

Setzt man *Tween 80* dem Nährboden zu, dann sinkt die Wirkung von Dioxy-hexachlor-diphenylmethan erheblich ab. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit A. L. Erlandson und C. A. Lawrence⁷⁰⁾.

Es ist weiter ersichtlich, daß die Wirksamkeit der von uns geprüften phenolischen Substanzen dann voll erhalten bleibt, wenn man eine Seifenzubereitung von 1% Substanz und 99% Kernseife in den Verdünnungstest einsetzt, man jedoch in Analogie zu den Ergebnissen mit der nichtionischen Substanz in Anwesenheit von 0,5% Kernseife im Nährboden geringere Aktivitäten findet. Dabei zeigt sich bei den Salicylsäureaniliden ein geringerer Abfall der Hemmwerte als durch die weiter in der Tabelle aufgeführten Verbindungen.

⁷⁰⁾ Science 118, 274 [1953]; siehe auch C. A. Lawrence u. A. L. Erlandson, J. Am. Pharm. Assoc. 42, 352 [1953].

In dieser Zusammenstellung wurde eine Übersicht über das Gebiet der mehrkernigen phenolischen Desinfektionsmittel erstrebt. Sie kann infolge der Fülle des vorliegenden, zum größten Teil in Patenten erschienenen Materials keinen Anspruch auf Vollständigkeit in bezug auf alle zu den geschilderten Verbindungstypen gehörenden Variationsmöglichkeiten erheben. Jedoch ist es für jeden an diesem Gebiet Interessierten möglich, sich auf Grund der zitierten Arbeiten das gebotene Bild zu vervollständigen.

Für die sorgfältige Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen sind wir Frl. Ursula Dörnbrack zu Dank verpflichtet. Weiter danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung von Geräten und der Chemischen Fabrik C. H. Boehringer Sohn für die Unterstützung unserer Arbeit.

Eingeg. am 2. November 1954 [A 632]

Neuere Ergebnisse der Humusforschung

Von Doz. Dr. ERWIN WELTE

Agrikulturchemisches und bodenkundliches Institut der Universität Göttingen

Es wird ein absorptionsspektrographisches Verfahren beschrieben, nach dem es möglich ist, Braunhuminsäure und Grauhuminsäure gleichzeitig quantitativ zu bestimmen. Die Papierelektrophorese von Braunhuminsäure ergab zwei Fraktionen, diejenige von Grauhuminsäure drei Fraktionen. Da Versuche mit Synthese-Huminsäuren die Untersuchungen bestätigten, ist begonnen worden, die Entstehungsbedingungen und den konstitutionellen Aufbau von Huminsäuren näher zu untersuchen; erste Ergebnisse werden mitgeteilt.

Die gesamte im Boden befindliche postmortale organische Substanz wird allgemein als „Humus“ bezeichnet. Sie umfaßt die verschiedenartigsten organischen Stoffgruppen, die sich chemisch weiter klassifizieren lassen. Unter diesen sind von besonderer Bedeutung die Huminstoffe, eine Gruppe von Verbindungen unbekannter Konstitution, die alle das gemeinsame Merkmal der humustypischen dunklen Farbe haben (ähnliche Absorptionsspektren). Gegenüber einer Reihe wässriger Extraktionsmittel, insbes. solcher alkalischer Reaktion bzw. von Alkalisalzen kalkfällender Säuren besitzen die Huminstoffe unterschiedliche Lösungseigenschaften, so daß sie auf Grund dieses Verhaltens weiter untergliedert werden können. Unter den Huminstoffen nehmen die alkalilöslichen und säurefällbaren Huminsäuren eine wichtige Stellung ein, da diese chemisch oder auch biochemisch im Boden gebildeten Verbindungen eine für den Boden jeweils eigentümliche Verteilung aufweisen und in ihren kolorimetrischen Eigenschaften eine Beurteilung des Fruchtbarkeitszustandes des Bodens erlauben.

Absorptionsspektrographische Huminsäuren-Bestimmung

Untersucht man das absorptionsspektrographische Verhalten von aus Böden extrahierten und anschließend gereinigten Huminsäuren, so lassen sich zwei Farbtypen unterscheiden: Braunhuminsäure und Grauhuminsäure. Beide Typen sind durch „Farbquotienten“ zu charakterisieren. In Auswertung zahlreicher Absorptionsspektren wurden zur Serienbestimmung des Farbtyps die beiden Wellenlängen 472 m μ und 664 m μ ausgewählt und

die bei diesen Wellenlängen gemessenen Extinktionen E_4 und E_6 für die Errechnung des Farbquotienten

$$Q_{4/6} = \frac{E_4}{E_6}$$

eingesetzt. Braunhuminsäuren besitzen einen $Q_{4/6}$ -Wert von ca. 5,0–5,5, wohingegen die typischen Grauhuminsäuren zwischen 2,2 und 2,8 liegen. Dabei ist der Farbquotient der Grauhuminsäure stark vom Stickstoff-Gehalt abhängig, und zwar wird er mit zunehmendem N-Gehalt nach niedrigen Werten verschoben. Beide Farbtypen sind nur selten in der Natur rein anzutreffen. Gewöhnlich handelt es sich um Mischungen, die je nach dem $Q_{4/6}$ -Wert einen höheren Anteil Grauhuminsäure oder Braunhuminsäure enthalten. Übersteigt der Meßwert die für Braunhuminsäure angegebene Grenze, so deutet dieser Befund noch auf die Anwesenheit nichtsäurefällbarer Huminstoffe hin. Da von den Huminsäuren bei ausreichender Verdünnung das Lambert-Beersche Gesetz befolgt wird, gilt $E = k \cdot c \cdot d$ und bei konstanter Schichtdicke $E = k \cdot c$. Es wurden nun an einer Reihe von Huminsäuren die Extinktionskoeffizienten (k -Werte) gemessen und ihre gesetzmäßige Beziehung zum $Q_{4/6}$ -Wert mathematisch formuliert. Für den Extinktionskoeffizienten k_4 ($\lambda = 472 \text{ m}\mu$) gilt allgemein:

$$k_4 = \frac{a}{b - \frac{1}{Q_{4/6}}} = \frac{a}{b - Q_{4/6}}$$

wobei a und b Stoffkonstanten sind. Als vorläufige Werte für diese Konstanten, die auf ihren absoluten Wert demnächst noch einmal überprüft werden sollen, wurde gefunden:

$$a = 9,71 \cdot 10^{-3} \text{ und } b = 0,776.$$

Unter Berücksichtigung dieser Werte ergibt sich zwischen dem Extinktionskoeffizienten k_4 und dem Farbquotienten $Q\ 4/6$ der in Bild 1 dargestellte Kurvenverlauf.

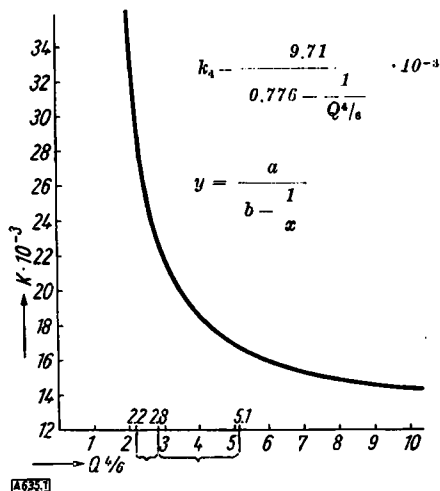


Bild 1

Damit ist nunmehr die Möglichkeit gegeben, aus der Messung des $Q\ 4/6$ -Wertes unmittelbar die Huminsäure-Konzentration kolorimetrisch zu bestimmen. Die für die Konzentrationsermittlung abgeleitete Gleichung lautet:

$$c = m \cdot E_4 - n \cdot E_0, \text{ wobei } m = \frac{a}{b} \text{ und } n = \frac{1}{a} \text{ ist.}$$

$c =$ ausgedrückt in mg Huminsäure je 100 g Trockenmasse

Somit können also aus der Messung zweier Extinktionen bei zwei verschiedenen Wellenlängen Farbtyp und Huminsäure-Konzentration zugleich bestimmt werden. Um die Messung technisch weitgehend zu vereinfachen, wurde ein neuartiges Spezialkolorimeter entwickelt, das Serienanalysen in großer Zahl durchzuführen gestattet.

Als Beispiel einer Meßreihe sei die Verteilung der Huminsäuren und der Huminsäure-Vorstufen nach Farbtyp und -konzentration in einem extremen Podsolboden wiedergegeben.

Horizont	Huminsäuren Farbtyp Q 4/6	Konz. c in %	Vorstufen Farbtyp Q 4/6	Konz. c in %
A ₀	5,40	5,09	12,96	0,43
A ₁	2,99	1,33	15,20	0,03
A ₂	2,88	0,49	13,70	0,02
B ₁	3,17	3,40	9,14	0,49
B ₂	3,20	0,72	11,00	0,27
B/C	3,58	0,17	—	0,06

Tabelle 1

Verteilung von Huminsäuren und Vorstufen im Podsolboden (Profil Knesebeck)

Danach finden wir im A₁- und A₂-Horizont Huminsäuren von eindeutigem Grauhuminsäure-Charakter, während Brahuminsäuren im A₀-Horizont vorherrschen und im B-Horizont nach Durchlauf durch den Auswaschungshorizont wieder zunehmen. Dieser sich im Profil abzeichnende Trenneffekt hängt weitgehend mit der unterschiedlichen Elektrolytempfindlichkeit der beiden Farbtypen zusammen.

Papierelektrophoretische Trennungen

Die unterschiedliche Verteilung von Braun- und Grauhuminsäuren in demselben Boden und das Vorhandensein von Mischungen beider Typen in den einzelnen Horizonten gab Veranlassung, weitere Auftrennungen der Huminsäuren zu versuchen. Dies gelang auf papierelektrophoretischem Wege (Bild 2). Der im A₀-Horizont des Podsolprofils vorherrschende Brahuminsäure-Typ wies dabei zwei ockerfarbene Fraktionen auf, während sich die im A₁ und A₂-Horizont überwiegenden Grauhuminsäuren sogar in drei Fraktionen auftrennen ließen. Die in diesem

Farbtyp nicht gewanderte Fraktion und die mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit zeigten einen umbräufarbenen Ton mit schwach violetterm Einstich, die Fraktion mit der größten Wanderungsgeschwindigkeit dagegen einen braunen Farbton. Im B-Horizont war eine Überlagerung aller Fraktionen beider Farbtypen festzustellen.

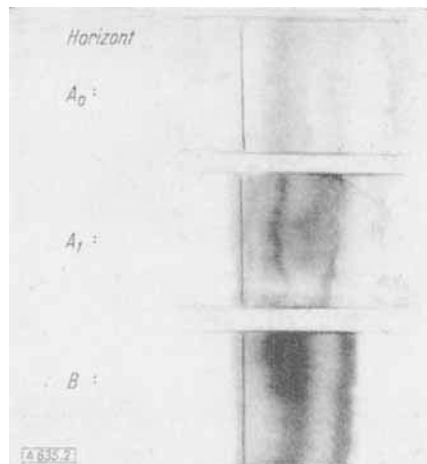


Bild 2

Elektropherogramme von Huminsäuren aus Podsol

Das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchungen beweist, daß die bisher auf Grund spektralphotometrischer Messungen angenommene Einheitlichkeit des Braun- bzw. Grauhuminsäure-Typs nicht zutrifft. Somit liegt es nahe, bei der natürlichen Bildungsweise des einen oder anderen Farbtyps getrennt nebeneinander und gleichzeitig ablaufende Teilprozesse anzunehmen, die zu einem Komplex führen, der als selbständiger Farbtyp aus dem Reaktionsgeschehen resultiert.

Untersuchung von Synthese-Huminsäuren

Da bereits in früheren Arbeiten die Auffassung vertreten wurde, daß die natürlichen Huminsäuren im allgemeinen aus verschiedenen monomeren Bausteinen ähnlichen chemischen Verhaltens aufgebaut sein können, war es nahelegend, das Studium dieses interessanten Befundes auf Synthese-Huminsäuren zu übertragen. Der Vorteil dieser Arbeitsweise liegt darin, daß die Huminsäure-Synthese von gleichartigen Monomeren aus gestartet werden kann. Als Ausgangsstoffe dienen Polyphenole, besonders Brenzcatechin und Hydrochinon. Im alkalischen Bereich werden diese Verbindungen unter Sauerstoff-Aufnahme und teilweiser Ringsprengung rasch oxydiert. Gleichzeitig findet eine Polykondensation statt, die in dreidimensionaler Verknüpfung zu den Huminsäuren führt. Eine Untersuchung dieser Synthese-Huminsäuren mit Hilfe der Papierelektrophorese ergab nun, daß genau wie bei dem natürlichen Grauhuminsäure-Typ drei Fraktionen unterschieden werden können (Bild 3).



Bild 3. Huminsäuren aus Hydrochinon. a) mit eingebautem Stickstoff, b) ohne Stickstoff

Damit wurde die bereits auf absorptionsspektrographischem Wege aufgefundene Identität dieser Modellsubstanz mit dem natürlich vorkommenden Grauhuminsäure-Typ bestätigt und außerdem dargetan, daß sich die Synthese-Huminsäuren zur Aufklärung der natürlichen Huminsäure-Bildung sehr wohl eignen.

In diesem Zusammenhang wurde auch versucht, den Einfluß des Stickstoffs auf die verschiedenen Fraktionen der synthetischen Grauhuminsäure kennenzulernen. Wie schon früher^{1, 2)} festgestellt werden konnte, wird durch den Einbau von Stickstoff in die Grauhuminsäure das Spektrum nach Rot verschoben, was äußerlich an der violetten Einfärbung des Farbtones und auch an der Verschiebung des $Q\ 4/6$ -Wertes erkennbar ist (siehe auch Bild 1). Es zeigte sich nun im Elektropherogramm (Bild 3), daß ausschließlich die mittlere Fraktion für den Stickstoff-Einbau in Frage kommt, während die 1. und 3. Fraktion keine Veränderungen aufweisen.

Zum Bildungsmechanismus der Huminsäuren

Die Ergebnisse über das Vorkommen von Grau- und Braunhuminsäuren in verschiedenen Bodentypen und die Untersuchungen über die Synthese-Huminsäuren auf Polyoxyphenol-Basis haben uns veranlaßt, grundsätzlich die Frage nach den Entstehungsbedingungen und nach dem konstitutionellen Aufbau der Huminsäuren aufzuwerfen. Es können hier die bisher erzielten Teilergebnisse über die Reaktionskinetik und den Verknüpfungsmechanismus nur summarisch genannt werden.

Erste Voraussetzung für die Konstitutionsermittlung ist die Kenntnis des Molekulargewichtes. Einleitende Versuche wurden bereits 1946 mit der Ultrazentrifuge unternommen. Es konnte aber in einem Schwerfeld von ca. 200000 g keine Sedimentation beobachtet werden — ein Zeichen dafür, daß die Huminsäuren nicht hoch —, sondern allenfalls höhermolekular im Sinne *Staudingers* sind. Dagegen wurde aus diesen Versuchen auf eine ausgesprochene Polydispersität und auf kugelförmige Gestalt der Huminsäure-Teilchen geschlossen. Da die klassischen Verfahren der niedermolekularen Chemie zur Molekulargewichtsbestimmung bei den nicht kristallisierenden Huminsäuren zu keinem Erfolg führten, wurde nach geeigneten festen Lösungsmitteln gesucht, um durch Bestimmung der Schmelzpunktsdepression dieses Ziel zu erreichen. Hierbei erwies sich Harnstoff als gut geeignet. In zahlreichen Messungen wurde ein Teilchengewicht von ca. 1000 ermittelt³⁾. Viskositätsmessungen in verschiedenen Lösungsmitteln erlaubten die Berechnung des Teilchengewichtes zu 700–800. Bei der Bestimmung des Teilchengewichtes über den Diffusionskoeffizienten in einer von uns entwickelten Spezialapparatur lagen die Werte zwischen 600–800. Zur Ergänzung wurden Äquivalentgewichtsbestimmungen an Barium-Humaten ausgeführt und durch Methoxyl-Gruppenbestimmungen ergänzt. Wir fanden im Mittel als Äquivalentgewicht für die auf Chinon-Basis künstlich aufgebauten Huminsäuren den Wert 124^{4, 5)}.

¹⁾ E. Wette, F. Scheffer u. O. v. Plotho, „Untersuchungen über die Bildung von Humusstoffen durch Actinomyceten“, Landwirtsch. Forsch. 7, 86 [1950].

²⁾ E. Wette, „Über die Entstehung von Huminsäuren und Wege ihrer Reindarstellung“, Pflanzenernährg., Düng., Bodenkd. 56, 105–139 [1952].

³⁾ E. Wette, „Über einen neuen Weg der Molekulargewichtsbestimmung und über die Elektrolytempfindlichkeit von Chinon-Huminsäuren“, ebenda 57, 142–151 [1952].

⁴⁾ E. Wette, M. Schatz u. W. Ziehm, „Über Huminsäuren I“ (Oxydationsmessungen), Naturwiss. 41, 213/14 [1954].

⁵⁾ E. Wette, A. Niemann u. W. Ziehm, „Über Huminsäuren II“ (Äquivalent- und Molekulargew.-Best.), ebenda 41, 334 [1954].

Diese Ergebnisse über Teilchengröße und Äquivalentgewicht sowie über die Uneinheitlichkeit der synthetischen Huminsäuren konnten die Grundlage für Versuche bilden, eine gewisse Klarheit über das Prinzip der Verknüpfung der einzelnen Monomeren zum Aufbau der Huminsäuren zu gewinnen. Dazu wurden umfangreiche Messungen über die Oxydation und die Sauerstoff-Aufnahme im geschlossenen System unternommen. Aus dem Sauerstoff-Verbrauch konnte die Oxydationsgeschwindigkeit und graphisch die Reaktionsordnung ermittelt werden, die wiederum Rückschlüsse auf die Anzahl der reagierenden Bausteine erlaubte.

Interessant ist dabei die Feststellung, daß es im Laufe der Autoxydation der vorgenannten Polyphenole bereits unter Einwirkung der Luft bei alkalischer Reaktion zu einer Ringsprengung kommt und nach Beendigung der Reaktion neben Kohlensäure auch noch Oxalsäure und etwas Essigsäure nachzuweisen sind. Die Beteiligung der Spaltprodukte an der Huminsäure-Synthese wird angenommen und setzt nach unserer Auffassung bereits mit der durch Oxydation geöffneten C_6 -Kette des Benzol-Ringes ein. Weitere labile Zwischenprodukte des autoxydativen Abbaues dürften außerdem daran beteiligt sein.

Die mit der Autoxydation gleichzeitig vorsichgehende Polykondensation dürfte durch die auftretenden reaktionsfähigen Spaltprodukte beeinflusst werden. Wir sind der Ansicht, daß sich diese Spaltprodukte inhibierend in den Verknüpfungsvorgang einschalten und sehen darin die Ursache für das relativ niedrige Teilchengewicht. Außerdem wird verständlich, weshalb trotz monomergleichartiger Ausgangsstoffe die entstehenden Chinon-Huminsäuren nicht einheitlich zusammengesetzt sind, wie das die Ergebnisse unserer elektrophoretischen Untersuchungen gezeigt haben. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld in Verbindung mit deutlich unterschiedlichen Merkmalen in der Farbe beweist, daß es sich bei den Fraktionen trotz einer gewissen chemischen Verwandtschaft um physikalisch voneinander abweichende höhermolekulare Verbindungen unterschiedlicher Konstitution handeln muß. Das Kristallisationsunvermögen der Huminsäuren ist nach unserer Auffassung darauf zurückzuführen, daß die Verknüpfung der 8–10 Benzolringe, die die Huminsäure-Molekel aufbauen, so rasch und räumlich irregulär abläuft, daß eine Einordnung der Ringe zu Raumgitterstrukturen nicht vorsichgehen kann.

Obgleich über den eigentlichen Reaktionsmechanismus der natürlichen Huminsäure-Synthese noch nichts Genaues gesagt werden kann, zeichnen sich eine Reihe von Teilvorgängen ab, die die überragende Bedeutung der Huminstoffe im Boden in ihrer Wechselbeziehung zur biologischen Phase und zur höheren Pflanze mit aller Deutlichkeit erkennen lassen. Ebenso eröffnen die Fortschritte auf dem Gebiet der kolorimetrischen Humusbestimmung begründete Aussichten, Fragen der Bodenklassifikation und Bodengenetik eingehender als bisher zu behandeln und den Verlauf der Bodenbildungsvorgänge besser zu verstehen und auszudeuten. Dieses dürfte in erhöhtem Maße für die Böden der Tropen gültig sein, über deren Humusverhältnisse wir nur ungenügend unterrichtet sind.

Eingeg. am 11. Dezember 1954 [A 635]