E 10

GÖTTINGER BODENKUNDLICHE BERICHTE

5

1968

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Einige Bemerkungen zum Problem der Huminstoffe	1
1.2	Literaturübersicht: Physikalisch-chemische Untersuchungen an Huminstoffen	3
1.3	Problemstellung	7
2.	Experimenteller Teil	9
2.1	Gewinnung von Huminsäuren	9
2.2	Die Original-Huminstoffe	13
2.2.1	Kationenumtauschkapazität und Leitfähigkeitstitration	13
2.2.2	Spezifische Wärme	16
2.2.3	Relative Stabilitätskonstanten von Zn^{++}-, Cu^{++}- und Fe^{++}-Huminsäurekomplexen	17
2.2.4	UV-Spektren	22
2.2.5	IR-Spektren	22
2.3	Die chemisch veränderten Huminstoffe	24
2.3.1	Acetylierung	24
2.3.2	Reduktive Acetylierung	27
2.3.3	Methylierung	30
2.3.4	Hydrierung	32
3.	Theoretischer Teil	35
4.	Zusammenfassung	49
5.	Anhang	51
5.1	Arbeitsvorschriften	52
5.2	Kurven	59
6.	Literaturverzeichnis	68

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Einige Bemerkungen zum Problem der Huminstoffe

Die postmortale organische Substanz des Bodens ist extrem komplexer Natur. Ihre Zusammensetzung wird wesentlich durch die Art der in den Boden gelangenden pflanzlichen und tierischen Rückstände bestimmt, hinzukommt ihre biologische, physikalische und chemische Umwandlung. Als Ergebnis resultiert ein Stoffgemisch größter Mannigfaltigkeit. Denn neben Komponenten der organischen Rückstände, die mehr oder weniger schnell dem Abbau unterliegen, sind auch Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen vorhanden, die die erstgenannten Stoffe als Quelle von Energie und Synthesebausteinen verwerten. Diese höchst unterschiedlichen Stoffgruppen umfassen Kohlenhydrate und verwandte Verbindungen, Proteine und ihre Abkömmlinge, Lignine, Fette, Wachse, Harze, Gerbstoffe usw. und ihre Abbauprodukte. Neben intermediären Produkten des organischen Stoffabbaus und den erwähnten sekundären Syntheseprodukten (infolge der Wirkung von Mikroorganismen) kommt es im Boden zur Akkumulation stärker restistenter Abbauprodukte - der Huminstoffe. Diese Naturstoffe werden definiert als ein komplexes und relativ resistentes Gemisch von braunen, amorphen und kolloidalen Substanzen zumeist sauren Charakters, deren Bildung im Verlaufe enzymatischer Abbauvorgänge, sowie biochemischer Umsetzungen der organischen Ausgangsstoffe erfolgt. Den Huminstoffen kommen Eigenschaften zu, die diese scharf von anderen natürlichen organischen Substanzen unterscheiden.

Das Vorhandensein von Humus als der Gesamtheit der Huminstoffe im Boden übt einen beträchtlichen Einfluß auf physikalische, chemische und biologische Verhältnisse aus. Der Humus verbessert die Bodenstruktur, die Wasserführung und Durchlüftung, erhöht die Wasserhalte-, Puffer- und Austauschkapazität, beeinflußt die Löslichkeit von Mineralen und

dient als Nährstoffquelle für die Entwicklung von Mikroorganismen (12). In letzterem Falle kann der Humus auch als Nährstoffspeicher für die Pflanze angesehen werden. Während des langsamen mikrobiellen Abbaus von Huminstoffen erfolgt eine allmählige Freisetzung und nachfolgende Mineralisierung von C, N, S, P und anderen Elementen, die während der Bildungsprozesse des Humus festgelegt worden sind.

Ursprünglich bestand die Vorstellung, daß Komplexe von Lignin und Protein mikrobieller Herkunft als sogenannte Lignoproteinkomplexe die hauptsächliche Quelle der Humussubstanzen des Bodens darstellen. Gewisse Übereinstimmungen zwischen der aromatischen Struktur des Lignins und der in Huminsäuren gefundenen, sowie die relative Resistenz des Lignins gegenüber dem enzymatischen Abbau schienen diese Vorstellung zu stützen (100). Ergebnisse jüngerer Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß Stoffe, deren Herkunft nicht dem Lignin zuzuschreiben ist, ebenfalls als Quelle von aromatischen "Struktureinheiten" dienen können. Unter diesem Aspekt sind insbesondere Produkte der Stoffwechselaktivitäten verschiedenster Pilze, Actinomyceten und Bakterien bedeutsam (9, 10, 34, 53). Mikroorganismen sind häufig verantwortlich für die Bildung von Verbindungen mit aromatischen oder ähnlichen Strukturen, die aus Umsetzungen vieler verschiedener organischer Stoffe, einschließlich der Kohlenhydrate, resultieren (79). Solche aromatische Verbindungen sind mitunter leicht oxidierbar und zu Kondensationen mit Aminosäuren oder Peptiden unter Bildung von Substanzen befähigt, die den in Bodenhumusfraktionen gefundenen ähnlich sind. Es besteht gegenwärtig offenbar kein Zweifel, daß die "Kernstruktur" von Huminsäuren sowohl aus veränderten Ligninkomponenten als auch aus anderen pflanzenbürtigen und von Mikroorganismen synthetisierten aromatischen Verbindungen hervorgeht. Mikroorganismen sind somit an allen Phasen der Humusbildung beteiligt.

Die Identifizierung und Charakterisierung aller Huminstoffkomponenten ist äußerst schwierig und gegenwärtig praktisch kaum durchführbar. Die Mannigfaltigkeit der vorliegenden Strukturen ist erheblich (73, 81) und verlockt daher kaum zu detaillierten chemischen Untersuchungen. Eine physikalische und chemische Charakterisierung der Huminstoffe ist jedoch erforderlich, wenn praktische Fragen im Hinblick auf ihre Rolle für die Bodenbildung und Bodenfruchtbarkeit beantwortet werden sollen. Es ist unzutreffend, daß ein Stoff, der nur in relativ geringer Konzentration im Boden vorliegt, deshalb von geringer Bedeutung sei. Die in jüngerer Zeit gemachten Fortschritte hinsichtlich der Extraktion, Auftrennung, Identifizierung und Charakterisierung der Huminstoffe sind ermutigend. Die Anwendung dieser von Biochemikern, Kolloidchemikern und Kohlechemikern entwickelten Techniken, insbesondere zur Charakterisierung von hochmolekularen Polymeren, sind von großem Wert für die Untersuchungen der Bodenhuminstoffe. Ein großer Teil der vorhandenen Information ist noch fragmentarisch und es bedarf weiterer eingehender Bemühungen, um die Chemie der Huminstoffe des Bodens einer Klärung näherzubringen. Diese aber wird dann auch für die praktische Landwirtschaft nicht ohne Interesse sein.

1.2 Literaturübersicht: Physikalisch-chemische Untersuchungen an Huminstoffen

Bei den bisher vorliegenden Untersuchungen über die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Huminsäuren sind eine Anzahl verschiedener Methoden zur Anwendung gekommen. Die Untersuchung einer organischen Substanz im Hinblick auf ihre Extraktion und Fraktionierung, ihren Abbau und ihre Charakterisierung kann in erheblichem Maße von der Eignung der

angewandten Methoden abhängig sein. Dies trifft besonders für Untersuchungen an komplexen Stoffen wie Huminsäuren zu. Die sogenannte "proximate analysis" von WAKSMAN am nicht aufgetrennten organischen Stoffkomplex hat bereits einige Informationen geliefert. Es hat sich jedoch im Verlaufe der Huminstoffuntersuchungen gezeigt, daß diese Bearbeitungsweise nur einen recht begrenzten Aussagewert hat und die Verwendung von weitgehend gereinigten Stoffen des Bodens für weitere Fortschritte der physikalisch-chemischen Untersuchungen von Huminsäuren erforderlich ist. Diesen Weg beschritt erstmals ACHARD (1), indem er die Isolierung der Huminsäuren durch Extraktion mit verdünnten wässerigen Lösungen von NaOH, KOH und NH_4OH vornahm. BREMNER und LEES (9) verglichen die Eignung verschiedener neutraler Reagenzien, insbesondere der Natriumsalze organischer und anorganischer Säuren zur Huminsäureextraktion. Weitere Untersuchungen über Neutralsalze als Extraktionsmittel wurden von HAMY und LeROY (40, 41) durchgeführt. Sie stellten fest, daß die wirkungsvollsten neutralen Extraktionsmittel Oxalat, Tartrat, Citrat, Malonat und Salicylat sind, die gleichzeitig zur Bildung von Komplexen mit Eisen befähigt sind. MARTIN (68) extrahierte Huminstoffe mit einem Natriumfluorid-Natriumborat-Borsäure-Puffer vom pH 9. Obwohl verschiedene neutrale Extraktionsmittel als brauchbar beschrieben worden sind, wird ihre Eignung als milde Lösemittel in vielen Fällen dadurch gemindert, daß die Extraktionsausbeute niedriger ist als mit den klassischen Extraktionsmitteln wie Natriumhydroxid und Natriumpyrophosphat.

Mehrere Forscher haben eine Fraktionierung der Huminstoffe unter Anwendung moderner Methoden unternommen. HOCK (46) versuchte eine Auftrennung natürlicher Huminsäuren, Fulvosäuren und Hymatomelansäuren durch Chromatographie an Al_2O_3-Säulen und untersuchte das Absorptionsverhalten der einzelnen Fraktionen im sichtbaren und ultraviolettem Licht. KONONOVA et al. (52) verbesserten die Fraktionierung an

Aluminiumoxid und dehnten diese Untersuchung auf Stärkegel aus. Modellhuminsäuren von ELLER (27) und ELLER et al.(29) wurden von LAATSCH (64) in den natürlichen Huminstoffen ähnliche Fraktionen aufgetrennt. PAVEL et al. (79) beschrieben die Fraktionierung von Huminsäuren mittels Papierchromatographie und FORSYTH (35) trennte Fulvosäuren in vier Fraktionen durch Adsorption an Aktivkohle und stufenweise Elution.

Die Infrarotabsorption von Huminsäuren ist erst in jüngerer Zeit in stärkerem Maße für Struktur untersuchungen besonders hinsichtlich der funktionellen Gruppen herangezogen worden. Die IR-Absorptionsspektren der typischen Huminsäuren zeigen jedoch nur einige breite Banden und erschweren detaillierte Aussagen über die chemische Struktur der Huminsäuren.

WOOD et al. (106) folgerten nach Überprüfung der acetylierten Produkte von Lignit-Huminsäuren, daß viele der COOH-Gruppen eng benachbart liegen, so daß eine Anhydrid-Bildung möglich ist. Diese Befunde wurden später von WAGNER und STEVENSON (99) bestätigt. WRIGHT und SCHNITZER (107), MARTIN et al. (68), DeWALT und GLENN (24) sowie andere werteten die IR-Absorption für die Bestimmung des Gesamthydroxylgehaltes von Huminsäuren nach Veresterung aus.

Wertvolle Informationen hinsichtlich der strukturellen Anordnung von funktionellen Gruppen in Huminsäuremolekulen wurden geliefert von ZIECHMANN (109), MORTENSEN und HIMES (74), KUMADA und AIZAWA (58), COLE (18), SCHNITZER et al. (87) ORLOV et al. (78), JOHNSTON (49) und BROADBENT und BRADFORD (14).

WELTE (103), ZIECHMANN (109) und KUMADA (56, 59) werteten eine größere Anzahl von Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich für Untersuchungen an Huminsäuren aus. Im allgemeinen zeigen diese Spektren einen monotonen Verlauf, jedoch glaubt KUMADA, bestimmte Absorptionsbereiche dem

Anthrachinon zuordnen zu können, und sieht in diesem einen möglichen Baustein des Huminsäuremoleküls.

Der Säurecharakter von Huminsäuren wird auf die Anwe-senheit von dissoziierbarem Wasserstoff aromatischer und aliphatischer -COOH- und saurer Hydroxy-Gruppen zurückgeführt. Der reaktive Wasserstoff in diesen Gruppen ist für die Austauschereigenschaften der Huminsäuren verantwortlich (WELTE (102), UBALDINI (96), BAILEY (2), SCHNITZER und GUPTA (89, 90), BLOM et al. (5) und andere). GILLAM (38) schloß auf das Vorhandensein von Carboxylgruppen in Huminsäurepräparaten aus der Form potentiometrischer Titrationskurven und zeigte, daß die Austauschkapazität durch blockierende Hydroxygruppen ve-ringert werden kann. BROADBENT und BRADFIELD (14) waren in der Lage, die Austauschkapazität verschiedener Humuspräparate durch Methylierung von Carboxyl- und Hydroxygruppen stark herabzusetzen. Diese Befunde weisen darauf hin, daß Carboxylgruppen von Uronsäuren offenbar einen wesentlichen Anteil an der Austauschkapazität haben. SCHEFFER, ZIECHMANN und SCHOLZ (85) fanden eine enge Beziehung zwischen dem Grad der Humifizierung und der Kationenumtauschkapazität von Bodenhumus.

Huminstoffe haben eine ausgeprägte Fähigkeit zur Bildung von relativ stabilen Komplexen mit di- und trivalenten Metallionen. Diese Eigenschaft beeinflußt die Verfügbarkeit von Nährstoffen für Pflanzenwurzeln und andere biologische Systeme, wirkt auf die physikalischen Eigenschaften von Böden ein und spielt schließlich auch eine bedeutende Rolle bei der Genese vieler wichtiger Bodentypen. Man vermutet, daß diese genannten Eigenschaften durch funktionelle Gruppen, wie Carboxyl-, Hydroxy- und Carbonylgruppen bedingt werden. HIMES und BARBER (45), HEMSTOCK und LOW (44) sowie SCHEFFER und ULRICH (86) berichteten über verschiedene Aspekte der Chelatbildung von Huminstoffen. Andere Forscher, zum Beispiel BREMNER et al. (8), DION und MANN (25), HEINTZE und MANN (43),

LEES (63) und WALLACE et al. (101) haben die Existenz von Komplexen zwischen Spurenelementen und Huminstoffen im Boden nachgewiesen.

Nur wenige Untersuchungen liegen bislang über die relativen Stabilitätskonstanten verschiedener Metall-Huminsäure-Komplexe vor. Der Grund hierfür ist vermutlich in der extremen Komplexität der Huminsäuren selbst zu finden. RANDHAWA und BROADBENT (81) erhielten für Zink-Huminsäure-Komplexe Stabilitätskonstanten von 4,42 bei pH 3,6; 6,18 bei pH 5,6 und 6,8 bei pH 7,0. SCHNITZER und SKINNER (93) fanden die höchsten Stabilitätskonstanten bei Cu^{++}/Fulvosäure-Komplexen, gefolgt von Fe^{++}- und Zn^{++}-Komplexen.

Obwohl zahlreiche Untersuchungen über die Bestimmung der spezifischen Wärme von Kohle vorliegen, wird diese bisher nicht zur Charakterisierung von Huminstoffen verwendet. Ein Überblick über die Ergebnisse an Kohle ist von McCABE und BOLEY (69) sowie von CLENDENIN et al. (17) gegeben worden. Daraus ist ersichtlich, daß die spezifische Wärme von Kohle im Bereich von 0,2 bis 0,4 liegt und abhängig ist vom Kohlenstoffgehalt, sowie methodisch vom Wassergehalt und von der Temperatur.

1. 3 Problemstellung

Die unter Ziff. 1.2 zusammengefaßte Literaturübersicht zeigte, daß physikalisch-chemische Untersuchungen an Huminstoffen unmittelbar einsetzten, nachdem man diese Naturstoffe als mehr oder weniger abgeschlossene Stoffgruppe mit gemeinsamen Merkmalen und gewisse Übereinstimmungen ihrer Biosynthese erkannt hatte. Physikalisch-chemische Untersuchungen als Ansatz sind also durchaus nichts Neues. Immerhin aber ist eine systematische Bearbeitung in dieser Hinsicht nicht bzw. nur in Ansätzen erfolgt. So sind wir erst in jüngster

Zeit über die Dichte, die Oberfläche, die spezifische Wärme, die elektrische Leitfähigkeit usw. von Huminstoffen informiert worden (110), Meßergebnisse aber, die bei den Stoffen des Inkohlungsprozesses längst vorliegen. Es wird damit deutlich, daß hier eine Lücke gegeben ist, die alsbald geschlossen werden sollte.

Nun kann es nicht Aufgabe dieser Arbeit sein, den bisherigen Messungen neue an die Seite zu stellen, sondern für derartige Untersuchungen war ein neuer Ansatz zu gewinnen.

Es sollte hier vielmehr der Versuch unternommen werden, eine Information darüber zu gewinnen, in welchem Maße die funktionellen Gruppen für die physikalischen Eigenschaften der Huminstoffe mit von Bedeutung sind. Aus diesem Grunde muß versucht werden, eine auf reaktiven Gruppen abzielende Veränderung der Huminstoffe einzuleiten, um ihre physikalischen Eigenschaften mit den Originalpräparaten zu vergleichen. Mithin umfaßt das vorgegebene Thema folgende Arbeitsgänge:

1. Gewinnung der Huminstoffe,
2. ihre chemische Veränderung,
3. physikalisch-chemische Untersuchungen, und
4. ihre Interpretation.

Nebenbei konnte untersucht werden, welche chemischen Veränderungen an Huminstoffen sinnvoll sind und zu welchen Aussagen sie führen.

2. Experimenteller Teil

2.1 Gewinnung von Huminsäuren

Nach vorliegenden Veröffentlichungen besteht eine allgemeine Übereinstimmung hinsichtlich der Auffassung, daß Huminsäuren keine Verbindung mit definierbarer chemischer Struktur sind, sondern ein Sammelprodukt verschiedenartiger Substanzen, die trotz gewisser gemeinsamer Struktureigenschaften untereinander nicht völlig identisch sind - WELTE (102, 105), NIEMANN und ZIECHMANN (103, 104), SCHEFFER et al. (84) und DAVIES et al. (21).

In diesem Zusammenhang liegen eingehende Untersuchungen für eine Trennung von Huminsäuren in verschiedene Fraktionen vor, um ein klares Bild über die Natur, die Struktur und die Synthese von Huminstoffen zu erhalten. Die angewandten Methoden und Untersuchungen waren jedoch abhängig vom Interesse der verschiedenen Autoren.

SPRINGER (94) unterschied Huminstoffe aus Böden auf Grund ihrer Acylierbarkeit. LEIN (64) trennte die Mineralteile des Bodens und die organische Substanz nach ihrer Dichte unter Verwendung von spezifisch schweren Flüssigkeiten. Die so gewonnenen Fraktionen wurden durch mikroskopische und röntgenoptische Methoden untersucht. Nach seinen Befunden enthielten die leichten Fraktionen freie organische Substanzen, die aus teilzersetztem Pflanzenmaterial, Huminen und Huminsäuren bestanden. Im Gegensatz dazu enthielten die spezifisch schweren Fraktionen Fulvo-Komplexe, die mit mineralischen Bodenkomponenten kombiniert oder an diese adsorbiert vorlagen. Weiterhin fand er, daß die intermediären Fraktionen fest gebundenes organisches Material enthielten, das er als esterartige Komplexe von Huminsäuren und Fulvosäuren bezeichnete.

Chromatographische Methoden zur Fraktionierung von Huminsäuren wurden von HOCK (46) und FORSYTH (35) angewandt. HOCK fand, daß sich Huminsäuren, Fulvosäuren und Hymatomelansäuren an einer Aluminiumoxid-Säule in mehrere Fraktionen auftrennen lassen. Der Befund zeigte, daß diese Methode für eine physikalische Fraktionierung von Huminstoffen dienen kann. FORSYTH stellte fest, daß sich Fulvosäuren durch eine selektive Adsorptionsmethode in 4 verschiedene Fraktionen auftrennen lassen.

SCHEFFER und Mitarbeiter (84) versuchten die Trennung von Huminsäuren durch Papierelektrophorese und fanden zwei Fraktionen, die auf Grund ihrer Farbe den Grau- und Braunhuminsäuren zugeordnet werden konnten. Sie nahmen an, daß alle Huminsäuren eine Mischung dieser zwei Fraktionen darstellen, wobei die eine oder die andere meist überwiegt. KYUMA (61) versuchte eine Trennung von Huminstoffen durch fraktionierte Ausfällung unter Verwendung eines Alkohol-Lauge-Systems und erhielt ebenfalls verschiedene Fraktionen.

Die chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften von Huminsäuren sind in Abwesenheit von anorganischen Anteilen des Bodens untersucht worden. Dabei zeigte es sich, daß die mit verschiedenen wässerigen oder nicht wässerigen Extraktionsmedien gewonnenen Huminstoffe unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufwiesen. Diese Unterschiede resultierten zum Teil daraus, daß viele Autoren die Huminstoffpräparate lediglich durch Farbe, N-Gehalt und C:N-Verhältnis charakterisierten, aber andere Faktoren wie z.B. pH, Extraktionsdauer usw. nicht genügend beachteten. Die am häufigsten verwendeten Extraktionslösungen für Huminstoffe des Bodens sind 0,1 M Na-pyrophosphat und 0,1 N oder 0,5 N NaOH. Hierbei gehen wesentlich mehr Huminstoffe in Lösung als bei Anwendung milderer Extraktionsmittel. Die hier verwendete Methode entspricht der von ROCHUS (82) beschriebenen. Ihre Vorteile bestehen u.a. in einer praktisch quantitativen Huminstoffgewinnung bei relativ kurzer Extraktionsdauer.

1. Die mit einem Mixgerät zerkleinerte Bodenprobe wird in Wasser suspendiert, mit Salzsäure auf pH 1 gebracht und mit 0,1 M HCl erschöpfend extrahiert. Der Extrakt wird filtriert und enthält neben anorganischen und organischen löslichen Stoffen säurelösliche Huminstoffkomponenten, die relativ niedermolekular und reaktionsfähig sind und als Huminsäurevorstufen bezeichnet werden. Ihre Isolierung erfolgt durch Bindung an ausflockendes Al-Hydroxid (sog. IBAH-Methode) nach Einstellen des Lösungs-pH-Wertes auf 6,0 mit NaOH. Da Aluminiumsalze aus den meisten Böden schon bei der sauren Extraktion mit in Lösung gehen, erübrigt sich in solchen Fällen oft der Zusatz von Aluminiumsalz. Das Aluminiumhydroxidadsorbat wird abfiltriert und chlorfrei gewaschen. Zur Gewinnung der Huminsäurevorstufen wird das Gel mit Kationenaustauscher behandelt, wodurch die mineralische Komponente an den Austauscher gebunden wird und die Huminsäurevorstufen in die wässerige Lösung freigesetzt werden.

2. Der saure Bodenrückstand von 1 wird in Wasser suspendiert, mit verdünnter NaOH auf pH 4 eingestellt und erschöpfend extrahiert. Das Filtrat wird sofort auf pH 1 gebracht, die hierbei ausfallende Huminsäurefraktion abfiltriert und sauer nachgewaschen, bis das Filtrat farblos ist.

3. Entsprechend verlaufen die Bodenextraktionen bei pH 7 und pH 14. Dabei wird im Neutralen mit Wasser extrahiert, im Alkalischen mit 0,1 N NaOH.

Aus den beiden Extraktionsstufen 2, 3 und 4 nach Abtrennung der sauer gefällten Huminsäuren anfallenden Filtraten werden die jeweiligen Huminsäurevorstufen nach der IBAH-Methode gewonnen. Dieses Verfahren der stufenweisen Bodenextraktion liefert folglich 3 Huminsäurefraktionen (pH-Stufen 4, 7 u. 14) und 4 Huminsäurevorstufenfraktionen (pH-Stufen 1, 4, 7 u. 14). Im Rückstand nach alkalischer

Extraktion verbleiben ungelöste mineralische Bodenbestandteile sowie organische Stoffe wie Lignine, Zellulose, Humine usw.

Eine schematische Darstellung des Fraktionierungsganges ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Angaben über den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wassergehalt (G_w) der Huminsäuren sowie über den Glühverlust (G_v) sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Kohlenstoff (C)-, Stickstoff (N)-, Wassergehalt (G_w) und Glühverlust (G_v) von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in Prozent

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH	G_w	G_v	C	N
Schwarztorf	-	4	-	-	-	-
		7	11,3	97,7	55,0	1,83
		14	15,2	98,4	60,4	1,00
Calluna Podsol	B	4	15,2	98,1	64,7	1,56
		7	12,2	98,2	55,0	1,56
		14	16,2	98,1	50,8	1,70
Braunkohle	-	4	17,4	97,0	60,1	1,14
		7	10,4	96,9	60,0	1,04
		14	9,1	94,4	54,4	0,94
Erica Podsol, Vogtei	A	4	6,2	96,5	n.b.	n.b.
		7	6,5	98,9	n.b.	n.b.
		14	5,1	88,1	n.b.	n.b.
Erica Podsol, Vogtei	B	4	9,7	95,5	n.b.	n.b.
		7	8,8	83,6	n.b.	n.b.
		14	9,0	76,0	n.b.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt

2.2 Die Original-Huminstoffe

2.2.1 Kationenumtauschkapazität (KUK) und Leitfähigkeitstitration

Die Kationenumtauscheigenschaft der Huminstoffe wurde offenbar nahezu gleichzeitig erkannt wie die des Bodens. Sie ist jedoch weit weniger intensiv untersucht worden als die der anorganischen Komponenten des Bodens. Die Bedeutung einer Untersuchung des Kationenumtauschvermögens von Bodenhumus ergibt sich aus der Tatsache, daß die KUK von Montmorrillonit gewöhnlich Werte von 80-100 mval/100 g Ton aufweist, während das gesamte Adsorptionsvermögen eines gut entwickelten Humusmaterials Werte von 200-300 mval/100 g Boden zeigt. Im allgemeinen bedeutet die Anwesenheit von 1% Humus in einem Mineralboden eine Zunahme der Umtauschkapazität von ungefähr 2 mval. Im Gegensatz dazu beeinflußt 1% Ton die Umtauschkapazität nur im Ausmaß von etwa 0,3 bis 0,6 mval je nach Art und Mengenverhältnis der vorliegenden Tone. Die vergleichsweise hohe Umtauschkapazität der Huminstoffe und der aus Boden gewonnenen Präparate betont die Bedeutung dieser organischen Stoffkomponente für Kationenumtauschvorgänge im Boden. Der langsame Fortschritt auf diesem Gebiet ist zweifellos zum Teil auf die Komplexität des zu untersuchenden Systems zurückzuführen. Die Kenntnisse über die chemische Natur der Huminsäuren sind im Gegensatz zu den Tonmineralen zur Zeit noch völlig unzureichend.

Die Carboxyl- und Hydroxy-Gruppen stellen die wesentlichen Kationenumtauschgruppen der Huminsäuren dar. Nach McGEORGE (70) sind Lignin, Lignocellulose, Lignohemicellulose und ähnliche Substanzen für die Umtauscheigenschaften des Humus hauptsächlich verantwortlich. Er fand eine direkte Beziehung zwischen dem Ligningehalt und der KUK und schrieb die Umtauschreaktionen den phenolischen Hydroxy-

gruppen des Lignins zu. MITCHELL (73) hielt ebenfalls Lignin oder Derivate desselben verantwortlich für die KUK der organischen Substanz des Bodens. Nach MULLER (76) ist die hohe Umtauschkapazität auf -COOH- und -OH-Gruppen zurückzuführen. BROADBENT und BRADFIELD (14) wiesen ebenfalls darauf hin, daß die Kationenumtauschgruppen im wesentlichen vermutlich -COOH und phenolische oder enolische -OH sind.

In quantitativer Hinsicht bestehen zum Teil erheblich unterschiedliche Auffassungen. SCHEFFER und ULRICH (86) fanden, daß der Säurecharakter mit zunehmendem Polymerisationsgrad (zunehmende Humifizierung) abnimmt und Fulvosäuren und Braunhuminsäuren saurer sind als die stärker humifizierten Grauhuminsäuren. Eine ähnliche Beobachtung wurde von DUBACH und MEHTA (26) mitgeteilt. KUMADA (57) hingegen berichtete über eine Zunahme der KUK von Huminsäurepräparaten mit zunehmendem Humifizierungsgrad. KAWAGUCHI und KYUMA (51) stützten mit früheren Mitteilungen die Ergebnisse von KUMADA. Neuere Befunde dieser Autoren (60) ergaben jedoch, daß in den Anfangsstadien des Humifizierungsprozesses, die Polyphenole zu einem Verlust von phenolischen Hydroxygruppen tendieren, woraus eine schwache Abnahme der KUK resultiert. Entsprechende Ergebnisse wurden von SCHEFFER, ZIECHMANN und SCHOLZ (85) mitgeteilt, doch führten die mit Fortschreiten des Oxydationsprozesses in synthetischen Humifizierungsprodukten auftretenden -COOH-Gruppen zu einer erheblichen Zunahme der KUK. Doch dürfte hier ein Sonderfall vorliegen, da unter oxydativen Bedingungen Ringspaltungen eintreten mit einer zusätzlichen Bildung sauerstofffunktioneller Gruppen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die KUK mit Hilfe der Leitfähigkeitsmethode nach FIEDLER (32) bestimmt. Die Ergebnisse der KUK-Bestimmungen sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Die KUK-Werte aller Huminsäureproben liegen im Bereich zwischen 200 bis 321 mval/100 g. Bei allen Huminsäuren zeigt sich keine durchgehende Tendenz. Im Falle des

Erica Podsols zeigen die Huminsäuren aus dem B-Horizont verglichen mit dem A-Horizont eine Abnahme der KUK-Werte für die pH 4,0 und pH 7,0 Fraktionen, während die pH 14 Fraktion aus dem B-Horizont einen höheren Wert aufweist als die aus dem A-Horizont. Die Huminsäurepräparate von Erica Podsol B-Horizont nahmen weiterhin insofern eine Ausnahmestellung ein, als ihre KUK-Werte der bei allen anderen untersuchten Huminsäuren vorliegenden Tendenz, von pH 4 zu pH 14 anzusteigen, nicht folgen. Die KUK der Huminsäuren aus dem Erica Podsol B-Horizont ist vielmehr am größten bei der pH 4 Fraktion und am kleinsten bei der pH 14 Fraktion.

Tabelle 2: Kationenumtauschkapazität von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mval/100 g Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	273,4	210,7
Calluna Podsol	B	246,6	231,1	217,9
Braunkohle	-	261,4	214,2	226,5
Erica Podsol, Vogtei	A	321,3	307,9	267,1
Erica Podsol, Vogtei	B	199,9	291,5	315,5

2.2.2 Spezifische Wärme - c_p

Die spezifische Wärme eines Stoffes ist jene Wärmemenge, die nötig ist, um 1 g dieses Stoffes um 1 Grad zu erwärmen. Sie ist im allgemeinen mit der Temperatur veränderlich.

Die kalorische Größe ist für die Charakterisierung der Huminstoffe und die Einteilung innerhalb der Humifizierungsvorgänge besonders geeignet (110). Die mittlere spezifische Wärme ist damit auch ein relatives Maß für den Humifizierungsgrad.

Tab. 3 zeigt die für die verschiedenen Huminsäuren erhaltenen c_p-Werte. Bei den Schwarztorf- und Calluna Podsol-Proben sinken die c_p-Werte von der pH 4 zur pH 14 Fraktion ab. Bei Braunkohle ist die c_p der pH 14 Fraktion höher als die der pH 7 Fraktion, aber niedriger als die der pH 4 Fraktion. Im allgemeinen liegen die c_p-Werte der Huminsäurefraktionen aus dem A-Horizont des Erica Podsols etwas höher als die aus dem B-Horizont, doch zeigt sich in der Reihenfolge der pH Fraktionen keine übereinstimmende Tendenz.

Tabelle 3: Spezifische Wärme von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in cal/g.Grad

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	0,186	0,181
Calluna Podsol	B	0,228	0,147	0,125
Braunkohle	-	0,159	0,132	0,142
Erica Podsol, Vogtei	A	0,137	0,136	0,147
Erica Podsol, Vogtei	B	0,121	0,137	0,133

2.2.3 Relative Stabilitätskonstanten von Zn^{++}-, Cu^{++}- und Fe^{++}-Huminsäurenkomplexen

Befunde eingehender Untersuchungen über metallorganische Verbindungen im Boden liegen bereits seit längerem vor (SCHEFFER und ULRICH (86), DEUL (23), MILLER und OHLROGGE (71)). GALLAGHAR (36) bestätigte ihren Einfluß auf die Bodenbildung durch Kationenauswaschung. DE KOCK (22) und ENNIS (29) untersuchten den Einfluß von Huminsäuren auf die Lieferung und Fixierung von Pflanzennährstoffen. MORTENSEN (75) zeigte, daß für die Reaktionen von Übergangs-Metall-Ionen mit organischen Substanzen des Bodens Chelat- bzw. Komplexbildung als wahrscheinlichster Mechanismus anzunehmen ist. KANWAR (50), TOBIA und HANNA (95), BROADBENT und OTTO (15), RANDHAWA und BROADBENT (81) und SCHNITZER und SKINNER (93) haben gezeigt, daß Kupfer, Zink und andere Kationen durch organische Stoffkomponenten im Boden und ähnliche organische Präparate gebunden werden, und untersuchten die Natur und Eigenschaften der beteiligten Austauschergruppen.

Die Kenntnisse über die Stabilitätskonstanten von verschiedenen metallorganischen Komplexen sind sehr gering. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet könnten zur Erklärung des Verhaltens dieser Verbindungen im Bodensystem beitragen. HIMES und BARBER (45), MILLER und OHLROGGE (71) und RANDHAWA und BROADBENT (81) ermittelten Log K-Werte (K = Stabilitätskonstante) für Komplexe des Zinks mit organischen Substanzen des Bodens zwischen 3,4 und 7,8 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Aus Titrationskurven schlossen BECKWITH (4) und COLEMAN und Mitarbeiter (19), daß Metalle aus der ersten Übergangs-Reihe im Periodensystem Komplexe mit organischen Verbindungen bilden, deren Stabilität der IRVING-WILLIAMS (47) Reihe folgte. Nach IRVING-WILLIAMS läßt sich die Stabilität von Komplexen bivalenter Metallionen unabhängig von der Natur des Komplexbildners in folgender Reihe anordnen: Pd > Cu > Ni > Co > Zn > Cd > Fe > Mn > Mg.

SCHNITZER und SKINNER (93) fanden hingegen für die Stabilität der Komplexe zwischen Fulvosäure und Cu^{++}, Zn^{++} und Fe^{++}, die Reihenfolge $Cu^{++} > Fe^{++} > Zn^{++}$.

Die in den vorliegenden Untersuchungen verwendete Methode entspricht mit einigen Abänderungen der von RANDHAWA und BROADBENT (81) sowie SCHNITZER und SKINNER (93). Diese Methode ist besonders geeignet für die Untersuchung von wasserlöslichen metallorganischen Komplexen, da sehr niedrige Metallkonzentrationen verwendet werden können und die Gleichgewichtseinstellung schnell erfolgt.

Die gefundenen Stabilitätskonstanten für Zn^{++}, Cu^{++} und Fe^{++} mit verschiedenen Huminsäuren sind in den Tabellen 4, 5 und 6 zusammengestellt. Die relativen Stabilitätskonstanten für Zn^{++} sind bei allen Huminsäuren mit Ausnahme von Braunkohle und Erica Podsol (A-Horizont) höher bei pH 7,0 als bei pH 3,5. Demgegenüber liegen die Konstanten für Cu^{++} und Fe^{++} in allen Fällen bei pH 7,0 höher als bei pH 3,5.

Tabelle 4: Relative Stabilitätskonstanten der Zink-Huminsäurekomplexe von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren bei pH 3,5 und pH 7,0

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH	Relative Stabilitätskonstante bei pH 3,5	7,0
Schwarztorf	-	4	-	-
		7	0,89	1,82
		14	0,14	0,13
Calluna Podsol	B	4	0,22	1,18
		7	0,21	1,22
		14	0,22	1,33
Braunkohle	-	4	0,20	0,13
		7	0,36	0,29
		14	0,25	0,20
Erica Podsol, Vogtei	A	4	0,44	0,22
		7	0,04	0,24
		14	0,24	0,22
Erica Podsol, Vogtei	B	4	0,26	0,70
		7	0,25	1,43
		14	0,13	1,05

Tabelle 5: Relative Stabilitätskonstanten der Kupfer-Huminsäurekomplexe von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren bei pH 3,5 und pH 7,0

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH	Relative Stabilitätskonstante bei pH 3,5	7,0
Schwarztorf	-	4	-	-
		7	0,09	1,41
		14	0,08	0,20
Calluna Podsol	B	4	0,13	0,85
		7	0,36	1,07
		14	0,13	0,44
Braunkohle	-	4	0,32	0,99
		7	0,22	0,41
		14	0,13	0,65
Erica Podsol, Vogtei	A	4	0,32	1,98
		7	0,20	1,26
		14	0,92	1,41
Erica Podsol, Vogtei	B	4	0,30	1,65
		7	0,22	1,31
		14	0,31	0,99

Tabelle 6: Relative Stabilitätskonstanten der Eisen-Huminsäurekomplexe von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren bei pH 3,5 und pH 7,0

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH	Relative Stabilitätskonstante bei pH 3,5	7,0
Schwarztorf	-	4	-	-
		7	0,13	0,88
		14	0,15	5,03
Calluna Podsol	B	4	1,05	4,44
		7	0,56	3,72
		14	0,26	3,71
Braunkohle	-	4	0,26	0,71
		7	0,25	3,71
		14	0,22	2,39
Erica Podsol, Vogtei	A	4	0,09	2,59
		7	0,54	1,66
		14	2,75	2,68
Erica Podsol, Vogtei	B	4	1,02	1,98
		7	0,40	2,13
		14	0,25	3,22

2.2.4 Ultraviolett(UV)-Spektren

Einen Überblick über die Anwendung der UV-spektrophotometrischen Technik auf dem Gebiet der organischen Strukturanalyse ist von BRAND und SCOTT (6) geliefert worden. ZIECHMANN (109) und KUMADA (56, 58) wandten diese Technik für eingehende Untersuchungen an Huminsäuren an. UV-Spektren dieser Stoffgruppe zeigten jedoch in der Regel einen monotonen Verlauf, indem die Absorption mit abnehmender Wellenlänge stetig ansteigt. Von KUMADA (56) wurde angenommen, daß Anthrachinon als Struktureinheit in den Huminsäuremolekülen vorliegt, doch bedarf diese Vorstellung noch weiterer Untersuchungen.

Die UV-Spektren aller untersuchten Huminsäuren zeigten bis auf minimale Unterschiede den aus anderen Untersuchungen (s.o.) hinlängst bekannten monotonen Verlauf.

2.2.5 Infrarot-Spektren - IR

Im Gegensatz zu den monotonen UV-Spektren liefern die IR-Spektren von Huminsäuren interessante Hinweise auf die Struktur. MORTENSEN und HIMES (74) untersuchten organische Präparate IR-spektrophotometrisch und stellten einige charakterisierende Gruppenfrequenzen fest. Die IR-spektrophotometrischen Untersuchungen an einigen japanischen Huminsäurepräparaten von KUMADA und AIZAWA (58) führten zur Annahme, daß diese Präparate Wasserstoffbrücken betätigende -OH-Gruppen, aromatische und aliphatische -CH-Gruppen, -COOH, C=O und C=C enthielten. Die strukturelle Grundeinheit des Huminsäuremoleküls wurde als eine Einheit aus verschiedenen aromatischen und aliphatischen Verbindungen angesehen, die Phenole, Chinone, Äther und Alkohole enthielt. ZIECHMANN (109) stellte enge genetische Beziehungen zwischen Lignin,

Huminsäure und Torf fest. Er beobachtete, daß die Absorptionsintensität im C=C-Bereich beim Lignin viel höher ist als bei Huminstoffen. Huminsäuren wiesen in diesem Bereich nur eine sehr geringe Absorption mit einer oder zwei Schultern auf. SCHNITZER und Mitarbeiter (87) benutzten verschiedene Methoden für die Huminsäureextraktion aus einem Podsol B-Horizont und stellten anhand der IR-Spektren fest, daß die Spektren der mit verschiedenen Extraktionsmethoden gewonnenen Huminsäure kaum Unterschiede zeigten. Sie nahmen daher an, daß die Extraktionsmittel keine bedeutende Rolle spielen, wenn sie nach der Extraktion leicht entfernt werden können. Die Autoren schlossen auf Grund der IR-Spektren auf die Anwesenheit von Hydroxy- und Carboxylgruppen, konnten jedoch keine Bande für C=O-Gruppen feststellen. In einer Untersuchung über Huminsäure postulierten ORLOV und Mitarbeiter (78), daß die Kernstruktur von Huminsäuren aus höhersubstituierten Benzol- oder Pyridin-Ringen besteht. Ein erheblicher Teil dieser aromatischen Ringe wurde als konjugiert mit C=C oder C=O Verbindungen angesehen. Es wurde angenommen, daß auch die Carboxylgruppen konjugiert waren wie beispielsweise bei Benzol-Carboxylsäuren. CH_2-Brücken oder terminale CH_3-Gruppen sollen eine geringe Rolle spielen.

CEH und HADZI (16), FARMER und MORRISON (30), SCHNITZER und GUPTA (89), WAGNER und STEVENSON (99) und andere lieferten wichtige Ergebnisse über die Natur und die Anordnung der funktionellen Gruppen im Huminsäuremolekül.

Die Hauptabsorptionsbanden der Spektren aller untersuchten Huminsäuren sind sich mit einigen Ausnahmen sehr ähnlich (Abb. 2 bis 9). Die pH 7 Fraktion von Schwarztorf und einige andere Huminsäuren zeigen beispielsweise eine breite Absorptionsbande zwischen 3,0 und 3,6 μ im Gegensatz zu schärferen Absorptionsbanden bei anderen Huminsäuren in diesem Bereich. Die Absorption der Calluna Podsol pH 7 und pH 14 Fraktionen

zeigte zwischen 5,9 und 6,0 μ lediglich eine schwache Schulter. Die ausgeprägtesten Absorptionsbanden traten auf zwischen 3,0 bis 3,1 μ (Wasserstoffbrücken OH), zwischen 3,4 bis 3,6 μ (aliphatische CH-Gruppierung), zwischen 5,9 bis 6,0 μ (Carboxyl-, Chinon- u. Carbonyl-Gruppen) und zwischen 6,2 bis 6,4 μ (aromatische C=C).

2.3 Die chemisch veränderten Huminstoffe

Zur Charakterisierung der peripheren Gruppen des Huminsäuremoleküls wurden die Huminsäureproben aller Fraktionen aus Schwarztorf, Braunkohle und Calluna Podsol (B-Horizont) verschiedenen chemischen Umsetzungen wie Acetylierung, reduktiver Acetylierung, Methylierung und Hydrierung unterworfen.

2.3.1 Acetylierung

Hydroxygruppen enthaltende Verbindungen reagieren mit verschiedenen Reagenzien. Diese Reaktivität ist abhängig von der Stellung der OH-Gruppen im zu acetylierenden Molekül. Da folglich die verschiedenen OH-Gruppen-Verbindungen Unterschiede in ihrer Reaktivität zeigen, existiert keine allgemeine Methode zur Erfassung aller OH-Gruppen in solchen Verbindungen. Die Methoden, die überwiegend für die Bestimmung von Hydroxygruppen angewandt werden, benutzen Acetanhydrid oder Phthalanhydrid. Daneben sind eine Reihe anderer Methoden mit größerer Spezifität angewandt worden.

WRIGHT und SCHNITZER (107) sowie MARTIN und Mitarbeiter (67) verwendeten die Veresterung mit Acetanhydrid in Pyridin bei 90°C zur Bestimmung des Gesamthydroxygehaltes.

DEWALT und GLENN (24) berichteten, daß Acetanhydrid außer mit Alkoholen und Phenolen auch mit primären und sekundären Aminen reagiert. WRIGHT und SCHNITZER (107) wiesen jedoch darauf hin, daß die Menge dieser interferierenden Verbindungen in Huminsäuren unbedeutend ist. Der Hydroxygruppengehalt von Huminsäuren kann bestimmt werden entweder (a) durch Verseifung des Esters nach Acetylierung und Bestimmung der freigesetzten Essigsäure oder (b) durch Bestimmung des nach Veresterung nicht umgesetzten Acetanhydrids im Reaktionsgemisch. MARTIN und Mitarbeiter (67) verglichen beide Methoden und stellten fest, daß die Bestimmung des Hydroxygruppengehaltes durch Titration des nicht reagierten restlichen Acetanhydrid keine zuverlässige Werte liefert.

Die hier angewandte Methode zur Acetylierung der Huminsäurepräparate basiert im wesentlichen auf VOGEL (98) mit den Abänderungen von SCHNITZER und SKINNER (91).

Die acetylierten Huminsäuren wurden zur Bestimmung des Acetylgruppengehaltes (Tab. 7), der Kationenumtauschkapazität (Tab. 8), der spezifischen Wärme (Tab. 9) und zur Aufnahme der IR (Abb. 2 bis 9) und UV-Spektren verwendet.

Tabelle 7: Acetylgruppengehalt der acetylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mg/100 mg Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	16,63	12,91
Calluna Podsol	B	9,32	7,56	2,58
Braunkohle	-	9,46	4,45	6,45

Tabelle 8: Kationenumtauschkapazität der acetylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mval/100 g Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	255,2	192,0
Calluna Podsol	B	239,6	223,9	208,5
Braunkohle	-	245,8	195,9	212,6

Tabelle 9: Spezifische Wärme der acetylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in cal/g. Grad

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	0,131	0,105
Calluna Podsol	B	0,170	0,212	0,125
Braunkohle	-	0,352	0,342	0,265

Bei Schwarztorf-Huminsäure wurde in beiden pH-Fraktionen der höchste Prozentsatz an Acetylgruppen gefunden. In allen Fällen, ausgenommen bei Braunkohle, nimmt der Acetylgruppengehalt von der pH 4 Fraktion zur pH 14 Fraktion ab. Bei Braunkohle-Huminsäure zeigte die pH 7 Fraktion den niedrigsten Gehalt an Acetylgruppen gefolgt von der pH 14 Fraktion und hohen Werten bei der pH 4 Fraktion.

Die KUK-Werte zeigen bei allen acetylierten Huminsäuren eine progressive Abnahme von der pH 4 Fraktion zur pH 14 Fraktion.

Die c_p-Werte lassen eine Abnahmetendenz mit zunehmendem pH der Fraktionsstufen erkennen mit Ausnahme von Calluna Podsol, wo die c_p der pH 7 Fraktion höher ist als die der beiden anderen Fraktionen.

Die IR-Spektren der acetylierten Produkte gleichen im wesentlichen den Spektren der Originalhuminsäuren mit Ausnahme einer neuen Bande bei 7,5 μ ($C-CH_3$) und einer Betonung der breiten Bande im Bereich von 8,5 μ. Die neue breite Bande bei 9,8 μ ist vermutlich auf S=O Gruppen zurückzuführen, die bei der Acetylierung in Anwesenheit von konz. H_2SO_4 in die Huminsäuren eingebaut worden sind.

Die UV-Spektren der acetylierten Huminsäuren lassen keine Unterschiede gegenüber den Spektren der Originalhuminsäuren erkennen.

2.3.2 Reduktive Acetylierung

Nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse über den chemischen Aufbau von Huminsäuren scheint ein bedeutender Teil des gesamten Sauerstoffs in den Huminsäuren als Carbonyl- und/oder Chinongruppen vorzuliegen. FLAIG et al. (33) bestimmten das Molekulargewicht einer Bodenhuminsäure und ermittelten 2,7% C=O oder eine C=O Gruppe pro Molekulargewicht. SCHNITZER und GUPTA (89) fanden in Huminsäuren aus grauem Waldboden zwischen 5,0 und 5,3% C=O, während der C=O-Gehalt der Fulvosäure aus dem gleichen Boden zwischen 4,8 und 8,4% schwankte. SCHNITZER und SKINNER (92) fanden in IR-Spektren von Huminsäuren nach reduktiver Acetylierung keine Hinweise für das Vorhandensein von Chinongruppen.

Zur reduktiven Acetylierung wurde die von SCHNITZER und SKINNER (92) angewandte Methode verwendet. Die reduktiv acetylierten Huminsäurepräparate wurden zur Bestimmung des Acetylgruppengehaltes (Tab. 10), der KUK (Tab. 11) und der c_p (Tab. 12) verwendet. Außerdem wurden die IR- (Abb. 2 bis 9) und UV-Spektren aufgenommen.

Tabelle 10: Acetylgruppengehalt der reduktiv acetylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mg/100 mg Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	23,66	21,80
Calluna Podsol	B	13,19	11,33	5,59
Braunkohle	-	9,46	9,61	8,75

Tabelle 11: Kationenumtauschkapazität der reduktiv acetylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mval/100 g Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	132,2	112,4
Calluna Podsol	B	150,3	143,9	71,0
Braunkohle	-	184,0	145,8	171,0

Tabelle 12: Spezifische Wärme der reduktiv acetylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in cal/g.Grad

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	0,148	0,148
Calluna Podsol	B	0,146	0,119	0,134
Braunkohle	-	0,207	0,134	0,189

Der Gehalt an Acetylgruppen nimmt nach reduktiver Acetylierung der Huminsäuren im allgemeinen von den Fraktionen pH 4 nach pH 14 ab, lediglich bei Braunkohle-Huminsäure wurde der höchste Gehalt an Acetylgruppen in der pH 7 Fraktion gefunden.

Die KUK nimmt bei Schwarztorf- und Calluna Podsol-Huminsäuren von den Fraktionen pH 4 nach pH 14 ab, während sie bei Braunkohle von pH 4 nach pH 7 abnimmt und bei der pH 14 Fraktion wieder höher liegt, aber nicht den Wert der pH 4 Fraktion erreicht.

Die c_p der beiden Schwarztorf-Huminsäurefraktionen sind gleich. Bei Calluna Podsol und Braunkohle haben die pH 7 Fraktionen die niedrigsten c_p-Werte.

Die IR-Spektren aller reduktiv acetylierten Huminsäuren zeigen gegenüber den Spektren der acetylierten Huminsäuren eine Verstärkung der Absorption bei 7,5 μ, 8,5 μ und 9,8 μ.

2.3.3 Methylierung

Diazomethan und Dimethylsulfat sind für Untersuchungen über die funktionellen Gruppen in den organischen Substanzen des Bodens verwendet worden. Diazomethan reagiert mit Sauerstofffunktionen; es werden folglich Carboxylgruppen, phenolische Hydroxyle, einige Keto-Enol-Gruppierungen an N-gebundenem Wasserstoff in Nachbarschaft zu Carboxylgruppen, sowie Säurefunktionen benachbarter Alkoholgruppen erfaßt. Dimethylsulfat reagiert mit allen eben genannten Gruppen außer mit Carboxylgruppen, jedoch im Gegensatz zu Diazomethan auch mit schwächeren Säuregruppierungen.

BROADBENT und BRADFORD (14) beobachteten bei Methylierungsversuchen, daß mehr als 50% der Austauschkapazität der gesamten organischen Substanzen des Bodens von Carboxylgruppen getragen wurde. Bei einem Vergleich beider Methylierungsmethoden erhielten sie bessere Ergebnisse mit Diazomethan. SCHNITZER und SKINNER (88, 91) fanden, daß die Methylierung der aktiven Säuregruppen die Metallaufnahme beträchtlich reduziert. WAGNER und STEVENSON (99) schlossen aus dem IR-Spektrum einer mit Diazomethan methylierten Huminsäure, daß nur ein Teil der phenolischen Hydroxygruppen methyliert wurde.

In den eigenen Untersuchungen wurde die Methylierung der Huminsäuren mit Diazomethan durchgeführt. Von den methylierten Huminsäuren wurden die KUK (Tab. 13) und c_p (Tab. 14) bestimmt sowie die IR- (Abb. 2 bis 9) und UV-Spektren aufgenommen.

Die KUK nimmt in allen Fällen von den pH 4 Fraktionen nach den pH 14 Fraktionen ab. Die Methylierung der pH 14 Fraktion von Calluna Podsol war wegen der schlechten Löslichkeit in Methanol nicht möglich.

Tabelle 13: Kationenumtauschkapazität der methylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mval/100 g Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	100,1	98,3
Calluna Podsol	B	183,2	82,3	-
Braunkohle	-	111,3	77,5	69,3

Tabelle 14: Spezifische Wärme der methylierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in cal/g. Grad

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	0,167	0,174
Calluna Podsol	B	0,253	0,157	-
Braunkohle	-	0,189	0,181	0,180

Die c_p-Werte für Calluna Podsol und Braunkohle wiesen die gleiche Tendenz wie die KUK-Werte auf. Im Falle der methylierten Schwarztorf-Huminsäuren war jedoch die c_p der pH 7 Fraktion kleiner als die der pH 14 Fraktion.

Die IR-Spektren zeigten eine Abnahme der Intensität der OH-Bande bei 3,0 µ, eine Zunahme der aliphatischen Absorption bei 3,5 µ und 7,0 µ. In der pH 7 Fraktion von Schwarztorf und der pH 14 Fraktion bei Braunkohle trat eine stär-

kere C=C-Absorption auf; in den anderen Fraktionen aller Huminsäuren war die C=O-Absorption verstärkt. Alle methylierten Huminsäuren zeigten eine ausgeprägte Bande zwischen 8,0 μ und 8,3 μ.

2.3.4 Hydrierung

Die Methode der Hydrierung unter Druck ist häufig in Abbauuntersuchungen an Ligninen angewandt worden. Folgende Reaktionen sind bei der Hydrierung möglich: (a) Hydrolyse, wobei Ätherbrücken und Sauerstoff enthaltene Ringe gesprengt werden; (b) Thermaler Abbau, wobei C-C-Bindungen unter Bildung von Radikalen gespalten werden; (c) Reduktion, wobei Carbonylgruppen zu stabilen Hydroxygruppen umgewandelt werden oder Sauerstoff vollständig eliminiert wird; (d) Hydrierung, wobei Doppelbindungen und Radikale mit Wasserstoff abgesättigt werden. BRAUNS (7), VAN KREVELEN (97), HARRIS et al. (42), COOKE et al. (20) und andere verwendeten die Hydrierung und Hydrogenolyse in Untersuchungen über die Struktur des Lignins. Verhältnismäßig wenig Anwendung hat diese Methode bei Strukturuntersuchungen an Huminsäuren gefunden. GOTTLIEB und HENDRICKS (39) hydrierten einige organische Stoffpräparate aus Boden bei einem H_2-Druck von 3,000 lb./inch^2 und einer Reaktionstemperatur von 260°C unter Verwendung von Cu-chromit als Katalysator. In einem Versuch erhielten die Autoren ein farbloses Öl, das als ein Gemisch von gesättigten aromatischen Alkoholen angesehen wurde. KUKHARENKO und SAVE'EV (54, 55) führten diese Methode an Huminsäurepräparaten in Dioxan und mit Ni-Katalysator durch. Sie erhielten flüchtige und nichtflüchtige Carbonsäuren, Phenole und neutrale Verbindungen. FELBECK (31) schloß aus Befunden nach Hochdruckhydrierung von organischen Bodenfraktionen, daß mindestens eine C=C-Bindung pro 4 C-Atome in der nicht hydrolysierbaren organischen

Fraktion enthalten war. Über eine Anwendung der Hydrierung unter Druck bei Raumtemperatur liegen keine Angaben in der Literatur vor.

In den eigenen Untersuchungen wurde die Sättigung von Kohlenstoff-Doppelbindungen (C=C) mittels katalytischer Hydrierung unter Verwendung von Palladium (37) bei Raumtemperatur und normalem Druck durchgeführt. Die von den verschiedenen Huminsäurepräparaten aufgenommenen Mengen an Wasserstoff (mg H_2/100 mg Huminsäure) sind in Tab. 15 zusammengestellt. Die KUK- und c_p-Werte der hydrierten Huminsäuren sind aus den Tabellen 16 und 17 ersichtlich.

Tabelle 15: Aufgenommene Wasserstoffmengen während der Hydrierung von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mg/100 mg Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	0,32	0,27
Calluna Podsol	B	0,47	0,88	1,01
Braunkohle	-	0,35	0,40	0,42

Bei Braunkohle- und Podsol-Huminsäure nimmt der H_2-Verbrauch und folglich die Hydrierbarkeit mit steigendem pH-Wert der Fraktionen zu, während bei Schwarztorf die H_2-Aufnahme der pH 14 Fraktion etwas niedriger ist als die der pH 7 Fraktion. Die KUK-Werte von Schwarztorf und Podsol sinken in der Reihenfolge der pH-Fraktionen von 4 zu 14 ab, Braunkohle hingegen zeigt in dieser Folge eine schwache

Tabelle 16: Kationenumtauschkapazität der hydrierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in mval/100 g Huminsäure

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	104,8	46,8
Calluna Podsol	B	47,0	41,1	33,2
Braunkohle	-	106,5	109,4	110,9

Tabelle 17: Spezifische Wärme der hydrierten Produkte von verschiedenen Fraktionen der Huminsäuren in cal/g. Grad

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH		
		4	7	14
Schwarztorf	-	-	0,210	0,203
Calluna Podsol	B	0,235	0,223	0,156
Braunkohle	-	0,217	0,152	0,170

Zunahme. Entsprechend verhalten sich die c_p-Werte der beiden erstgenannten Huminsäuren, während bei Braunkohle der c_p-Wert der pH 14 Fraktion gering höher liegt als der der pH 7 Fraktion.

Die IR-Spektren der hydrierten Huminsäuren gleichen im Wesentlichen denen der Originalhuminsäuren bis auf eine breite Bande bei 7,2 μ bis 7,3 μ und einer Verstärkung der Carbonylgruppen-Absorption.

3. Theoretischer Teil

Eine so heterogene Stoffgruppe wie die der Huminstoffe wird auch bei ihrer systematischen und exakten Untersuchung nicht ohne weiteres eindeutige Zusammenhänge bei der Interpretation ihrer Ergebnisse erkennen lassen. Und in der Tat war auch an Meßergebnissen auf dem Gebiet ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften bisher viel weniger bekannt als z.B. auf dem benachbarter Naturstoffe wie der Lignine und Kohlen. Daher mußte eine Aufgabe dieser Studie vor allem darin gesehen werden, überhaupt Material zu diesem Fragenkomplex herbeizuschaffen, um sodann zu prüfen, ob irgendwelche erklärbaren Beziehungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Meßverfahren bestehen (vgl. Problemstellung, S.7).

Der Weg hierzu ist bereits im einleitenden Teil dargelegt: es werden eine Reihe von physikalisch-chemischen Untersuchungen zunächst an unveränderten, sodann an den gleichen, nun chemisch modifizierten Huminstoffen durchgeführt. Entsprechend diesem Vorgehen soll auch eine Interpretation der Ergebnisse versucht werden.

Zwischen den UV-Spektren der Originalpräparate und der acetylierten, reduktiv acetylierten, methylierten sowie hydrierten treten keine prinzipiellen, gelegentlich nur graduelle Abweichungen auf.

Dieser Befund besagt, daß für den typisch monotonen Verlauf der Spektren von Huminstoffen in diesem Spektralbereich eine zwar nicht große Anzahl, aber sicher gleichberechtigte funktionelle Gruppen in Betracht kommt: würde z.B. die C=O-Gruppe als Chromophor überwiegen, dann wäre einmal das Spektrum durch bestimmte Maxima ausgezeichnet, zum anderen würden chemische Modifizierungen (redukt. Acetylierung, Hydrierung) auch eine drastische Veränderung des Spektrums nach sich ziehen.

Die Acetylierung führt ganz deutlich zu einer Vereinheitlichung der bei verschiedenen pH-Werten gewonnenen Huminstoffe: Es bestehen kaum noch Unterschiede ihrer UV-Spektren. Das besagt, daß die an sich geringe Differenzierung der Huminstoff-Spektren vor allem auf (phenolische) Hydroxygruppen zurückgeführt werden kann.

Andererseits ist bemerkenswert, daß bei einem recht hohen Gehalt an Acetylgruppen bei Schwarztorf-Huminstoffen (16, 63 und 12,91%) nur unwesentliche Veränderungen der Spektren eintreten. Dieser Befund ist nur so zu deuten, daß mit einer großen Anzahl von zwar ähnlichen aber doch abweichenden Strukturelementen auch eine Unzahl von Elektronenanregungszuständen gegeben ist und daher kaum ein dominierendes Maximum oder Minimum zu erwarten sein wird.

Immerhin läßt sich besonders bei dem aus Calluna-Podsol (pH 14) gewonnenen Huminstoff bei 245-250 mμ eine deutliche Maximumandeutung erkennen, die auf die neueingeführten Carbonylgruppen zurückzuführen ist:

$$-OH \xrightarrow{\text{Acetanhydrid}} -O-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_3$$

Gleichzeitig ergibt sich die für Huminstoffe offensichtlich wichtige Feststellung, daß nicht der absolute Gehalt an funktionellen Gruppen ausschlaggebend zu sein braucht, als vielmehr ihr Verhältnis zueinander.

Im Allgemeinen kann man bezüglich der bei verschiedenen pH-Werten gewonnenen Huminstoffe folgende Beobachtung treffen: Mit steigendem pH-Wert wird das Spektrum der Originalsubstanzen undifferenzierter, jedoch das der chemisch modifizierten stärker verändert. Es folgt daraus, daß mit steigendem pH-Wert auch zunehmend undifferenzierte Huminstoffe gewonnen werden, also solche, die entweder über weniger funktionelle Gruppen und damit auch über weniger Chromo-

phore verfügen, oder bei denen ihr Verhältnis ein ausgeglichenes ist. Veränderungen bei diesen Präparaten werden aber am nachhaltigsten ihr Spektrum beeinflussen.

Für Huminstoffe gilt also: Der für diese Stoffgruppe charakteristische monotone Verlauf ihrer UV-Spektren hat verschiedene Gründe:

1) Es liegt ein bestimmter Dispersitätsgrad vor (konservative Absorption - SEIDEL, 1966),
2) es sind wenig chromophore oder auxochrome Gruppen vorhanden oder
3) es besteht bei einem höheren Gehalt an diesen Gruppen ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen ihnen.

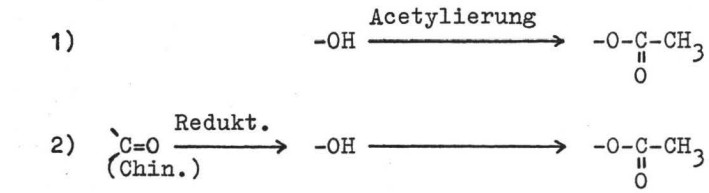
Die beiden letzten Fälle einer konsumptiven Absorption (Elektronenanregung) betreffen die chemische Struktur der Huminstoffe und sind durch das eingangs geschilderte Vorgehen zu unterscheiden. Denn z.B. ein geringer Gehalt an phenolischen Hydroxygruppen wird nach ihrer Methylierung natürlich auch keine drastische Veränderung des Spektrums zur Folge haben. Wohl aber wird dies bei einem ausgeglichenen Verhältnis aber insgesamt höherem Gehalt, z.B. für Carbonylgruppen gelten, wenn diese Chromophoren eliminiert werden (obiges Beispiel).

Die Infrarot-Spektren lassen bei nahezu allen Originalpräparaten eine sehr deutliche Ausprägung der OH-Bande bei $\sim 3\ \mu$ als Indiz für Assoziationserscheinungen erkennen. Ein Vergleich mit analogen Huminstoffen, die anderen Gewinnungsverfahren unterworfen worden sind, läßt den Schluß zu, daß in vielen Fällen eine während der Präparation erfolgte Veränderung in erster Linie die Assoziationsfähigkeit der OH-Gruppen beeinträchtigt. Im Übrigen haben die Spektren wenig Banden und wie üblich bei Huminstoffen eine beträchtliche Untergrundabsorption.

Sämtliche, auf S. 9-34 dargestellten Veränderungen der Huminstoffe haben eine weniger aufgeweitete OH-Bande bei

3 μ zur Folge. Verstärkt wird die CH-Valenzschwingungsbande bei ~ 3,4 μ. Doch dürfte dies nur scheinbar sein, da hier die Aufweitung der benachbarten OH-Bande gegenüber den Originalpräparaten zurückgeht.

Die stärkste Veränderung des Spektrums der veränderten Huminstoffe ist im Gebiet der Doppelbindungen um 6 μ zu beobachten. Bemerkenswert ist das Hervortreten der Esterbande bei 5,82 μ bei den beiden acetylierten Präparaten. Im Falle der reduzierten Acetylierung verschwindet nahezu vollständig die Bande bei 6 μ, die damit offensichtlich als eine Chinonbande angesprochen werden kann:



Auch die stärkere Intensität der Bande bei 5,82 μ für den Fall (2) stimmt mit dieser Deutung überein. Abgesehen von dem beim pH-Wert 7 gewonnenen Braunkohlenpräparat konnte diese Beobachtung bei allen Huminstoffen gemacht werden.

Die Methylierung hebt naturgemäß die Assoziation der OH-Banden auf. Neue Banden treten bei ~ 8 und ~ 9,2 μ hinzu. Ganz offensichtlich handelt es sich um Ätherbrücken, die im Falle der aromatischen Äther bei niedrigeren, bei aliphatischen bei höheren Wellenlängen liegen:

Damit läßt sich die bei Huminstoffen bislang ungeklärte Frage folgendermaßen entscheiden: bei 8,0 - 8,3 μ liegt die Absorption der Äthergruppen. Dieser Befund ist insofern von einiger Bedeutung, als sich darauf eine Analyse der Biogenese der Huminstoffe von den Ligninen aufbauen läßt (Methoxylgruppen).

Die Hydrierung verändert sowohl C=O- als auch C=C-Banden um 6 μ und zwar unterschiedlich. Es ist daraus der Schluß herzuleiten, daß eine solche Behandlung der Huminstoffe keinesfalls eine überall gleiche Wirkung hervorruft, sondern offensichtlich von der Struktur abhängige Veränderung mit sich bringt. Eine weitere vertiefte Diskussion der IR-Spektren soll aber erst erfolgen, wenn eine Interpretation der physikalischen Eigenschaften der Original- und modifizierten Präparate vorliegt.

Die für Huminstoffe recht informative Kationenumtauschkapazität liegt in dem für diese Stoffe zu erwartenden Bereich von 200-320 mval/100 g Huminstoff, also weitaus höher als für anorganische Stoffe im Boden.

Die Acetylierung, reduktive Acetylierung, die Methylierung und die Hydrierung haben in der Regel eine Verminderung der Kationenumtauschkapazität zur Folge (Tab. 18).

Die einfache Zusammenfassung solcher Werte für Huminstoffe verschiedenster Herkunft vermag an sich wenig über den Mechanismus dieses Vorganges auszusagen. Daher wurden hier, wie einleitend dargestellt, dieses wie auch andere Verfahren mit jeweils veränderten funktionellen Gruppen durchgeführt.

Nun lassen sich sogleich zwei Schlüsse ziehen:

1. Die Kationenumtauschkapazität der Huminstoffe geht offensichtlich auf ihre funktionellen Gruppen zurück. (Es wäre evtl. im Gegensatz hierzu noch an π-Komplexe zu denken.)

Tabelle 18: Die prozentuale Abnahme der Kationenumtauschkapazität bei chemischer Veränderung der Huminsäure

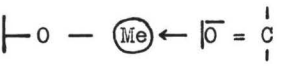
Huminsäuren	Acetylierung	reduz. Acetylierung	Methylierung	Hydrierung
Schwarztorf				
pH 4	-	-	-	-
7	7,0	52	63	62
14	7,0	47	53	78
Calluna Podsol				
pH 4	2,5	39	25	82
7	2,5	38	64	83
14	3,1	67	-	85
Braunkohle				
pH 4	6,1	29	57	59
7	9,0	32	64	48
14	6,2	24	68	51

2. Eine Deutung der in Tab. 18 zusammengestellten prozentualen Abnahme der Kationenumtauschkapazität nach verschiedenen chemischen Veränderungen ist nicht mit den bisherigen Annahmen vereinbar, wonach Carboxyl- und Hydroxygruppen ausschließlich diesen Vorgang bestimmen.

Denn wäre dies der Fall, dann müßten bereits nach einer Acetylierung die Kationenumtauschkapazitäten beträchtlich zurückgehen. Aber im Gegenteil, hier liegen die geringsten Abnahmen mit stets unter 10%. Es ist also anzunehmen, daß noch andere als die genannten funktionellen Gruppen hier in Betracht zu ziehen sind, etwa solche, die aufgrund freier

Elektronenpaare koordinative Bindungen mit Metallen einzugehen vermögen. In Betracht kommen vor allem die bei Huminstoffen bereits nachgewiesenen Carbonylgruppen. Unterstellt man dies, dann wird auch verständlich, weswegen allein die Hydrierung einen Abfall der Kationenumtauschkapazität um mehr als 50%, bei den Calluna-Podsol-Huminstoffen sogar mehr als 80% bewirken kann.

Offensichtlich gehört die Carbonylgruppe der Huminstoffe zu einem, Eigenschaften und reaktives Verhalten bestimmenden Strukturteil. Die Bindung eines Metalles (Me) dürfte sich dann folgendermaßen vollziehen:



Natürlich lassen sich auf dieser Grundlage keine stöchiometrischen Beziehungen und damit auch keine exakte Interpretation der in Tab. 18 aufgeführten Ergebnisse herleiten, denn aus sterischen Gründen ist sicher nicht jede Carbonylgruppe als gleich wirksam anzusehen.

Liegt aber ein solcher Mechanismus bei Huminstoffen vor, dann muß sich auch ein Hinweis darauf aus den Stabilitätskonstanten ergeben.

Neben der zu erwartenden Zunahme der relativen Stabilitätskonstanten mit steigendem pH-Wert, fällt besonders der hohe Wert für Zink-Komplexe bei den Calluna-Podsol-Huminstoffen auf. Es geht dieser Befund also völlig konform mit den aus den Messungen der Kationenumtauschkapazität herzuleitenden. Augenfällig ist dieser Zusammenhang auch für Eisenkomplexe gültig. Es ist nun interessant, die Austauschqualitäten der Huminstoffe nach diesen Befunden mit denen anderer Sorptionsträger im Boden zu vergleichen. Es gilt z.B. für Aminosäuren und Polypeptide folgende Reihenfolge zunehmender Stabilität:

Cu > Ni > Zn > Co > Cd > Fe > Mn > Mg

An erster Stelle rangiert Kupfer. Wie aber aus Tab. 19 ersichtlich, ist Kupfer gegenüber Zink und Eisen in den meisten Fällen nicht an erster Stelle zu finden. Damit zeigt sich ein besonderes, offenbar spezifisches - weil von Huminstoff zu Huminstoff wechselnd und vom Präparationsgang abhängig - Sorptionsverhalten dieser Naturstoffgruppe.

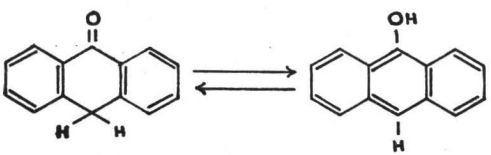
Dieses Verhalten der Huminstoffe dürfte für physiologische Effekte von einiger Bedeutung sein. So wird sicher eine unterschiedliche Beeinflussung zinkhaltiger Fermente durch Huminstoffe unter Zugrundelegung derartiger Effekte zu diskutieren sein. Auch für die Behebung von Zinkschäden könnten Huminstoffe von Bedeutung sein.

Bemerkenswert ist wieder, daß durchaus kein gleichartiges Verhalten der einzelnen Huminstoff-Fraktionen vorliegt, woraus offenbar eine ausgeprägte Spezifität der Huminstoffe hinsichtlich ihrer Intensität, Komplexe zu bilden, resultiert.

Auffallend ist immer wieder die starke Veränderung der Huminstoffe durch ihre Hydrierung bzw. Methylierung.

Besonders die Leitfähigkeitstitrationen beweisen diesen Effekt. In jedem Falle konnte hier gezeigt werden, daß eine Hydrierung auch eine Aciditätsminderung der Huminstoffe herbeiführt (die ja eigentlich nicht zu erwarten wäre).

Nun ließe sich ein solcher Fall von einer Keto-Enol-Tautomerie herleiten. Das heißt, es muß der saure Charakter der Huminstoffe in nicht unerheblichem Maße von Carbonylgruppen herrühren, die als Protonenakzeptoren fungieren und in dieser Eigenschaft durch eine katalytische Hydrierung ausgeschaltet werden. Ein entsprechendes Beispiel wäre hier:



Anthron Anthranol

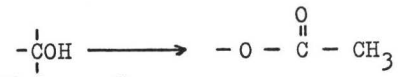
Tabelle 19: Die Abnahme der relativen Stabilitätskonstanten von Me-Huminstoff-Komplexen

Huminsäuren	Horizont	Extrahiert bei pH	Abnahme der relativen Stabilitätskonstanten, gemessen bei pH 3,5	pH 7,0
Schwarztorf	-	-	-	-
		7	Zn → Fe → Cu	Zn → Cu → Fe
		14	Fe → Zn → Cu	Fe → Cu → Zn
Braunkohle	-	4	Zn → Cu → Fe	Cu → Fe → Zn
		7	Zn → Fe → Cu	Fe → Cu → Zn
		14	Zn → Fe → Cu	Fe → Cu → Zn
Calluna Podsol	B	4	Fe → Zn → Cu	Fe → Zn → Cu
		7	Fe → Cu → Zn	Fe → Zn → Cu
		14	Fe → Zn → Cu	Fe → Zn → Cu
Erica Podsol	A	4	Zn → Cu → Fe	Fe → Cu → Zn
		7	Fe → Cu → Zn	Fe → Cu → Zn
		14	Fe → Cu → Zn	Fe → Cu → Zn
Erica Podsol	B	4	Fe → Cu → Zn	Fe → Cu → Zn
		7	Fe → Zn → Cu	Fe → Zn → Cu
		14	Cu → Fe → Zn	Fe → Zn → Cu

Zwar ist das Anthron (in der Ketoform) die stabilere Verbindung, aber in der Hitze erfolgt in Gegenwart von Alkali die Umlagerung zur Phenolform. Im Übrigen wird aus dem Anthron verhältnismäßig leicht mit Essigsäureanhydrid in Pyridin das Acetat gewonnen.

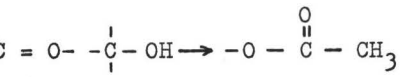
Für unser Problem bedeutet dies: Die bei manchen Huminstoffen verhältnismäßig geringe Differenz zwischen dem Acetylgehalt der einfachen (1) und der reduktiven Acetylierung (2):

einf. Acetylierung



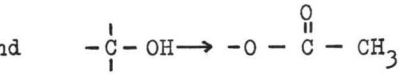
(1)

redukt. Acetylierung



(2)

und



darf keinesfalls als repräsentativ für den Gehalt an Carbonylgruppen gewertet werden, da diese offensichtlich auch (als Enol-Gruppen) bei dieser Umsetzung reagieren.

Nun ist auch der offensichtliche Widerspruch zu klären, der zwischen diesen Meßwerten auftritt. So z.B. ist bei der Calluna Huminsäure (pH 14) die geringste Differenz beider Acetylgehalte, aber die höchste Wasserstoffaufnahme. Zu bemerken ist hier, daß die Grundstruktur der Huminstoffe offensichtlich wenig durch die Hydrierung verändert worden ist, was bedeuten dürfte, daß die vorstehend aufgeführten Möglichkeiten einer Strukturveränderung bei Huminstoffen nicht relevant sind. Dafür spricht im Übrigen auch der vorstehend diskutierte Abfall der Kationenumtauschkapazität (um 80%) nach einer Hydrierung.

Die relativen spezifischen Wärmen von Huminstoffen wurden erstmals von LENTZ und ZIECHMANN (110) vermessen. Sie sind für diese Stoffe eine charakteristische Größe und offensichtlich ein Maß für den Verlauf von Humifizierungsvorgängen, d.h. für das relative Alter der Huminstoffe mit:

$$\Delta H = \int_{80}^{293} c_p . dt \qquad \underline{\text{def}} \qquad \widetilde{c_p} . 213$$

und $$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{c_p}{T} . dt$$

stellt sie eine Verbindung zur Entropie (ΔS) her.
Ein Fortschreiten der Humifizierung äußert sich als Abnahme von c_p.

Allerdings - und dies zeigen die vorliegenden Ergebnisse mit Deutlichkeit - dürfen nur Huminstoffe eines Typs, im vorliegenden Falle nur e i n e s Vorkommens verglichen werden. Es wird weiteren Experimenten überlassen sein, wie weit hier eine Verallgemeinerung vorgenommen werden kann.

Innerhalb des Extraktionsganges wie des Profils treten Schwankungen auf. Dies bedeutet zunächst, daß keinerlei Generalisierung über den Bildungsort der Huminstoffe im Bodenprofil erfolgen kann. Wie nicht anders zu erwarten, werden in der Regel bei den niedrigen pH-Wertstufen der Gewinnung die Huminsäurevorstufen, dann erst die chemisch weniger reaktiven Huminsäuren anfallen.

Abhängigkeiten dieser Größe von der chemischen Veränderung der Huminstoffe sind recht kompliziert.

Bei allen Präparaten nimmt die spezifische Wärme nach ihrer Hydrierung zu, die Kationenumtauschkapazität aber erheblich ab (Tab. 18). Der letztere Befund spricht, wie bereits erörtert, für einen Verlust an hierfür in Betracht kommenden funktionellen Gruppen. Dies geht im Übrigen auch aus dem Vergleich der Leitfähigkeiten hervor. Es ist also ein Zusammenhang zwischen dem Bestand an funktionellen

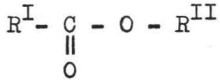
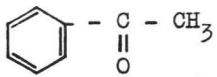
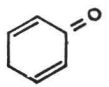
Gruppen und dieser thermodynamischen Größe nicht gegeben bzw. vorerst noch nicht ersichtlich. Da sich aber diese Feststellungen für die Hydrierung (Leitfähigkeitstitrationen, Spektren) und für die c_p-Werte a l l e r untersuchten Substanzen eindeutig ergeben, müßte dies auch ein wesentlicher Befund für diese Naturstoffe sein. Damit ist hier ganz offensichtlich ein Bezug zu der oben erwähnten Entropie gegeben. Mit der Zunahme der spezifischen Wärme erfolgt auch eine solche der Entropie. Diese Feststellung wäre verhältnismäßig allgemein und unverbindlich, wenn im IR-Spektrum nach einer Hydrierung nicht eine Zunahme an Wasserstoffbrücken ersichtlich wäre. Nun ist offenbar der Schluß berechtigt, daß durch diese zwischenmolekulare Beziehung ein Moment der Unordnung in das System der Huminstoffe eingebracht wird. Dies ist aber nur so zu verstehen, daß äußere Wasserstoffbrücken bei Huminstoffen keine dauerhafte Bindungsform darstellen, sondern einem gewissen Wechsel unterliegen müssen, wodurch sich nicht zuletzt eine milieu- und zeitabhängige Bearbeitung in vielen Fällen so überaus unerfreulich gestaltet.

Die chemische Veränderung der Huminstoffe natürlicher Böden und die Analyse ihrer physikalischen Eigenschaften führt uns wieder zu den eingangs erörterten IR-Spektren zurück, denn nun sollte es auch gelingen, einige wesentliche Merkmale aus diesen herauszulösen, vor allem aber einige bislang strittige Banden nun eindeutig zuzuordnen (108).

Neben einer Bestätigung der bislang als allgemein verbindlich angenommenen Banden konnten, wie aus Tab. 20 ersichtlich, einige neu erkannt werden.

Mit diesem Ansatz konnten also einige bislang nicht genau zu lokalisierende Banden und damit einige wesentliche Strukturelemente der Huminstoffe erkannt werden.

Tabelle 20: Zuordnung von funktionellen Gruppen in IR-Spektren

Position	Zuordnung	Beweis	Bemerkung
5,82 µ ; 1720 cm^{-1}	Estergruppe 	Acetylierung	
8,3 µ ; 1205 cm^{-1}	Phenol.Acetat 	Acetylierung mit Acetanhydrid	
5,91 µ ; 1680 cm^{-1}	Chinon-Carbonyl 	redukt.Acetylierung, Hydrierung (Schwarztorf!)	bei Benzochinon 1664 cm^{-1}, bei Huminstoffen also eine Verschiebung, bislang bei diesen umstritten.

Fortsetzung Tabelle 20

Position	Zuordnung	Beweis	Bemerkung
~6,0 µ ; 1670 cm^{-1}	C = C	redukt.Acetylierung	
6,25 µ ; 1600 cm^{-1}	C = C	Hydrierung	möglicherweise konj. Doppelbindung. (bislang umstritten)
8,1 µ ; 1235 cm^{-1}	Ätherbrücke bes.	Methylierung	(bislang umstritten) bei Ligninen: 1260 cm^{-1}, daher möglicherweise ein Maß für die Überführung von Ligninen ⟶ Huminstoffen
7,0 µ ; 1430 cm^{-1}	C = CH_3 Deformat.	Methylierung	

4. Zusammenfassung

Es wurde versucht zu zeigen, daß Huminstoffe nur dann physikalisch-chemisch sinnvoll zu untersuchen sind, wenn vorher auch ihre kontrollierte chemische Veränderung erfolgt.

Ein Vergleich konnte sich nun auf folgende Präparate erstrecken:

1) Original-Huminstoffe,
2) acetylierte,
3) reduktiv acetylierte,
4) methylierte und
5) hydrierte Huminstoffe.

Die physikalisch-chemischen Untersuchungen bezogen sich auf:

1) Die Bestimmung der Kationenumtauschkapazität und Leitfähigkeitstitration.
2) Die Bestimmung der relativen spezifischen Wärmen.
3) Die Bestimmung der Stabilitätskonstanten für Zn^{++}-, Cu^{++}- und Fe^{++}-Komplexe.
4) UV-Spektren.
5) IR-Spektren.

Ergebnisse:

1. Die Kationenumtauschkapazität ist auf funktionelle Gruppen, vornehmlich Carboxyl- und Hydroxygruppen zurückzuführen. Hinzu treten koordinative Bindungen zwischen Carbonyl und Metall. Andere Effekte sind offensichtlich auszuschließen.
2. Es wird erneut die Bedeutung der Huminstoffe für die Festlegung von Schwermetallen im Boden deutlich. Es werden vornehmlich Zink und Eisen, weniger Kupfer gebunden. Den einzelnen Fraktionen kommt eine pH-Wert-abhängige Selektivität zu.

3. Die relativen spezifischen Wärmen lassen eine hinreichend genaue Beschreibung des Humifizierungsgrades zu (Altersbestimmung der Huminstoffe). Bildung und Bewegung der Huminstoffe im Profil lassen sich auf dieser Basis interpretieren.

4. Leitfähigkeitstitrationen, Acetylierungen und Spektren lassen auf eine Keto-Enol-Tautomerie bei Huminstoffen schließen.

5. Aufgrund des vorstehend erläuterten experimentellen Ansatzes kann eine erweiterte Zuordnung charakteristischer Banden im infraroten Spektralbereich erfolgen.

5. Anhang

5.1 Arbeitsvorschriften

5.1.1 Kationenumtauschkapazität

Nach FIEDLER (32) wurden die Huminsäureproben in 0,1 N NaOH gelöst und über Nacht bis zum vollständigen Lösen stehengelassen. Nach Zugabe von 1 ml konz. HCl wurden die gefällten Huminsäuren abzentrifugiert und auf der Zentrifuge einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Huminsäure-Gel wurde in aufgekochtem dest. Wasser aufgeschwemmt und unter magnetischer Rührung und langsamem Durchleiten von N_2-Gas mit carbonatfreier $Ba(OH)_2$-Lösung titriert. Während des Neutralisationsvorganges der Huminsäuren bleibt die Leitfähigkeit auf Grund der Bildung von unlöslichem Bariumhumat konstant. Die Leitfähigkeitsmeßwerte wurden gegen den Verbrauch an ml $Ba(OH)_2$-Lösung aufgetragen und die Kurve zur genauen Ermittlung der für die Neutralisation der Huminsäure verbrauchten $Ba(OH)_2$-Menge ausgewertet. Die KUK der Huminsäuren wurden wie folgt berechnet:

$$KUK = \frac{\text{ml } 0{,}1 \text{ N } Ba(OH)_2 \cdot (100 + G_w\%) \cdot 2 \cdot 10}{G \cdot G_v\%}$$

Es bedeuten:

G_w = Wassergehalt
G_v = Glühverlust
G = Gewicht der aschefreien Probe

5.1.2 Spezifische Wärme, c_p

Die Bestimmung der c_p geschah wie folgt: Ein Verdampfungskalorimeter wurde mit flüssigem Stickstoff gefüllt und in

ein ebenfalls mit flüssigem Stickstoff angefülltes Thermosgefäß gesetzt, so daß die Temperatur in Verdampfungskalorimeter konstant bei -196°C gehalten werden konnte. Eine Huminsäureprobenmenge von etwa 15-20 mg wurde in einem sehr kleinen Glasbehälter eingewogen und dieser in den oberen Teil des Kalorimeters von außen kippbar angebracht. Danach wurde das Kalorimeter luftdicht verschlossen. Ein Auslass dieses Kalorimeters wurde mit einem mit Benzol gefüllten Eudiometerrohr verbunden. Die Rate der infolge Verdampfung des flüssigen Stickstoffs im Eudiometerrohr aufsteigenden Blasen wurde in 30 Sekunden Abständen verfolgt. Sobald die Rate konstant blieb, wurde die Huminsäureprobe in den flüssigen Stickstoff des Kalorimeters eingekippt. Die N_2-Gas-Bildung wurde im Eudiometerrohr so lange verfolgt, bis sie sich wieder konstant zeigte. Zur graphischen Auswertung wurden die am Eudiometerrohr abgelesenen Werte gegen die Zeit aufgetragen. Aus der erhaltenen Kurve wurde die durch die zugegebene Huminsäuremenge hervorgerufene Volumenänderung ermittelt.
Die Bestimmung der c_p erfolgte nach folgender Beziehung:

$$c_p = \frac{\Delta H \, (P_a - P_{fl} - P_s) \, (V_2 - V_1)}{m \, (T_Z - T_L) \cdot R \cdot T_Z}$$

Es bedeuten:

ΔH = die Verdampfungswärme in cal/Mol
P_a = äußerer Druck
P_{fl} = Sättigungsdampfdruck der Flüssigkeit
V_1 = Anfangsvolumen im Eudiometer
V_2 = Endvolumen im Eudiometer
m = eingewogene Probemenge
T_Z = Zimmertemperatur
T_L = Temperatur des siedenden flüssigen Stickstoffs
R = universelle Gaskonstante

5.1.3 Stabilitätskonstanten

Bestimmung der relativen Stabilitätskonstanten erfolgte in Anlehnung an die Beziehung von MARTELL und CALVIN (65):

$$\text{Log} \left(\frac{\tau_0}{\tau} - 1\right) = \text{Log } K - x \text{ Log } [HS]$$

Es bedeuten:

τ_0 = Die Verteilungskonstanten in Abwesenheit von Huminsäure (HS)

τ = Die Verteilungskonstanten in Gegenwart von HS

Log K = Relative Stabilitätskonstante

x = Anzahl der Mole von HS, die mit 1 Mol Metallion reagiert

[HS] = Relative Konzentration der HS in mg anstelle der molaren Konzentration, da das Molekulargewicht der verwendeten HS-Präparate nicht bekannt war.

wurde wie folgt ermittelt:

$$\tau_0 = \frac{\alpha_0 V}{(100 - \alpha_0 g)}$$

Es bedeuten:

α_0 = am Austauscher gebundenes Metall in % des Gesamtmetalles

$100 - \alpha_0$ = in Lösung verbliebenes Metall in % des Gesamtmetalles

V = Volumen der Lösung

g = Gewicht des Austauschers.

τ wurde in der gleichen Weise wie τ_0 bestimmt, jedoch in Anwesenheit von verschiedenen HS-Konzentrationen. x wurde für jedes Metall bei jedem pH aus der Neigung der Kurve nach

Auftragung von $\frac{I_0}{I} - 1$ gegen verschiedene HS-Konzentrationen auf Log-Log Papier ermittelt.

Die HS-Probe wurde gelöst in 0,1 N NaOH und durch Sephadex G 50 Passage gereinigt. Aliquote Mengen 1, 3, 5, 7 und 10 mg HS enthaltend, wurden in 50 ml Meßkolben pipettiert und mit dest. Wasser auf ungefähr 40 ml verdünnt. Jeder Kolben erhielt 5 ml 1 N KCl und danach 3 ml einer Cu-(200 µg/ml), Fe-(100 µg/ml) oder Zn-(100 µg/ml) Chloridlösung. Das pH der Lösungen wurde mit 0,1 N KOH oder 0,1 N HCl auf 3,5 oder 7,0 eingestellt. Abschließend wurden die Kolben mit dest. Wasser aufgefüllt. Eine Kontrollreihe erhielt keine HS.

Die Versuchslösungen wurden mit jeweils einem Gramm K-gesättigten Kationenaustauscher (Dowex 50 W-X8, 20-50 mesh) im 125 ml Erlenmeyerkolben für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde durch Filtration und mehrmaliges Nachwaschen mit dest. Wasser der Austauscher abgetrennt. Filtrat und Waschwasser wurden auf dem Wasserbad zur Trockne eingeengt und mit 5 ml einer Mischung (5:1) von konz. HNO_3 und H_2SO_4 bis zur völligen Entfärbung gekocht. Die Lösung wurde mit dest. Wasser verdünnt und kolorimetrisch der Gehalt an Zink als Dithizonat, an Kupfer als Carbamat und an Eisen als o-Phenanthrolin-Eisen-Komplex bestimmt (48).

5.1.4 UV-Spektren

Für die Aufnahme von UV-Spektren wurden 5 mg Huminsäure in 25 ml 0,1 N NaOH gelöst und davon 0,2 ml in der Meßküvette mit dest. Wasser auf 3 ml verdünnt. Die UV-Spektren wurden jeweils bei einem pH der Meßlösung von 3, 5, 7, 9 und 11 aufgenommen. Als Gerät diente das Beckman UV-Spektrophotometer DBG-Grating.

5.1.5 IR-Spektren

1 mg Huminsäure und 800 mg KBr wurden gründlich in einem Achatmörser staubfrei homogenisiert. Dieses Gemisch wurde unter Vakuum bei 300 kg/cm^2 gepreßt. Diese KBr-Preßlinge wurden für die IR-Analyse im IR-Spektrophotometer der Firma Leitz, Wetzlar, verwendet.

5.1.6 Acetylierung

Die Bestimmung erfolgte nach VOGEL (98) und SCHNITZER und SKINNER (91). 1 g Huminsäure wurde in einem Erlenmeyer-Kolben mit 15 ml Acetanhydrid versetzt und nach Zugabe von 3 Tropfen konz. H_2SO_4 auf dem Wasserbad für 24 Stunden erhitzt. Danach wurde die Suspension im Eisbad abgekühlt, 2 Stunden stehengelassen und schließlich auf der Nutsche filtriert. Der Filterrückstand wurde mit kaltem destilliertem Wasser säurefrei gewaschen und danach über P_2O_5 in Vakuum getrocknet.

5.1.7 Reduktive Acetylierung

Methode nach SCHNITZER und SKINNER (92). 100 mg Huminsäure wurden nacheinander mit 10 ml Acetanhydrid, einem Tropfen konz. H_2SO_4 und 2,5 g Zinkstaub versetzt. Die Suspension wurde auf einem Wasserbad von 70°C 24 Stunden erhitzt und danach heiß filtriert. Zu dem klaren Filtrat wurden 10 ml dest. Wasser gegeben und zur Hydrolyse des Acetanhydrids 5 Minuten auf dem Wasserbad mäßig erhitzt. Die Lösung wurde im Rotationsverdampfer unter Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Der trockne Rückstand wurde zur vollständigen Entfernung der Essigsäure mehrfach mit Methanol extrahiert und abschließend über P_2O_5 unter Vakuum getrocknet.

5.1.8 Acetylgruppen-Bestimmung

Zur Bestimmung der Acetylgruppen wurde mit geringer Abänderung die bei GATTERMANN (37) beschriebene Standardmethode verwendet. 10 mg der zuvor acetylierten bzw. reduktiv acetylierten Huminsäure wurde mit 2 ml 50% H_2SO_4 für eine Stunde verseift. Nach Abkühlung der Reaktionslösung wurde der Kühler 2 mal mit 5 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die freigesetzte Essigsäure wurde nach Abdestillieren mit N/30 NaOH und Phenolphthalein als Indikator titriert. 1 ml N/30 NaOH entspricht 1,434 mg Acetylgruppen($-COCH_3$).

5.1.9 Methylierung

Die Methylierung wurde mit Diazomethan durchgeführt, das aus frisch hergestelltem Nitrosomethylharnstoff gewonnen und am gleichen Tag verwendet wurde. 500 mg Huminsäure wurden in 40 ml Methanol und 4 ml dest. Wasser gelöst. In Äther gelöstes Diazomethan aus 10,3 g Nitrosomethylharnstoff wurde zu der alkoholischen Huminsäurelösung gegeben und über Nacht stehengelassen. Danach wurde das überschüssige Diazomethan durch mäßiges Erwärmen auf dem Wasserbad entfernt, das methylierte Produkt unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet und über P_2O_5 aufbewahrt.

5.2.0 Hydrierung

Zur katalytischen Hydrierung unter Normaldruck wurden 500 mg Huminsäure in Eisessig gelöst und nach Zugabe der gleichen Menge Palladiumkohle unter H_2-Atmosphäre 2 Stunden bei Raumtemperatur reagiern gelassen. Das Palladium wurde sodann aus der Reaktionslösung abfiltriert, das Filtrat unter Vakuum zur Trockne eingeengt und das erhaltene hydrierte

Huminsäureprodukt über P_2O_5 aufbewahrt.

Die von der Huminsäure aufgenommene Menge an Wasserstoff wurde aus dem Verbrauch an H_2-Gas wie folgt berechnet:

$$V_o = V \frac{p.T_o}{T.P_o}$$

Es bedeuten:

V_o = Wasserstoffmenge, aufgenommenen von Huminsäure
V = Verbrauchte Wasserstoffmenge unter den Reaktionsbedingungen
p = Atmosphärendruck während der Reaktion
T = Reaktionstemperatur (Raumtemperatur)
T_o = 273°K
P_o = 760 mm Hg, Normaldruck.

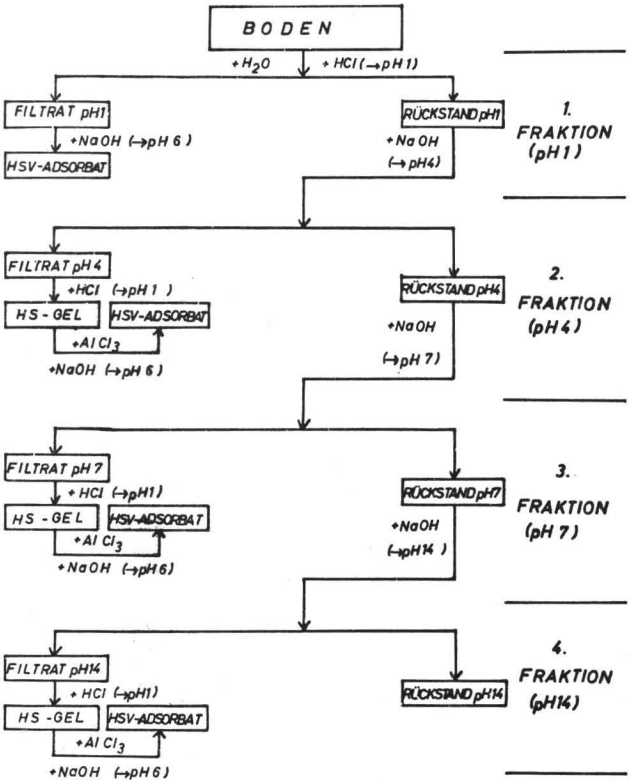


Abb. 1: Schematische Darstellung des Extraktions- und Fraktionierungsganges von Huminstoffen aus Boden.

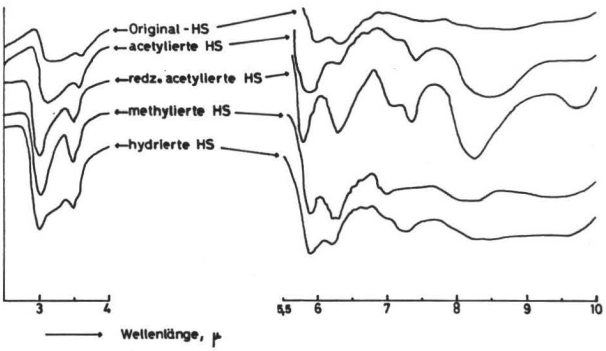


Abb. 2: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Schwarztorf-Huminsäure (pH 7 Fraktion).

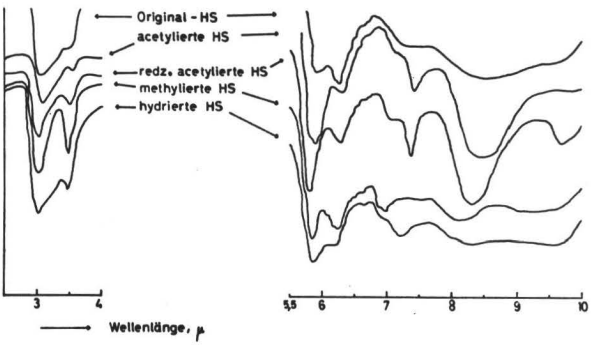


Abb. 3: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Schwarztorf-Huminsäure (pH 14 Fraktion).

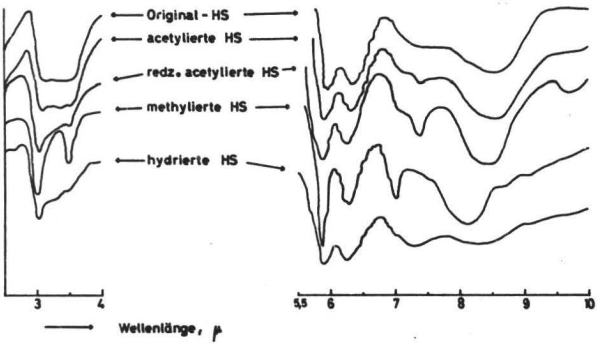


Abb. 4: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Braunkohle-Huminsäure (pH 4 Fraktion).

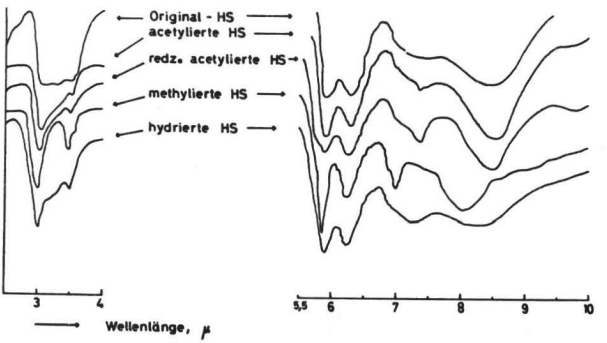


Abb. 5: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Braunkohle-Huminsäure (pH 7 Fraktion).

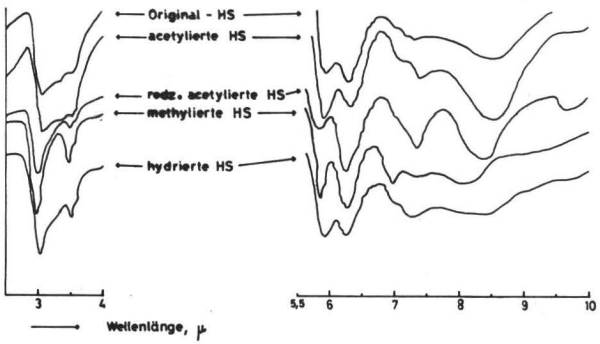


Abb. 6: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Braunkohle-Huminsäure (pH 14 Fraktion).

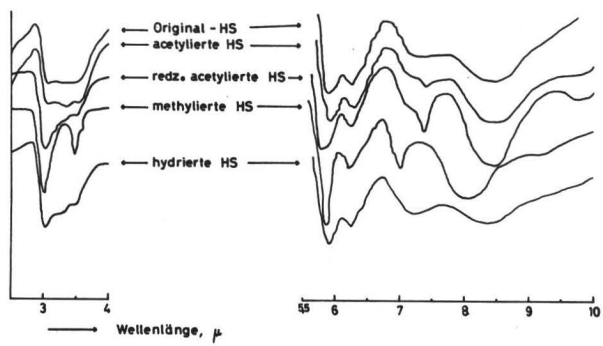


Abb. 7: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Calluna Podsol-Huminsäure (pH 4 Fraktion).

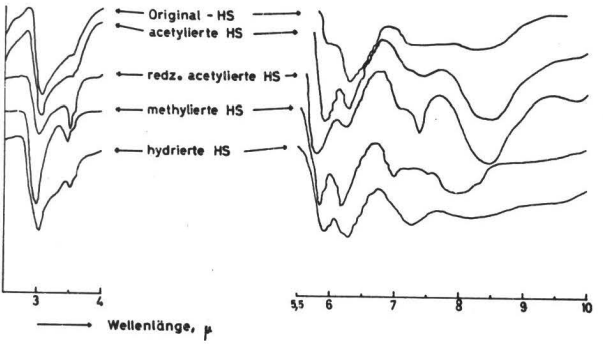


Abb. 8: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Calluna Podsol-Huminsäure (pH 7 Fraktion).

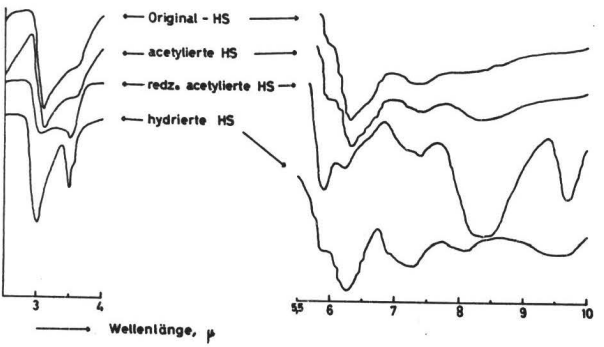


Abb. 9: IR-Absorptionsspektren von Original- und chemisch veränderter Calluna Podsol-Huminsäure (pH 14 Fraktion).

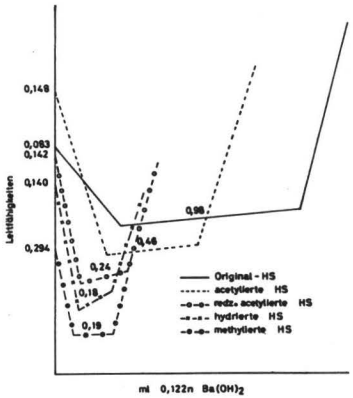


Abb. 10: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Schwarztorf-Huminsäure (pH 7 Fraktion).

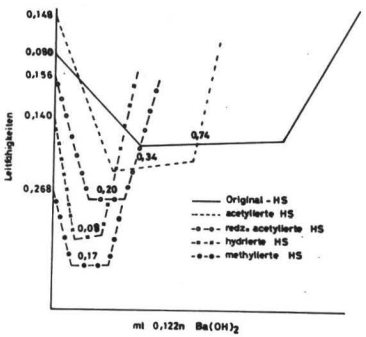


Abb. 11: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Schwarztorf-Huminsäure (pH 14 Fraktion).

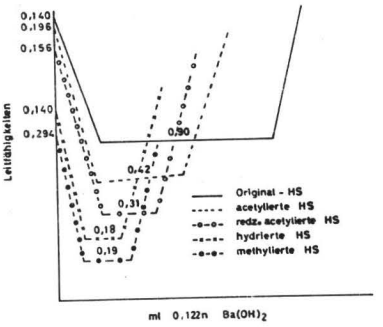


Abb. 12: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Braunkohle-Huminsäure (pH 4 Fraktion).

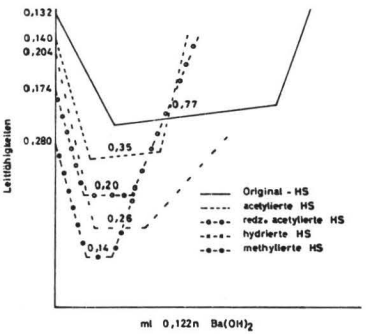


Abb. 13: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Braunkohle-Huminsäure (pH 7 Fraktion).

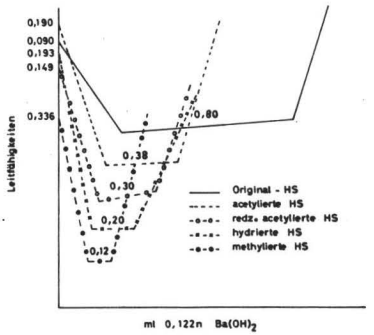


Abb. 14: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Braunkohle-Huminsäure (pH 14 Fraktion).

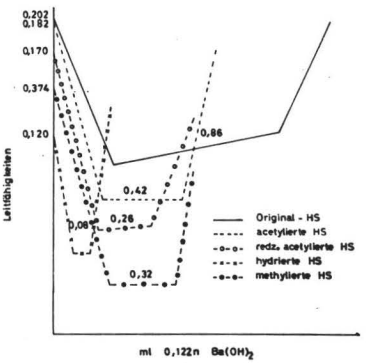


Abb. 15: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Calluna-Podsol-Huminsäure (pH 4 Fraktion).

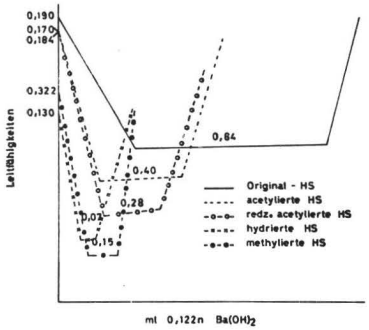


Abb. 16: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Calluna Podsol-Huminsäure (pH 7 Fraktion).

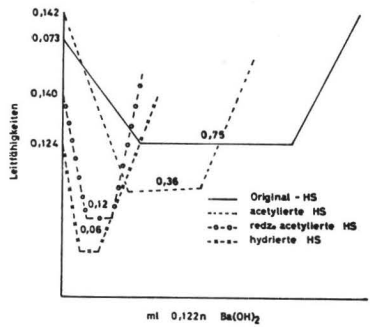


Abb. 17: Leitfähigkeitstitrationskurven von Original- und chemisch veränderter Calluna Podsol-Huminsäure (pH 14 Fraktion).

Literaturverzeichnis

1. ACHARD, F.K. : Crell's Chem.Ann. 2, 391 (1786)

2. BAILY, R.W. : New Zealand Jour.Sci.Tech. 34A, 421 (1953)

3. BARTON, D.H.R., and SCHNITZER, M. : Nature 198, 217 (1963)

4. BECKWITH, R.S. : Nature 184, 745 (1959)

5. BLOM, L., EDELHAUSEN,L., and VAN KREVELEN, D.W. : Fuel. 36, 135 (1957)

6. BRAND, J.C.D., and SCOTT, A.I. : Soil Plant Food. 1, 29 (1963)

7. BRAUNS, F.E. : The Chemistry of Lignin. Academic Press,New York,U.S.A. (1952)

8. BREMNER, J.M., MANN, P. J.G., HEINTZE, S.G., and LEES, H. : Nature 158, 790 (1946)

9. BREMNER, J.M. and LEES,H. : Jour.Agric.Sci. 39, 274 (1949)

10. BREMNER, J.M. : Jour.Soil Sci. 2, 67 (1951)

11. BREMNER, J.M. : Jour.Soil Sci. 5, 214 (1954)

12. BREMNER, J.M. : Soil and Fertiliser.19,115 (1956)

13. BROWN, J.K. and WYSS,W.F. : Chem.Ind. 1118 (1955)

14. BROADBENT, F.E. and BRADFIELD, G.R. : Soil Sci. 74, 447 (1952)

15. BROADBENT, F.E. and OTTO, J.B. : Soil Sci. 83, 419 (1957)

16. CEH, M. and HADZI, D. : Fuel. 35, 77 (1956)

17. CLENDENIN, J.D., BARCLAY, K.M., DONALD, J.H., GILLMORE, D.W., and WRIGHT,C.C. : Penna.State Coll.Min.Ind.Expt. Sta.Tech.Paper. 160 (1949)

18. COLE, A.R.H. : Technique in Organic Chemistry Willey (Interscience), N.Y., U.S.A. (1963)

19. COLEMAN, N.T., McCLUNG, A.C., and MOORE, D.P. : Science 123, 330 (1956)

20. COOKE, L.M., McCARTHY, J.L., and HIBBERT, H. : Jour.Am.Chem.Soc. 63, 3052 (1941)

21. DAVIS, R.I., COULSON, C.B. and CARLOS, L. : Chem.and Indst. 23, 1544 (1957)

22. DE KOCK, P. : Science 121, 473 (1955)

23. DEUL, H. : Trans.VII Int.Congr.Soil Sci. Madison, U.S.A. 1, 38 (1960)

24. DE WALT, C.W.Jr., and GLENN, R.A. : Anal.Chem. 24, 1789 (1952)

25. DION, G., and MANN,P.J.G.: Jour.Agric.Sci. 36, 239 (1946)

26. DUBACH, P., and MEHTA, N.C. : Soil and Fertiliser 26, 293 (1963)

27. ELLER, W. : Ann.Chem. 431, 133 (1923)

28. ELLER, W., HERDIECKE-ROFF, E., and SAENGER,H. : Ibid. 43, 177 (1923)

29. ENNIS, M.T. : Irish Jour.Agric.Res. 1, 139 (1962)

30. FARMER, V.C., and MORRISON, R.I. : Sci.Proc.Roy.Dublin Soc. 11, 85 (1959)

31. FELBACK, G.T.Jr. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 29, 48 (1965)

32. FIEDLER, H.J. : Die Untersuchung der Boden. Band II. Verlag T.Steinkopff, Dresden und Leipzig (1965)

33. FLAIG, W., SCHEFFER,F., und KLAMROTH, B. : Z.Pfl.Ernähr.,Düng.,Bodenkd. 71, 33 (1955)

34. FLAIG, W. : Trans.VII Intern.Congr.Soil Sci. 2, 648 (1960)

35. FORSYTH, W.G.C. : Biochem.Jour. 41, 176 (1947)

36. GALLAGHER, P.H. : Proc.Roy.Irish.Acad. 48B, 213 (1942)

37. GATTERMANN, L. : Die Praxis des organischen Chemikers. Walter De Gruyter Co. Berlin (1961)

38. GILLAM, W.S. : Soil Sci. 49, 433 (1940)

39. GOTTLIEB, S., and HENDRICKS, S.B. : Soil Sci.Proc.Amer.Proc. 10, 117 (1946)

40. HAMY, A., and LeROY,G. : C. R.Acad.Agric. 38, 553 (1952)

41. HAMY, A., and LeROY,G. : Ann.Agron. 3, 939 (1952)

42. HARRIS, E.E., D'IANNI,J. and ADKINS, W. : Jour.Am.Chem.Soc. 60, 1467 (1938)

43. HEINTZE, S.G., and MANN, P.J.G. : Nature 158, 791 (1946)

44. HEMSTOCK, G.A., and LOW, P.F. : Soil Sci. 76, 331 (1953)

45. HIMES, F.L., and BARBER, S.A. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 21, 368 (1957)

46. HOCK, A. : Z.Pfl.Ernähr.Bodenkd. 5,I (1937)

47. IRVING, H., and WILLIAMS, R.J.P. : Nature 162, 746 (1948)

48. JACKSON, M.L. : Soil Chemical Analysis. Prentice Hall, N.Y., U.S.A. (1965)

49. JOHNSTON, H.H. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 23, 293 (1959)

50. KANWAR, J.S. : Jour.Ind.Soc.Soil Sci. 2, 73 (1954)

51. KAWAGUCHI, K., and KYUME, K. : Soil and Plant Food 5,54 (1959)

52. KONONOVA, M.M., BELCHIKOVA, N.P., and NIKIFOROF : Pochvovedenie 3, 83 (1958)

53. KONONOVA, M.M. : Soil Organic Matter. Pergamon Press, N.Y., U.S.A.

54. KUKHARENKO, T.A., and SAVEL'EV, A.S. : Chem.Abs. 45, 8451h (1951)

55. KUKHARENKO, T.A., and SAVEL'EV, A.S. : Chem.Abs. 47, 8037c (1952)

56. KUMADA, K. : Soil and Plant Food. 1,29 (1955)

57. KUMADA, K. : Soil and Plant Food. 2,44 (1956)

58. KUMADA, K., and AIZAWA, K. : Soil and Plant Food. 3, 152(1958)

59. KUMADA, K. : Soil and Plant Food. 4,145 (1958)

60. KYUME, K., and KAWAGUCHI, K. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 28, 371 (1964)

61. KYUME, K. : Soil Sci.and Plant Nutrition 10, 33 (1964)

62. LAATSCH, W. : Dynamik der deutschen Acker-und Waldböden. Steinkopff. Dresden und Leipzig (1944)

63. LEES, H. : Biochem.Jour. 46, 450 (1950)

64. LEIN, Z.Ya. : Pedology 10, 41 (1940)

65. MARTELL, A.E., and CALVIN, M. : Chemistry of Metal Chelate Complexes.Prentice Hall N.J.,U.S.A. (1952).

66. MARTIN, F., DUBACH,P., MEHTA, N.C., and DEUEL,H. : Z.Pfl.Ernähr.Düng.Bodenkd. 101, 149 (1962)

67. MARTIN, F., DUBACH,P., MEHTA,N.C.,and DEUEL, H. : Z.Pfl.Ernähr.Düng.Bodenkd. 103, 27 (1963)

68. MARTIN, G. : C.R.Acad.Agric. 38, 709 (1952)

69. McCABE, L.C., and BOLEY, C.C. : Chemistry of Coal Utilisation. Vol.1.N.Y.,U.S.A. (1945)

70. McGEORGE, W.T. : Arizona Agri.Expt.Sta.Tech.Bull. 31 (1931)

71. MILLER, M.H., and OHLROGGE, A.J. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 22, 225 (1958)

72. MILLER, M.W. : The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites. McGrew-Hill Inc. N.Y., U.S.A. (1961)

73. MITCHELL, J. : Jour.Amer.Soc.Agron. 24, 256 (1932)

74. MORTENSEN, J.L., and HIMES, F.L. : Chemistry of the Soil. 2nd. Ed. Reinhold, N.Y., U.S.A. (1964)

75. MORTENSEN, J.L. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 27, 179 (1963)

76. MULLER, J.F. : Soil Sci. 35, 229 (1933)

77. ORGANIKUM. : Von einem Autorenkollektiv der technischen Universität Dresden (1964)

78. ORLOV, D.S., ROZANOVA, O.N., and MATYUKHINA, S.G. : Soviet Soil Sci.(Eng.) 1, 15 (1962)

79. PAVEL, L., KOLOUSEK,J., and SMATLAK, V. : Acad.tchecosl.Agric. 26A, 155 (1953)

80. PINCK, L.A., DYAL, R.S. and ALLISON, F.E. : Soil Sci. 78, 109 (1954)

81. RANDHAWA, N.S., and BROADBENT, F.E. : Soil Sci. 99, 362 (1965)

82. ROCHUS, W. : Mitt.Deutsch.Bodenkd.Ges.Bd.4, 301 (1965)

83. RODERICK, W.R. : Jour.Chem.Edn. 39, 2 (1962)

84. SCHEFFER, F., ZIECHMANN, W., und SCHLÜTER, H. : Z.Pfl.Ernähr.Düng.Bodenkd. 70, 260 (1955)

85. SCHEFFER, F., ZIECHMANN, W., und SCHOLZ,H. : Z.Pfl.Ernähr.Düng.Bodenkd. 80, 134 (1958)

86. SCHEFFER, F., und ULRICH, B. : Humus und Humusdüngung. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1960)

87. SCHNITZER, M., SHEARER, D.A., and WRIGHT, J.R. : Soil Sci. 87, 252 (1959)

88. SCHNITZER, M., and SKINNER, S.I.M. : Soil Sci. 96, 181 (1963)

89. SCHNITZER, M., and GUPTA, U.C. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 28, 374 (1964)

90. SCHNITZER, M., and GUPTA, U.C. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 29, 274 (1965)

91. SCHNITZER, M., and SKINNER, S.I.M. : Soil Sci. 99, 278 (1965)

92. SCHNITZER, M. and SKINNER, S.I.M. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 29, 400 (1965)

93. SCHNITZER, M., and SKINNER, S.I.M. : Soil Sci. 102, 361 (1966)

93a. SEIDEL, H. : Kolloides Verhalten nativer Huminsäure-Sole. Dissertation (1966)

94. SPRINGER, U. : Z.Pfl.Ernähr.Düng.Bodenkd. 3, 129 (1943)

95. TOBIA, S.K., and HANNA, A.S. : Soil Sci. 85, 302 (1958)

96. UBALDINI, I. : Brennst.Chem. 81, 188 (1937)

97. VAN KREVELEN, D.W. : Coal.Elsevier.N.Y.,U.S.A. (1961)

98. VOGEL, A.I. : Practical Organic Chemistry. Longman,Green and Co.,London, U.K. (1950)

99. WAGNER, G.H., and STEVENSON, F.J. : Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 29, 43 (1965)

100. WAKSMAN, S.A. : Humus. 2nd.Ed.Baltimore,U.S.A. (1938)

101. WALLACE, A., MUELLER, R.T., LUNT, O.R., ASHCROFT,R.T. and SCHANNON, L.M. : Soil Sci. 80, 101 (1955)

102. WELTE, E. : Z.Pfl.Ernähr.Düng.Bodenkd. 56, 105, (1952)

103. WELTE, E., NIEMANN und ZIECHMANN, W. : Naturwissen. 41, 334 (1954)

104. WELTE, E., SCHATZ und ZIECHMANN, W. : Naturwissen. 41, 213 (1954)

105. WELTE, E. : Angew.Chemie 67, 153 (1955)

106. WOOD, J.C., MOSCHOPEDIS,S.E. and DEN HERTOG,W. : Fuel. 40, 491 (1961)

107. WRIGHT, J.R., and SCHNITZER, M. : Trans.7th.Intern.Congr.Soil Sci. 2, 120 (1960)

108. ZIECHMANN, W. : Brennst.Chemie 39, 353 (1958)

109. ZIECHMANN, W. : Geochemica Et.Cosm.Acta 28, 1555 (1964)

110. ZIECHMANN, W. und LENTZ, H. : Unveröffentliche Mitteilung. (1967)

Kickuth, R. und Vardakis, F.:

Aufnahme und Abbau von L-NN-Dimethyl-Valin durch Helianthus Annuus

(Ein Beitrag zur chemischen Ökologie organischer Bodenkomponenten)

Göttinger Bodenkundliche Berichte
5, Teil B, 1–70 (1968)

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Theoretischer Teil	4
3.	Methoden und Ergebnisse	18
	3.1 NN-Dimethylaminosäuren	18
	3.1.1 Synthese chromatographisch reiner L-NN-Dimethylaminosäuren	18
	3.1.2 Darstellung von radiaktivem L-NN-Dimethyl-Valin	19
	3.1.3 Analytische Daten der L-NN-Dimethyl-verbindungen	19
	3.1.4 Anfärbeverfahren für L-NN-Dimethyl-aminosäuren	21
	3.2 Pflanzenversuche mit L-NN-Dimethylaminosäuren	25
	3.2.1 Pflanzenwahl, Aufzucht der Pflanzen (nicht steril)	25
	3.2.2 Sterile Aufzucht	26
	3.2.3 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	27
	3.2.4 Einwirkung von L-NN-Dimethylamino-säuren auf Trockensubstanzbildung und Salzaufnahme bei Helianthus annuus	35
	3.2.5 Aufnahme und Metabolisierung von C^{14}-markiertem L-NN-Dimethyl-Valin durch Helianthus annuus	36
	3.3 Analyse und Befunde am Pflanzenmaterial	37
	3.3.1 Aminosäuren (Sproß)	38
	3.3.2 Organische Säuren (Sproß)	42
	3.3.3 Aminosäuren (Wurzel)	43
	3.3.4 Organische Säuren (Wurzel)	44
4.	Diskussion	45
5.	Zusammenfassung	52
6.	Experimenteller Teil	53
Autorenverzeichnis		62

1. Einleitung und Problemstellung

Entwicklungen, die bei den klassischen Naturwissenschaften schon lange abgelaufen sind und deren Konsequenzen das heutige Bild dieser Wissenschaften mitbestimmen, haben in der Bodenkunde, einer vergleichsweise jungen Wissenschaft, erst unlängst begonnen, auch ihr Bild mitzuprägen.
Als bemerkenswerteste Anzeichen dafür dürfen wir einerseits das Auftauchen äußerst spezieller chemischer, physikalischer und biologischer Probleme ansehen, andererseits aber das Bemühen um ganzheitliche Einsichten, das sich in der besonders raschen Entwicklung ökologischer Disziplinen zu erkennen gibt.

So konstatieren wir die Entwicklung bodenkundlicher Teildisziplinen, die sich im Gegensatz zu den klassischen Fragen nach der Systematik, Stratigraphie, der Profilansprache, schließlich auch der ackerbaulichen Nutzbarkeit von Böden, mehr den chemischen, physikalischen, biologischen Teilprozessen der Bodenbildung, Bodenentwicklung und Bodenmetabolik widmen.

Diese Forschungsrichtung hofft, von der Erhellung dieser Teilprozesse zu gegebener Zeit Rückschlüsse auf das makroskopische Geschehen eines gegebenen Standortes ziehen zu können.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn wir in der modernen bodenkundlichen Literatur neben den nach wie vor zahllosen Arbeiten über stratigraphische, systematische und morphologische Probleme in zunehmendem Maße Arbeiten antreffen, die sich mit einem speziellen chemischen, physikalischen oder biologischen Problem befassen und deren Platz ebenso gut in der klassischen naturwissenschaftlichen Literatur sein könnte.

Mit diesen kurzen Ausführungen soll der Standort auch dieser Arbeit charakterisiert sein, einer Arbeit, die sich, auf den einfachsten Ausdruck gebracht, lediglich mit dem Schicksal einer N-Methyl-Funktion beschäftigt.

In dem ausgezeichneten Werk von Mc LAREN und PETERSEN (1967), Soil Biochemistry, sind zwei Kapitel eigens den Verbindungen gewidmet, die nicht pflanzliche, mikrobielle oder tierische Synthese- oder Abbauprodukte und als solche "natürliche" Bodenkomponenten sind, sondern durch den Menschen in den Boden hineingebracht werden und hier neben ihrer ursprünglich beabsichtigten Wirkung, Einflüsse ausüben können, die es aufs sorgfältigste zu studieren gilt.

Die Untersuchung dieser Verbindungen im Hinblick auf ihre Wirkungen und ihr Schicksal im System Boden - Pflanze ist somit nicht nur ein legitimes Anliegen moderner bodenkundlicher Arbeit, sondern ist darüber hinaus von erheblichem praktischen Interesse.

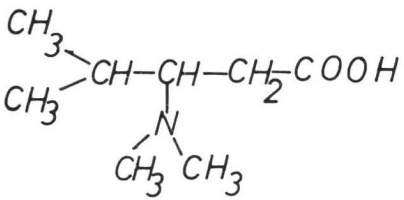
Am stärksten in das Bewußtsein auch weiterer Kreise ist wohl die Frage nach dem Verbleib solcher Verbindungen unter dem Gesichtswinkel des sogenannten "Rückstandsproblems" bei Insektiziden und Pestiziden gedrungen.

Nach dem Verbleib und nach dem Schicksal von organischen Verbindungen im Boden zu fragen, die in ihrer Struktur von den normalen Metaboliten und Syntheseprodukten des Tier- und Pflanzenreiches abweichen, ist auch ein Anliegen dieser Arbeit, die sich damit an eine im Jahre 1966 erschienene Arbeit von R. ALDAG anschließt. Die darin mitgeteilten Befunde, daß N-Monoalkyl-Verbindungen (Methyl-Amin und N-Methyl-Valin) durch Pflanzen aus dem Boden aufgenommen werden können und von ihnen abgebaut werden, führte zu der Frage, inwieweit auch NN-Dialkyl-Verbindungen, bei denen die Bildung der Pyridoxal-phosphatkomplexe, wie weiter hinten auszuführen sein wird, nicht mehr ohne weiteres gegeben ist, ebenfalls von der Pflanze aufgenommen und metabolisch bewältigt werden können.

Interessant ist dieses Problem auch darum, weil viele unserer modernen Pestizide solche Gruppierungen im Molekül enthalten.

Es soll in diesem Zusammenhang aber darauf hingewiesen werden, daß solche Gruppierungen auch in Naturstoffen auftreten, zum Beispiel in vielen Alkaloiden, die, wie zahlreiche Arbeiten darlegen, aus den Blättern und Wurzeln lebender Pflanzen ausgewaschen werden und so in den Boden gelangen können. (NEUMANN und TSCHÖPE, 1966). Ferner muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß Aminosäuren abweichender Konstiturion, die als "unnatürliche" bzw. nicht proteinogene Aminosäuren bezeichnet werden, heute als Syntheseprodukte zahlreicher Mikroorganismen und höherer Pflanzen bekannt sind. (BODANSKY und PERLMANN, 1964). Die Erforschung dieses Gebietes ist noch in vollem Fluß, und ständig werden neue Verbindungen isoliert.

Eine Substanz, die im Zusammenhang mit unserer Arbeit von besonderem Interesse ist, finden wir im Antibiotikum Etamycin. Dieses enthält als Bauelement das β-NN-Dimethyl-Leucin.



Wissenschaftshistorisch schließlich ist eine Arbeit wie die vorliegende insofern besonders reizvoll, als sie einen Beitrag zur Pflanzenernährung leistet, der wiederum der organischen Substanz des Bodens eine besondere Rolle zuweist und somit interessante Beziehungen zur Humus-Theorie Albrecht THAERs aufzeigt.

2. Theoretischer Teil

Uns interessieren vor allem solche Verbindungen, die, sofern nicht anthropogenen Ursprungs, artspezifisch oder sortengebunden sind, wie zum Beispiel Alkaloide, Glycoside, eine Reihe von Aromaten, bei den Mikroorganismen z.B. Antibiotika und Fungizide, die zwar in ihrer Zusammensetzung enge Beziehungen zu Kohlenhydraten und Aminosäuren zeigen, jedoch von diesen durch gewisse Abweichungen in der Konstitution und Konfiguration unterschieden sind.

In den letzten 20 Jahren ist es durch die Einführung neuer analytischer Techniken, unter denen die chromatographischen Methoden besonders hervorgehoben werden müssen, z.B. gelungen, eine Reihe von "nichtproteinogenen" Aminosäuren zu entdecken und zu identifizieren.

Das spezifisch strukturelle Merkmal, das uns im Rahmen dieser Arbeit interessierte, nämlich die NN-Dialkyl-Gruppe, finden wir darunter, von einer Ausnahme abgesehen, nicht. (ß-NN-Dimethyl-Leucin), jedoch muß es angesichts der Isolierung so unterschiedlicher Strukturen und bei den raschen Fortschritten der Untersuchungen auf diesem Gebiet nicht unbedingt auch in Zukunft so bleiben. Einer der Gründe dafür, daß NN-Dialkyl-Aminosäuren bisher in der Natur praktisch noch nicht nachgewiesen worden sind, obwohl in zahlreichen anderen Naturstoffen (Alkaloiden) diese Gruppierung außerordentlich häufig anzutreffen ist, dürfte das Fehlen geeigneter Nachweisreaktionen für diese Verbindungsgruppe sein. Als Zwitterionen sprechen diese Verbindungen bekanntlich weder auf die üblichen Nachweisreagenzien für Säuren noch auf solche für Basen an. Darüber hinaus fehlen aber auch durch die vollständige Substitution der Stickstoff-Funktion die Angriffsmöglichkeiten für die bekannten Aminosäurenreagenzien (Ninhydrin, Isatin, Folins Reagenz), deren Angriff mit einer N-C Dehydrierung beginnt. (s. Experimenteller Teil).

Viele andere Verbindungen mit ungewöhnlichen Strukturmerkmalen sind aber isoliert worden.

LISS (1962) hat aus dem Milchsaft von Euphorbia pulcherrima N-Acetyl-α,γ -Diaminobuttersäure isoliert. Auch in Mimosen ist eine Reihe von Nicht-Eiweißaminosäuren vorhanden.

DUNNIL und FOWDEN (1965) haben N-4-Methyl-Asparagin in den Samen von Curcubitaceen-Arten identifiziert.

Durch den Nachweis einer Reihe von N-substituierten Derivaten des Asparagins im Ecballium elaterium (GRAY und FOWDEN, 1961) und in Bryonia dioica (FOWDEN, 1961) läßt sich die mögliche Vielfalt von Derivaten einer Hauptaminosäure im Pflanzenstoffwechsel erkennen.

In Kulturen von Claviceps purpurea haben STEINER und HARTMANN (1964) α-Aminoheptansäuren gefunden. Ferner berichtet FOWDEN (1962), daß ß-Pyrazolylalanin in Curcubitaceen, besonders in deren Samen in ungewöhnlich großen Mengen anzutreffen ist.

VANCURA und HOWADIK (1965) haben diese Aminosäure in den Wurzelexudaten von Gurken nachgewiesen. GRAY und FOWDEN (1962) isolierten aus Litshi sinensis -(Methylencyclopropyl)-glycin, ein niederes Homologes des ß-(Methylencyclopropyl)-alanin.

Ein vermutliches Intermediärprodukt bei der Umwandlung von 4-Methyl-Prolin in 4-Hydroxymethylprolin (beide Verbindungen kommen im Samen von Rosaceen vor), ist die von GRAY und FOWDEN (1962) im Samen von Eriobotrya japonica gefundene neue Iminosäure 4-Methylenprolin.

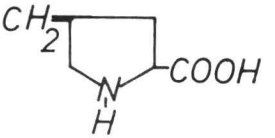


Abb. 1: 4-Methylenprolin

BELL und TIRIMANA (1964) konnten zeigen, daß in den Samen von Vicia-Arten relativ hohe Konzentrationen von Canavanin sowie Arginin und -Hydroxyarginin vorkommen.

THOMPSON und Mitarbeiter beschreiben eine große Anzahl von -Glutamylpeptiden, die sie aus Pflanzenextrakten isolieren konnten. Folgende seien aufgeführt:
-Glutamyl-Derivate von Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Methionin und Cystein sowie mit einer Reihe von Nicht-Eiweißaminosäuren wie:
S-Methyl-L-Cystein-Sulfoxid, L-Aminobuttersäuren.
Erweitert wurde diese Liste durch die Isolierung einer Reihe neuer Verbindungen dieses Typs:
-Glutamyl- -pyrazol 1-yl-L-alanin aus Samen von Cucumis sativus (DUNNIL und FOWDEN, 1963).

Aus der Vielzahl der neuentdeckten und untersuchten Aminosäuren der höheren Pflanzen sind hier nur einige Vertreter erwähnt worden. Im übrigen sei auf die Literatur verwiesen: MUSSO (1956), WIELAND (1960), TSCHIERSCH (1962), FOWDEN (1962).

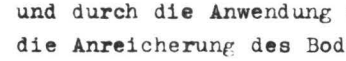
Diese ungewöhnlich konstituierten Verbindungen, die häufig genug in sehr hohen Konzentrationen in den Pflanzen anzutreffen sind, gelangen spätestens mit deren Absterben in den Boden und bereichern somit das Spektrum der organischen Komponenten auf eine höchst bemerkenswerte Weise.

Daß sie auch als Exudate aus der lebenden Pflanze in den Boden gelangen können, ist in einigen Fällen schon gezeigt worden. Es sei hier auf die einschlägige Literatur verwiesen: VANCURA und HOWADIK (1965), IVANOV und JAKOBSON (1964), FRENZEL (1961), SUBRA-RAO et all. (1962), VANCURA (1964), BÖRNER (1961), CHONG, CHANG und BANDURSKI (1964), PAUL und SCHMIDT (1961), ROVIRA (1965), MILLER und SCHMIDT (1965), STRICKER (1963).

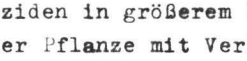
Verbindungen, die in einem konstitutionellen Merkmal (NN-Dimethyl-Gruppe) unserem Modell entsprechen, finden wir zahlreich unter den Alkaloiden, auch eine Reihe häufig verwendeter Pestizide enthält solche Gruppen. An der Präsenz von Stoffen dieser Art im Boden ist nicht zu zweifeln, seitdem NEUMANN und TSCHÖPE (1966) den Austritt von Alkaloiden aus der lebenden Pflanze in den Boden sicherstellen konnten, und durch die Anwendung von Pestiziden in größerem Umfange die Anreicherung des Bodens und der Pflanze mit Verbindungen dieser Art zu einem bedrohlichen und viel diskutierten Problem geworden sind.

Aus den eben erwähnten Verbindungsgruppen lassen wir einige als Beispiele folgen, die konstitutionelle Beziehungen zu dem für unsere Arbeit gewählten Modell zeigen.

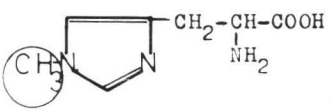
Nicht-Proteinogene Aminosäuren



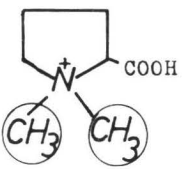
(N-Äthyl-Asparagin)
(Curcubitaceen)
(FOWDEN, 1962)



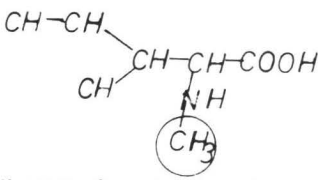
Sarkosin



1-Methyl-Histidin



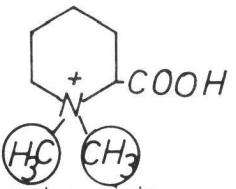
L-Prolin-Betain
(Stachydrin) (Lucerne)
(ROBERTSON-MARION, 1963)



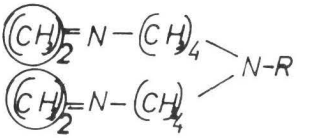
N-Methyl-L-Isoleucin

Alkaloide

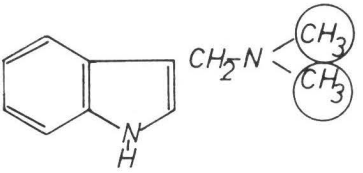
Systematische Untersuchungen ergaben, daß etwa 20 % der höheren Pflanzen, einschließlich der Gräser, Orchideen und Liliaceen, aber auch eine Anzahl niedere Pflanzen Alkaloide führen. In dieser Stoffklasse ist NN-Alkyl-Substitution besonders häufig anzutreffen.



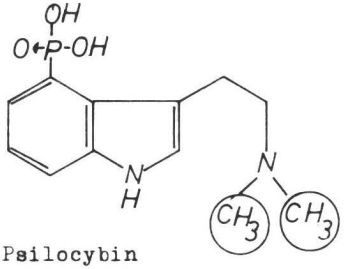
Homostachydrin
(Lucerne)
(ROBERTSON-MARION, 1963)



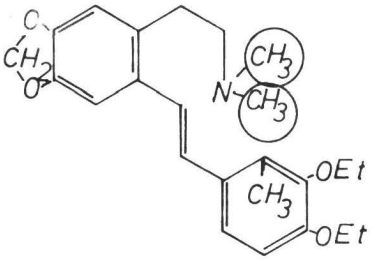
Solapalmitin
(Solanum tripartitum)
(S. MOTHES et al.)



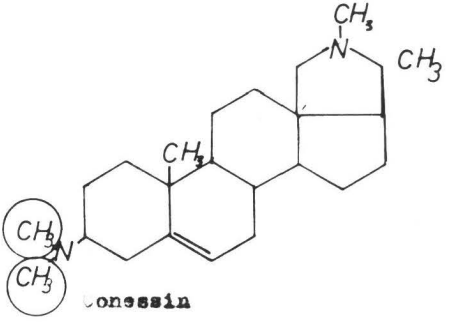
Gramin
(Gerste)
(K.MOTHES et al., 1963)



Psilocybin
(Rauschpilze der Gattung Psilocybe)
(MOTHES et al., 1963)

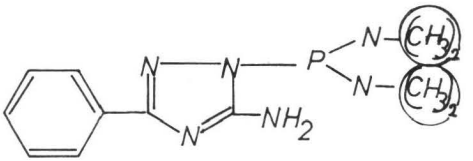


Hunnemanin
(aus Hunnemania fumariaefolia
(MANSKE-HOLMES, 1954)



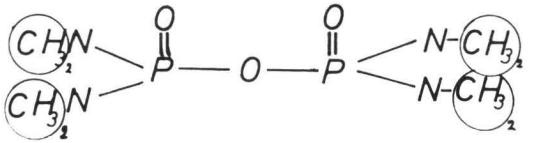
Conessin
(aus Apocynaceen)
(MANSKE-HOLMES, 1954)

Von den zahlreichen Pestiziden und Fungiziden führen wir einige für uns interessante Strukturtypen auf.



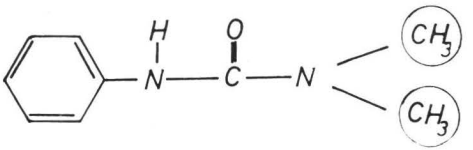
Fungizid: Wepsin WP 155 ® (Fa. Philips-Duphar)

1-bis-(Dimethylamino)-phosphoryl-5-amino-3-phenyl-1,2,4-triazol



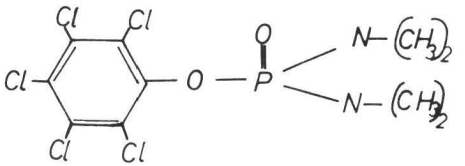
Pestizid: OMPA ® (BAYER)

Oktamethyl-pyrophosphorsäureamid



Herbizid: Fenuron ® (PHILIPS Gloeilampen Fabr.)

1,1-Dimethyl-3-Phenylharnstoff



Fungizid: TH 184-F (Anonym)

Phosphorsäure-pentachlorphenylester-bis-dimethylamid

Verbindungen aus diesen Stoffklassen können, wie wir oben bereits erwähnt haben, durchaus dem Kollektiv der organischen Bodenverbindungen angehören. Man muß sie demgemäß als ökologische Faktoren betrachten und nach den Möglichkeiten und der Art ihrer Auswirkungen auf die biotischen und abiotischen Partner des Bio-Geo-Systems fragen.

Für die als Beispiel erwähnten nicht proteinogenen Aminosäuren ist bekannt - teilweise wird es vermutet -, daß sie Entgiftungs- und Speicherprodukte im Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel der Pflanze darstellen. Diese Funktion ist natürlich nur innerhalb des sie produzierenden Organismus gegeben. Gelangen solche Verbindungen in den Boden, so wirken sie auf die Mehrzahl der darin befindlichen Partner als stoffwechselfremde Verbindungen, sofern sie von diesen aufgenommen werden. Sie können dann zu erheblichen Beeinflussungen des Stoffwechsels und den daraus sich ergebenden Konsequenzen führen (Krankheitssymptome, Ertragsdepressionen usw.).

Schon die Anwendung normaler proteinogener Aminosäuren auf höhere Pflanzen kann zu Störungen in Wachstum und Entwicklung führen, obzwar einige Pflanzen unter bestimmten Bedingungen ihren Stickstoffbedarf zu einem erheblichen Teil auf diese Weise zu decken vermögen.

Die Aufnahme und Assimilation von D-L-Aminosäuren als N-Quelle bei Erbsen und Gerste untersuchten E. VALLE und VIRTANEN (1966). RATNER (1964) und Mitarbeiter stellten ähnliche Versuche an Luzerne und Erbsen an.

Die meisten der angebotenen Aminosäuren verursachten Wachstumshemmungen. HARRIS (1959) untersuchte den Einfluß von Aminosäuren auf das Wachstum abgeschnittener Wurzeln von Rotklee; auch hier wirkten sie hemmend.

MILLER und SCHMIDT (1965) applizierten 2 C^{14} markiertes Glycin bei Bohnenpflanzen. Sie konnten nachweisen, daß das Glycin aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust wird. Ein großer Teil der markierten Substanz wurde in der Fraktion der freien Aminosäuren als Serin wiedergefunden.

Da bei diesen Untersuchungen die Konzentration einer an sich natürlich und normalerweise in der Zelle auftretenden Verbindung erhöht wurde, wodurch Schädigungen entstanden, wurden diese Effekte im allgemeinen als Endprodukthemmung gedeutet. (GRAY und HENDLIN, 1962, OAKS, 1965).

Interessanter im Zusammenhang mit unserem Problem sind einige Untersuchungen anderer Autoren, die sich mit dem Einfluß "unnatürlicher" Verbindungen auf den Stoffwechsel beschäftigen. Mit der Anwesenheit solcher Verbindungen im Boden muß gerechnet werden, wie wir oben ausgeführt haben.

Zunächst ist ihr Ab- und Umbau im Boden möglicherweise erschwert, denn zweifellos ist seine enzymatische Ausrüstung dafür schwächer entwickelt als für den Abbau weitverbreiteter primärer Metaboliten, selbst wenn man die Fähigkeit der Mikroorganismen, sich entsprechend einzustellen, in Betracht zieht.

So stellt sich also die Frage ihrer ökologischen Bedeutung für das System Boden - Pflanze in besonderer Weise, denn:

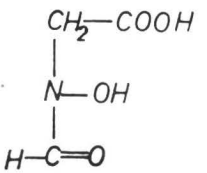
1. durch das Fehlen geeigneter Enzyme im Boden werden ihre Abbauchancen im Biotop erniedrigt, was einer Verlängerung ihrer Verweilzeit im Boden gleichkommt;

2. sie können als "Antimetaboliten" oder auf andere Art und Weise in den Stoffwechsel eingreifen (R. KICKUTH und R. ALDAG, 1966).

Es ist beispielsweise bekannt, daß im Boden nur in geringem Umfange Enzyme vorhanden sind, die D-Aminosäuren abbauen können (SALTON, 1964, SMITH, 1951, JANKE, 1950/51). Man darf annehmen, daß solche Enzyme vorwiegend bei den Mikroorganismen selbst anzutreffen sind.

BALKE und GANDER (1965) beschreiben den Metabolismus von D-Tyrosin in Keimlingen von Sorghum vulgare, während KICKUTH und ALDAG (1967) den Einfluß der nicht-proteinogenen Aminosäuren D-Tryptophan, D-Phenyl-Alanin, D-Valin und D-Methionin auf Oldenburger Weidelgras untersuchten.

GRAY und HENDLIN (1962) erzielten bei Bohnenpflanzen und Euglena Wachstumshemmungen durch O-Methylthreonin, die durch Isoleucin aufgehoben werden konnten. GRAY und Mitarbeiter (1964) berichteten von einem neuen Wachstumsinhibitor bei Pflanzen, der von Penicillium purpurescens gebildet wird. Die Verbindung wurde als N-Formylhydroxyaminoessigsäure identifiziert und Hadacidin genannt.



Hadacidin

Abb. 2: Hadacidin

OWEN und WRIGHT (1965) isolierten eine phytotoxisch wirkende Aminoverbindung aus Sojabohnenknöllchen und aus jungen chlorotischen Blättern.

Von besonderem Interesse ist die direkte Einwirkung der Mikroflora auf die Pflanze. Die Mikroorganismen als Produzenten einer Reihe von Antibiotika, Wirk- und Wuchsstoffen sind ein bedeutender Faktor für die Anreicherung des Bodens mit organischen Verbindungen.

Die Aufnahme von Antibiotika direkt durch die Pflanzenwurzel konnte KRÜGER (1961) nachweisen. Ebenfalls konnten SCHÖNBECK (1962), SCHEFFER (19) und KlOKE (1954) dieses bestätigen. (siehe auch WINTER, 1952, BRIAN, 1951, LEH, 1960, REPKA und MACKO, 1964, WINKLER und MÜLLER, 1964)

Die Antibiotika sollen besonders erwähnt werden, weil an ihrem Aufbau oft N-Alkyl- bzw. NN-Dialkyl-Verbindungen beteiligt sind. Hier seien nur einige aufgeführt:
Echinomycin aus Streptomyces echinatus, Enniatin A und B aus Fusarium orthoceras, Etamycin (Viridogrisein) aus Streptomyces spec. auch lavandulae und Actinomycin C aus Streptomyces chrysomallus und antibioticus. (siehe dazu auch ALEXANDER, 1961, WAKSMANN, 19 , LECHEVALIER, 1953 und COCHRANE, 1961)

Untersuchungen von LEH (1960) an Erbsen und Sonnenblumen zeigten eindeutig, daß antibiotische Substanzen sowohl stimulierend wirken als auch Chlorosen, Nekrosen und Blattveränderungen hervorrufen können.

REPKA und MACKO (1964) stellten eine Steigerung des Korn- und Strohertrages bei Getreide durch Penicilliummycel fest. Der positive Einfluß auf das Wachstum der Leguminosen durch verschiedene Rhizobiumarten ist ebenfalls seit langem bekannt. (SILNIKOVA, 1963) Kulturen von Azotobacter und Chlostridien fördern das Wachstum von Weizen und Mais, Tomaten ließen dagegen keine Wirkung erkennen.

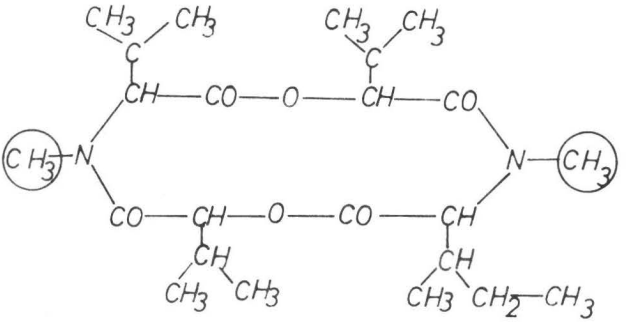


Abb. 3: Enniatin A

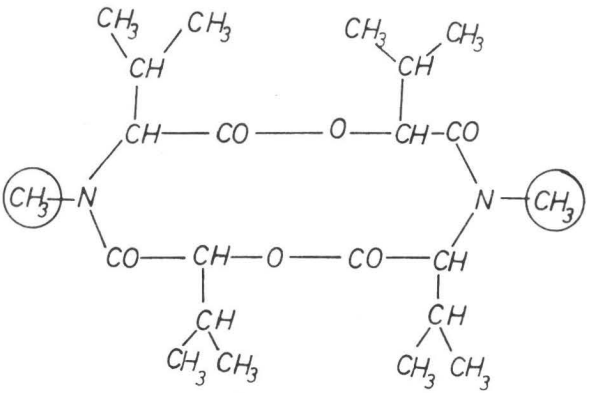


Abb. 4: Enniatin B

Die aus der älteren Literatur bekannten Enniatine A und B (s. Abb. 3 und 4) verursachen bei Tomaten eigentümliche Welkeerscheinungen. (PLATTNER und NAGER, 1948). Am Ringaufbau ist N-Methyl-Valin beteiligt. (PLATTNER und NAGER, 1948, BIRKINSHAW und STICKINGS, 1962).

Das DL-N-Methyl-Valin ist ferner am Aufbau einer Reihe ande-

rer Antibiotika beteiligt, z.B. an den von COOK, COX und FARMER (1949), BROCKMANN (1964) und SARLET (1954) beschriebenen.

Im Peptidring des Etamycins (Abb. 2) finden wir ebenfalls eine unnatürlich konstituierte Aminosäure, das ß-NN-Dimethyl-Leucin:

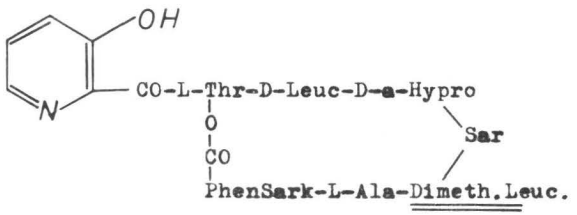


Abb. 5: Etamycin

Einen ausgezeichneten Überblick über chemische und biologische Eigenschaften von mehr als 40 Antibiotika bieten die von BODANSKY und PERLMANN (1964) aufgestellten Tabellen.

Bisher ist nicht bekannt, daß L-NN-Dimethyl-Aminosäuren von der höheren Pflanze aufgenommen und metabolisiert werden.

Hinsichtlich der Aufnehmbarkeit dieser Verbindung durch die Pflanze bestand für uns von vornherein nur geringer Zweifel. Die außerordentlich zahlreichen Publikationen zur Frage der Aufnehmbarkeit organischer Verbindungen durch die Pflanzenwurzel haben unsere Vorstellungen über Selektionen bei der Stoffaufnahme erheblich modifiziert und zwar dahingehend, daß wir heute kaum noch Grenzen hinsichtlich Größe, Gestalt und Funktion eines organischen Moleküls für dessen Aufnehmbarkeit festlegen können. Es scheint auch nach den Erfahrungen unseres Arbeitskreises keinen prinzipiellen Hemm-Mechanismus zu geben, so daß zum mindesten Stoffe beliebiger Konstitution

mit dem allgemeinen Stoffstrom in den Innenraum der Pflanze gelangen können.

Daß nicht alle diese Verbindungstypen von der Pflanze ohne Schädigung vertragen, geschweige denn metabolisiert werden können, ist selbstverständlich. Zwar verfügen die höheren Pflanzen über eine Reihe von Entgiftungsreaktionen - von denen oben kurz die Rede war -, und sie verfügen auch mit ihrer Vakuole über ein Inkretionsorgan, mit dem wenigstens teilweise die beim Tier entwickelten Exkretionsprozesse ersetzt werden können. Jedoch sind bei der Pflanze, wenigstens bei der höheren grünen Pflanze, diese Mechanismen infolge ihrer fast ausschließlich autotrophen Ernährung vergleichsweise schwach entwickelt.

Andererseits lassen sich auch bei der höheren grünen Pflanze metabolische Leistungen nachweisen oder auch induzieren, mit deren Hilfe bestimmte metabolische Probleme, die mit der Aufnahme von Fremdstoffen auftauchen, bewältigt werden können. So hat ALDAG (1966) in seiner Arbeit den Abbau von Methyl-amin und N-Methyl-Valin in Sonnenblumen nachweisen und zum Teil aufklären können, von zwei Verbindungen also, die nicht von der Sonnenblume selbst synthetisiert werden, und für die a priori in der Pflanze auch kein ausreichendes enzymatisches Instrumentarium vorhanden sein dürfte.

Immerhin wird man damit rechnen können, daß eine Verbindung wie das N-Methyl-Valin noch verhältnismäßig einfach durch oxydative Desaminierung über die unspezifische Bindung an das Pyridoxalphosphat (Snell'sche Reaktion) erfolgen kann. Diese Reaktionsmöglichkeit haben wir jedoch durch die mit voller Absicht getroffene Wahl einer NN-Dimethyl-Aminosäure zunächst unterbunden. Sollte die Pflanze dennoch in der Lage sein, diese Verbindung zu katabolisieren, so wird sie auf jeden Fall andere Wege beschreiten müssen, deren Aufklärung eines der Ziele dieser Arbeit ist.

Daneben sollten selbstverständlich auch mögliche morphologische oder physiologische Erscheinungen an der Pflanze, wie sie bei der Aufnahme stoffwechselfremder Substanzen häufig auftreten, (WOLTZ und Mitarbeiter, 1961, GRAY und HANDLIN, 1962) beobachtet und beschrieben werden.

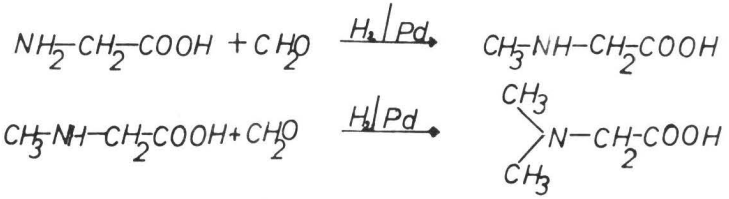
3. Methoden und Ergebnisse

3.1 NN-Dimethylaminosäuren

Die Ergebnisse der Dissertation ALDAGs (1966) boten eine interessante Basis für weitere Untersuchungen mit "unnatürlich" konstituierten Aminosäuren. Unsere Untersuchungen befassen sich mit L-NN-Dimethyl-Aminosäuren. Als Vertreter wurden die L-NN-Dimethyl-Derivate folgender sieben Aminosäuren ausgewählt:
L-Leucin, L-Valin, L-Phenylalanin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Lysin, L-Alanin.
Unsere besondere Aufmerksamkeit galt dem L-NN-Dimethyl-Valin, dessen monosubstituiertes Derivat ALDAG (1966) untersucht hatte.

3.1.1 Synthese chromatographisch reiner L-NN-Dimethylaminosäuren

Die Synthese der NN-substituierten Aminosäuren erfolgte nach der von BAUMANN und STROUD (1950) beschriebenen Methode der Alkylierung von Aminosäuren durch reduktive Kondensation mit Formaldehyd in Wasserstoff-Atmosphäre in Anwesenheit von Palladium/Aktivkohle als Katalysator. Die Reaktion erfolgt nach dem Schema:



Die exakte Anlehnung an die Vorschrift von BAUMANN und STROUD (1950) in bezug auf die Mengenverhältnisse Formaldehyd - Aminosäuren, lieferte chemisch reine Präparate. Für

unsere Zwecke erwiesen sie sich als nicht rein genug. Wir änderten das Verfahren insofern, als wir

1. nach dem Ende der eigentlichen Hydrierung das Reaktionsprodukt nochmals mit einer kleinen Menge Formaldehyd versetzten und bis zur Sättigung weiterhydrierten. Das als Nebenprodukt entstandene Paraformaldehyd ließ sich mühelos durch mehrmaliges Verdampfen am Rotationsverdampfer entfernen;

2. die Rohprodukte zum Teil aus absolutem Äthanol-Petroläther auskristallisierten anstelle von Äthanol-Aceton bzw. wässrigem Äthanol-Aceton. Die Ausbeuten sind fast quantitativ.

Aus den Mutterlaugen erhalten wir beim Eindampfen einen Rückstand, der sich nicht mehr auskristallisieren läßt, und den wir als stark verschmutzte L-NN-Dimethyl-Aminosäure identifizierten. Die von uns isolierten Präparate erwiesen sich als biologisch rein. (chromatographischer Vergleich, Abb.)

3.1.2 Darstellung von radioaktivem L-NN-Dimethyl-Valin

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von BAUMANN und STROUD (1950). Hier wurde neben normalem Formaldehyd auch radioaktives zugesetzt, so daß bei einem Millimolansatz eine Aktivität von 60 μ C vorhanden war, ausreichend für 10 Pflanzen. (siehe experimenteller Teil)

3.1.3 Analytische Daten der L-NN-Dimethylverbindungen

Gewisse Schwierigkeiten traten auf bei dem Versuch, die gewonnene Substanz kristallin zu erhalten. Die von den Autoren angegebenen Lösungsmittel führten zu mangelhaft ausgebilde-

ten Kristallen, und der Reinheitsgrad war unbefriedigend (chromatographischer Nachweis).

Zum Erfolg führte ein Gemisch aus Äthanol-Petroläther, aus dem wir chromatographisch reine Präparate gewinnen konnten. Charakteristisches Merkmal dieser Verbindungen ist die starke Hygroskopizität und das Ausbleiben einer Färbung mit Ninhydrin.

Ihre Rf-Werte auf dem Papierchromatogramm (System: n-Butanol-Eisessig-Wasser, 4 : 1 : 1, vol. aufsteigend) liegen höher als die Rf-Werte der nicht substituierten L-Aminosäuren, wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist:

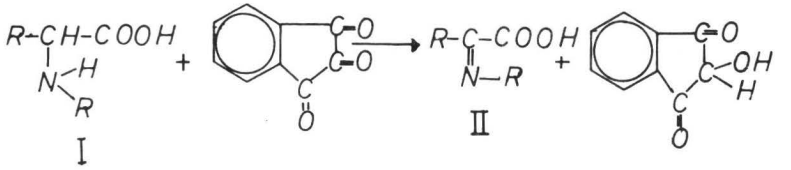
Substanzen	Rf-Werte		Test
L-NN-Dimeth.Leucin	70,0	64,0	Leucin
L-NN-Dimeth.Ph.Alanin	56,5	54,0	Phenyl-Alanin
L-NN-Dimeth.Valin	61,5	50,5	Valin
L-NN-Dimeth.Alanin	41,3	30,8	Alanin
L-NN-Dimeth.Glutam/re	36,2	22,0	Glutaminsäure
L-NN-Dimeth.Glycin	34,1	19,1	Glycin
L-NN-Dimeth.Lysin	22,9	12,6	Lysin

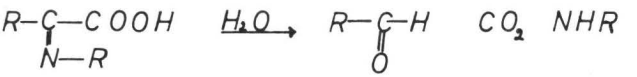
Tab. 1: Rf-Werte der L-NN-Dimethyl-Aminosäuren in Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 1)

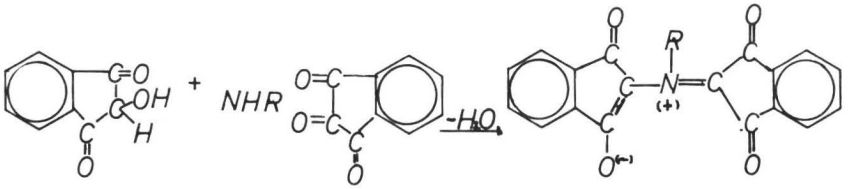
Es gibt hier offenbar keine konstanten Rf-Inkremente oder Inkrementzuwachse für zwei zusätzliche Methyl-Gruppen, die man für eine "Blindlokalisierung" hätte auswerten können.

3.1.4 Anfärbeverfahren für L-NN-Dimethylaminosäuren

Der papierchromatographische Nachweis, die Farbreaktion mit Ninhydrin, bereitet keine Schwierigkeiten, sofern es sich um Aminosäuren, Peptide, Amine oder Proteine handelt.



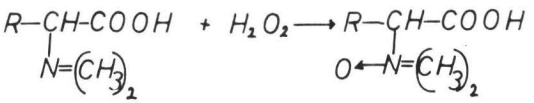


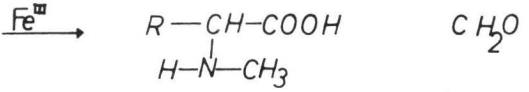


Wie das Reaktionsschema zeigt, dehydriert das Triketohydrinden (Ninhydrin) die Aminosäure zur Iminosäure und geht dabei selbst in den entsprechenden Alkohol über. Die Iminosäure zerfällt in den nächst niederen Aldehyd, Kohlendioxid und Ammoniak bzw. das primäre Amin, das mit dem noch vorhandenen Ninhydrin unter Kondensation den Farbstoff bildet. Im Falle einer

NN-Dimethyl-substituierten Aminosäure, in welcher der Stickstoff tertiär substituiert vorliegt, wird der zur Ammoniak- oder Aminbildung unerläßliche Reaktionsschritt I ⟶ II unterbunden, da kein Proton am Stickstoff vorhanden ist. Dadurch ist der chromatographische Nachweis der L-NN-Dimethyl-Aminosäuren auf diesem Wege unmöglich. Auf der Suche nach einem geeigneten Verfahren zur Sichtbarmachung solcher Verbindungen prüften wir die Anwendbarkeit des von SWEELEY und HORNIG (1957) beschriebenen Verfahrens, welches sie zum Nachweis geringer Mengen tertiärer Amine neben sekundären entwickelten.

Die Methode beruht auf der Bildung des N-Oxids einer Dimethyl-Aminosäure durch Oxydation der Dimethylverbindung mit Wasserstoffperoxid in schwach alkalischer Lösung. Dieses ergibt eine positive Ninhydrinreaktion. Die Natur der Reaktion geben die Autoren als unbekannt an. Es spricht jedoch einiges dafür, daß hier die Oxydation und Eliminierung einer Methyl-Gruppe als Formaldehyd stattgefunden hat, wobei sich das entstehende Monomethylderivat an der Farbstoffbildung beteiligt.





Dieses Verfahren erwies sich jedoch in unserem Fall als nicht anwendbar, weil wir mindestens einen Teil des aminosäurehaltigen Pflanzenextraktes aggressiven Reaktionsbedingungen unterwerfen mußten, deren Folge eine Verwischung des Aminosäurespektrums auf dem Chromatogramm war.

Versuche unter ähnlichen Reaktionsbedingungen direkt auf dem Papierchromatogramm führten zu keinem greifbaren Ergebnis. Unsere Bemühungen konzentrierten sich darauf, ein Verfahren zu entwickeln, welches den direkten Nachweis auf dem Chromatogramm gestattet.

Es gelang uns schließlich, durch Besprühen (Baden) des Chromatogramms mit gesättigter Lösung von Blei(IV)Acetat in Toluol und anschließende mehrstündige Lufttrocknung mit Ninhydrin eine positive Farbreaktion zu erzielen.

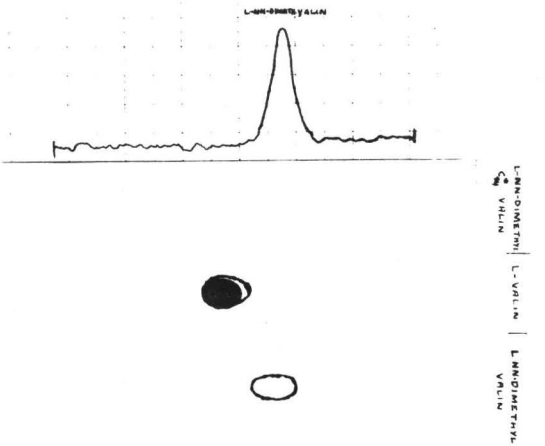


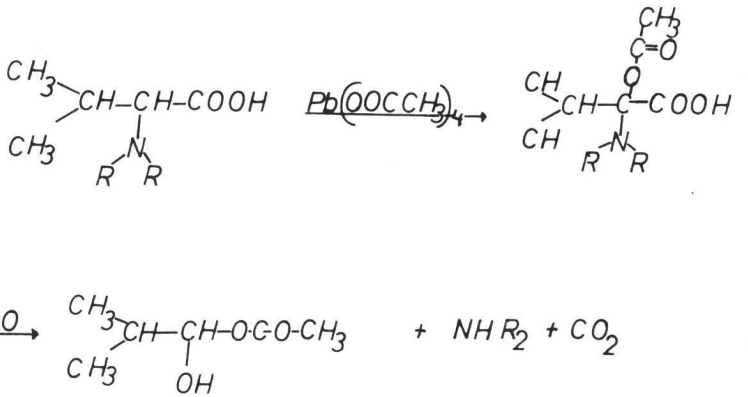
Abb. 6: Oben: Radiogramm des ^{14}C-L-NN-Dimethyl-Valins zum Dünnschicht-Chromatog.

Mitte: Dünnschicht-Chromatog. von L-NN-Dimethyl-Valin und L-Valin als Vergleichssubstanz (ohne Pb(IV)-acetatvorbehandlung) nach Ninhydrinfärbung

Unten: L-NN-Dimethyl-Valin nach Pb-IV-acetatvorbehandlung und Anfärbung mit Ninhydrin

Diese Reaktion ist als solche nicht in der Literatur bekannt. Jedoch herrscht Klarheit über die Angriffsweise des Pb-IV-Acetats auf organische Verbindungen allgemein (W. FÖRST, 1953).

Wir schlagen auf Grund dieser Tatsachen das folgende Reaktionsschema für die Einwirkung von Pb-IV-Acetat auf NN-Dimethyl-Aminosäuren vor, ein Reaktionsschema, das die Bildung ninhydrinpositiver Substanzen zwanglos erklärt.



Die Reaktion ähnelt der von TURNER und SCHMERZLER (1954) beschriebenen Abspaltung C-terminaler Aminosäuren aus einem Peptid durch Einführung einer Acetyl-Gruppe.

3.2 Pflanzenversuche mit L-NN-Dimethylaminosäuren

3.2.1 Pflanzenwahl, Aufzucht der Pflanzen (nicht steril)

Nachdem das Problem der Lokalisierung und Identifizierung der L-NN-Dimethyl-Aminosäuren auf dem Chromatogramm gelöst war, wurden die Pflanzenversuche angesetzt.

Unsere Versuche wurden zunächst in Hydrokultur (nicht steril) durchgeführt, um eventuell auftretende Wachstums- oder morphologische Veränderungen feststellen zu können.

Helianthus annuus-Pflanzen (5 Tage alt, ungarische Herkunft) wurden einzeln auf 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer modifizierten Hoagland-Arnon-Nährlösung angezogen. (Nähere Einzelheiten über Vorkeimen, Anzuchtmethoden, Zusammensetzung der Nährlösung, Ernteverfahren, Aufarbeitung der Extrakte werden im experimentellen Teil besprochen.)

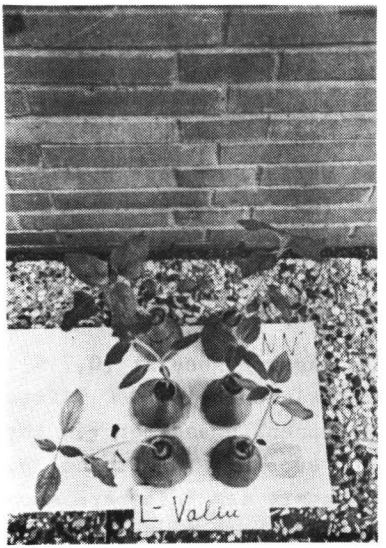


Abb. 7: Chlorosesymptome, hervorgerufen durch L-Valin-Zugabe im Nährsubstrat

Die L-NN-dimethylierten Aminosäuren: L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Valin, L-Alanin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Lysin, wurden in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l der Nährlösung zugegeben. Parallel wurde ein Versuch mit der entsprechenden Konzentration der natürlichen L-Aminosäuren durchgeführt. Nach einer Versuchsdauer von 4 Tagen zeigten die mit den natürlichen L-Aminosäuren angezogenen Pflanzen Chlorosesymptome: Die jungen Blätter begannen, vom Stengel her sich gelb zu verfärben. Die mit L-NN-Dimethyl-Aminosäuren behandelten Pflanzen zeigten keine wahrnehmbaren Symptome. Auf eine Aufarbeitung der Pflanzen wurde verzichtet.

3.2.2 Sterile Aufzucht

Die Frage, ob die höhere Pflanze in der Lage ist, solche "unnatürlich" konstituierten Aminosäuren über die Wurzel aufzunehmen, und gegebenenfalls zu metabolisieren, wurde durch die Versuche ALDAGs (1966) mit DL-N-Methyl-Valin und DL-N-Methyl-Leucin an Lupinus angustifolius, Lupinus luteus, Solanum lycopersicum und Helianthus annuus, eindeutig beantwortet. Unsererseits wurde ausschließlich Helianthus annuus als Versuchspflanze verwendet. In Zukunft sollte nur noch mit Sterilkulturen gearbeitet werden, um alle Einflüsse von Mikroorganismen auszuschalten. (Helianthus annuus läßt sich auf Grund seines Längenwachstums gut auf Agarnährsubstrat kultivieren.) Von Vorteil für die sterile Anzucht von Pflanzen erwies sich die Methode von LORENZ.

Der Nährlösung wurde Difco-Agar zugesetzt (0,7 %) und das Nährsubstrat 20 min im Autoklaven bei 120°C (1,2Atm) sterilisiert. Wir befreiten die Sonnenblumensamen von ihrer Samenschale und beizten sie 100 sec lang in Methanol p.a. Anschließend wurden die Samen mit dem Endosperm nach unten gerichtet in das erkaltete Nährsubstrat gesetzt. Während dieses Vorgangs werden die Samen in sterilem Wasser aufbewahrt. Als

Kulturgefäße dienten Reagenzgläser von 90 ml Inhalt, die mit einem Wattebausch verschlossen wurden. Nach 4 - 6 Tagen hatten sich die Keimlinge soweit entwickelt, daß der Sproß unter möglichst sterilen Bedingungen (UV-Lampe) an der Watte vorbeigeführt werden konnte. Im Durchschnitt aller Versuche konnten über 90 % der angesetzten Pflanzen steril aufgezogen werden.

Die Versuchsanordnung ist folgende: Jeweils 10 Sonnenblumen-Pflanzen wurden unter Zusatz einer der sieben L-NN-Dimethyl-Aminosäuren in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l steril aufgezogen, eine Kontrollreihe wurde parallel aufgezogen.

3.2.3 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Nach einer Versuchsdauer von etwa 18 Tagen haben wir die Pflanzen geerntet und die alkohollöslichen Aminosäuren des Sprosses analysiert. Wie aus den Übersichten 1 - 7 zu entnehmen ist, konnte neben der eindeutigen Aufnahme der zugesetzten L-NN-Dimethyl-Aminosäuren bzw. dem Auftreten der L-N-Methyl-Derivate keine nennenswerte Veränderung des Aminosäurespektrums gegenüber dem der Kontrollpflanzen beobachtet werden.

Übersicht 1

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Valin bei
Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Valin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	+
Phenylalanin	++	-
Valin	++	+
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	-	+
Prolin	+	+
Alanin	++	++
Serin	-	-
Threonin	-	+
Glutaminsäure	++	++
Glycin	++	++
Asparaginsäure	+	-
Histidin	-	-
Arginin	-	-
Ornithin	-	-
Lysin	++	++
Cystein	+	+
L-N-Methyl-Valin	-	+++

Kulturgefäße dienten Reagenzgläser von 90 ml Inhalt, die mit einem Wattebausch verschlossen wurden. Nach 4 - 6 Tagen hatten sich die Keimlinge soweit entwickelt, daß der Sproß unter möglichst sterilen Bedingungen (UV-Lampe) an der Watte vorbeigeführt werden konnte. Im Durchschnitt aller Versuche konnten über 90 % der angesetzten Pflanzen steril aufgezogen werden.

Die Versuchsanordnung ist folgende: Jeweils 10 Sonnenblumen-Pflanzen wurden unter Zusatz einer der sieben L-NN-Dimethyl-Aminosäuren in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l steril aufgezogen, eine Kontrollreihe wurde parallel aufgezogen.

3.2.3 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Nach einer Versuchsdauer von etwa 18 Tagen haben wir die Pflanzen geerntet und die alkohollöslichen Aminosäuren des Sprosses analysiert. Wie aus den Übersichten 1 - 7 zu entnehmen ist, konnte neben der eindeutigen Aufnahme der zugesetzten L-NN-Dimethyl-Aminosäuren bzw. dem Auftreten der L-N-Methyl-Derivate keine nennenswerte Veränderung des Aminosäurespektrums gegenüber dem der Kontrollpflanzen beobachtet werden.

Übersicht 1

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Valin bei
Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Valin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	+
Phenylalanin	++	-
Valin	++	+
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	-	+
Prolin	+	+
Alanin	++	++
Serin	-	-
Threonin	-	+
Glutaminsäure	++	++
Glycin	++	++
Asparaginsäure	+	-
Histidin	-	-
Arginin	-	-
Ornithin	-	-
Lysin	++	++
Cystein	+	+
L-N-Methyl-Valin	-	+++

Übersicht 2

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Leucin bei
Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus 0-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Leucin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	+
Phenylalanin	++	-
Valin	++	+
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	-	+
Prolin	+	+
Alanin	++	++
Serin	-	-
Threonin	-	+
Glutaminsäure	++	+
Glycin	++	+
Asparaginsäure	+	+
Histidin	-	+
Arginin	-	+
Ornithin	-	+
Lysin	++	+
Cystein	+	+
L-N-Methyl-Leucin	-	++

Übersicht 3

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Alanin bei
Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Sterilkultur:
Alter der Pflanzen: 20 Tage

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Alanin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	+++
Phenylalanin	++	+
Valin	++	-
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	+	+
Prolin	+	-
Alanin	++	+
Serin	-	+
Threonin	-	+
Glutaminsäure	++	+
Glycin	++	+
Asparaginsäure	+	(+)
Histidin	-	+
Arginin	-	-
Ornithin	-	+++
Lysin	+	+
Cystein	+	+
L-N-Methyl-Alanin	-	+++

Übersicht 4

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Phenylalanin bei Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Phenylalanin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	++
Phenylalanin	++	+
Valin	++	+
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	+	+
Prolin	+	-
Alanin	++	++
Serin	-	-
Threonin	-	-
Glutaminsäure	++	+
Glycin	++	+
Asparaginsäure	+	+
Histidin	-	+
Arginin	-	-
Ornithin	-	+
Lysin	+	+
Cystein	+	-
L-N-Methyl-Phenylalanin	-	+++

Übersicht 5

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Glutaminsäure bei Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Glutaminsäure 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	+
Phenylalanin	++	-
Valin	++	+
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	+	+
Prolin	+	+
Alanin	++	(+)
Serin	-	-
Threonin	-	-
Glutaminsäure	++	+
Glycin	++	+
Asparaginsäure	+	Histamin (+)
Histidin	-	+
Arginin	-	+
Ornithin	-	(+)
Lysin	+	+
Cystein	+	+
L-N-Methyl-Glutaminsäure	-	+++

Übersicht 6

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Glycin bei
Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus + L-NN-Dimethyl-Glycin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	++
Phenylalanin	++	-
Valin	++	++
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	+	+
Prolin	+	+
Alanin	++	++
Serin	-	(+)
Threonin	-	-
Glutaminsäure	++	+
Glycin	++	++
Asparaginsäure	+	+
Histidin	-	Histamin (+)
Arginin	-	-
Ornithin	-	+
Lysin	+	+
Cystein	+	-
L-N-Methyl-Glycin	-	+++

Übersicht 7

Aufnahme von L-NN-Dimethyl-Lysin bei
Helianthus annuus (ungarischer Herkunft)

Sproß:
Konzentration: 10^{-3} Mol/l
Alter der Pflanzen: 20 Tage
Sterilkultur:

Aminosäuren	Helianthus annuus O-Serie	Helianthus annuus +L-NN-Dimethyl-Lysin 10^{-3} Mol/l
Leucin	++	++
Phenylalanin	++	-
Valin	++	++
Methionin	+	++
γ-Aminobuttersäure	+	+
Prolin	+	+
Alanin	++	++
Serin	-	-
Threonin	-	+
Glutaminsäure	++	+
Glycin	++	++
Asparaginsäure	+	+
Histidin	-	(+)
Arginin	-	-
Ornithin	-	-
Lysin	+	+
Cystein	+	+
L-N-Methyl-Lysin	-	+++

3.2.4 Einwirkung von L-NN-Dimethylaminosäuren auf Trockensubstanzbildung und Salzaufnahme bei Helianthus annuus

Die folgenden Untersuchungen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Dem Nährsubstrat wurde als Vertreter der "unnatürlich" konstituierten Aminosäuren eine der folgenden sieben L-NN-Dimethylderivate der L-Aminosäuren in einer Konzentration von jeweils 10^{-3} Mol/l zugesetzt.
L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Valin, L-Alanin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Lysin.

Wir ließen die Pflanzen solange wachsen, bis das Nährsubstrat zu 85 % aufgezehrt war. Aus diesem Grund sind die Pflanzen zur Zeit der Ernte nicht alle gleich alt. Dieser Nachteil wurde in Kauf genommen, damit genügend Trockensubstanz zur Bestimmung der Nährstoffe Kalium, Calcium und Phosphor zur Verfügung stand.

Aus der Tabelle läßt sich erkennen, daß die L-NN-Dimethyl-Aminosäuren sowohl auf die Kationenaufnahme als auch auf die Phosphataufnahme keinen sichtbaren Einfluß nehmen.

Die Werte in Tab. 2 repräsentieren die Durchschnittswerte der von 6 Pflanzen jeweils aufgenommenen Nährstoffmenge. Die Übersicht zeigt, daß die applizierten Aminosäuren keine Hemmung der Salzaufnahme hervorrufen. Aus diesem Grunde wurde auf eine weitere Untersuchung in dieser Richtung verzichtet, da sich unsere Bemühungen auf die Fähigkeit der Metabolisierung dieser Aminosäuren richten sollten, nachdem wir festgestellt hatten, daß die Sonnenblume die "unnatürlich" konstituierten Aminosäuren aufzunehmen vermag.

Helianthus annuus Sterilkultur		Aufgenommene Durchschnittsmenge pro Pflanze		
Applizierte L-NN-Dim.-Aminosäuren	Durchschn. Trockensubstanz (mg)	K (mg)	Ca (mg)	P (mg)
L-NN-Dim.Leuc.	106,20	2,64	4,68	0,89
L-NN-Dim.Ph.Ala.	116,13	2,88	4,70	0,85
L-NN-Dim.Val.	120,21	3,06	5,05	0,72
L-NN-Dim.Ala.	114,00	2,58	4,57	0,67
L-NN-Dim.Gluts.	107,12	2,92	4,40	0,96
L-NN-Dim.Gly.	103,00	2,05	3,51	0,87
L-NN-Dim.Lys.	128,23	3,23	5,23	0,68
O-Serie	111,03	2,51	4,83	0,68

Tab. 2: Salzaufnahme bzw. Nährstoffgehalt in behandelten Helianthus-Pflanzen

3.2.5 Aufnahme und Metabolisierung von C^{14}markierten L-NN-Dimethyl-Valin durch Helianthus annuus

Die chromatographische Auswertung der nicht sterilen Versuche ließ erkennen, daß die Pflanze beim Abbau der sieben Dimethyl-Aminosäuren jeweils den gleichen Weg einschlägt (soweit er zu verfolgen war).

Aus diesem Grund erschien uns die Fortführung unserer Untersuchungen mit sieben radioaktiv markierten Präparaten un-

zweckmäßig. Wir entschlossen uns, alle weiteren Untersuchungen mit L-NN-Dimethyl-Valin durchzuführen. Zudem bietet diese Verbindung interessante Vergleichsmöglichkeiten zu den Untersuchungen ALDAGs mit DL-N-Methyl-Valin.

3.3 Analyse und Befunde am Pflanzenmaterial

Es interessierte die Frage, ob das L-NN-Dimethyl-Valin nur in der Pflanzenzelle akkumuliert wird, oder unter geeigneten Bedingungen ein Abbau der Methylgruppen erfolgen kann.

In der Reihe der nicht sterilen Versuche konnten wir chromatographisch feststellen, daß die Pflanze mindestens eine Methylgruppe abspaltet. Das Schicksal dieses Fragments jedoch ließ sich nicht weiter verfolgen.

Es galt also, ein C^{14}markiertes Präparat darzustellen und dieses der Pflanze anzubieten.

Zu diesem Zweck wurden 117 mg Valin entsprechend der von uns modifizierten Vorschrift von BOWMANN und STROUD (1950) mit C^{14}markiertem Formaldehyd umgesetzt. Die Zugabe wurde so berechnet, daß das erhaltene Präparat 60 µ C pro m/Mol enthielt.

Wie auf S. 18 beschrieben wurde, gelang uns die Darstellung chromatographisch reiner Präparate.

Abb. 8:

Chromatographisch reines L-NN-C^{14}-Dimethyl-Valin

L-NN-DIMETH-VALIN C^{14}

3.3.1 Aminosäuren (Sproß)

Die Gesamtmenge der radioaktiven Substanz wurde auf ein Agarnährsubstrat von 1 l verteilt.
Die Konzentration des L-NN-Dimethyl-Valins betrug 10^{-3} Mol/l.
Die Aktivität betrug 60 μ C pro l.

Die Pflanzen wurden steril aufgezogen und nach 18 Tagen geerntet, die alkohollöslichen Aminosäuren, Neutralstoffe und organischen Säuren des Sprosses chromatographisch identifiziert (Einzelheiten siehe experimentellen Teil).

Beim Chromatographieren stellte sich heraus, daß aus den ursprünglich freien A-S am Austauscher Peptide entstanden. Aus diesem Grunde wurde die Aminosäurefraktion einer 6stündigen Hydrolyse mit 6 HCl unterworfen. Nach Entfernen der Salzsäure wurden Chromatogramme angefertigt, deren radiographische Auswertung wir im folgenden beschreiben.

Anhand von Vorversuchen stellten wir auf dem Radiogramm zwei radioaktive Komponenten fest. Die eine konnten wir als N-Monomethyl-Valin identifizieren, auf Grund seines R_f-Wertes und der charakteristischen purpurroten Färbung, die nach einiger Zeit in Rot übergeht. Die zweite Komponente konnten wir zunächst nicht einwandfrei zuordnen. Nach unserer Auffassung konnte es Methionin sein, Gewißheit verschaffte ein Doppelsegment-Chromatogramm nach KICKUTH (1963) (aufsteigend). Auf diesem konnte der zweite Peak als Methionin erkannt werden (Abb. 9).

Bemerkenswert erschien uns, daß im Sproß keine anderen markierten Aminosäuren nachzuweisen waren. Wie ALDAG (1966) berichtet, waren neben nicht umgesetztem DL-N-Methyl-Valin, die Aminosäuren Cystein, Alanin, Tyrosin und Tryptophan radioaktiv markiert. Die Aktivität dieser Aminosäuren scheint durchaus plausibel, wenn man die Übertragung einer oxydierten C_1-Einheit von der N-Methyl-Gruppe auf das Glycin und Bildung von

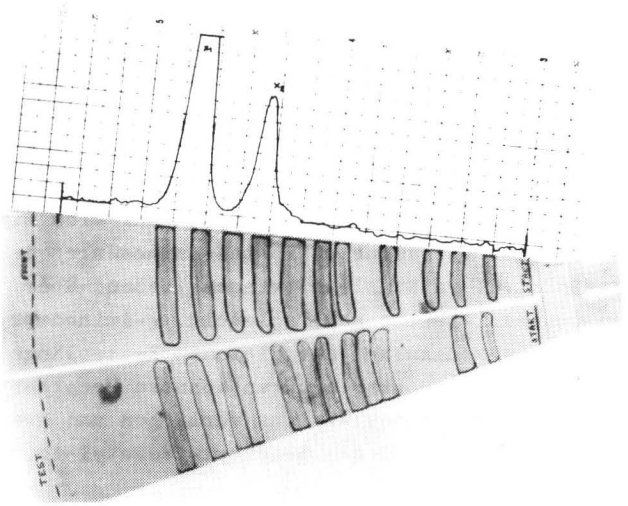


Abb. 9: Aminosäuren aus dem Sproß von Helianthus nach Dimethyl-Valin-Angebot

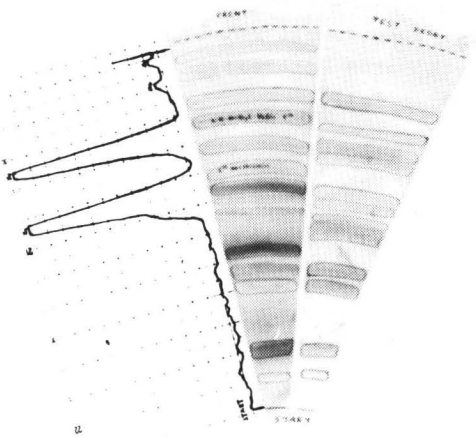


Abb. 10: Aminosäuren im Sproß von Helianthus nach Dimethyl-Valin-Angebot

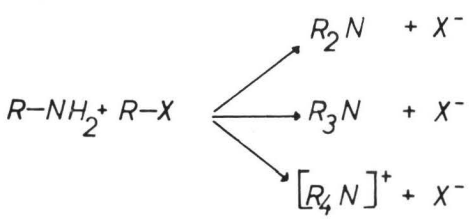
x 1 L-NN-Dimethyl-isobutyl-Amin
x 2 NN-Methyl-isobutyl-Amin
x 3 L-N-Methyl-Valin
x 4 Methionin

ß-C^{14}-Serin als Ausgangsreaktion ansieht.

Durch wiederholte Versuche, wobei größere Mengen Aminosäuren-Extrakt aufgetragen wurden, konnte im Bereich von Cystein, Serin, Alanin, Tyrosin und Tryptophan keine Aktivität gemessen werden. Stattdessen traten zwei schwach rote Zonen oberhalb von Leucin auf, die Aktivität aufwiesen und sich mit den R_f-Werten der aus der Literatur bekannten Aminosäuren der höheren Pflanzen nicht in Einklang bringen ließen. Über Leucin können unseres Wissens nur Isoleucin, α-Aminocaprylsäure und eine Reihe von Aminen der gleichen Kettenlänge auftreten. Nach theoretischen Überlegungen konnten Decarboxylierungsprodukte des L-NN-Dimethyl-Valins vorliegen und zwar das NN-Dimethyl-isobutyl-Amin und das N-Methyl-isobutyl-Amin.

Um diese Annahme zu prüfen, haben wir die betreffenden Amine präparativ dargestellt und auf dem Chromatogramm als Test laufen lassen. Das sekundäre und tertiäre Amin konnten wir durch Alkylierung von Isobutylamin erhalten. (J.GOERDELER, 1958) Von dem als Nebenprodukt entstehenden quarternären Amin lassen sie sich durch Ätherextraktion leicht abtrennen (siehe experimenteller Teil).

Allgemeines Alkylierungsschema



Wie aus Abb. 11 (S. 41) zu entnehmen ist, stimmen die R_f-Werte der von uns dargestellten Substanzen mit den R_f-Werten der aktiven Zonen im LINSKENS- (1955) System (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1) überein.

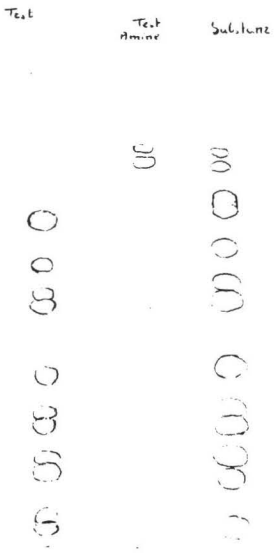


Abb. 11:

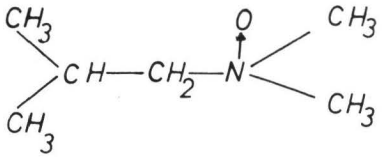
Testchromatogramm

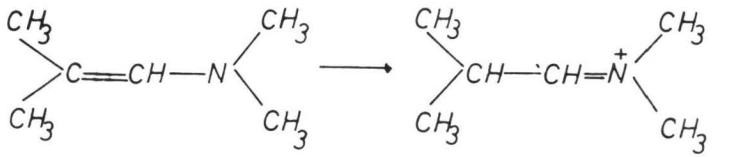
N-Methyl-isobutylamin
und NN-Dimethyl-isobutyl-
amin

Ein gewisser Widerspruch zu unseren bisherigen Ausführungen besteht darin, daß hier offenbar ein tertiäres Amin ninhydrin-positiv ist. Diese Reaktion des NN-Dimethyl-isobutylamins, ohne vorherige Behandlung des Chromatogramms mit Blei-IV-Acetat, konnte vorläufig nur auf Grund oxydativer Vorgänge während des Entwickelns erklärt werden (im Schema Weg I).

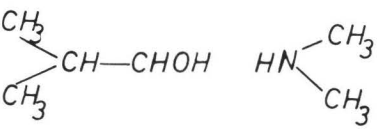
Es könnte aber auch eine C = C-Dehydrierung erfolgt sein, wobei das Ninhydrin als Wasserstoffakzeptor fungiert. Durch Umlagerung und Hydrolyse entsteht aus dem ersten Reaktionsprodukt ein sekundäres Amin und ein Alkohol (Weg II).

I





II



3.3.2 Organische Säuren (Sproß)

In der Fraktion der organischen Säuren des Sprosses konnten wir auf dem Papierchromatogramm keine Trennung der einzelnen Säuren erzielen. Das aufgenommene Radiogramm zeigt jedoch fast im gesamten Bereich Aktivität. (Abb. 12, S. 43)

Auch ALDAG (1966) gelang bei seinen Versuchen mit L-N-Methyl-Valin keine einwandfreie Trennung. Er konnte jedoch im Sproß der Sonnenblume drei radioaktive organische Säuren nachweisen: Citronensäure, Apfelsäure und Phosphoenol-BTS.

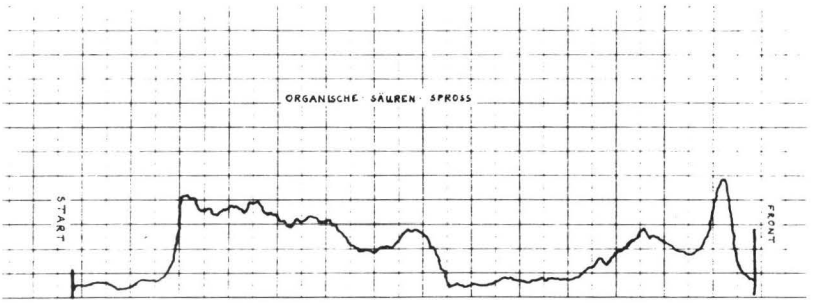


Abb. 12: Radiogramm organischer Säuren (Sproß) von Helianthus nach NN-Dimethyl-Valin-Behandlung

3.3.3 Aminosäuren (Wurzel)

In der Fraktion der Aminosäuren aus der Wurzel konnten wir kein aktives Methionin wie auch kein Glycin oder Serin nachweisen. In sehr hoher Konzentration war L-N-Methyl-Valin vorhanden.

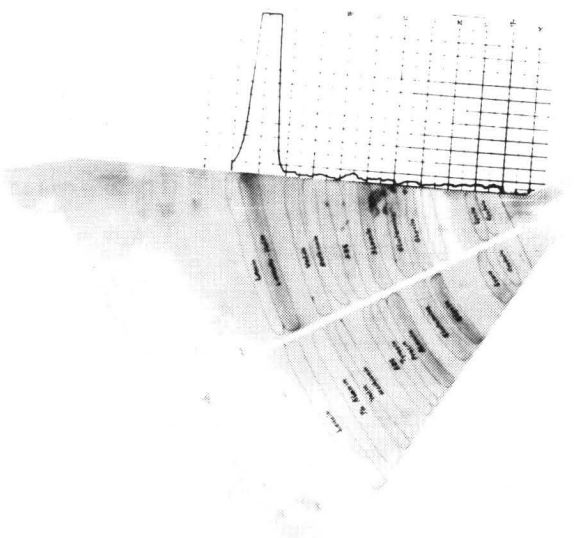


Abb. 13:

Radiogramm und Chromatogramm von Aminosäuren aus der Wurzel von Helianthus nach NN-Dimethyl-Valin-Behandlung

3.3.4 Organische Säuren (Wurzel)

Im Gegensatz zum Sproß konnten wir in den Wurzeln der Sonnenblume vier organische Säuren einwandfrei identifizieren: **Fumarsäure**, Äpfelsäure, Citronensäure und Weinsäure, die jedoch keine Aktivität aufwiesen.

Auf Grund der Erfahrungen ALDAGs wurde auf die Isolierung der Neutralstoffe verzichtet.

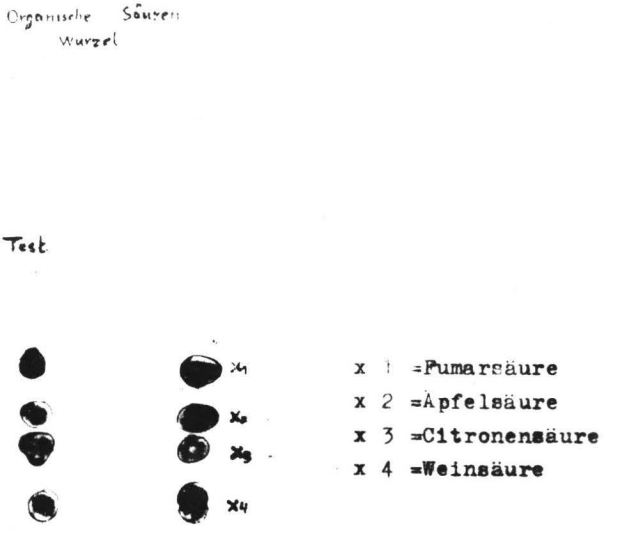


Abb. 14: Dünnschicht-Chromatogramm organischer Säuren (Wurzel)

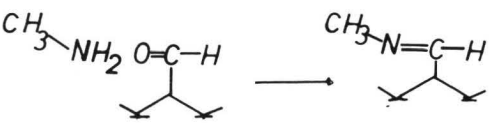
4. Diskussion

R. ALDAG (1966) teilt mit, daß Helianthus annuus die Fähigkeit besitzt, L-N-Methyl-Valin zu metabolisieren. Durch Applikation der C^{14}-markierten Verbindung, konnte er den Abbauweg der N-Methylgruppe verfolgen. Er stellte fest, daß in der Wurzel Methionin, Cystein, Serin, Homoserin, Tyrosin und Tryptophan markiert sind. Im Sproß konnte er ferner markierte Citronensäure nachweisen.

Seine Vergleichsversuche mit radioaktivem Methyl-Amin waren insofern interessant, als aus ihnen hervorging, daß dieses im Vergleich zum N-Methyl-Valin mit erheblich größerer Geschwindigkeit durch die Pflanze abgebaut wird.

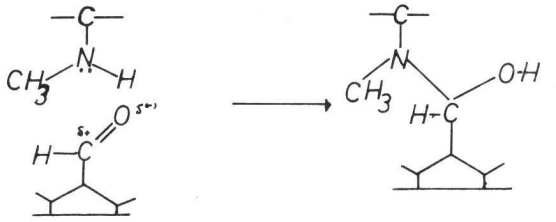
Dieser Unterschied wird verständlich, wenn man dem Abbau von aminofunktionellen Verbindungen das SCHNELLsche Reaktionsschema zugrunde legt. Bei dieser Reaktion wird das Amin bzw. die Aminosäure intermediär an das Pyridoxal-Phosphat unter Bildung einer SCHIFFschen Base gebunden, das entstehende resonanzfähige Gebilde kann durch Ladungsverschiebung die verschiedenen bekannten Zerfallsreaktionen von Aminoverbindungen einleiten.

Wie man dem nachfolgenden Reaktionsschema entnehmen kann, ist die Bildung einer SCHIFFschen Base aus Pyridoxal-Phosphat und Methyl-Amin und damit die Bildung des reaktiven Komplexes leicht möglich



Eine Reaktion des N-Methyl-Valins mit dem Pyridoxal-Phosphat führt, wie das folgende Reaktionsschema zeigt, nicht zur Bildung der echten SCHIFFschen Base, sondern zu einem Carbinol-

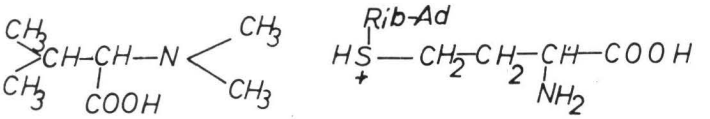
Amin, dessen weitere Reaktion zum mindesten erschwert ist. Ob eine solche Reaktion überhaupt möglich ist, wissen wir nicht. Es ist nach den Befunden ALDAGs durchaus möglich, daß eine C_1-Übertragung der weiteren Umsetzung am Pyridoxal-Phosphat vorausgehen muß.

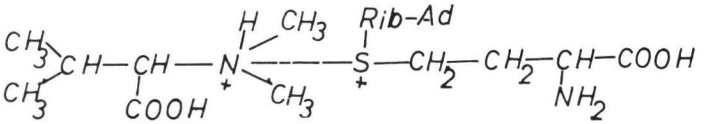


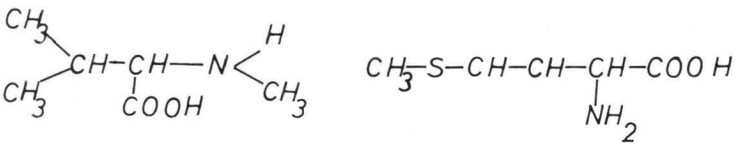
Für den Fall, daß man der Pflanze eine Verbindung mit tertiärem Stickstoff anbietet, und das ist bei unseren Versuchen mit L-NN-Dimethyl-Valin geschehen, besteht die Möglichkeit einer direkten Bindung an Pyridoxal-Phosphat nicht mehr.

Hier muß, wenn überhaupt eine Metabolisierung eintreten soll, der Angriff an einer anderen Stelle des Moleküls erfolgen. Er könnte z.B. in einer stufenweisen Oxidation der Säurekette bestehen. Dafür bietet aber weder die Arbeit ALDAGs noch unsere eigene irgendwelche Anhaltspunkte. Wir konnten indes einwandfrei sicherstellen, daß der einleitende Angriff auf solche Strukturen in einer nicht oxidativen Übertragung einer C_1-Einheit besteht. Dabei wird NN-Dimethyl-Valin in N-Methyl-Valin überführt und es entstehen äquivalente Mengen radioaktiven Methionins aus Homocystein.

Aus der Tatsache, daß bereits nach kurzer Zeit das ursprünglich applizierte Dimethyl-Valin in der Pflanze nicht mehr nachzuweisen ist, statt dessen aber aktives N-Methyl-Valin und aktives Methionin in etwa gleich großen Mengen vorliegen, folgt, daß dieser einleitende Schritt sehr schnell vor sich geht, es folgt auch daraus, daß die sich anschließenden Schritte wesentlich langsamer verlaufen.







Diese einfache C_1-Übertragung erklärt das Auftreten von markiertem Methionin im Sproß ohne weiteres.

Es könnte ein Hinweis sein, daß die Pflanze auf diese Weise die stoffwechselfremde Substanz vorerst zum Teil entmethyliert und an den Zellwänden in der Vakuole speichert, ohne sie vorerst in den Stoffwechsel einzuschleusen.

Von N-Methyl-Valin ausgehend konnte ALDAG (1966) in geringeren Mengen Aktivität in einigen Aminosäuren nachweisen, die sich nur über das Auftreten oxidierter C_1-Einheiten erklären läßt. Wir selbst konnten bei unseren Untersuchungen, bei denen ebenfalls intermediär N-Methyl-Valin gebildet wird, diesen Befund nicht bestätigen.

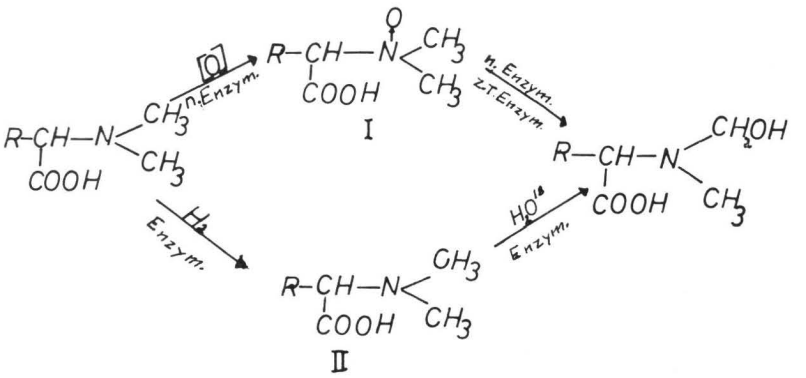
Das mag mit den veränderten Aufzuchtbedingungen zusammenhängen, wobei allerdings zu bemerken ist, daß auch in den Versuchen ALDAGs die Menge der markierten anderen Aminosäuren äußerst gering war.

Hingegen konnten wir in Übereinstimmung mit ALDAG auch Aktivität bei den Säuren des Citrat-Zyklus feststellen.

Wir dürfen also annehmen, daß auf jeden Fall auch Überträger für oxidierte C_1-Einheiten wirksam geworden sind. Als Überträger für C_1-oxidierte Einheiten ist im menschlichen und im tierischen Organismus (ROTHENBERG, 1965) wie auch in Bakterien (WHITELEY, OSBORN und HUENNEKENS, 1959), (RABINOWITZ und PRICER, 1962) die Tetrahydrofolsäure bekannt. HIAT (1965) konnte jüngst Tetrahydrofolsäure auch in Pflanzen nachweisen. Er konnte sie aus Spinat, Erbsen, Bohnen und Tabakpflanzen isolieren. WANG und BURRIS (1965), McCONNELL und FINDLAYSON (1961), McCONNELL und BILINSKI (1959) konnten die Anlagerung einer C_1-Einheit an das Glycin unter Bildung von Serin sowie den umgekehrten Vorgang bei Weizenblättern nachweisen.

Ein Mechanismus für die Entstehung und den Transport einer C_1-oxidierten Einheit läßt sich nur hypothetisch aufstellen. Weitgehend Unklarheit herrscht über die Reaktionsart, die zur Bildung eines Methylol bzw. Formaldehyd führt.

Zwei Wege werden in der einschlägigen Literatur beschrieben: Der eine soll über die Bildung eines Aminoxids führen (I), der andere über eine Iminostufe (II).



FISCH, JOHNSON, LOWRENCE und HORNIG (1955) weisen auf eine Aminoxidbildung hin, wobei die Gegenwart von Eisen III-Ionen eine Umlagerung des tertiären Aminoxids zu einem sekundären Amin und einem Aldehyd bewirken.

JAMES, GILLETTE. DINGEL und BRODIE (1958) beschreiben drei Wege, die zur Dimethylierung führen, auch hier sollen Eisen III-Ionen als Elektronenacceptoren fungieren.

1. $\quad - NH - CH_3 + H_2O_2 \longrightarrow \quad - NH - CH_2OH + H_2O$

2. $R - NH - CH_3 + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow R - NH - CH_2OH$

3. $R - NH - CH_3 + 2\ Fe^{3+} \longrightarrow R - N = CH_2 + 2Fe^{2+} + 2\ H^+$

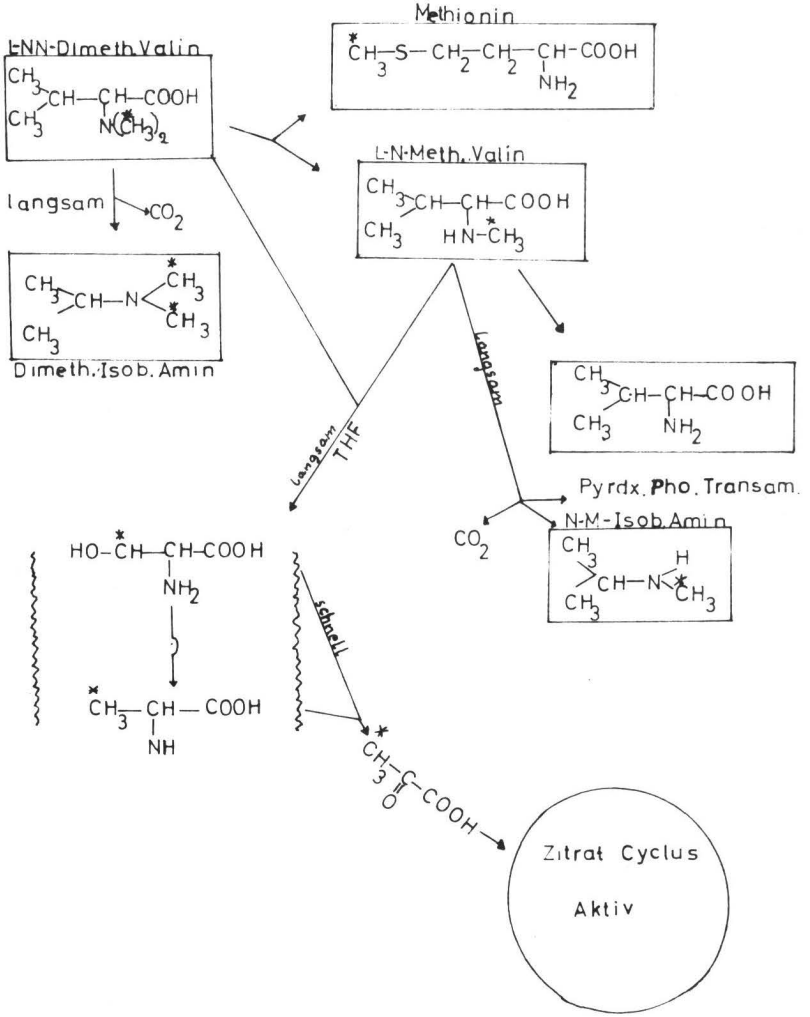
$R - N = CH_2 + HOH \longrightarrow R - NH - CH_2OH$

Aus den Versuchen von W. DALY und B. WITKOP (1963) ergab sich, daß der Sauerstoff im entstehenden Aldehyd aus $H_2{}^{18}O$ nicht aus $^{18}O_2$ stammt. Kinetische Studien sprachen gegen ein intermediäres N-Oxyd. Vielmehr wird angenommen, daß sich die Spaltung über ein Imin vollzieht (hierzu Schema II).

Aufgrund der Ergebnisse aus der Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffs auf die einzelnen organischen Verbindungen des

Sprosses wurde ein vereinfachtes Stoffwechselschema aufgestellt.

Metabolismus des L-NN-Dimethyl-Valins



Im ersten Reaktionsschritt wird eine N-Methylgruppe auf das Homocystein übertragen. Das entstandene Methionin und L-N-Methyl-Valin liegen annähernd in gleichen Mengen vor, wie aus der Intensität der Peaks in Abb. hervorgeht.

In ganz geringen Mengen entsteht durch Decarboxylierung von L-NN-Dimethyl-Valin ein tertiäres biogenes Amin, das NN-Dimethyl-Isobutylamin. Sowohl aus nicht umgesetztem L-NN-Dimethyl-Valin, als auch vom L-N-Methyl-Valin wäre die Übertragung einer C_1-oxidierten Einheit an das Glycine unter Bildung von Serin denkbar.

Das Fehlen jeglicher Aktivität im Bereich der oben genannten Aminosäuren schließt nicht aus, daß in unserem Fall die Sonnenblume diesen Weg beschritten hat. Anders läßt sich das Auftreten von Aktivität im Zitronensäurecyclus nicht erklären.

Die Entstehung eines sekundären biogenen Amins, des N-Methyl-Isobutylamins, wird vermutlich durch Pyridoxalphosphatkatalyse induziert als Konkurrenzreaktion der Desaminierung. Der Mechanismus dieser enzymatischen Reaktion wird im Reaktionsschema kurz erläutert.

Die Frage, ob die Pflanze bei stickstoffarmer Ernährung L-NN-Dimethyl-Aminosäuren verstärkt abbaut, bleibt vorerst offen. Grundsätzlich wäre dies jedoch nicht auszuschließen, da ihre Metabolisierbarkeit nachgewiesen werden konnte.
Damit ist der Nachweis erbracht, daß eine funktionelle Gruppe, nämlich die NN-Dimethyl-Aminogruppe, die in Naturstoffen sehr häufig anzutreffen ist und darum auch als Bodenkomponente Beachtung verdient, auch von einer höheren Pflanze, der sie"stoffwechselfremd" ist, aufgenommen und metabolisiert werden kann. Da viele unserer Pestizide und Insektizide ebenfalls solche Gruppierungen enthalten, ist dieser Befund auch im Zusammenhang mit dem sogenannten "Rückstandsproblem" von Interesse. Die bodenkundliche Forschung wird sich in Zukunft dieser Verbindungen, die durch den Menschen in den Boden gebracht werden, in verstärktem Maße annehmen müssen.

5. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselbeziehungen zwischen Pflanzenwurzel und organischen Bodenverbindungen, besonders unter dem Gesichtspunkt spezifisch stoffwechselfremder, auch anthropogener Verbindungen erörtert.

2. Es wurden als Modelle dafür sieben "unnatürlich" konstituierte L-NN-Dimethyl-Aminosäuren synthetisiert.

3. Es wurde eine neue Methode ausgearbeitet, die es gestattet, diese Verbindungen direkt auf dem Chromatogramm nachzuweisen.

4. Es konnte gezeigt werden, daß Helianthus annuus die "unnatürlich" konstituierten Aminosäuren über die Wurzel aufgenommen und metabolisiert hat.

5. Der Nachweis wurde in zweifacher Hinsicht erbracht:

   a. durch direkte Sichtbarmachung der L-NN-Dimethyl-Aminosäuren auf dem Chromatogramm;

   b. durch radiographische Lokalisierung auf dem Chromatogramm der im Stoffwechsel entstandenen radioaktiven Komponenten.

6. Es gelang durch Modifizierung des Syntheseverfahrens von BAUMANN und STROUD (1950) die Gewinnung von äußerst reinen Präparaten (chromatographischer Nachweis).

7. NN-Dimethyl-Isobutyl- und N-Methyl-Isobutyl-Amin konnten in der höheren Pflanze nach Applikation einer Vorstufe (NN-Dimethyl-Valin) unseres Wissens zum ersten Mal identifiziert werden.

8. Die Möglichkeiten der Bildung einer oxydierten C_1-Einheit wurden erörtert. Es wurde ein Stoffwechselschema aufgestellt, das auf Grund unserer Versuche die Metabolisierung des L-NN-C^{14}Dimethyl-Valins beschreibt.

6. Experimenteller Teil:

Synthese chromatographisch reiner L-NN-Dimethyl-Aminosäuren

1) L-NN-Dimethyl-Glycin:

2.5 g L-Glycin in 100 ml Wasser wurden mit 5 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle als Katalysator (10 %) versetzt und bis zur Aufnahme von 1.46 l-H_2 hydriert. (Reaktionsdauer = 5 Std.)
Nach Beendigung der Reaktion wurden noch 5 ml Formaldehyd zugefügt und weiter hydriert bis zur Sättigung. Das Reaktionsprodukt wurde im Becherglas 2 min lang gekocht, abfiltriert und der Rückstand mit heißem Wasser gewaschen.
Das Filtrat wurde mehrmals am Rotationsverdampfer eingedampft bis zur restlosen Entfernung von noch vorhandenem Paraformaldehyd. Das gewonnene Rohprodukt wurde in wenig heißem absolutem Äthanol gelöst und mit einem starken Überschuß an p.A. Aceton versetzt. Aus der milchig-weißen Lösung kristallisierte im Eisschrank in fast quantitativer Ausbeute L-NN-Dimethyl-Glycin in feinen Prismen aus. Rasches Arbeiten ist beim Abfiltrieren (Abnutschen) erforderlich, da die Substanz sehr hygroskopisch ist. Nach eintägigem Trocknen über P_2O_5 im Vakuum, Schmelzpunkt: 175 - 178°C.

2) L-NN-Dimethyl-Alanin:

2.5 g L-Alanin in 100 ml Wasser wurden mit 4.2 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle (10 %) versetzt und hydriert bis zur Aufnahme von 1.24 l-H_2. (Reaktionsdauer = 3 Std.)
Anschließend wurden 0.5 ml Formaldehyd zugesetzt und solange hydriert, bis kein Wasserstoff mehr aufgenommen wurde. Weitere Behandlung wie unter 1). Das Rohpro-

dukt wird in warmem absolutem Äthanol gelöst und mit wenig p.A. Aceton bis zur einsetzenden Trübung versetzt. (Beim Überschuß von Aceton verschwindet die Trübung.) Durch einen starken Überschuß von p.A. Petroläther (40 - 60° Siedepunkt) und Kratzen der Wände kristallisiert aus der anfänglich klebrigen Masse in der Kälte das L-NN-Dimethyl-Alanin. Hygroskopische Prismen. Schmelzpunkt: 183°C (Kofler). Trocknung im Vakuum über P_2O_5.

3) L-NN-Dimethyl-Valin:

2.5 g L-Valin in 100 ml Wasser werden mit 3.2 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle (10 %) versetzt und bis zur Aufnahme von 0.94 l-H_2 hydriert. (Reaktionsdauer = 2 $\frac{1}{2}$ Std.) Weiterbehandlung wie unter 1).
Das Rohprodukt in heißem absolutem Äthanol lösen und mit einem sehr starken Überschuß an p.A. Petroläther (40 - 60° Siedepunkt) versetzen. Beim Kühlen scheidet sich L-NN-Dimethyl-Valin in langen Nadeln an den Gefäßwänden ab (hygroskopisch).
Schmelzpunkt: 155°C. Trocknung im Vakuum über P_2O_5.

4) L-NN-Dimethyl-Leucin:

Zu 2.5 g Leucin in 100 ml Wasser werden 2.88 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle (10 %) zugegeben und bis zur Aufnahme von 0.84 l-H_2 hydriert. (Reaktionsdauer = 4 Std.) Weitere Behandlung wie bei 1).
Das Rohprodukt in absolutem Äthanol lösen und mit p.A. Aceton im Überschuß versetzen und reiben. Über Nacht im Eisschrank kristallisiert das L-NN-Dimethyl-Leucin in Nadeln aus.
Schmelzpunkt: 187°C. Trocknung im Vakuum über P_2O_5.

5) L-NN-Dimethyl-Phenylalanin:

Eine Suspension von 2,5 g Phenylalanin in 100 ml Wasser werden mit 2.25 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle (10 %) versetzt und bis zur Aufnahme von 0.665 l-H_2 hydriert. Weitere Behandlung wie bei 1). Das Rohprodukt kristallisiert aus wenig heißem Äthanol beim Versetzen mit einem starken Überschuß an p.A. Petroläther (40-60° Siedepunkt) in kleinen Nadeln L-NN-Dimethyl-Phenylalanin. Schmelzpunkt: 219°C. Trocknung über P_2O_5.

6) L-NN-Dimethyl-Glutaminsäure:

2.5 g L-Glutaminsäure in 100 ml Wasser mit 2.7 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle (10 %) werden bis zur Aufnahme von 0.73 l-H_2 hydriert. Weitere Behandlung wie bei 1). Rohprodukt aus wenig absolutem Äthanol und einem Überschuß p.A. Aceton in der Kälte auskristallisieren lassen (kleine Prismen), L-NN-Dimethyl-Glutaminsäure. Schmelzpunkt: 192°C. Trocknung im Vakuum über P_2O_5.

7) L-NN-Dimethyl-Lysin:
(Partielle Methylierung an einer NH_2-Gruppe)

2.5 g L-Lysin-Hydrochlorid in 100 ml Wasser werden mit 4.2 ml Formaldehyd (40 %) und 2.5 g Pd-Kohle (10 %) bis zur Aufnahme von 1.20 l-H_2 hydriert und wie bei 1) weiterbehandelt. Das Rohprodukt wird aus wenig absolutem Äthanol und einem Überschuß von p.A. Aceton auskristallisiert. Es ist sehr rasches Arbeiten erforderlich, da die Substanz besonders stark hygroskopisch ist.
Schmelzpunkt: 183°C (im vorgeheizten Apparat)
Trocknung im Vakuum über P_2O_5.

Synthese des L-NN-C_{14}-Dimethyl-Valins

Eine Suspension von 117 mg L-Valin in 50 ml Wasser wurde mit 1.2 ml C_{14}-Formaldehyd*) (Aktivität 60 μC) und 0.150 ml Formaldehyd (40 %) versetzt und bis zur Aufnahme von 0.45 l-H_2 hydriert. (Reaktionsdauer = 30 min.) Der Reaktionslösung wurden noch 0.1 ml Formaldehyd (40 %) zugesetzt und weiter bis zur Sättigung hydriert. Aufarbeitung wie bei 1). Isolierung wie bei 3). Spez. Aktivität 60 μC/Millimol

Präparative Darstellung von N-Methyl-isobutylamin und NN-Dimethyl-isobutylamin

3.5 g (0.5 Mol) Isobutylamin werden unter Kühlung mit 7.2 g (0.6 Mol) Methyljodid versetzt und anschließend in 200 ml 1 n NaOH gegossen und mit Äther ausgeschüttelt. Im gelben Ätherextrakt sind das sekundäre und das tertiäre Amin enthalten.

Behandlung der Samen und Kulturgefäße bei Nichtsterilkulturen

Beizen der Samen in 80 %igem Methanol 100 sec, anschließend dreimal nachwaschen mit destilliertem Wasser. Die Erlenmeyerkolben (250 ml) vor Versuchsbeginn mit Chlorkalklösung waschen. Das Vorkeimen erfolgt auf feuchtem Fließpapier in Neubauerschalen.

Die Pflanzen werden in einer Klimakammer aufgezogen, in der folgende Aufzuchtbedingungen herrschen:

Temperatur:	nachts 14°	tags 26°
Relative Luftfeuchtigkeit:	nachts 90 %	tags 80 %
Tageslänge:	12 Stunden	

Als Lichtquelle diente ein 6 kW-Bestrahler der Firma Osram (XENON-Langbogen-Lampe, luftgekühlt). Entfernung der Lichtquelle: 2 m

*) Das aktive Material wurde von "The Radiochemical Centre" (Amersham, England) bezogen.
Die Radioaktivität betrug 15 mc/mM 0.05 ml
0.5 mc (1 - 3 % wässrige Lösung)
Das Präparat wurde in 10 ml Wasser aufgenommen.
Aktivität 500 C, 1.2 ml enthalten eine Aktivität von 60 C.

Zusammensetzung der Nährlösung

Hauptnährstoffe:	$Ca(NO_3)_2$	wasserfrei	0.944 g/l
	KNO_3		0.45 g/l
	$MgSO_4$		0.1903g/l
	KH_2PO_4		0.1087g/l
Spurenelemente:	$FeSO_4 x 7H_2O$		3.75 mg/l
	H_3BO_3		1.50 mg/l
	$MnSO_4 x 1H_2O$		1.00 mg/l
	$CoCl_2 x 6H_2O$		0.125 mg/l
	$CuSO_4 x 5H_2O$		0.125 mg/l
	$Al_2(SO_4)_3 x 18H_2O$		0.125 mg/l
	$ZnSO_4 x 7H_2O$		0.125 mg/l
	Ammonmolybdat		0.125 mg/l
	Kaliumtartrat		7.500 mg/l

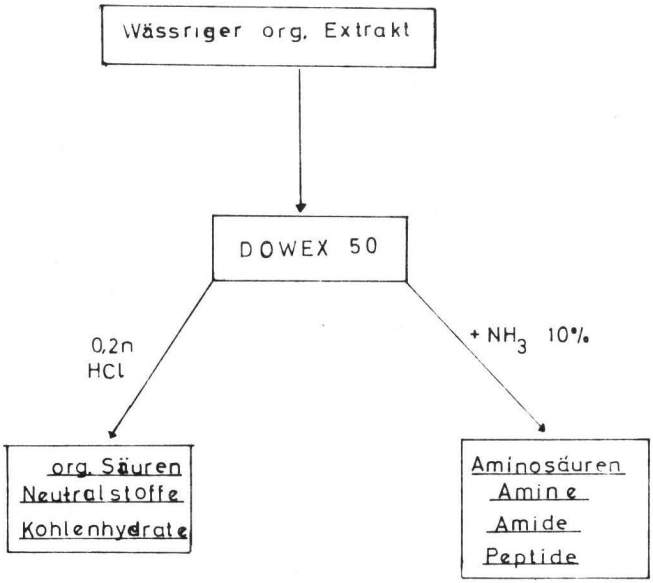
Ernte und Gewinnung des Pflanzenmaterials

Sproß bzw. Wurzel mit einer Schere fein zerschneiden und mit sterilem Sand zerreiben. Pflanzenmaterial in absolutem Methanol kalt extrahieren. Vor der Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen Methanol abdampfen.

Bei allen Versuchen, die unter sterilen Bedingungen oder mit radioaktiven Zusätzen in Nährlösung angesetzt wurden, wurde das Pflanzenmaterial wie folgt aufgearbeitet:
Sofort nach der Ernte Sproß- bzw. Wurzelmasse in absolutem Methanol abtöten, 20 min anschließend kochen, zerreiben und erneut mit 80 %igem Methanol extrahieren.
Die Extrakte werden eingeengt und über Ionenaustauscher in die einzelnen Fraktionen aufgetrennt.

Trennung der gewonnenen Extrakte

Die Extrakte werden ausschließlich über Kationenaustauscher in zwei Fraktionen aufgetrennt. (Dowex 50 = Kationenaustauscher)



Papierchromatographie

Die Trennung der einzelnen Fraktionen erfolgte nach dem Verfahren von SCHEFFER, ALEXETH und STRICKER (1963) aufsteigend mit Doppelsegmenten. Es wurde das Papier "Ederol" 202 F der Firma Binzer, Hatzfeld/Eder benutzt.

Für Dünnschichtchromatogramme wurden mit Zellulose beschichtete Glasplatten 10 x 20 cm der Firma Schleicher und Schüll verwendet.

Fließmittel für Aminosäuren

Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 1) nach LINSKENS
Butanol : Äthanol : Wasser (4 : 1 : 1) nach LINSKENS

Fließmittel für organische Säuren

Butanol : Eisessig : Wasser (4 : 1 : 1) nach LINSKENS
Butylformiat : Ameisensäure : Wasser (5 : 2 : 1)
Phenol : Wasser : Ameisensäure (100 g Phenol : 50 ml Wasser : 5 ml Ameisensäure)

Die beiden letzten Systeme nach SCHLIMME (1966).

Auftragen der Substanzen

Die zu untersuchenden Lösungen wurden mit einer Fortuna-Pipette (0.1 cm^3 Inhalt) aufgetragen. Menge je nach Segment 30 - 40 μ g. Trocknung durch Föhn.

Identifizierung

1. Durch Farbreagenzien

a) Aminosäuren

Anfärben mit Ninhydrin nach BAROLLIER
Entwickeln bei 60 - 80°C im Trockenschrank
Ninhydrinreagenz.
75 mg $CdCl_2$ + 6 ml H_2O + 0.3 ml Eisessig + 100 ml Aceton + 2 g Ninhydrin, in dieser Reihenfolge zugeben.

Chromatogramme werden im Reagenz gebadet oder besprüht und anschließend getrocknet.

b) Organische Säuren

Anfärbung: Chromatogramm wird mit einer Lösung von 2 g Glucose und 2 ml Anilin in 20 ml Wasser + 20 ml Alkohol + 60 ml n-Butanol gebadet und anschließend 10 min bei 115°C getrocknet.

2. Die Zuordnung erfolgte nach Normierung.

Dieses Verfahren wurde von STRICKER und VOLLERT (1963) ausführlich beschrieben.

Hydrolyse von Peptiden:

6 Stunden mit 6 n HCl am Rückflußkühler kochen, Salzsäure wird durch nochmaliges Abdampfen am Rotationsverdampfer entfernt.

3. Anfärbung der L-NN-Dimethyl-Aminosäuren

2 g Bleitetraacetat werden in 100 ml Toluol suspendiert. Aminosäure wie üblich auftragen, laufen lassen, nach dem Trocknen Chromatogramm in Reagenz baden und an der Luft trocknen lassen, mindestens 3 Stunden.
Es erscheinen helle Flecken, die nach Behandlung mit Ninhydrin sich rot färben. Kein Einfluß auf das übrige Aminosäurenspektrum.

Vorbehandlung der Samen und Anzucht steriler Pflanzen

Vor dem Beizen Samenschalen entfernen, Endosperm 100 sec in absolutem Methanol beizen, Methanol abgießen und Endosperm unter sterilem Wasser halten.

Agar-Nährsubstrat besteht aus der bereits beschriebenen Nährlösung unter Zusatz von 0.7 % Agar (Bacto-Difco-Agar) und einer L-NN-Dimethyl-Aminosäure in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l.

Sterilisierungszeit 20 min bei 1.2 Atmosphären und 125°C.

In das erkaltete Nährsubstrat werden die Samen mit dem Hypokotyl nach unten gerichtet gesetzt. Die verwendeten Reagenzgläser von 90 ml Inhalt werden mit sterilem Wattebausch verschlossen.

Nach dem Entwickeln der Keimlinge (Dauer 5 - 6 Tage) wird ein Wattepolster um den Sproßstengel gelegt, so daß keine Wachstumsbehinderung eintreten kann (Arbeiten unter der UV-Lampe). Über 90 % der angesetzten Pflanzen konnten steril aufgezogen werden. Nach 18 - 20 Tagen wurde geerntet. Jede Pflanze ergab durchschnittlich 140 - 180 mg Trokkensubstanz (Sproß).

Trockensubstanzbestimmung und Salzaufnahme

Trockensubstanzbestimmung: Sproß mit Schere zerschneiden und bei 105°C 6 Stunden trocknen.

Salzbestimmung: 120 - 140 mg Trockensubstanz bei 600°C im Muffelofen 6 Stunden veraschen. Asche anfeuchten und in 5 ml HNO_3 (1:2 verdünnt) aufschließen und auf 50 ml auffüllen.

P-Bestimmung

Mit Ammonmolybdat und Ammonvanadat photometrisch nach SCHEFFER und PAJENKAMP (1952)

Kalium und Calcium

Flammenphotometrisch am Eppendorf (Neteler und Hinz, Hamburg)

Radiographie der Chromatogramme

Die Chromatogramme wurden durch Abtasten an einem offenen Methandurchflußzähler ausgewertet. (Frieseke und Höpfner, Fh 107) Geschwindigkeit 1 cm in 3 min (kontinuierlich), Hochspannung 2800 Volt.

A u t o r e n v e r z e i c h n i s

1. ALDAG, R.: Vernachlässigte Aminosäuren des Bodens und ihre Wirkung auf höhere Pflanzen. Dissertation, Göttingen 1966

2. ALEXANDER, M.: Introduction of soil microbiology. John Willy and sons, inc., New York, London (1961)

3. BALCE, L.V. und J.E. GANDER: D-Tyrosine metabolism in sorghum vulgare seedlings. Nature, 207, 759-760 (1965)

4. BAROLLIER, J.: Ein Ninhydrinreagenz für quantitative Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen. Naturwissenschaften, 42, 416 (1955)

5. BAUMAN and STROUD: N-Substitued Amino-acids Part I. A New Method of Preparation of Dimethylamino-acids. J.Chem.Soc., II, 1027-1937 (1950)

6. BELL und TIRIMANA: The Isolation of -Hydroxahomo-arginine as its lactone from seeds of lathyrus tingitanus, its Byon-synthesis and Distribution.

7. BIRKINSHAW, J.H. and C.E. STICKINGS: Nitrogen containing Metabolites of Fungi. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, XX, 1-33 (1962)

8. BODANSKY, M. and D. PERLMANN: Are peptide antibiotics small proteins? Nature, 204, 840-844 (1964)

9. BÖRNER, H.: Untersuchungen zur Frage der Wurzelausscheidungen mit Hilfe radioaktiver Isotopen, am Beispiel von Ackersenf (Sinapis arvensis L). Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 68, 626-633 (1961)

10. BRIAN und Mitarbeiter: Uptake of Antibiotics of soil microorganisme by plants. Nature (London), 167, 347 (1951)

11. BROCKMANN, H. und J.H. MANEGOLD:
Partialsynthese von Actinomycin C_1. Totalsynthese von Actinomycin C_1D. Die Naturwissenschaften, 51, 383-385 (1964)

12. CHONG, W.CHANG and R.S. BANDURSKI:
Exocellular enzymes of corn roots. Plant Physiology, 39, 60-64 (1964)

13. COCHRANE, V.W.:
Physiology of actinomycetes. Annual Review Microbiology, 15, 1-26 (1961)

14. COOK, A.H., S.F. COX and T.H. FARMER:
Production of antibiotics by fungi. Part IV. Lateritiin-I, Lateritiin-II, Avenacein, Sambucinin and Fructigenin. Journal of the chemical Society, Part II, 1022-1028 (1949)

15. McCONNELL, W.B. und E. BILINSKI:
Studies on wheat plants using carbon -14 compounds. IX. Radioactivity of wheat following injection of formate C^{14} and Glycin C^{14} with special reference to serine labeling. Canadian Journal Biochem.Physiology, 37, 549-555 (1959)

16. McCONNELL, W.B. und A.J. FINDLAYSON:
Studies on wheat plants using carbon-14 compounds. XV. Utilisation of Serine-I-C^{14} and serine-3-C^{14}. Cand.Journal Biochem.Physiol. 39, 1107-1111 (1961

17. DALY, W. und B. WITKOP:
Neue Untersuchungen über zentralwirkende endogene Amine. Angew. Chemie, 75, 564 (1963)

18. DUNNILL und FOWDEN:
Phytochemistry, 4, 933-944 (1965)

19. DUNNILL und FOWDEN:
Biochem. J. 86, 338-391 (1963)

20. FOWDEN, L.:
Die nicht proteinogenen Aminosäuren. Endeavour, 21, 35-42 (1962)

21. FOWDEN, L.:
Ann. Rev. Biochem., 33, 173-203(1964)

22. FOWDEN, L.:
A New Asparagine Derivative N^4-(2-Hydroxyethyl)-L-Asparagine from Bryoni (Bryonia divica). Biochem. J. 81, 154-156 (1961)

23. FISCH, JOHNSON, LOWRENCE, HORNING:
Oxydative N-dealkylation
Biochimica et Biophysika acta
18, 564 (1955)

24. FÖRST :
Neuere präparative Methoden in der Org.Chemie I
Verlag Chemie 1953

25. FRENZEL, B.:
Modellversuche zur Klärung einiger Probleme der Abgabe von Aminoverbindungen durch die Wurzel höherer Pflanzen im Boden.
Planta, 57, 444-454 (1961)

26. GRAY, R.A. und D. HENDLIN:
Growth inhibition and bleacing in higher plants and Euglena by O-Menthyl-Threonine, reversal by Isoleucine.
Plant Physiology, 37, 223-227 (1962)

27. GRAY, R.A., GAUGER, G.W., DULANEY, E.L., KACZKA, E.A. and H.B. WOODRUFF:
Hadacidin a new plant growth inhibitor produced by fermantation.
Plant Physiology, 39, 204-207 (1964)

28. GRAY and FOWDEN:
Nature (Lond.) 189, 401-402 (1961)

29. GRAY and FOWDEN:
Biochem. J. 82, 385-389 (1962)

30. GRAY and FOWDEN:
Nature Lond. 193, 1285-1286 (1962)

31. GÖRDELER:
Darstellung quartärer Ammoniumverbindungen.
Houben-Weyl, Bd. XI,2, 559-630 (1958)

32. HARRIS, G.P.:
Amino acids as nitrogen sources for the growth of exised roots of red clover.
New Phytologist, 58, 330-344 (1959)

33. HIATT, A.J.:
Formid Acid Activation in Plants.
I. Purification, properties and distribution of Formyltetrahydrofolate Synthetase.
Plant Physiology, 40, 184-188 (1965)

34. IVANOV, V.P., G.A. JACOBSON und M.J. VOINOV:
Die Rolle der Wurzelausscheidungen in gemischten Ansaaten.
Landw.Zentralblatt, II, 2407 (1964)

35. JAMES, GILLETTE, DINGEL und BRODIE:
Dealkylation of N-Alkylamines by Model Systems.
Nature, 181, 898 (1958)

36. JANKE: Der mikrobielle Abbau der Aminosäuren.
Archiv für Mikrobiologie, 15, 472-497 (1950/51)

37. KICKUTH, R., R. ALDAG: Einwirkung von D-Aminosäuren an Kulturpflanzen.
Angew. Botanik, Bd. XLI, Heft 5, 165-175 (1967)

38. KRÜGER, W.: The activity of antibiotics in soils. II. Movement, stability and biological activity of antibiotics in soils and their uptake by tomato plants.
South African Journal agric.Science, 4, 301-313 (1961)

39. McLAREN und PETERSEN: Soil Biochemistry.
Verlag Marcel Decker, INC., New York (1967)

40. LEH, H.O.: Die Wirkung von Streptomycin auf das Wachstum einiger Kulturpflanzen.
Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, 88, 129 (1960)

41. LINSKENS, H.F.: Papierchromatographie in der Botanik.
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955

42. LISS: Phytochemistry, 1, 87-88 (1962)

43. MANSKE-HOLMES: The Alkaloids (Chemistry and Physiology).
Akademic Press, New York (1954)

44. MILLER, R.H. und E.L. SCHMIDT: Uptake and Assimilation of amino acids supplied to the sterile soil root environment of the bean plant. (phaseolus vulgaris)
Soil Science, 100, 323-330 (1965)

45. MILLER, R.H. und E.L. SCHMIDT: A technique for maintaining asterile soil, plant root environment and its application to the study of amino acids in the rhizosphere.
Soil Science, 100, 267-273 (1965)

46. MOTHES et. al : Biosynthese von Alkaloiden. Angew. Chemie, 75, 353-392 (1963)

47. MOTHES, K. und H. KALA: Die Wurzel als Bildungsstätte für Cumarin. Naturwissenschaften, 42, 159 (1955)

48. MORIS, S., KUPCHAN, A.DAVIES, S.J. BARBOUTIS: The Isolation, Structural Enclucidation and Synthesis of Solapalmitine and Solapalmitene, Two Novel Alkaloid Tumor Inhibitors from Solanum tripartitum. J.A. Chem. Soc. 89, 5718 (1967)

49. MUSSO, H.: Neue natürliche Aminosäuren. Angew. Chemie, 68,9, 313-344 (1956)

50. NEUMANN und TSCHÖPE: Abbau von Solanaceen-Alkaloiden in höheren Pflanzen. Flora, 156, 521-542 (1966)

51. OAKS: The Effect of Leucine on the Biosynthesis of Leucine in the Maize Root tips. Plant Physiology, 40, 149-155 (1965)

52. PAUL, E.A. and E.L. SCHMIDT: Formation of free amino acids in rhizosphere and nonrhizosphere soil. Proc. Soil Science Soc. America, 25, 359-362 (1961)

53. PLATTNER, P.H. and U. NAGER: Über die Konstitution des Eniatin B. Helvetica Chimica Acta, 31,1, 665 (1948)

54. PLATTNER, P.H. and U. NAGER: N-Methyl-Valin aus Eniatin B. Helvetica Chimica Acta, 31, 665, (1948)

55. RABINOWITZ, J.C. und W.E. PRICER: Formyltetrahydrofolate synthetase. I. Isolation and crystallisation of the enzyme. Journal Biolog. Chemistry, 237, 2898-2902 (1962)

56. RATNER, E.J., A.M. SMIRNOV, H. HUANG, S.F. UCHINA und I.N. KUZOVKINA: Die Aufnahme von Aminosäuren als N-Quellen durch isolierte Lucernewurzeln und Erbsenpflanzen in steriler Kultur. Landw. Zentralblatt, II, 2682, (1964)

57. REPKA, J. und O.MACKO: Zur Frage der Wirkung des Penicillienmycels auf Pflanzen. Landw. Zentralblatt, I, 623 (1964)

58. ROBERTSON, L. MARION: Canad. J. Chem. 37, 590 (1959)

59. ROTHENBERG, S.P.: A radio-enzymatic assay for folic acid. Nature, 206, 1154-1156 (1965)

60. ROVIRA, A.D.: Interactions between plant roots and soil microorganisms. Annual Review of Microbiology, 19, 241-266 (1965)

61. ROVIRA, A.D. and J.R. HARRIS: Plant root excrations in relation to the rhizosphere effect. Plant and Soil, 14, 199-214 (1961)

62. SALTON, M.R.J.: The bacterial Cell Wall. Elsevier Publ. Co. 1964, Amsterdam, London, New York

63. SARLET, H.: Acides amines des Actinomycines Produites par Streptomyces, S. 67. Biochemica et Biophysica Acta, 13, 143-152 (1954)

64. SCHEFFER, F., R. KICKUTH, G. STRICKER: Aufsteigende Papierchromatographie auf Kreissegmenten. Zeitschrift für analytische Chemie, 193, 161-165 (1963)

65. SCHEFFER, F. und A. KLOKE: Der Einfluß von Antibiotika auf die Entwicklung und den Nährstoffgehalt von Kulturpflanzen. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, 66, 29-38 (1964)

66. SCHEFFER, F. und H. PAJENKAMP: P-Bestimmung in Pflanzenaschen nach der Molybdän-Vanalin-Methode. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, 56, 2-8 (1952)

67. SCHÖNBECK, F.: Weitere Untersuchungen über die Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von Pflanzen durch Aufnahme phenol- und cumarinartiger Verbindungen aus Nährlösung und Boden. Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, 98, 126-136 (1962)

68. SIL'NIKOVA, V.K.: Stickstoffgehalt des Saftes von Erbsenpflanzen, die mit Knöllchenbakterienrassen verschiedener Aktivität geimpft wurden. Landw. Zentralblatt, II, 2375 (1963)

69. SMITH, E.L.: Action of Carboxypeptidase on derivatives of unnatural amino acids. Advances in Enzymology, 12, 232 (1951)

70. STEINER und HARTMANN: Biochem. Z. 340, 436-440 (1964)

71. STRICKER, G. und K. VOLLER: Untersuchungen an Blatt- und Wurzelexkreten verschiedener Arten und Sorten der Gattung Triticum. Dissertation, Göttingen, Mai 1963

72. SUBRA-RAO, N.S., R.G.S. BILDWELL and D.L. BAILEY: Studies of rhizosphere activity by the use of isotopically labeled carbon. Cand. Journal Botany, 40, 203-212 (1962)

73. SWEELY und HORNING: Rearrangement and Decarboxylation. Reaction of N-N-Dimethyl-glycine Oxide. J.A.Ch. Soc. 79, 2620 (1953)

74. TSCHIERSCH, B.: Neue Aminosäuren in Pflanzen. Pharmazie, 17, 721-730 (1962)

75. TURNER und SCHMERZLER: A new Method for identifying C-Terminiol residues in peptides. J.A.Ch.S. 949, (1954)

76. ULRICH, J.M., R.A. LUSE and A.D. McLAREN: Growth of tomato plants in presence of proteins and amino acids. Physiologia Plantarum, 17, 683-696 (1964)

77. VANCURA, V.: Root Exudates of Plants. I. Analyses of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. Plant and Soil, 21, 231-248 (1964)

78. VANCURA, V. and A. HOVADIK: Root Exudates of Plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. Plant and Soil, 22, 21-32 (1965

79. VALLE, E, und A. VIRTANEN: On the injurius and growth-promoting effects in Peas and Barley of various amino-acids given together with Nitrate.
Soumen Maataloustieteellisen Seuran Julkaisuja, 107, 308-319 (1966)

80. VIRTANEN, A.I. and P.K. HIETALA:
Enzymatic decarboxylation of Hydroxy- amino-n-butyric acid.
Acta chemica Scandinavica, 9, 549-550 (1955)

81. VOLLERT, Carlos A.W.: Mobilisierungsvorgänge an Calcium-, Eisen- und Aluminiumphosphaten durch Chelatoren aus dem Wurzelraum von Lucerne und Steinklee.
Dissertation, Göttingen, Mai 1964

82. WAKSMANN, S.A. and H.A. LECHEVALIER:
Guide to the classification and identification of the actinomycetes and their antibiotics.
Williams and Wilkens Company, Baltimore 1953

83. WANG, D. und R.H. BURRIS: Carbon metabolism of ^{14}C-labeled amino acids in wheat leaves. III. Further studies on the role of serine in glycine metabolism.
Plant Physiology, 40, 415-418 (1965)

84. WINTER: Untersuchungen über die Aufnahme von Penicillin und Streptomycin durch die Wurzeln von Lepidium sativum und ihre Beständigkeit im Boden.
Z.Bot., 40, 153-172 (1952)

85. WHITELEY, H.R., M.J. OSBORN und F.M. HUENNEKENS:
Purification and properties of the formate-activating enzyme from Micrococcus aerogenes.
Journal Biol.Chemistry, 234, 1538-1543 (1959)

86. WINKLER, H. und G. MÜLLER: Bildung und Verhalten physiologisch aktiver Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen im Boden und deren Wirkung auf höhere Pflanzen.
Sitzungsbericht. Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin
Bd. 3, Heft 10, 29-40 (1964)

37. WOLTZ, S.S. and C.R. JACKSON:
Production of yellow strapleaf of Chrysanthenum similar disorders by amino acid treatment.
Plant Physiology, 36, 197-201 (1961)

38. SCHLIMME, E.K.W.O: persönliche Mitteilung.