nitraten oder Ammonsalzen ernährte Pilze werden durch Zusatz verschiedener Oxydations- und Reduktionsmittel verschieden beeinflusst. Die hemmende Wirkung liegt in manchen Fällen in extrazellulären chemischen Umsetzungen (z. B. auf der Bildung der

Nitrite aus Nitraten), in anderen Fällen dagegen in verschiedener Beeinflussung der intrazellularen Assimilation (z. B. die Wirkung der Chlorate auf die Nitrataassimilation).

3. Weder Hydroxylamin-, noch Hydrazinsalze sind allgemein als Plasmagifte zu bezeichnen, sie werden sogar durch mehrere Pilze assimiliert.

4. Der Assimilation des Stickstoffes der Aminosäuren geht deren Desamidierung voran. Die Eiweißstoffe werden also vor der Assimilation bis zu Ammoniak abgebaut.

5. Bei der Desamidierung der aliphatischen oder der aromatischen Aminosäuren werden entsprechende aliphatische und aromatische stickstofflose Verbindungen gebildet, welche weiteren Oxydationen unterliegen können. Der primären Bildung der Oxalate ist also die Bildung der primären „Gerbstoffkörper“ homolog.

Nakładem Akademii Umiejętności.

Pod redakcją

Sekretarza Wydziału matem.-przyrod. Józefa Rostańskiego.

Kraków. 1906. — Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod zarządem J. Filipowskiego.

21 Listopada 1906.

