



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Über die Kultur von <i>Aspergillus niger</i> mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermögen der Nährlösung
Author(s)	SAKAMURA, Tetsu
Citation	Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan, 14(2), 65-128
Issue Date	1925-03-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12575
Type	departmental bulletin paper
File Information	14(2)_p65-128.pdf



Über die Kultur von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermögen der Nährlösung.

Von

Tetsu Sakamura

PROFESSOR DER PFLANZENPHYSIOLOGIE AN DER HOKKAIDO KAISERLICHEN
UNIVERSITÄT, SAPPORO.

Mit 12 Figuren

Einleitung.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel mehr, dass das Wachstum der Pilze stark von der aktuellen Acidität des Nährsubstrats beeinflusst wird. Auch bei den Kulturversuchen mit der klassischen Versuchspflanze *Aspergillus niger*, wodurch die Kenntnis der Ernährungsphysiologie der Schimmelpilze nicht wenig gefördert worden ist, hat man die Reaktion der Nährlösung oft erörtert. Schon früher haben einige Autoren auf die innige Beziehung zwischen dem Wachstum des Pilzes und der H-Ionenkonzentration aufmerksam gemacht, doch haften ihren Untersuchungen verschiedene Mängel an, die allerdings zum großen Teil auf die Unzulänglichkeit ihrer Messungsmethoden zurückzuführen sind, da die Bestimmung der Acidität damals nur auf dem Wege der Titration ausgeführt wurde. Heutzutage ist es eine allgemein anerkannte Forderung, dass die physiologisch wichtige Acidität¹⁾ durch die exakte H-Ionenkonzentration, aber nicht durch die Zahl der totalen Säuremoleküle ausgedrückt werden muss.²⁾ In dieser Beziehung sind trotz der

1) In den folgenden Zeilen verstehe ich unter "Acidität" nur diejenige, die durch die H-Ionenkonzentration ausgedrückt wird, und ich möchte sie der "Titrationsacidität" gegenüberstellen.

2) Es ist in gewissen Fällen nicht ausgeschlossen, dass die Säuremoleküle stark auf die Lebenserscheinungen wirken. Fettsäuren, z.B. entfalten viel stärkere physiologische Wirkung, als man nach ihrem Dissoziationsgrade erwarten sollte. Näheres siehe: LOEB (zit. nach CZAPEK) und CZAPEK.

wertvollen Arbeiten von WEHMER, NIKITINSKY, BRENNER(1), BUTKEWITSCH, RITTER u.a. noch wichtige Punkte unberührt gelassen worden, die noch der Aufklärung harren.

Bei Kulturversuchen mit Schimmelpilzen oder Bakterien bestimmt man in neuerer Zeit die H-Ionenkonzentration oder, der Einfachheit halber, den pH-Wert des Nährsubstrats. Wir treffen aber dann und wann auf Arbeiten, in denen z.B. die Aciditätswirkung der Nährlösung nur mit ihrer anfänglichen H-Ionenkonzentration verglichen wird, während das noch wichtigere Puffervermögen ganz ausser acht gelassen wird.

CLARK definiert die Pufferwirkung folgendermassen: "By buffer action we mean the resistance exhibited by a solution to change in pH through the addition or loss of acid or alkali" (S.40).¹⁾ In der vorliegenden Arbeit verstehe ich unter Pufferwirkung, der Bequemlichkeit halber, jene Wirkungen der Lösung, welche die Vermehrung der H-Ionenkonzentration hemmen, entweder im echten Sinne der Pufferung oder durch die aus dem Stoffwechsel resultierende Verminderungstendenz der H-Ionenkonzentration.

Die Lösungen mit demselben pH-Wert besitzen nicht immer das gleiche Puffervermögen, und zwar gibt es Fälle, wo Lösungen mit geringerem pH-Wert eine stärkere Pufferwirkung gegen Säuren aufweisen als solche mit grösserem pH-Wert.²⁾

Bei der Kultur des Pilzes kommt noch die fortwährende Veränderung der Acidität der Nährlösung hinzu, was die Umstände noch komplizierter macht. Der anfängliche pH-Wert dient also nur als Masstab für den Keimungsgrad der Sporen oder für den Entwicklungsgrad des Mycels im frühesten Stadium. Für das Wachstum des Pilzes in ununterbrochener Kultur spielt die Pufferwirkung die grössere Rolle als die anfängliche H-Ionenkonzentration.

Bei Bakterienkulturen ist die Pufferwirkung des Nährsubstrats schon von MICHAELIS, LARK, JONES, KLIGLER, WOLFF, BROWN,³⁾ VERZÁR und seinen Mitarbeitern berücksichtigt worden, während bei der Kultur des Schimmelpilzes, soweit meine Kenntnis der Literatur reicht, dies noch nicht der Fall ist.

Die umfangreichen und lehrreichen Untersuchungen von WEHMER,

1) Siehe: MICHAELIS (1) (S. 27-31) und MICHAELIS (2) (S. 89-93).

2) MICHAELIS (1) (S. 6).

3) Diese Arbeiten sind nach VERZÁR u.a. zitiert.

NIKITINSKY u.a., die hauptsächlich mit *Aspergillus niger* ausgeführt worden sind, müssen nun ergänzt werden, indem auf die exakte H-Ionenkonzentration sowie auf die Pufferwirkung acht gegeben wird. Die Resultate und die Schlussfolgerungen, die in der vorliegenden Arbeit erzielt worden sind, möchte ich aber weder auf die Kultur anderer Schimmelpilze noch anderer Kulturlösungen verallgemeinert wissen, weil *Aspergillus niger* ein Säurebildner ist und starke Acidität zu ertragen vermag. Doch hoffe ich, dass meine Untersuchungen die Kenntnis der Pilzkulturen, insofern sie sich auf *Aspergillus niger* beziehen, einigermassen erweitern werden, was unter Umständen auch von allgemeiner Bedeutung sein kann.

Methodik.

In der vorliegenden Untersuchung bediente ich mich meist einer synthetischen Nährlösung (Grundlösung),¹⁾ die schon früher von WEHMER u.a. bei der Kultur von *Aspergillus niger* benutzt worden ist und folgende Zusammensetzung zeigt:

Ammoniumnitrat (NH_4NO_3)	4 g
Monokaliumphosphat (KH_2PO_4)	2 g
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1 g
Eisenchlorid (FeCl_3) (2%)	ein Tropfen
Umdestilliertes Wasser ²⁾	100 ccm

Zum Gebrauch wurde die Grundlösung mit umdestilliertem Wasser und Glukoselösung verdünnt. Sämtliche Präparate wurden mit MERKS „garantiert reinen“ oder „extra reinen“ Chemikalien hergestellt. Als Kohlenstoffquelle kam pulverige Glukose gleicher Herkunft zur Anwendung, die vor dem Gebrauche völlig wasserfrei getrocknet wurde. Stark verdünnte Nährlösung ist, ausser zu besonderen Zwecken, nicht gebraucht worden, weil die Pufferwirkung der Nährlösung durch die Verdünnung mehr oder weniger stark herabgesetzt wird.³⁾

Als Kulturgefässe wurden ERLÉNMEYERSCHE Kolben von etwa 250 oder 300 ccm Inhalt verwendet. Auf die Eigenschaft der Gläser

1) Die Grundlösung wird beim Gebrauch in der Weise verdünnt, dass ihre Konzentration derjenigen bei WEHMER gleich ist.

2) Gewöhnliches destilliertes Wasser wurde in unserem Laboratorium in einem aus einheimischem Normalglas besonders hergestellten Destillationsapparat sorgfältig umdestilliert.

3) Siehe: MICHAELIS (1) (S. 30).

wurde besonders acht gegeben, und nur Kolben aus einheimischem Normalglas kamen zur Verwendung. Vor dem Gebrauch wurden die Gefäße, mit Wattepropfen verschlossen, im Trockenschrank sterilisiert. Die Kolben wurden mit meistens 100 ccm der Nährlösung beschickt und im KOCHSCHEN Dampftopf eine Stunde lang sterilisiert. Nach einstündiger Sterilisation wurden einige Kolben zur Kontrolle ausgewählt und tags darauf mit dem Pilz besät, indem drei Tropfen einer konzentrierten *Aspergillus*-Sporensuspension mit einer sterilisierten Kapillarpipette rasch hinzugefügt wurden. Die Konidiosporen stammten von Mycel, das auf festen Agar-Böden mit der oben genannten synthetischen Lösung und Glukose rein gezüchtet worden war. Nach der Aussaat wurden die Kulturen in den Thermostaten gestellt und die Temperatur auf 25—26° C reguliert. Zur Erntezeit wurde die Kulturflüssigkeit mitsamt der Erntemasse durch Filtrierpapier von bekanntem Gewicht filtriert. Bei der Messung der H-Ionenkonzentration wurde das Filtrat direkt zum Gebrauch verwendet. Die Erntemasse wurde weiter wiederholt mit kaltem destilliertem Wasser gespült und dann in einem Trockenschrank getrocknet. Nach ihrem Erkalten im Exsikkator wurde das Gewicht bestimmt durch Subtraktion des Filtrierpapiergewichtes vom Gesamtgewicht. Zur Ernte wurden in den meisten Fällen je drei oder auch je zwei Kolben aus der gleichen Kulturserie ausgewählt und der Durchschnittswert der Pilzernte für einen Kolben berechnet.

Die H-Ionenkonzentration der Nährlösung wurde mit Hilfe der Indikatoren von CLARK oder bei der gefärbten Lösung elektrometrisch bestimmt und der Einfachheit halber mit dem pH-Wert bezeichnet.¹⁾

Das Filtrat und auch das Abspülwasser wurden öfters der Oxalsäure- und Glukose-Analyse oder der Messung der Titrationsacidität unterworfen. Zu diesem Zwecke wurde das Gemisch weiter auf 500 ccm verdünnt und unter Zusatz von einigen Tropfen Toluol ein paar Tage aufbewahrt.

Bestimmung der Titrationsacidität: 50 ccm der auf 500 ccm verdünnten Lösung wurden aufgenommen und mit $n/10$ NaOH und Phenolphthalein als Indikator titriert. Die Titrationsacidität der

1) Aus zwei oder drei pH-Werten direkt einen durchschnittlichen pH-Wert zu berechnen, ist theoretisch nicht angängig. Falls aber die Differenz unter den pH-Werten nicht zu gross ist, bringt eine solche einfache Durchschnittsrechnung keinen merklichen Fehler hervor. Nur der Bequemlichkeit halber habe ich hier diese Rechnungsweise befolgt.

gesamten Lösung wurde mit dem zehnfachen für die Titration verbrauchten Volumen von $n/10$ NaOH bezeichnet.¹⁾

Oxalsäure-Analyse²⁾: 20 ccm des auf 500 ccm verdünnten Filtrats wurden als Probe in einen ERLLENMEYERSCHEN Kolben gefüllt und Calciumchlorid und dann Kalkmilch zugesetzt, bis die Lösung alkalisch reagierte. Der Niederschlag enthielt Calciumoxalat und Calciumphosphat zusammen. Der Kolben wurde stehen gelassen und der Niederschlag nach Verlauf einer Nacht abfiltriert, sodann mit Wasser ausgewaschen und mit Salzsäure aufgelöst. Nach Verdünnung der Lösung mit Wasser von 70° auf ca. 200 ccm, fügte ich 10 ccm verdünnte Schwefelsäure (1:4) hinzu und titrierte mit $n/10$ Kaliumpermanganatlösung unter beständigem Umrühren. Aus der nötigen Menge der Permanganatlösung wurde die gesamte Menge von Oxalsäure berechnet und mit der Zahl der ccm $n/10$ Lösung bezeichnet.

Glukose-Analyse: 5 oder 10 ccm des auf 500 ccm verdünnten Filtrats wurden nochmals auf 20 ccm verdünnt und diese Lösung als Probe verwendet. Die Glukose wurde nach der BERTRANDSCHEN Methode volumetrisch bestimmt und die Mengen des Zuckers in den Proben mit der für die Titration verbrauchten ccm 0.5% gen Kaliumpermanganatlösung vergleichsweise angegeben.

Der pH-Wert der nicht geimpften Kontrolllösung wurde vor dem Versuche bestimmt, während die Oxalsäure- und Zucker-Analyse sowie die Messung der Titrationsacidität in den Kontrollkolben nach dem Verweilen im Brutschrank am Ende des Versuchs ausgeführt wurden.

Wenn das Wachstum der verschiedenen Schimmelpilzkulturen miteinander verglichen werden soll, so muss besonders auf den Zeitpunkt der Ernte geachtet werden. Bei einer langen Kulturdauer wächst der Pilz so lange, bis die C-Quelle erschöpft und damit das Wachstumsmaximum überschritten ist. Wird der C-Vorrat ganz oder fast ganz konsumiert, so wird das Pilzgewicht immer geringer, was durch die Proteolyse des Pilzkörpers verursacht wird, worauf MALFITANO schon früher aufmerksam gemacht hat und was auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt worden ist. BRENNER (1) hat auf diesen Umstand bei der Kultur von *Aspergillus niger* besondere Rück-

1) In einigen Fällen wurde die gesamte Menge von 500 ccm Lösung in zehn Teile geteilt und zur Titration gebraucht. Die Titrationsacidität der gesamten Lösung wurde mit der Summe der gebrauchten ccm $n/10$ NaOH bezeichnet.

2) Diese Methode ist auch beim Zusatz von K-Citrat oder K-Tartarat als Puffer verwendbar. Beim Zusatz von K-Tartarat wurde sie etwas modifiziert.

sicht genommen und aus zahlreichen Kulturen einer Serie täglich Pilzmycel geerntet, um den Wachstumsprozess genauer verfolgen zu können. Auch NIKITINSKY hat aus dem gleichen Grunde mehrmals solche Ernten ausgeführt. HAENSELER hat sich auch mit der Kultur von *Aspergillus niger* beschäftigt und dessen Wachstumsverlauf in seiner besten Nährlösung untersucht. Nach dreitägiger Kultur erreicht der Pilz sein Wachstumsmaximum; nachher, bis zum siebenten Tag, wird nur eine langsame Verminderung des Pilzgewichts bemerkt. Aus diesem einzigen Vorversuche hat er geschlossen, dass die einmalige Ernte einer siebentägigen Kultur genügt, um die Nährwerte der von ihm gebrauchten verschiedenen Nährlösungen zu vergleichen. Es scheint mir aber unwahrscheinlich, dass das Wachstum in diesen verschiedenen Kulturlösungen immer auf dieselbe Weise wie in seinem Vorversuche verläuft.

Wenn Kulturresultate, die von verschiedenen Forschern unabhängig voneinander gewonnen worden sind, miteinander verglichen werden, so haben die Schlussfolgerungen nur dann einen Wert, wenn die Zeitpunkte der Ernte besonders bei langer Kulturdauer oder bei einer spärlichen C-Quelle nicht zu sehr voneinander abweichen.

Um das Wachstum in den verschiedenen Kulturen am klarsten zu veranschaulichen, habe ich daher in der vorliegenden Untersuchung eine Reihe von Kolben für jede gleiche Kultur benützt, und meistens täglich oder doch in möglichst kurzen Zwischenräumen das Pilzmycel geerntet. Mehrere Kulturen wurden mittels Kurven miteinander verglichen, oder wenn die Ernte unter Umständen nicht so oft ausgeführt werden konnte, so wurde der übriggebliebene Zucker qualitativ oder quantitativ nachgewiesen, damit man bemerken konnte, wann die Herabsetzung der Pilzernte begann, d.h. wann das Maximum des Pilzgewichts erreicht war.

Ganz dieselbe Aufmerksamkeit ist natürlich auch auf den Verlauf der Aciditätsänderung gerichtet worden. Viele Autoren, welche bei ihren Versuchen den pH-Wert der Nährlösung mitteilen, sind aber gewöhnt, die Messung des pH-Wertes nur am Anfang und am Ende des Versuches auszuführen ohne zu berücksichtigen, wie die Acidität im Verlauf der Entwicklung sich verändert. Die Schwankung der Acidität muss daher ohne Zweifel auch hier graphisch klar gezeigt werden.¹⁾

1) YOUNG und BENNET haben z. B. bestätigt, dass bei der Kultur von *Fusarium oxysporum* die Veränderung des pH-Wertes der Kulturlösung (RICHARDSSCHE Lösung) wie folgt stattfindet: 4.2 → 3.6 → 8.4.

Die Rückkehr zur schwächeren Acidität oder das Übergehen in die alkalische Reaktion im späteren Kulturstadium wurde in den vorliegenden Versuchen oft beobachtet. Wenn die ganze Menge des Zuckers oder des Ammoniaks konsumiert ist, so beginnt die Acidität plötzlich abzunehmen, indem, wahrscheinlich infolge der Proteolyse, alkalisch reagierende Substanzen, z. B. Ammoniak erzeugt wird oder beziehungsweise infolge des Ammoniakmangels die disponibel gewordene Säure nun vom Pilz aufgenommen wird.

Da *Aspergillus niger* VAN TIEGH. zahlreiche Rassen enthält und die physiologische Leistung möglicherweise je nach den Rassen verschieden sein dürfte,¹⁾ so habe ich in der vorliegenden Arbeit nur einen einzigen Stamm als Versuchspflanze verwendet, der im Laboratorium für Angewandte-Mykologie der hiesigen Universität seit langem unter der Bezeichnung Nr. 99 rein kultiviert wird. Hier möchte ich Herrn Professor HANZAWA, dem Direktor des genannten Laboratoriums für die Überlassung des Pilzmaterials meinen wärmsten Dank aussprechen.

Kultur in der Grundlösung.

Da der Kulturversuch mit der glukosehaltigen Grundlösung die Norm für andere Versuche mit etwas modifizierten Kulturlösungen abgibt, so ist der Verlauf des täglichen Wachstumsprozesses und der täglichen Veränderung der Acidität zunächst durch diesen Versuch eingehend untersucht worden. Folgende Kulturlösung wurde benützt:

Grundlösung	25 cem
Glukoselösung (m/2)	50 cem
Umdest. Wasser	25 cem

VERSUCH I.

pH nach einstündiger Sterilisation: 4.43.

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 cem Inhalt.

Tabelle I.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1	2	0.020	3.6	0	+
2	„	0.018	3.5	0	+
3	„	0.007	3.4	0	+
	2	0.015	3.5	0	+

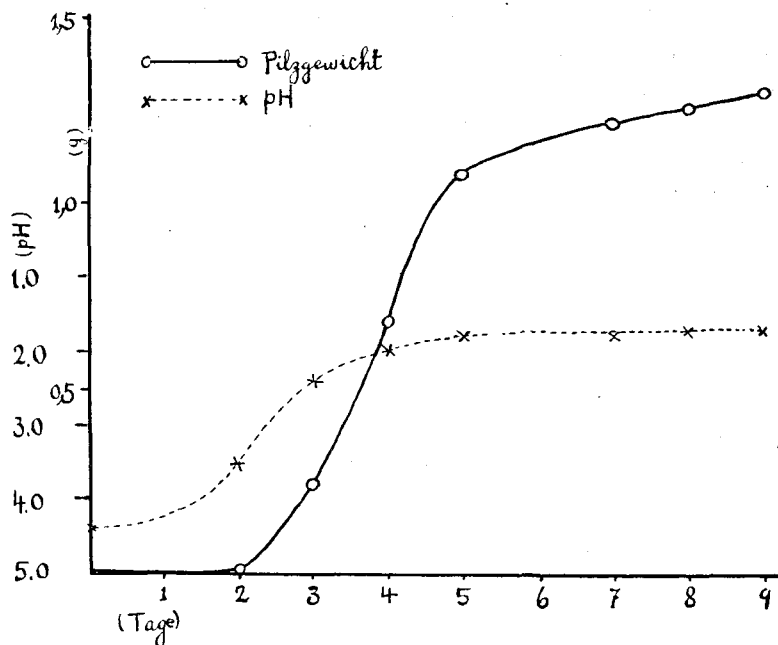
1) Vergl.: BRENNER (1) (S.571-572).

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
4	3	0.283	2.35	0	+
5	„	0.262	2.32	0	+
6	„	0.175	2.56	0	+
	3	0.240	2.41	0	+
7	4	0.700	2.0	0	+
8	„	0.742	1.9	0	+
9	„	0.614	2.1	0	+
	4	0.685	2.0	0	+
10	5	1.124	1.8	0	+
11	„	1.033	1.8	0	+
12	„	1.087	1.8	0	+
	5	1.081	1.8	0	+
13	7	1.486	1.7	0	+
14	„	1.142	1.9	0	+
15	„	1.023	1.8	0	+
	7	1.217	1.8	0	+
16	8	1.392	1.7	0	+
17	„	1.269	1.7	0	+
18	„	1.121	1.8	0	+
	8	1.261	1.7	0	+
19	9	1.325	1.7	0	+
20	„	1.313	1.7	0	+
21	„	1.301	1.7	0	+
	9	1.313	1.7	0	+

(Siehe Fig. I.)

Aus diesem Versuche geht klar hervor, dass das Wachstum sowie die Veränderung des pH-Wertes die autokatalyseähnliche β -förmige Kurve zeigt. Im früheren Stadium der Kultur ist die Wachstumsgeschwindigkeit sehr gering, am vierten Tag erreicht sie das Maximum, vom fünften Tag an beginnt sie langs am abzunehmen, indem sich das Pilzgewicht täglich nur wenig vermehrt. Die Verminderungsgeschwindigkeit des pH-Wertes erreicht das Maximum am zweiten Tag, vom dritten Tag an wird sie wieder langsamer, und vom fünften bis zum neunten Tag ersieht man keine merkliche Veränderung, es wird nämlich jederzeit der pH-Wert 1.8 oder 1.7 gefunden. Es ist noch zu bemerken, dass die Maxima der Wachstumsgeschwindigkeit und der Veränderung des pH-Wertes nicht vollständig miteinander übereinstimmen, indem das

Fig. I.



letztere etwas früher kommt als das erstere. Beim Vergleich dieser zwei Kurven kann man sagen, dass der optimale pH-Wert der Grundlösung für das fortgeschrittene Wachstum des Mycels von *Aspergillus niger* etwa 2.0 beträgt. Wenn die Acidität nur etwas höher wird, so wirkt sie hemmend auf das Wachstum.

Obwohl ich in dem vorliegenden Versuche keine quantitative Bestimmung der zurückgebliebenen Zuckermenge ausgeführt habe, so ist es leicht, mittels der FEHLINGSCHEN Reaktion zu beweisen, dass noch viel Zucker bis zum Ende des Versuchs zur Verfügung steht.

Oxalsäure ist in dieser Kultur von *Aspergillus niger* nie erzeugt worden, was bemerkenswert ist; denn in einer fast gleichen Kulturlösung hat WEHMER Oxalsäurebildung nachweisen können. Man könnte geneigt sein, die Ursache dieses Unterschieds so zu erklären, dass die Kultur im obigen Versuche nur neun Tage dauerte, während sie im Falle von WEHMER viel länger fortgesetzt wurde. Dass dies trotzdem nicht der Fall ist, kann man ohne weiteres daraus ersehen, dass auch bei einer anderen zwei oder drei Wochen dauernden Kultur von mir keine Oxalsäurebildung nachgewiesen werden konnte. Auch bei anderen

Rassen¹⁾ von *Aspergillus niger* mit gleicher Nährlösung ist keine Spur von Oxalsäure konstatiert worden. BUTKEWITSCH hat das Fehlen der Oxalsäurebildung bei diesem Pilz bestätigt, wenn Ammoniumnitrat als N-Quelle angewendet wird.

Die Steigung der Acidität bis pH 1.7 ohne Bildung organischer Säure²⁾ ist daher darauf zurückzuführen, dass freie Salpetersäure bei der Aufnahme des Ammoniaks durch den Pilz aus Ammoniumnitrat disponibel wird, was schon früher von WEHMER und besonders von NIKITINSKY eingehend untersucht worden ist.

Während die Entwicklung des Pilzes durch die H-Ionenkonzentration des Kulturmediums stark beeinflusst wird, muss darauf geachtet werden, dass umgekehrt jene auch diese fortwährend verändert. Diese Wechselbeziehung ist, wenigstens oberflächlich, der Autokatalyse ähnlich. Heute wird das Wachstum des Organismus von einigen Autoren als eine Art Autokatalyse aufgefasst.³⁾ Obwohl es in meinem Falle natürlich noch zu früh ist, das Wachstum des Pilzes mit der Autokatalyse zu vergleichen, so ist doch zu bemerken, dass die Form der Kurve des Wachstums sowie der Veränderung des pH-Wertes auffallend derjenigen der Autokatalyse entspricht. NIKITINSKY hat bei der Kultur von *Aspergillus niger* bemerkt, dass das Wachstum durch Stoffwechselprodukte manchmal stimuliert wird. Er konnte aber weder qualitativ noch quantitativ etwas über diese Reizstoffe erfahren und sagt: „Ob diese Erscheinung überhaupt als eine katalytische oder vielleicht als eine „physiologische Gegenreaktion“ betrachtet werden muss, müssen wir sogar dahingestellt sein lassen und uns zufrieden geben, die erwähnte oberflächliche Aehnlichkeit mit den autokatalytischen Erscheinungen zu konstatieren.“ (S. 58).

Kultur in der pufferhaltigen Grundlösung.

Wie schon erwähnt, verstehe ich hier unter Pufferwirkung einer Lösung ihr Widerstandsvermögen gegen das Ansteigen der H-Ionenkonzentration.

Es steht natürlich ausser Zweifel, dass die Grundlösung einigermaßen ein Puffervermögen besitzt.⁴⁾ Wenn aber ein spezifischer Puffer

1) Nr. 55 und 96 vom Laboratorium für Angewandte Mykologie der hiesigen Universität.

2) Citronensäure wurde, soweit ich die Sache beiläufig untersucht habe, gar nicht nachgewiesen.

3) CHODAT (zit. nach THOMPSON, Growth and Form) Wo. OSTWALD, ROBERTSON u. a.

4) KARRER and WEBB.

zur Grundlösung hinzugefügt wird, so werden das Wachstum, die Aciditätsänderung, die Säurebildung usw. mehr oder weniger verändert. Um diese Verhältnisse klar zu machen, sind eine Reihe von Versuchen mit folgenden Puffersalzen¹⁾ angestellt worden:

- Kaliumoxalat
- Kaliumcitrat
- Kaliumtartarat
- Dikaliumphosphat

Diese Salze besitzen ohne weiteres die Pufferwirkung gegen ihre entsprechende Säure, doch ist es nicht ausgeschlossen, dass sie mehr oder weniger stark auch als Puffer gegen andere Säuren wirksam sind. Ich habe dies in vitro durch Titration mit verdünnter Salpeter- oder Salzsäure bestätigt. Es ist daher zu vermuten, dass das Vorhandensein dieser Salze die Erhöhung der H-Ionenkonzentration hemmen kann, die durch die Dissoziation der vom Pilze erzeugten Oxalsäure oder durch andere Ursachen hervorgerufen wird.

VERSUCH II.

Spezifische Grundlösung:

Ammoniumnitrat	0.5 g
Monokaliumphosphat	0.5 g
Magnesiumsulfat	0.25 g
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen
Umdest. Wasser	100 ccm

Kulturlösungen:	(1)	(2)	(3)
Spez. Grundlösung	25 ²⁾	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
K-Oxalat (normal)			25
K-Oxalat (n/4)		25	
Umdest. Wasser	25		
Summe (ccm)	100	100	100

pH nach einstündiger Sterilisation:

- (1) 4.00
- (2) 5.32
- (3) 5.61

ERLENMEYERSCHE Kolben von 250 ccm Inhalt.

Titrationssacidität in der Kontrolle:

Die für die Titration verbrauchte
Menge von n/10 NaOH

- (1) 10 ccm
- (2) 29 ccm
- (3) 29 ccm

1) Diese Chemikalien sind „garantiert reine“ oder „extra reine“ Reagentien von MERK. Mit Phenolrot reagieren sie alle fast neutral oder alkalisch (Phosphat).

2) In ccm ausgedrückt. Ebenso in den folgenden Tabellen.

Oxalsäure-Analyse in der Kontrolle:

n/10 Lösung

- (1) 0
 (2) 62.5 ccm
 (3) 250.0 ccm

Glukose-Analyse in der Kontrolle (10 ccm als Probe genommen):

Die für die Titration verbrauchte

Menge von 0.5% KMnO_4

- (1) 16.6 ccm
 (2) 16.5 ccm
 (3) 16.6 ccm

Tabelle II.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm n/10 NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO_4
					gesamt	erzeugt	
1-1	7	0.314	1.91				
1-2	„	0.431	2.02				
1	7	0.373	1.97				
2-1	7	0.792	3.69				
2-2	„	0.893	3.71				
2	7	0.843	3.70				
3-1	7	1.202	4.25				
3-2	„	1.414	4.33				
3	7	1.308	4.29				
1-1'	7	0.311		16.5	0	0	12.3
1-2'	„	0.256		16.2	0	0	13.9
1	7	0.284		16.3	0	0	13.1
2-1'	7	0.790		33.2	62.5	0	9.5
2-2'	„	0.739		31.4	62.5	0	10.1
2	7	0.764		32.3	62.5	0	9.8
3-1'	7	1.384		28.3	250.0	0	3.9
3-2'	„	1.665		43.1	250.0	0	3.3
3	7	1.525		35.7	250.0	0	3.6
1-3	14	0.693	1.91				
1-4	„	0.541	1.90				
1	14	0.617	1.91				
2-3	14	1.384	3.48				
2-4	„	1.315	3.38				
2	14	1.350	3.43				
3-3	14	1.379	5.30				
3-4	„	1.455	5.41				
3	14	1.417	5.36				

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm ⁿ /10 NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 5.0% KMnO ₄
					gesamt	erzeugt	
1-3'	14	0.709		14.1	0	0	6.5
1-4'	"	0.785		13.7	0	0	6.1
1	14	0.747		13.9	0	0	6.3
2-3'	14	1.252		75.0	57.5	-5.0	1.0
2-4'	"	1.334		69.5	57.5	-5.0	0.8
2	14	1.293		72.3	57.5	-5.0	0.9
3-3'	14	1.310		9.8	250.0	0	0
3-4'	"	1.417		5.6	250.0	0	0
3	14	1.364		7.7	250.0	0	0
1-5	21	1.147	2.59				
1-6	"	1.080	2.47				
1	21	1.114	2.53				
2-5	21	1.339	4.01				
2-6	"	1.360	4.79				
2	21	1.350	4.40				
3-5	21	1.069	7.40				
3-6	"	1.009	6.22				
3	21	1.039	6.81				
1-5'	21	1.190		9.4	0	0	1.4
1-6'	"	1.084		8.2	0	0	1.8
1	21	1.137		8.8	0	0	1.6
2-5'	21	1.297		4.9	58.8	-3.8	0
2-6'	"	1.215		13.7	60.2	-2.3	0
2	21	1.256		9.3	59.5	-3.0	0
3-5'	21	1.121		3.0	251.5	1.5	0
3-6'	"	1.057		3.0	259.6	9.6	0
3	21	1.089		3.0	255.5	5.5	0

(siehe Fig II and III)

Verfolgt man den Prozess des Wachstums, so ist es ersichtlich, dass in der ersten Woche der Pilz bei Zusatz von Kaliumoxalat besser wächst als ohne Zusatz, und zwar um so besser je grösser die zugesetzte Menge ist. In der zweiten Woche ist das Verhältnis fast gleich. Die dritte Woche ergibt für die Kultur 1 noch eine Vermehrung des Pilzgewichtes; in der Kultur 2 ist eine solche Vermehrung nicht mehr nachweisbar, da im Gegenteil schon die Neigung zur Verminderung erkennbar ist. Eine merkliche Abnahme des Pilzgewichtes wird in der Kultur 3 beobachtet. Diese Abnahme im späteren Stadium

Fig. II.

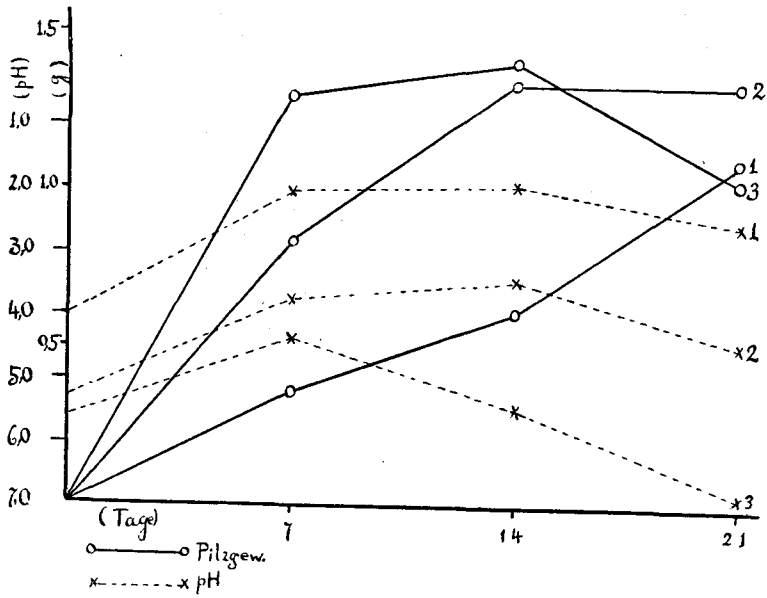
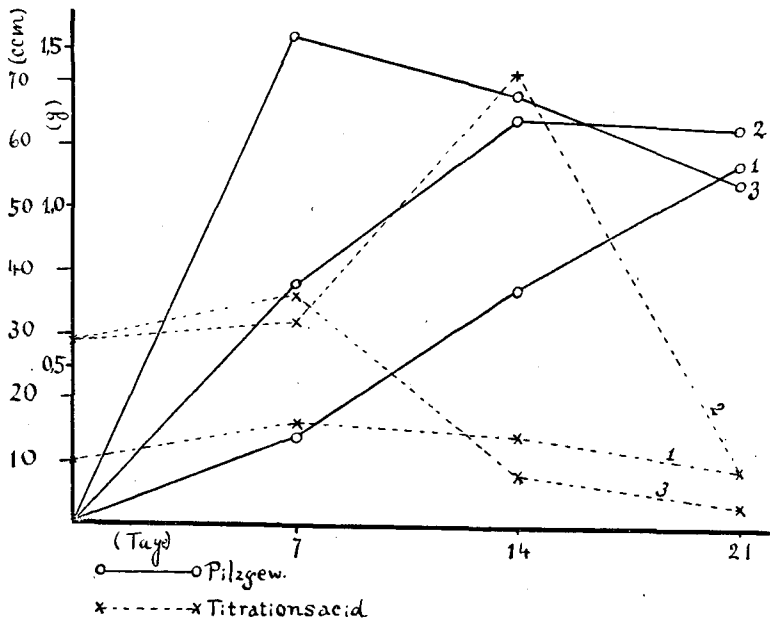


Fig. III.



ist begreiflicherweise eine Folge des Zuckermangels und der dadurch hervorgerufenen Proteolyse des Pilzkörpers. Dies kann man durch die Bestimmung der zurückgebliebenen Zuckermenge klar verstehen. Im Falle, wo die Pilzernte vermindert ist gegenüber früher, ist stets zu erkennen, dass der Zuckerbedarf des Pilzes nicht gedeckt ist. Da möglicherweise auch Ammoniak oder dessen Derivate produziert werden, so findet ausnahmslos eine gleichzeitige Erniedrigung der Titrationsacidität statt.

Die Kulturlösung in der Kultur 2 erreichte am vierzehnten Tag eine so hohe Titrationsacidität, dass 72 ccm $n/10$ NaOH für die Titration verbraucht wurden. In der Kultur 3, wo sowohl stärkeres Puffervermögen als auch grösseres Pilzgewicht zu erwarten waren, zeigten jedoch im ganzen Verlauf der Entwicklung die Filtrate keine solch hohe Titrationsacidität. Es scheint mir aber die Annahme berechtigt, dass in Wirklichkeit schon in der zweiten Woche das Maximum der Titrationsacidität vorkommt, dass es sich aber lediglich der Beobachtung durch die Ernte entzieht.

Betreffs der H-Ionenkonzentration kann man schon am Anfang des Versuches in den verschiedenen Kulturen den Unterschied des pH-Wertes wahrnehmen, der durch den Zusatz von Kaliumoxalat herbeigeführt worden sein muss. Mit steigender Menge des Puffers verstärkt sich das Puffervermögen. Es erfolgt also in der Kulturlösung eine langsame Erhöhung der H-Ionenkonzentration.

Werden nur diese Resultate in Betracht gezogen, so scheint es, als ob keine Oxalsäurebildung stattgefunden hätte. Doch darf man in früheren Stadien auch bei diesem Versuche die Oxalsäurebildung vermuten, weil die folgenden Versuche zeigen, dass Oxalsäure einmal im früheren Stadium produziert und dann nachher wieder vom Pilz verarbeitet wird, wenn starker oder totaler Zuckermangel auftritt.¹⁾

Zusammenfassend lassen sich aus diesem Versuche die folgenden Resultate gewinnen:

Wenn Kaliumoxalat in bestimmten Mengen der Kulturlösung als Puffer zugesetzt wird, so wirkt dieses Neutralsalz hemmend auf den Anstieg der H-Ionenkonzentration. Das Wachstum des Pilzes verläuft dabei schnell und erreicht bald das Maximum. Die Menge des zugesetzten Oxalats wird durch das Gedeihen des Pilzes nicht merklich verändert.

1) Vergl.: Versuch VII.

VERSUCH III.

Kulturlösungen :	(1)	(2)
Grundlösung	25	25
Glukoselösung (molar)	50	50
K-Oxalat (normal)		25
Umdest. Wasser	25	

Summe (cem)	100	100
-------------	-----	-----

pH nach einstündiger Sterilisation :

(1)	3.55
(3)	5.10

ERLENMEYERSCHE Kolben von 250 cem Inhalt.

Titrationsacidität in der Kontrolle :

Die für die Titration verbrauchte
Menge von n/10 NaOH

(1)	40.5 cem
(3)	40.5 cem

Oxalsäure-Analyse in der Kontrolle :

n/10 Lösung

(1)	0
(3)	250

Glukose-Analyse in der Kontrolle (5 cem als Probe genommen)

Die für die Titration verbrauchte

Menge von 0.5% KMnO_4

(1)	16.9 cem
(3)	16.9 cem

Tabelle III.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität cem ⁿ /10NaOH	Oxalsäure cem n/10 Lös.		Glukose cem 0.5% KMnO_4
					gesamt	erzeugt	
1-1	5	0.367	2.5				
1-2	„	0.337	2.5				
1	5	0.353	2.5				
3-1	5	1.461	3.6				
3-2	„	1.112	3.7				
3	5	1.287	3.7				
1-1'	5	0.507		53	0	0	15.2
1-2'	„	0.441		52	0	0	15.5
1	5	0.474		53	0	0	15.4
3-1'	5	1.649		101	247.5	-2.5	11.5
3-2'	„	1.112		105	250.0	0	12.3
3	5	1.381		103	248.8	-1.25	11.9

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm ³ /10NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO ₄
					gesamt	erzeugt	
1-2	10	0.708	1.99				
1-3	"	0.917	1.87				
1	10	0.813	1.93				
3-2	10	3.750	2.53				
3-3	"	3.675	2.53				
3	10	3.713	2.53				
1-2'	10	1.056		70	0	0	12.0
1-3'	"	1.243		82	0	0	12.7
1	10	1.150		76	0	0	12.4
3-2'	10	3.801		119	182.5	-67.5	1.8
3-3'	"	3.461		157	187.5	-62.5	3.4
3	10	3.631		138	185.0	-65.0	2.6
1-4	15	1.475	1.65				
1-5	"	1.672	1.65				
1	15	1.574	1.65				
3-4	15	3.763	2.86				
3-5	"	3.490	3.96				
3	15	3.627	3.14				
1-4'	15	1.412		89	0	0	9.5
1-5'	"	1.605		106	0	0	9.5
1	15	1.509		102	0	0	9.5
3-4'	15	3.485		68	177.5	-72.5	0
3-5'	"	3.429		63	192.5	-57.5	0
3	15	3.457		66	185.0	-65.0	0
1-6	24	1.430	1.76				
1-7	"	2.203	1.49				
1	24	1.817	1.63				
3-6	24	3.041	4.79				
3-7	"	3.160	4.07				
3	24	3.101	4.43				
1-6'	24	1.821		134	0	0	6.3
1-7'	"	1.875		124	0	0	6.9
1	24	1.848		129	0	0	6.6
3-6'	24	3.201		46	182.5	-67.5	0
3-7'	"	3.202		52	177.5	-72.5	0
3	24	3.202		49	180.0	-70.0	0

(Siehe Fig. IV und V)

Fig. IV.

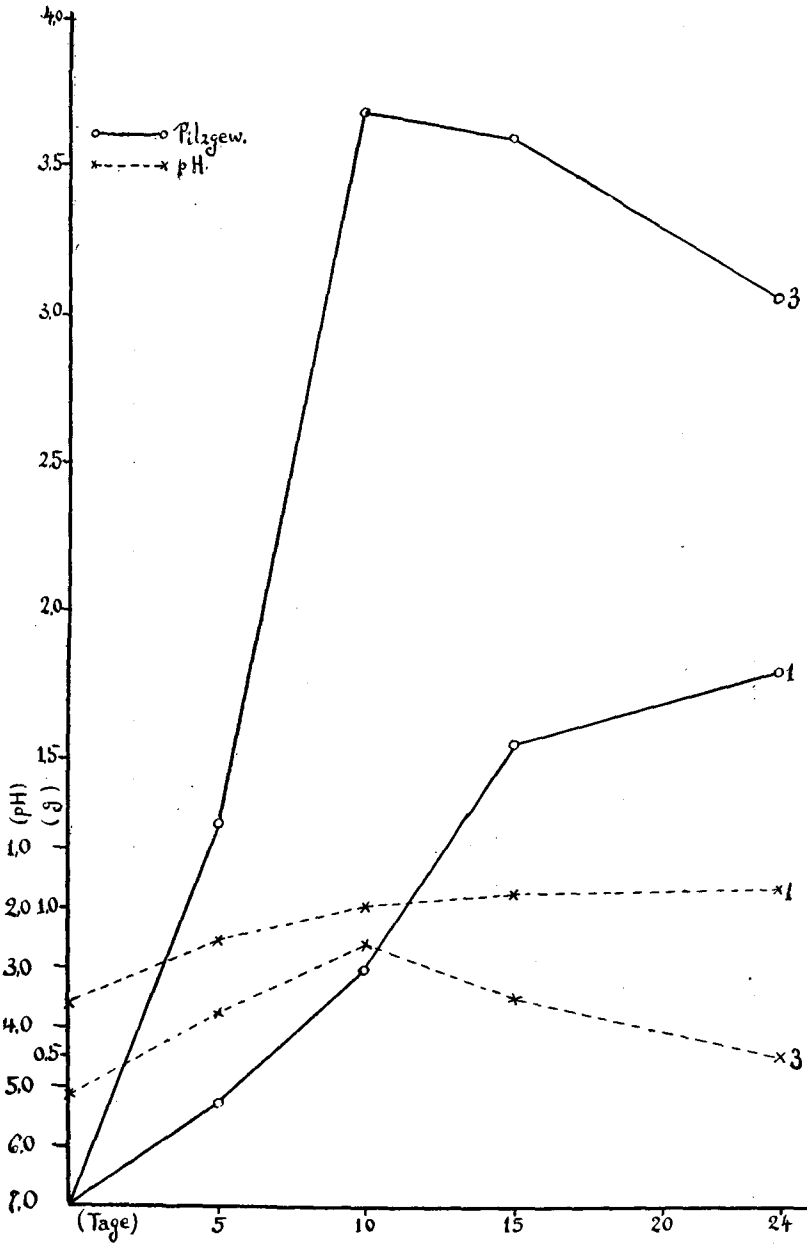
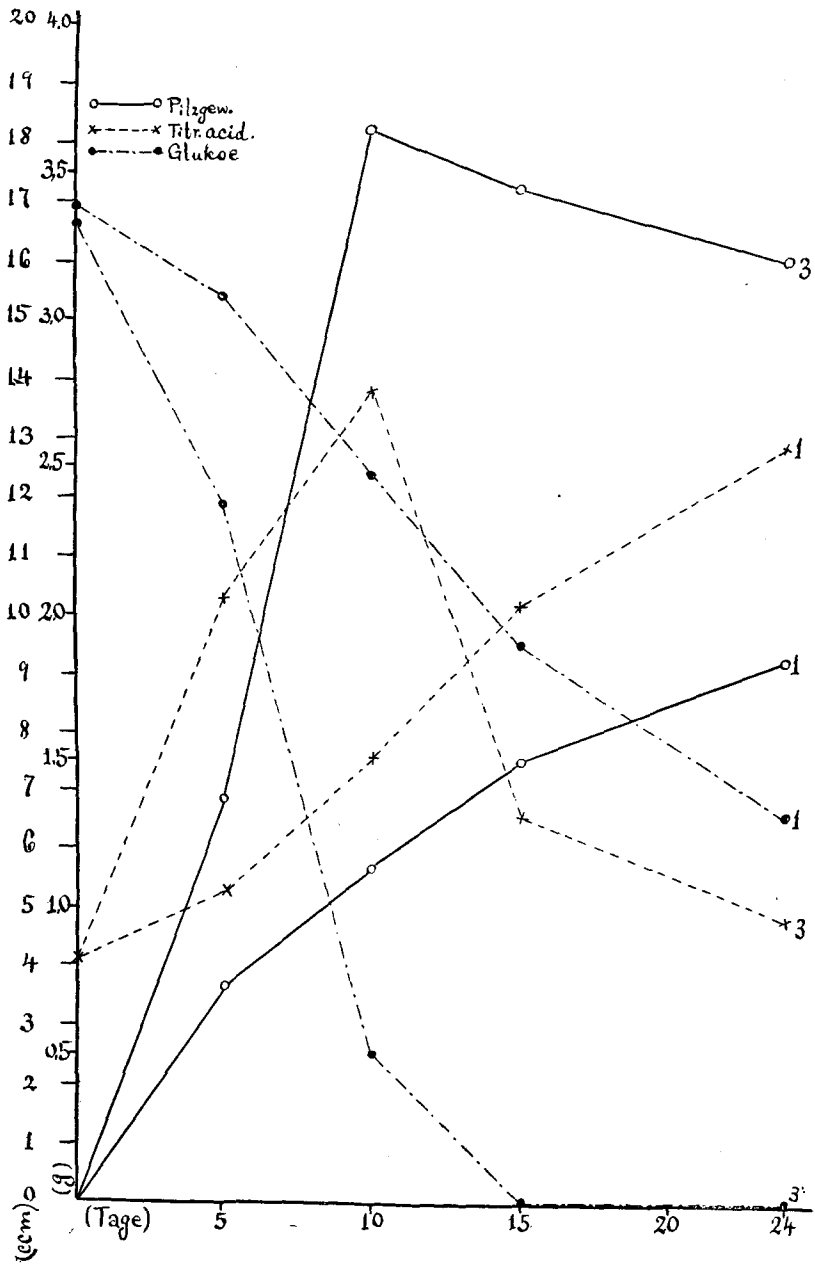


Fig. V.



Aus dem Versuchsergebnis kann man im grossen und ganzen denselben Schluss ziehen, wie beim Versuch II. Da aber die Konzentration der Kulturlösung, besonders die Zuckermenge, doppelt so gross ist wie beim Versuch II und unter Umständen auch Oxalat vom Pilz assimiliert werden kann,¹⁾ so erfolgt die Verminderung der Pilzernte sowie der Titrationsacidität infolge der Proteolyse des Pilzkörpers viel langsamer als beim Versuch II.

VERSUCH IV.

Kulturlösungen:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50	50	50	50	50
K-Oxalat (n/4)		25					
K-Oxalat (normal)			25				
K-Tartarat (n/4)				25			
K-Tartarat (normal)					25		
K-Citrat (n/4)						25	
K-Citrat (normal)							25
Umdest. Wasser	25						
Summe (ccm)	100	100	100	100	100	100	100
pH nach einstündiger Sterilisation:							
(1)	4.31						
(2)	4.60						
(3)	5.10						
(4)	4.82						
(5)	5.34						
(6)	5.36						
(7)	5.68						
ERLENMEYERSCHE Kolben von 250 ccm Inhalt.							
Titrationsacidität in der Kontrolle:							
Die für die Titration verbrauchte Menge von n/10 NaOH							
(1)	40.5 ccm						
(2)	40.5 ccm						
(3)	40.5 ccm						
(4)	40.5 ccm						
(5)	40.5 ccm						
(6)	40.5 ccm						
(7)	40.5 ccm						
Oxalsäure-Analyse in der Kontrolle:							
n/10 Lösung							
(1)	0						
(2)	62.5 ccm						
(3)	246.0 ccm						
(4)	0						
(5)	0						

1) Im Versuch II wird das Oxalat durch den Pilz nicht merklich verarbeitet.

(6) 0
(7) 0

Glucose-Analyse in der Kontrolle (10 ccm als Probe genommen):

Die für die Titration verbrauchte Menge von 0.5% KMnO_4

(1) 16.4 ccm
(2) 16.4 ccm
(3) 16.6 ccm
(4) 16.2 ccm
(5) 16.5 ccm
(6) 16.4 ccm
(7) 16.1 ccm

Tabelle IV.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm ⁿ /10NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO_4
					gesamt	erzeugt	
1-1	7	0.900	1.81				
1-2	„	1.019	1.88				
1	7	0.960	1.85				
2-1	7	1.860	2.06				
2-2	„	1.638	2.25				
2	7	1.749	2.16				
3-1	7	1.950	3.36				
3-2	„	1.841	3.36				
3	7	1.896	3.36				
4-1	7	1.588	2.58				
4-2	„	1.362	2.58				
4	7	1.475	2.58				
5-1	7	2.317	4.05				
5-2	„	2.247	4.19				
5	7	2.282	4.12				
6-1	7	2.090	2.32				
6-2	„	1.854	2.49				
6	7	1.972	2.41				
7-1	7	2.060	6.51				
7-2	„	2.240	6.34				
7	7	2.150	6.43				
1-3	7	0.886		64.8	0	0	10.5
1-4	„	0.820		56.5	0	0	10.9
1	7	0.853		60.7	0	0	10.7
2-3	7	1.713		75.5	57.9	-4.6	3.8
2-4	„	1.864		75.0	55.0	-7.5	3.2
2	7	1.789		75.3	56.5	-6.0	3.5

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm ⁿ /10NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO ₄
					gesamt	erzeugt	
3-3	7	2.055		92.0	240.0	-0.6	0.4
3-4	„	1.955		96.0	247.5	1.5	0.4
3	7	2.005		94.0	243.8	-2.3	0.4
4-3	7	1.630		103.0	0	0	4.4
4-4	„	1.349		102.0	0	0	6.2
4	7	1.490		102.5	0	0	5.3
5-3	7	2.521		46.0	160.0	160.0	0
5-4	„	2.273		60.0	195.0	195.0	0
5	7	2.397		53.0	178.0	178.0	0
6-3	7	2.089		54.0	0	0	0.4
6-4	„	2.131		51.0	0	0	0.4
6	7	2.110		52.5	0	0	0.4
7-3	7	2.095		26.0	130.6	130.6	0
7-4	„	2.143		24.0	132.5	132.5	0
7	7	2.119		25.0	131.6	131.6	0

VERSUCH V.

Kulturlösungen:	(1)	(3)	(5)	(7)
Grundlösung	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50	50
K-Oxalat (normal)		25		
K-Tartarat (normal)			25	
K-Citrat (normal)				25
Umdest. Wasser	25			

Summe (ccm)	100	100	100	100
-------------	-----	-----	-----	-----

pH nach einstündiger Sterilisation:

(1)	4.34
(3)	5.11
(5)	5.21
(7)	5.82

ERLENMEYERSCHE Kolben von 250 ccm Inhalt.

Titrationsacidität in der Kontrolle:

Die für die Titration verbrauchte
Menge von n/10 NaOH

(1)	40.5 ccm
(3)	40.5 ccm
(5)	40.5 ccm
(7)	40.5 ccm

Oxalsäure-Analyse in der Kontrolle:

n/10 Lösung

(1)	0
(3)	246 ccm

(5) 0
(7) 0

Glukose-Analyse in der Kontrolle (10 ccm als Probe genommen):

Die für die Titration verbrauchte

Menge von 0.5% KMnO_4

(1, 16.4 ccm
(3) 16.6 ccm
(5) 16.5 ccm
(7) 16.4 ccm

Table V.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm ⁿ /10NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO_4
					gesamt	erzeugt	
1-1	5	0.095	3.71				
1-2	„	0.235	3.56				
1	5	0.165	3.64				
3-1	5	1.220	3.84				
3-2	„	1.375	3.78				
3	5	1.298	3.81				
5-1	5	1.557	4.19				
5-2	„	1.595	4.19				
5-3	„	1.797	4.17				
5	5	1.650	4.18				
7-1	5	1.560	4.97				
7-2	„	1.495	4.73				
7-3	„	1.769	4.97				
7	5	1.608	4.89				
1-3	5	0.153		1	0	0	16.5
1-4	„	0.145		0	0	0	16.5
1-5	„	0.121		0	0	0	16.3
1	5	0.140		Spur	0	0	16.4
3-3	5	1.550		95	245.0	-1.0	6.9
3-4	„	1.570		90	242.5	-3.5	7.0
3-5	„	1.641		100	247.5	1.5	5.9
3	5	1.537		95	245.0	-1.0	6.6
5-4	5	1.740		64	52.5	52.5	6.8
5-5	„	1.541		65	50.0	50.0	7.5
5-6	„	1.817		62	57.5	57.5	6.2
5	5	1.699		63	53.3	53.3	6.8
7-4	5	1.895		100	30.0	30.0	3.8
7-5	„	1.682		85	47.0	47.0	5.2
7-6	„	1.562		90	47.5	47.5	6.1
7	5	1.706		92	41.5	41.5	5.0

VERSUCH VI.

Kulturlösungen :	(1)	(3)	(5)	(7)
Grundlösung	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50	50
K-Oxalat (normal)		25		
K-Tartarat (normal)			25	
K-Citrat (normal)				25
Umdest. Wasser	25			
Summe (ccm)	100	100	100	100

pH nach einstündiger Sterilisation¹⁾:

(1)	3.55
(3)	5.09
(5)	5.16
(7)	5.78

ERLENMEYERSCHE Kolben von 250 ccm Inhalt.
Titrationsacidität in der Kontrolle:

Die für die Titration verbrauchte
Menge von n/10 NaOH

(1)	40.5 ccm
(3)	40.5 ccm
(5)	40.5 ccm
(7)	40.5 ccm

Oxalsäure-Analyse in der Kontrolle:

	n/10 Lösung
(1)	0
(3)	250 ccm
(5)	0
(7)	0

Glukose-Analyse in der Kontrolle (10 ccm als Probe genommen):

Die für die Titration verbrauchte
Menge von 0.5% KMnO₄

(1)	16.5 ccm
(3)	16.1 ccm
(5)	16.3 ccm
(7)	16.1 ccm

1) Aus unbekanntem Grunde sind die anfänglichen Werte der H-Ionenkonzentration etwas höher als bei den vorhergegangenen Versuchen.

Tabelle VI.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Titrations- acidität ccm ⁿ /10NaOH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5%KMnO ₄
					gesamt	erzeugt	
1-1	6	0.569	2.07				
1-2	„	0.545	2.07				
1	6	0.557	2.07				
3-1	6	1.562	3.45				
3-2	„	1.040	3.67				
3	6	1.301	3.56				
5-1	6	1.658	3.95				
5-2	„	1.203	4.26				
5	6	1.431	4.11				
7-1	6	1.931	4.56				
7-2	„	1.960	4.65				
7	6	1.946	4.61				
1-3	6 1/6	0.572		50	0	0	14.6
1-4	„	0.479		51	0	0	14.1
1	6 1/6	0.526		51	0	0	14.4
3-3	6 1/6	1.476		110	277.5	27.5	6.0
3-4	„	1.373		150	262.5	12.5	6.7
3	6 1/6	1.425		130	270.0	20.0	6.4
5-3	6 1/6	1.681		101	77.5	77.5	6.1
5-4	„	1.651		80	50.0	50.0	7.7
5	6 1/6	1.666		91	63.8	63.8	6.9
7-3	6 1/6	2.213		100	52.5	52.5	2.5
7-4	„	2.135		124	65.0	65.0	3.1
7	6 1/6	2.174		112	58.8	58.8	2.8

Im allgemeinen lässt sich bezüglich der obigen Versuchsergebnisse sagen, dass Kaliumtartarat und Kaliumcitrat den Nährlösungen eine stärkere Pufferwirkung liefern als Kaliumoxalat. Natürlich kann man sich der finalen H-Ionenkonzentration nicht als Masstab für das Wachstum bedienen, weil einerseits in der Lösung mit stärkerem Puffer der Pilz günstig gedeihen kann, andererseits beim starken Wachstum die Acidität sehr schnell die optimale Wachstumszone überschreitet. Gestützt auf die obigen Versuchsergebnisse, wo der Unterschied der finalen H-Ionenkonzentrationen je nach den als Puffer gebrauchten organischen Salzen ziemlich gross ist, darf man wohl schliessen, dass die dem Puffer zu verdankende Stabilität der Acidität auf das Wachs-

tum viel günstiger wirkt.¹⁾

Die Oxalsäurebildung bei Zusatz von Kaliumoxalat als Puffer wird bestätigt, wenn man mit der Ernte den richtigen Zeitpunkt trifft. In den Versuchen IV und V bemerkt man bei der Schlussernte eher eine Verminderung der ursprünglich zugesetzten Oxalatmenge, während im Versuche VI am sechsten Tag eine Neubildung von Oxalsäure sicher nachgewiesen worden ist. Es wäre demnach nicht ausgeschlossen, dass der Pilz auch in den Versuchen IV und V in einem früheren Stadium Oxalsäure produziert hat. Bei der Anwendung von Kaliumtartarat oder Kaliumcitrat von normaler Konzentration als Puffer wird eine lebhafte Oxalsäurebildung deutlich konstatiert. In diesen Fällen ist es aber auch möglich, dass nach dem starken Konsum von Zucker eine gewisse Menge des zugesetzten Puffersalzes vom Pilz als C-Quelle verarbeitet und einigermassen zu seinem Wachstum benutzt wird.

In den obigen Versuchen ist der Einfluss des Puffers bei verhältnismässig lang dauernder Kultur untersucht worden, wobei das Pilzmycel ein-bis dreimal geerntet wurde. Um nun den Wachstumsverlauf die Aciditätsveränderung, die Oxalsäurebildung usw. unter Pufferzusatz bei kurzer Kultur und zwar eingehender verfolgen zu können, habe ich folgende Versuche angestellt, wobei ich als Puffer folgende Salzlösungen benützt habe:

Dikaliumphosphat (normal)	}	in gleichen Mengen gemischt.
Dikaliumphosphat (normal)		
plus		
Monokaliumphosphat (normal)		
Kaliumoxalat (normal)		

VERSUCH VII.

Kulturlösungen:	(1)	(2)	(3)
Grundlösung	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
K ₂ HPO ₄ (normal)	25		
K ₂ HPO ₄ (normal)		25	
KH ₂ PO ₄ (normal)			
K-Oxalat (normal)			25
Summe (ccm)	100	100	100

1) Bei der Kultur 7 Versuch IV beträgt der anfängliche pH-Wert 5.18 und nach einer Woche 6.43. Die H-Ionenkonzentration scheint aber nicht gleichmässig abgenommen zu haben, vermutlich ist zuerst eine Zunahme der Acidität und dann erst die stetige Zunahme des pH-Wertes vorgekommen.

pH nach einstündiger Sterilisation :

- (1) 6.40 (wenige unlösliche Kristalle)
- (2) 5.98 (wenige unlösliche Kristalle)
- (3) 5.20

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

Oxalsäure-Analyse in der Kontrolle :

n/10 Lösung

- (1) 0
- (2) 0
- (3) 250 ccm

Glukose-Analyse in der Kontrolle (5 ccm als Probe genommen) :

Die für die Titration verbrauchte

Menge von 0.5% KMnO₄

- (1) 8.7 ccm
- (2) 8.7 ccm
- (3) 8.7 ccm

In diesem Versuche wurde der pH-Wert einer kleinen Menge des Filtrats elektrometrisch oder kolorimetrisch bestimmt. Die gebrauchte Flüssigkeit wurde wieder samt dem übrigen Teil auf 500 ccm verdünnt, und diese verdünnte Lösung wurde weiter zur Analyse von Oxalsäure und Glukose verwendet.

Tabelle VII.

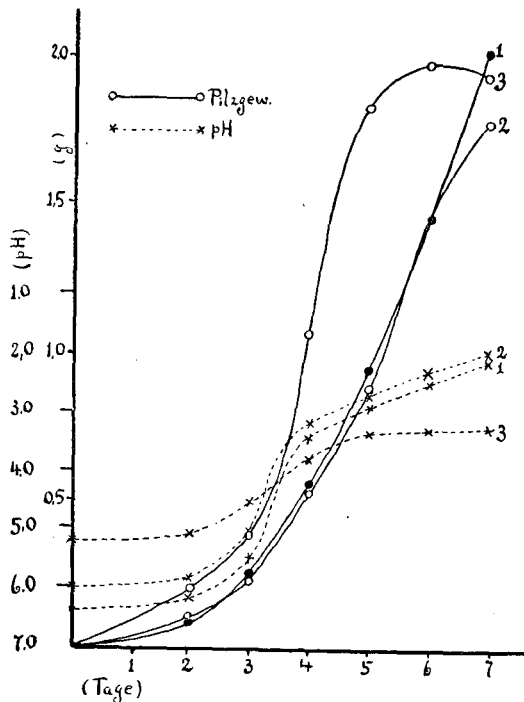
Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO ₄
				gesamt	erzeugt	
1-1	2	?	6.07	0	0	+
1-2	„	0.083	6.24	0	0	+
1-3	„	0.090	9.14	0	0	+
1	2	0.087	6.15	0	0	+
2-1	2	0.089	5.74	0	0	+
2-2	„	0.117	5.88	0	0	+
2-3	„	0.091	5.83	0	0	+
2	2	0.039	5.82	0	0	+
3-1	2	0.193	5.1	0	0	+
3-2	„	0.201	5.1	0	0	+
3-3	„	0.219	5.1	0	0	+
3	2	0.204	5.1	0	0	+
1-4	3	0.268	5.40	7.5	7.5	6.6
1-5	„	0.254	5.54	7.5	7.5	7.0
1-6	„	0.268	5.44	7.5	7.5	6.4
1	3	0.263	5.46	7.5	7.5	6.7
2-4	3	0.291	4.80	25.0	25.0	7.2
2-5	„	0.222	5.11	12.5	12.5	7.5
2-6	„	0.192	5.25	12.5	12.5	7.4
2	3	0.235	5.05	16.7	16.7	7.4

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO ₄
				gesamt	erzeugt	
3-4	3	0.403	4.6	?	?	?
3-5	"	0.387	4.5	247.0	-3.0	7.0
3-6	"	0.356	4.5	249.0	-1.0	7.5
3	3	0.382	4.5	248.0	-2.0	7.3
1-7	4	0.574	3.41	65.0	65.0	5.5
1-8	"	0.588	3.38	75.0	75.0	5.7
1-9	"	0.515	3.38	70.0	70.0	5.3
1	4	0.559	3.39	70.0	70.0	5.5
2-7	4	0.546	3.01	57.5	57.5	5.8
2-8	"	0.601	3.38	27.5	27.5	6.4
2-9	"	0.575	3.08	75.0	75.0	5.7
2	4	0.574	3.16	53.3	53.3	6.0
3-7	4	1.174	3.8	262.5	12.5	4.3
3-8	"	1.048	3.8	255.5	5.5	3.9
3-9	"	1.005	3.9	265.0	15.0	5.0
3	4	1.076	3.8	261.0	11.7	4.4
1-10	5	1.107	2.97	85.0	85.0	5.9
1-11	"	0.807	2.81	137.5	137.5	4.9
1	5	0.957	2.89	111.3	111.3	5.4
2-10	5	1.043	2.60	75.0	75.0	4.3
2-11	"	0.738	2.74	75.0	75.0	5.3
2	5	0.891	2.67	75.0	75.0	4.8
3-10	5	1.839	3.27	287.5	37.5	2.5
3-11	"	1.832	3.38	287.5	37.5	2.7
3	5	1.836	3.33	287.5	37.5	2.6
1-12	6	1.444	2.50	112.5	112.5	2.1
1-13	6	1.488	2.50	112.5	112.5	2.1
1	6	1.466	2.50	112.5	112.5	2.1
2-12	6	1.415	2.31	72.5	72.5	2.8
2-13	"	1.500	2.20	92.5	92.5	2.4
2	6	1.458	2.26	82.5	82.5	2.6
3-12	6	1.920	3.25	275.0	25.0	0.9
3-13	"	2.045	3.25	267.0	17.5	0.9
3	6	1.983	3.25	271.3	21.3	0.9
1-14	7	2.083	2.11	100.0	100.0	0.8
1-15	"	1.964	2.11	87.5	87.5	0.8
1	7	2.024	2.11	93.8	93.8	0.8

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure ccm n/10 Lös.		Glukose ccm 0.5% KMnO ₄
				gesamt	erzeugt	
2-14	7	1.678	2.01	70.0	70.0	0.6
2-15	„	1.798	1.93	60.0	60.0	0.6
2	7	1.738	1.97	65.0	65.0	0.6
3-14	7	1.927	3.27	270.0	20.0	0.6
3-15	„	1.955	3.27	267.5	17.5	0.7
3	7	1.941	3.27	268.8	18.8	0.7

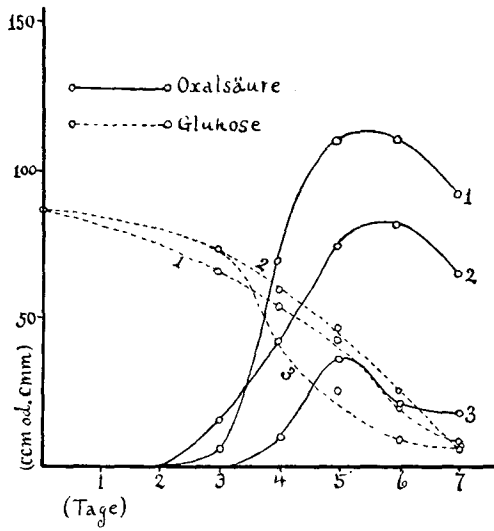
(Siehe Fig. VI und VII)

Fig. VI.



Dass die Kulturlösungen im obigen Versuche stärkere Pufferwirkung besitzen als im Versuch I, ist ohne weiteres klar, wenn man die Kurven der Aciditätsveränderung in beiden Fällen miteinander vergleicht. Es gibt nämlich einen Unterschied im anfänglichen pH-Wert zwischen den beiden Phosphat-Kulturlösungen, je nachdem K₂HPO₄ oder

Fig. VII.



K_2HPO_4 plus KH_2PO_4 zugesetzt wird. Vom dritten Tag an vermindert sich der pH-Wert der beiden Lösungen fast mit gleicher Geschwindigkeit, was die beiden Kurven, die in paralleler Weise fortschreiten, zeigen. Von besonderem Interesse ist, dass, trotzdem der anfängliche pH-Wert der Kultur 3 weniger beträgt als derjenige der Kulturen 1 und 2, nach dem Verlauf der viertägigen Kultur ein umgekehrtes Verhältnis zu bemerken ist. Nur gestützt auf den Vergleich solcher Kurven darf man aber nicht sogleich entscheiden, ob Phosphat oder Oxalat die stärkere Pufferwirkung besitze.

Betrachtet man diese Kurven, so scheint es, als ob das Ansteigen der Acidität durch Zusatz von Phosphat schneller fortschritte als bei Zusatz von Oxalat. Da aber das Phosphat bei niedriger Acidität im unlöslichen Zustand bleibt, kann es die Pufferwirkung nicht in voller Kraft zeigen. Mit der Erhöhung der H-Ionenkonzentration geht gleichzeitig das phosphorsaure Salz allmählich in den löslichen Zustand über, wodurch das Puffervermögen der Lösung verstärkt wird. Diese Umstände lehren uns, dass die pH-Kurve in diesem Falle nicht nur aus der Pufferwirkung, sondern auch aus dem Zusammenhang zwischen der Pufferwirkung und der Dissoziation der disponibel werdenden Säuren oder zwischen jener und der Oxalsäurebildung sich ergibt. Durch Zusatz von Phosphat sollte deshalb in Wirklichkeit die Puffer-

wirkung stärker sein als bei Zusatz von Oxalat.

Die grösste Wachstumsgeschwindigkeit ist in der Kultur 3 (Zusatz von K-Oxalat) wahrzunehmen; in den Kulturen 1 und 2 wächst der Pilz mit fast gleicher Geschwindigkeit. Die Reihenfolge des Pilzgewichtes am Ende des Versuchs ist (1), (3), (2), wobei in der Kultur 3 schon wieder eine abnehmende Tendenz zu verzeichnen ist. Auch aus diesem Ergebnis ist es ersichtlich, dass ein Vergleich des Wachstums, nur gestützt auf eine einmalige Ernte ohne den Verlauf des Wachstumsprozesses in Betracht zu ziehen, ein ganz anderes und zwar weniger wertvolles Resultat ergeben hätte. Die Oxalsäurebildung lässt sich in den Kulturen 1 und 2 nachweisen, aber vom sechsten Tag an beginnt die neu gebildete Oxalsäure durch den Pilz wieder verarbeitet zu werden und an Menge abzunehmen. In der Kultur 3 beginnt die Oxalsäurebildung am vierten Tag und am fünften erreicht ihre Menge das Maximum, nimmt aber bald darauf wieder ab.¹⁾

Die Abnahme der Zuckermenge verläuft fast parallel zur Wachstumsgeschwindigkeit. Wenn aber totaler oder teilweiser Zuckermangel in der Kulturlösung eintritt, so zersetzt der Pilz die erzeugte Oxalsäure, um diese als C-Quelle zu benützen.

Wie schon in der Einleitung erwähnt worden ist, ist es theoretisch richtiger, bei der Pilzkultur eher das Puffervermögen der Lösung in Betracht zu ziehen als den anfänglichen pH-Wert. Um die grössere Wichtigkeit des Puffervermögens zu beweisen, habe ich einen weiteren Versuch angestellt.

VERSUCH VIII.

Kulturlösungen:	(1)	(2)
Grundlösung	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50
NaOH (n/10)	10	
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O (in g)		(6)
H ₃ PO ₄ (molar)		10
Umdest. Wasser	15	15
Summe (ccm)	100	100
pH nach einstündiger Sterilisation:		
(1)	5.92	
(2)	5.64	

1) Vergl.: Versuch VI.

Dass die Kulturlösung 1 pufferärmer ist als 2, konnte ich mittels der Titration mit n/10 Salzsäure konstatieren.

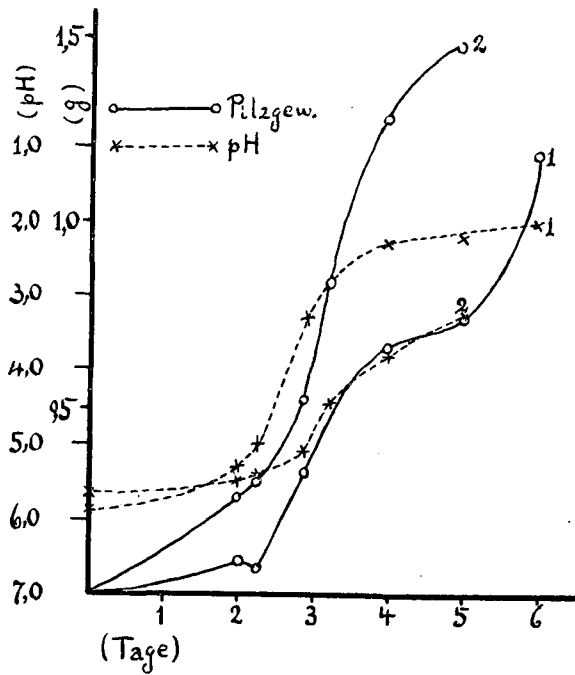
ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

Tabelle VIII.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	2	0.102	5.2	0	+
1-2	"	0.082	5.5	0	+
1-3	"	0.104	5.2	0	+
1	2	0.096	5.3	0	+
2-1	2	0.180	5.51	0	+
2-2	"	0.250	5.56	0	+
2-3	"	0.190	5.53	0	+
2	2	0.207	5.53	0	+
1-4	2 1/4	0.094	5.0	Spur	+
1-5	"	0.072	4.9	Spur	+
1-6	"	0.055	5.0	Spur	+
1	2 1/4	0.074	5.0	Spur	+
2-4	2 1/4	0.347	5.43	0	+
2-5	"	0.296	5.39	0	+
2-6	"	0.257	5.43	0	+
2	2 1/4	0.300	5.42	0	+
1-7	2 11/12	0.395	3.2	Spur	+
1-8	"	0.380	3.3	Spur	+
1-9	"	0.368	3.3	Spur	+
1	2 11/12	0.329	3.3	Spur	+
2-7	2 11/12	0.664	5.13	Spur	+
2-8	"	0.480	5.07	Spur	+
2-9	"	0.415	5.19	Spur	+
2	2 11/12	0.520	5.13	Spur	+
2-10	3 1/4	0.619	4.85	Spur	+
2-11	"	0.873	4.34	Spur	+
2-12	"	1.017	4.14	+	+
2	3 1/4	0.839	4.44	Spur	+
1-10	4	0.605	2.3	+	+
1-11	"	0.777	2.2	Spur	+
1-12	"	0.617	2.3	+	+
1	4	0.666	2.3	+	+
2-13	4	1.291	3.90	++	+
2-14	"	1.285	3.63	++	+
2-15	4	1.266	3.85	++	+
2	4	1.281	3.79	++	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-13	5	0.726	2.2	+	+
1-14	„	0.768	2.2	+	+
1-15	„	0.756	2.2	+	+
1	5	0.750	2.2	+	+
2-16	5	1.559	3.14	+	+
2-17	„	1.395	3.21	+++	+
2-18	„	1.360	3.21	+++	+
2	5	1.438	3.19	+++	+
1-16	6	1.240	2.0	+++	+
1-17	„	1.042	2.1	+	+
1-18	„	1.307	1.9	+	+
1	6	1.196	2.0	+	+

Fig. VIII.



Aus der obigen Tabelle und Fig. VIII geht hervor, dass die Zunahme der H-Ionenkonzentration in der pufferarmen Lösung trotz ihres anfänglichen pH-Wertes sehr schnell vor sich geht, und dass diese Geschwindigkeit mit dem Wachstum des Pilzes Schritt hält. Dies zeigt, dass in der Tat eher das Puffervermögen als der anfängliche pH-Wert als Masstab für die Veränderung der Acidität gewählt werden muss.

In der Kulturlösung 1 verläuft der Wachstumsprozess auffallend unregelmässig. Die Erklärung hierfür ist noch unmöglich. Der pH-Wert der zweiten Ernte, wo eine plötzliche Abnahme des Pilzgewichts wahrgenommen wird, liegt etwa bei 5.0. Kürzlich hat ROBBINS ungünstige H-Ionenkonzentrationen für das Gedeihen verschiedener Pflanzen mitgeteilt und diese als isoelektrische Punkte des Protoplasmas der betreffenden Pflanzen angenommen. Diese Punkte liegen meistens zwischen den für das Wachstum günstigen H-Ionenkonzentrationen. Ich selbst habe mich seit langem mit ähnlichen Problemen beschäftigt und schon konstatiert, dass verschiedene H-Ionenkonzentrationen ganz verschiedenartig und sprungweise auf die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas wirken. Es liegt nahe anzunehmen, dass pH 5.0 auch eine solche ungünstige H-Ionenkonzentration für das Wachstum von *Aspergillus niger* bedeutet. Eine solche Abnahme des Pilzgewichtes in der Nähe des pH-Wertes 5.0 wurde auch im Versuch XI beobachtet.

Zusammenfassend können wir unsere Ergebnisse in diesem Kapitel folgendermassen ausdrücken:

Wenn ein spezifischer Puffer der Kulturlösung zugesetzt wird, so wird dadurch die Erhöhung der H-Ionenkonzentration infolge des Pilzwachstums mehr oder weniger gehemmt. Da, wie aus dem Versuche I ersichtlich ist, die Wachstumsgeschwindigkeit von *Aspergillus niger* ungefähr beim pH-Wert 2.0 das Maximum erreicht und in einer etwas höheren Acidität die Entwicklung stark retardiert wird, kann die pufferhaltige Kulturlösung diesbezüglich mehr oder weniger von Vorteil sein. Obwohl die als Puffer zugesetzten organischen Salze möglicherweise dann und wann als C-Quelle vom Pilz angegriffen werden, so ist dies doch nicht die Hauptursache des günstigen Wachstums. So lange genug Zucker vorhanden ist, dienen solche organische Salze hauptsächlich als Puffer, spielen also keine grosse Rolle als Nährstoffe. Diese Tatsache hat schon WEHMER bei der Kultur von *Aspergillus niger* konstatiert. Er hat weiter gemeint, dass die Oxalsäurebildung nur dann auftritt, wenn die Lösung den Bedingungen entspricht, unter denen die gebildete Oxalsäure festgehalten wird. Üppiges Wachstum und

gleichzeitige Oxalsäurebildung, die bei Zusatz von Kaliumoxalat nachgewiesen werden können, hat WEHMER darauf zurückgeführt, dass die gebildete Oxalsäure fortwährend als Oxalat festgelegt wird, während das zugesetzte sowie neugebildete Oxalat nicht als Nährstoff verwertet wird. Auch das Phosphat hat er als ein derartig wirksames Salz in eine Reihe mit dem Oxalat gestellt und diese beiden Salze als die Regulatoren der Oxalsäurebildung betrachtet, weil sie die Erhöhung der Acidität infolge der Oxalsäurebildung hemmen können. NIKITINSKY hat auch die Hemmung der unmässigen Steigerung der H-Ionenkonzentration bestätigt, wenn Ammoniumtartarat als N-Quelle neben Ammoniumchlorid benützt wird. Auch beim Zusatz von 5% Kalium-resp. Ammoniumoxalat in der Kulturlösung von *Aspergillus niger* sowie *Penicillium glaucum* hat er eine Stimulation des Wachstums im Vergleich zur Kontrollkultur bestätigt.

Trotz der oben erwähnten Tatsachen darf man nicht den Schluss ziehen, dass das Wachstum besser sei, je stärker die Pufferwirkung ist. Oxalsäure, die in der Kultur von *Aspergillus niger* produziert wird, ist nicht als das Endprodukt des Betriebsstoffwechsels zu betrachten, sondern als dessen Zwischenprodukt. Unzweifelhaft bringt die Oxalsäurebildung dem Pilz wenigstens in ökonomischer Hinsicht viel Nachteil, während die durch die vollständige Zersetzung des Zuckers befreite Energie vom Pilz ausreichend benützt werden kann. BRENNER (1) hat dieselbe Ansicht bezüglich der Kultur von *Aspergillus niger* geäußert.¹⁾

Aus den Versuchsergebnissen von WEHMER u. a. und nun auch aus denjenigen der vorliegenden Arbeit kann man schliessen, dass nicht nur die Basen, welche die Oxalsäure neutralisieren können, sondern noch mehr die Pufferwirkung der Kulturlösung den wichtigsten Anstoss zur Oxalsäurebildung durch *Aspergillus niger* abgeben kann.

Wenn auch die starke Pufferwirkung einerseits für das Wachstum bis zu einem gewissen Grad günstig ist, so beschleunigt sie andererseits die Oxalsäurebildung, die in ökonomischer Hinsicht den Pilz sehr benachteiligt.

Aus dem oben erwähnten ist es selbstverständlich, dass zwischen der Pufferwirkung und der Oxalsäurebildung eine sehr komplizierte Beziehung besteht, wodurch wieder das Wachstum des Pilzes beein-

1) Siehe auch: Ōno (S. 157)

flusst wird. Das beste Wachstum von *Aspergillus niger* wird erst dann erzielt, wenn diese Momente untereinander harmonieren, d.h. wenn der Kulturlösung eine mässig starke Pufferwirkung zukommt.

Diese Verhältnisse kann man aus dem Versuche VII wohl ersehen. Die Phosphat-Kulturlösung besitzt wenigstens im früheren Stadium der Kultur ein stärkeres Puffervermögen als die Oxalat-Kulturlösung, was eine merkliche Oxalsäurebildung in der erstern Lösung, besonders in derjenigen mit grossen Mengen von K_2HPO_4 hervorrufen kann. Im Gegenteil dazu wächst der Pilz in der Phosphat-Kulturlösung langsam, so lange Oxalsäure in grosser Menge erzeugt wird; wenn aber starker oder totaler Zuckermangel eintritt und der Pilz die produzierte Oxalsäure notgedrungen wieder verarbeitet, bemerkt man eine auffallende Vermehrung des Pilzgewichtes. Solch komplizierte Beziehungen werden auch bei Gebrauch der Ammoniumsalze als N-Quelle getroffen, was wir später ausführlich erörtern werden.

Anorganische Stickstoffquellen und Aciditätsveränderung der Kulturlösung.

Dass die Acidität der Nährlösung bei der Kultur von *Aspergillus niger* oder anderen Pilzarten infolge der Anhäufung der Säure allmählich erhöht wird, die bei N-Konsum aus dem als N-Quelle gegebenen Ammoniumsalz disponibel wird, ist von NIKITINSKY, WEHMER, BUTKEWITSCH, RITTER, BRENNER(1) u. a., besonders aber von dem erstgenannten Forscher bewiesen worden. Da aber diesen Forschern die exakte Bestimmung der H-Ionenkonzentration damals nicht möglich war, dürfte es nicht überflüssig sein, wenn man sich aufs neue unter Benutzung aller technischen Hilfsmittel mit diesem Problem beschäftigt.

NIKITINSKY hat konstatiert, dass die Pilzernte bei Gebrauch der anorganischen Ammoniumsalze als N-Quelle geringer ist als bei der Benutzung der organischen Salze. Dies hat er darauf zurückgeführt, dass die dabei disponibel gewordene Säure die Acidität verhältnismässig stark erhöht und das Wachstum des Pilzes hemmt. Organische Salze dagegen wirken durch ihre disponibel gewordenen organischen Säuren nicht hemmend, sondern wie z. B. Ammoniumcitrat, nach NIKITINSKY, bisweilen beschleunigend auf das Wachstum.

BUTKEWITSCH hat die Nährwerte der verschiedenen Ammoniumsalze für die Kultur von *Aspergillus niger* miteinander verglichen, und er ist

zum Resultat gekommen, dass von Sulfat, Chlorid und Nitrat das erste die beste und das letzte die schlechteste N-Quelle ist. Dieses Ergebnis weicht etwas von demjenigen NIKITINSKY'S ab, der das Chlorid als die schlechteste N-Quelle betrachtet. BUTKEWITSCH hat den Unterschied der Nährwerte der Ammoniumsalze der Mineralsäuren mit Hilfsannahme einer relativen Affinität der betreffenden Säuren zu Ammoniak zu erklären versucht. Seiner Ansicht nach steht das Pilzwachstum im umgekehrten Verhältnis zu dieser Affinität.

BRENNER(1) ist zum Schluss gekommen, dass der Nährwert der Ammoniumsalze gar nicht mittels der von BUTKEWITSCH vorgeschlagenen Affinität zwischen Säureanionen und Ammoniak zu erklären ist. Er hat mit Ammoniumphosphat die geringste Pilzernte bekommen, wo doch die schwächste Affinität bestehen soll. BRENNER(1) hat die Frage nach dem Nährwert der Ammoniumsalze mit dem Dissoziationsgrad der disponibel gewordenen Säure, d. h. der H-Ionenkonzentration zu beantworten gesucht.

Auch RITTER ist ähnlicher Meinung wie BRENNER, obwohl der erstere nur von „Stärke“ der Säure, aber nicht von „Dissoziation“ spricht. Ein eigentümlicher Fall ist von CZAPEK bei der Kultur von *Aspergillus niger* mitgeteilt worden, wonach fast kein Pilzwachstum beim Gebrauch von Ammoniumchlorid als N-Quelle zu bemerken ist.¹⁾ Dies muss aber ein spezifischer Fall sein, weil andere Forscher und ich selbst mit Ammoniumchlorid ziemlich gute Erfolge erreicht haben.

Was den Zusammenhang zwischen dem Ammoniumsalz als N-Quelle und der Oxalsäurebildung betrifft, so sind schon von WEHMER einige Versuche darüber ausgeführt worden. Seine Resultate zeigen uns, dass gar keine Erzeugung von Oxalsäure bei der Anwendung von Ammoniumsulfat,-chlorid oder Salmiak nachzuweisen ist, während mit dem Ammoniumsalz der Oxalsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure diese erzeugt werden kann.

Das als N-Quelle zugesetzte Ammoniumsalz vermag möglicherweise die folgenden zwei Einflüsse auf die Acidität der Kulturlösung auszuüben:

1. Erhöhung der H-Ionenkonzentration durch die Dissoziation der disponibel gewordenen Säure.
2. Einfluss als Puffer.

Die erste Möglichkeit habe ich oben genau erörtert. Betreffs der zweiten Möglichkeit möchte ich nun einige Bemerkungen machen, bevor

1) Zitiert nach NIKITINSKY (S. 20).

wir auf die Versuche selbst übergehen.

Wie aus den vorhergehenden Versuchen klar ersichtlich ist, kann es nicht mehr bezweifelt werden, dass die Kaliumsalze der Phosphor-, Oxal-, Wein- und Citronensäure ziemlich starke Pufferwirkung in der Kulturlösung aufweisen. Dass auch den Ammoniumsalzen dieser Säuren ebenso starke Pufferwirkung zukommt, ist leicht begreiflich. In diesem Falle vermögen die Ammoniumsalze als N-Quelle und zu gleicher Zeit auch als Puffer zu wirken. Sie unterscheiden sich aber als Puffer dadurch von den oben genannten Kaliumsalzen, dass ihr Puffervermögen durch den Konsum des Ammoniaks fortwährend vermindert wird, und dass die Acidität gleichzeitig durch Dissoziation der infolgedessen disponibel gewordenen Säuren positiv erhöht wird.

Diese Beziehung beachtend, habe ich eine Reihe von Versuchen über den Nährwert des Ammoniumsalzes und die Oxalsäurebildung angestellt. Die folgenden Ammoniumsalze¹⁾ sind als N-Quelle verwendet worden :

anorganische Salze	organische Salze
NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2$ -Oxalat
NH_4Cl	$(\text{NH}_4)_3$ -Citrat
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2$ -Tartarat
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	

Ausser diesen Salzen wurde noch NaNO_3 als N-Quelle verwendet.

In den folgenden Versuchen wurden Ammoniak-N, sowie Nitrat-N in allen Fällen in äquivalenten Mengen genommen.

VERSUCH IX.

Spezifische Grundlösung :

Monokaliumphosphat	2 g
Magnesiumsulfat	1 g
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen
Umdest. Wasser	100 ccm

Wenn z. B. 4 g von NH_4NO_3 als N-Quelle dieser spezifischen Lösung zugesetzt werden, so enthält diese Lösung dieselben Bestandteile in gleichen Mengen wie die gewöhnliche Grundlösung.

1) Mit Phenolrot reagieren sie fast neutral oder schwach alkalisch (Phosphat).

Kulturlösungen :	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
	Nitrat	Chlorid	Sulfat	Phosphat	Oxalat	Citrat	Tartarat	(NaNO ₃)
Spez. Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50	50	50	50	50	50
Umdest. Wasser	25	25	25	25	25	25	25	25
Amm.-Salze (in g)	(1.001)	(0.669)	(0.826)	(0.827)	(0.888)	(1.013)	(1.151)	(1.062)
Summe (in ccm)	100	100	100	100	100	100	100	100

In 100 ccm von jeder Lösung ist Stickstoff in äquivalenter Menge enthalten d. h. 1/8 normal NH₃ sowie NO₃.

pH nach einstündiger Sterilisation :

(1)	4.1
(2)	4.1
(3)	4.1
(4)	6.15 (wenige unlösliche Kristalle)
(5)	5.2
(6)	5.2
(7)	5.2
(8)	4.1

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

Tabelle IX.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	5	1.008	1.8	0	+
1-2	„	0.819	1.8	0	+
1-3	„	0.856	1.8	0	+
1	5	0.895	1.8	0	+
2-1	5	1.258	1.4	0	+
2-2	„	0.837	1.8	0	+
2-3	„	0.931	1.8	0	+
2	5	1.009	1.6	0	+
3-1	5	1.728	1.8	0	+
3-2	„	1.545	1.8	0	+
3-3	„	1.976	1.6	0	+
3	5	1.750	1.7	0	+
4-1	5	1.206	2.07	+	+
4-2	„	1.466	8.28	+	+
4-3	„	0.657	2.63	+	+
4	5	1.110	2.33	+	+
5-1	5	1.477	2.9	+	+
5-2	„	1.631	2.9	+	+
5-3	„	1.150	3.0	+	+
5	5	1.419	2.9	+	+
6-1	5	0.799	3.6	+	+
6-2	„	1.118	3.2	+	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalst�ure	Glukose
6-3	5	1.413	3.1	+	+
6	5	1.143	3.3	+	+
7-1	5	1.112	3.1	+	+
7-2	„	1.119	3.1	+	+
7-3	„	1.123	3.2	+	+
7	5	1.118	3.1	+	+
8-1	5	0.377	3.8	+	+
8-2	„	0.481	3.6	+	+
8-3	„	0.696	3.1	+	+
8	5	0.518	3.5	+	+

Aus dieser Tabelle ist die folgende Reihenfolge der Ammoniumsalze in bezug auf ihre günstige Wirkung auf das Pilzwachstum ersichtlich: Sulfat, Oxalat, Tartarat, Citrat, Phosphat, Chlorid, Nitrat, NaNO_3 .

VERSUCH X.

Spezifische Grundlösung:

Monokaliumphosphat	1.0 g
Magnesiumsulfat	0.5 g
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen
Umdest. Wasser	100 ccm

Kulturlösungen:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
	Nitrat	Chlorid	Sulfat	Phosphat	Oxalat	Citrat	Tartarat	(NaNO_3)
Spez. Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50	50	50	50	50	50
Umdest. Wasser	25	25	25	25	25	25	25	25
Amm.-Salze (in g)	(0.500)	(0.334)	(0.413)	(0.413)	(0.444)	(0.506)	(0.575)	(0.531)
Summe (in ccm)	100	100	100	100	100	100	100	100

In 100 ccm von jeder Lösung ist Stickstoff in äquivalenter Menge enthalten, d. h. 1/16 normal NH_3 sowie NO_3 . Die Salzkonzentration beträgt gerade die Hälfte der Kulturlösung des Versuches IX, wie auch die Hälfte der Konzentration der gewöhnlichen Kultur.

pH nach einstündiger Sterilisation:

(1)	4.1
(2)	4.1
(3)	4.1
(4)	6.28 (wenige unlösliche Kristalle)
(5)	5.1
(6)	5.0
(7)	5.2
(8)	4.1

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

Tabelle X.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	7	1.829	1.24	0	+
1-2	„	1.060	1.70	0	+
1-3	„	0.553	2.20	0	+
1	7	1.147	1.71	0	+
2-1	7	1.498	1.40	0	+
2-2	„	1.057	1.80	0	+
2-3	„	0.833	2.00	0	+
2	7	1.129	1.73	0	+
3-1	7	2.002	1.6	0	+
3-2	„	1.642	1.6	0	+
3-3	„	1.648	1.6	0	+
3	7	1.764	1.6	0	+
4-1	7	1.800	1.65	+	+
4-2	„	1.106	1.64	+	+
4-3	„	1.623	1.79	+	+
4	7	1.510	1.69	+	+
5-1	7	1.996	1.8	+	+
5-2	„	1.000	2.3	+	+
5-3	„	1.268	2.1	+	+
5	7	1.421	2.1	+	+
6-1	7	1.850	2.0	+	+
6-2	„	2.075	2.2	+	+
6-3	„	0.961	2.7	+	+
6	7	1.629	2.3	+	+
7-1	7	2.020	2.1	+	+
7-2	„	1.001	2.6	+	+
7-3	„	1.512	2.5	+	+
7	7	1.511	2.4	+	+
8-1	7	0.345	3.0	+	+
8-2	„	0.362	3.0	+	+
8-3	„	0.753	3.0	+	+
8	7	0.487	3.0	+	+

Für die Ammoniumsalze ergibt sich die folgende Reihenfolge bezüglich ihrer günstigen Einwirkung auf das Pilzwachstum :

Sulfat, Tartarat, Phosphat, Oxalat, Nitrat, Chlorid, NaNO_3 .

VERSUCH XI.

Spezifische Grundlösung :

Monokaliumphosphat	2 g
Magnesiumsulfat	1 g
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen
Umdest. Wasser	100 ccm

Wenn z. B. 4 g von NH_4NO_3 als N-Quelle dieser spezifischen Lösung zugesetzt werden, so enthält diese Lösung ebensogrosse Mengen der Bestandteile wie die gewöhnliche Grundlösung.

Kulturlösungen :	(1)	(3)	(4)
	Nitrat	Sulfat	Phosphat
Spez. Grundlösung	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
Umdest. Wasser	25	25	25
Amm.-Salze (in g)	(1.001)	(0.826)	(0.827)
Summe (in ccm)	100	100	100

In 100 ccm von jeder Lösung ist Stickstoff in äquivalenter Menge enthalten, d. h. $1/8$ normal NH_3 .

pH nach einstündiger Sterilisation :

(1)	4.1
(3)	4.1
(4)	6.11 (wenige unlösliche Kristalle)

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

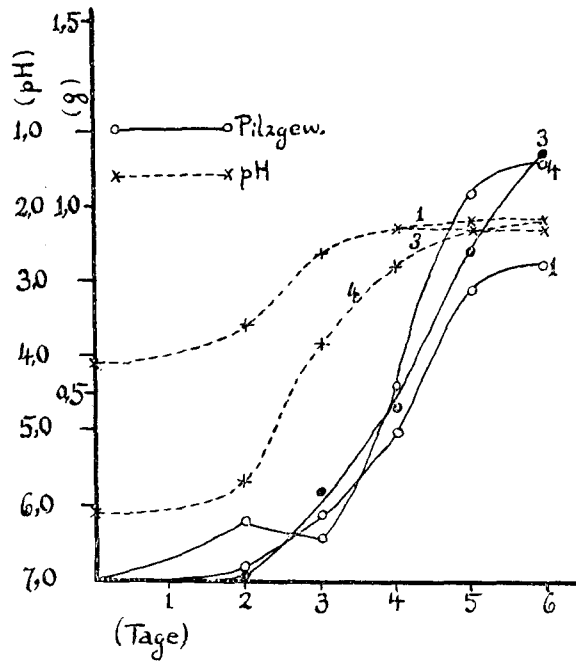
Tabelle XI.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	2	0.034	3.6	0	+
1-2	„	0.034	3.6	0	+
1-3	„	0.036	3.6	0	+
1	2	0.035	3.6	0	+
3-1	2	0.015	3.6	0	+
3-2	„	0.004	3.6	0	+
3-3	„	0.017	3.6	0	+
3	2	0.012	3.6	0	+
4-1	2	0.127	5.69	0	+
4-2	„	0.197	5.64	0	+
4-3	„	0.177	5.70	0	+
4	2	0.167	5.68	0	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-4	3	0.205	2.6	0	+
1-5	„	0.140	2.6	0	+
1-6	„	0.221	2.5	0	+
1	3	0.189	2.6	0	+
3-4	3	0.237	2.6	0	+
3-5	„	0.252	2.6	0	+
3-6	„	0.257	2.6	0	+
3	3	0.249	2.6	0	+
4-4	3	0.110	3.72	+	+
4-5	„	0.130	3.80	Spur	+
4-6	„	0.129	3.78	+	+
4	3	0.123	3.77	+	+
1-7	4	0.335	2.3	0	+
1-8	„	0.446	2.3	0	+
1-9	„	0.451	2.3	0	+
1	4	0.411	2.3	0	+
3-7	4	0.510	2.3	0	+
3-8	„	0.427	2.3	0	+
3-9	„	0.475	2.3	0	+
3	4	0.471	2.3	0	+
4-7	4	0.376	2.92	+	+
4-8	„	0.611	2.72	+	+
4-9	„	0.569	2.75	+	+
4	4	0.519	2.80	+	+
1-10	5	0.768	2.2	0	+
1-11	„	0.812	2.2	0	+
1-12	„	0.804	2.2	0	+
1	5	0.795	2.2	0	+
3-10	5	0.951	2.3	0	+
3-11	„	0.807	2.3	0	+
3-12	„	0.927	2.3	0	+
3	5	0.895	2.3	0	+
4-10	5	1.005	2.38	+	+
4-11	„	1.013	2.33	+	+
4-12	„	1.093	2.32	+	+
4	5	1.037	2.34	+	+
1-13	6	0.829	2.2	0	+
1-14	„	0.863	2.3	0	+
1-15	„	0.858	2.2	0	+
1	6	0.850	2.2	0	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
3-13	6	1.218	2.2	0	+
3-14	„	1.013	2.2	0	+
3-15	„	1.221	2.1	0	+
3	6	1.151	2.2	0	+
4-13	6	1.101	2.36	+	+
4-14	„	1.170	2.30	+	+
4-15	„	1.104	2.34	+	+
4	4	1.125	2.33	+	+

Fig. IX.



VERSUCH XII.

Spezifische Grundlösung:

Monokaliumphosphat	2 g
Magnesiumsulfat	1 g
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen
Umdest. Wasser	100 com

Wenn z. B. 4 g von NH_4NO_3 als N-Quelle dieser spezifischen Lösung zugesetzt werden, so enthält sie ebensogrosse Mengen der Bestandteile wie die gewöhnliche Grundlösung. In diesem Versuche wurde der Phosphat-Kulturlösung noch eine bestimmte Menge Phosphorsäure hinzugefügt, um die anfänglichen H-Ionenkonzentrationen möglichst einheitlich zu machen.

Kulturlösungen:	(1)	(3)	(4)	(8)
	Nitrat	Sulfat	Phosphat	(NaNO_3)
Spez. Grundlösung	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50	50
Umdest. Wasser	29.4	29.4	25	29.4
H_3PO_4 (molar)			4.4	
Amm.-Salze (in cem)	(1.001)	(0.826)	(0.827)	(1.062)
Summe (in cem)	104.4	104.4	104.4	104.4
pH nach einstündiger Sterilisation:				
(1)	4.2			
(3)	4.2			
(4)	4.0			
(8)	4.2			

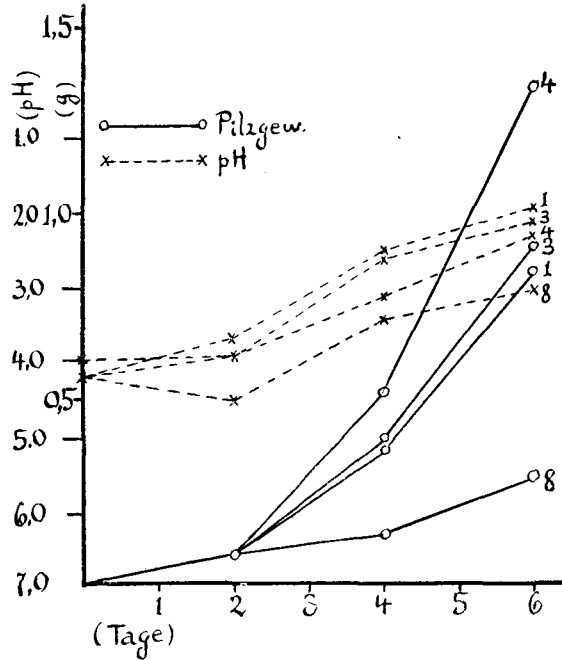
ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 cem Inhalt.

Tabelle XII.

Kultur	Kulturdauer Tage	Filzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	2	0.036	3.7	0	+
1-2	„	0.034	3.7	0	+
1-3	„	0.034	3.7	0	+
1	2	0.035	3.7	0	+
3-1	2	0.070	3.8	0	+
3-2	„	0.084	3.9	0	+
3-3	„	0.086	3.9	0	+
3	2	0.080	3.9	0	+
4-1	2	0.080	3.9	0	+
4-2	„	0.087	3.9	0	+
4-3	„	0.087	3.9	0	+
4	2	0.085	3.9	0	+
8-1	2	0.091	4.5	0	+
8-2	„	0.085	4.5	0	+
8-3	„	0.093	4.5	0	+
8	2	0.090	4.5	0	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-4	4	0.347	2.5	0	+
1-5	„	0.363	2.5	0	+
1-6	„	0.408	2.4	0	+
1	4	0.373	2.5	0	+
3-4	4	0.253	2.7	0	+
3-5	„	0.451	2.5	0	+
3-6	„	0.496	2.5	0	+
3	4	0.400	2.6	0	+
4-4	4	0.504	3.2	+	+
4-5	„	0.436	3.2	+	+
4-6	„	0.647	2.9	+	+
4	4	0.529	3.1	+	+
8-4	4	0.144	3.4	+	+
8-5	„	0.176	3.3	+	+
8-6	„	0.143	3.4	+	+
8	4	0.154	3.4	+	+
1-7	6	0.854	1.9	0	+
1-8	„	0.896	1.8	0	+
1-9	„	0.785	1.9	0	+
1	6	0.845	1.9	0	+
3-7	6	0.915	2.1	0	+
3-8	„	0.926	2.1	0	+
3-9	„	0.927	2.1	0	+
3	6	0.923	2.1	0	+
4-7	6	1.424	2.2	+	+
4-8	„	1.198	2.3	+	+
4-9	„	1.394	2.3	+	+
4	6	1.339	2.3	+	+
8-7	6	0.311	3.0	+	+
8-8	„	0.300	3.0	+	+
8-9	„	0.307	3.0	+	+
8	6	0.306	3.0	+	+

Fig. X.



Das Ammoniumphosphat und die organischen Ammoniumsalze, die verhältnismässig starke Pufferwirkung besitzen, und aus denen die schwach dissoziierbaren Säuren disponibel werden, leisten als N-Quelle gute Dienste.¹⁾ Ausserdem wird dabei mehr oder weniger Oxalsäure produziert, während bei Zugabe von anderen anorganischen Ammoniumsalzen als N-Quelle gar keine Oxalsäurebildung stattfindet. Trotzdem die Schwefelsäure, die aus Ammoniumsulfat disponibel wird, stärker dissoziiert als die organischen Säuren und trotzdem sie ein schwächerer Puffer ist, wächst der Pilz dabei verhältnismässig üppig, was noch unerklärlich ist. Obgleich auch BUTKEWITSCH und BRENNER(1) die Vorzüge des Ammoniumsulfats als N-Quelle bestätigt haben, so trifft BUTKEWITSCH' Annahme einer Affinität zwischen dem Ammoniak und dem Säureanion nicht das Richtige.

Bei einer Vergleichung der Nährwerte verschiedener N-Quellen stösst man auf nicht geringe Schwierigkeiten. Es besteht nämlich auch hierbei

1) WEHMER, CZAPEK (zit. n. BRENNER); NUKITINSKY und BRENNER(1) haben alle Ammoniumoxalat als eine gute N-Quelle geschätzt.

die schon erwähnte komplizierte Beziehung zwischen Pufferwirkung und Oxalsäurebildung, die wieder auf das Wachstum des Pilzes wirken kann. Eine harmonische Verteilung in dieser Beziehung ergibt eine grosse Pilzernte. Die starke Pufferwirkung von organischen Ammoniumsalzen sowie vom Ammoniumphosphat hemmt einerseits die allzurache Aciditätszunahme, anderseits ruft sie aber durch Oxalsäurebildung einen grossen Verlust in der Leistungsökonomie des Pilzes hervor. Wenn diese letztere Erscheinung in den Vordergrund tritt, so übertrifft das Wachstum der Kulturen mit anorganischen Ammoniumsalzen, insbesondere die Sulfat-Kultur, diejenige mit organischen Salzen.

Das Ammoniumphosphat übertrifft für Mucorineen nach den Erfahrungen von RITTER und HAGEM¹⁾ die übrigen Ammoniumsalze der anorganischen Säuren. Dass das Phosphat für *Aspergillus niger* nicht immer eine ausgezeichnete N-Quelle ist, geht aus dem Versuche von BRENNER(1) und dem Versuch IX in der vorliegenden Arbeit hervor. Dieser Umstand ist vielleicht auf die Verschiedenheit des Oxalsäurebildungsvermögens in pufferhaltiger Kulturlösung zurückzuführen. Daher ist es leicht verständlich, dass die Mucorineen, die weniger Oxalsäure erzeugen, in der pufferhaltigen Phosphat-Kultur sehr günstig gedeihen ohne einen merklichen Verlust in ökonomischer Hinsicht zu erleiden. Dass die Umstände beim starken Säurebildner *Aspergillus niger* ganz anders sind, braucht nicht wiederholt zu werden. Wenn die Pufferwirkung der Phosphat-Kulturlösung durch mässigen Zusatz von Phosphorsäure etwas herabgesetzt wird, so erhält man, wie z.B. in der Kultur XII, eine grössere Pilzernte als in der Sulfat-Kultur (Fig. X). Selbst im Versuch XI, wo keine Phosphorsäure zugesetzt wurde, kann man in der Phosphat-Kultur eine grössere Wachstumsgeschwindigkeit bemerken als in der Sulfat-Kultur (Fig. IX).²⁾

Dass *Aspergillus niger* lieber Ammoniumsalze als Nitrate als N-Quelle verarbeitet, ist bisher von verschiedenen Autoren festgestellt worden. Dies kann man leicht auch in meinem Falle erkennen. Es ist natürlich anzunehmen, dass *Aspergillus niger* aus dem Ammoniak leichter Stickstoff assimilieren kann als aus dem Nitrat. Wenn aber Nitrat, z.B. in der Form von NaNO_3 als N-Quelle zugegeben wird, so wird hier NaOH disponibel, wodurch die Kulturlösung in alkalische

1) Zitiert nach BRENNER(1) (S. 43).

2) Die unregelmässige Wachstumskurve beruht auf der vermutlich ungünstigen H-Ionenkonzentration ($\text{pH} = \text{ca. } 5.0$) wie beim Versuch VIII.

Reaktion übergeht. Also hier wächst das Neutralisationsvermögen der Lösung immer mehr und dadurch wird dem Pilz der Anreiz gegeben, Oxalsäure zu erzeugen. Oxalsäure wird in so grosser Menge produziert, dass nicht nur die befreite Base neutralisiert wird, sondern auch die Acidität dadurch noch erhöht wird. Fortwährende Oxalsäurebildung bringt dem Pilzwachstum in ökonomischer Beziehung ohne Zweifel Nachteil, was zum Teil schuld ist am geringeren Nährwert der Nitrats für *Aspergillus niger*. BRENNER(1) hat bei der Kultur desselben Pilzes gesagt: „In betreff der Nitrats als N-Quelle für Schimmelpilze sei schliesslich hervorgehoben, dass die Erklärung ihres geringeren Nährwertes teils in dem durch die Reaktion bedingten grösseren Energieverbrauch zu suchen ist, wie PUREWITSCH experimentell dargetan hat, teils in der notgedrungenen Erzeugung von Oxalsäure“ (S. 597).

Konzentration und Puffervermögen der Kulturlösung.

Der Einfluss der Konzentration einer Kulturlösung auf die Entwicklung des Pilzes ist bisher hauptsächlich von den folgenden zwei Punkten aus betrachtet worden:

1. Osmotische Wirkung.
2. Menge der Nährstoffe.

HAENSELER hat eine Reihe von Kulturversuchen von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf die Konzentration der Nährlösung ausgeführt. Obwohl es mir nicht klar ist, was er für eine physiologische Wirkung unter Konzentrationseinfluss versteht, so scheint es mir, dass dieser Einfluss nach ihm hauptsächlich osmotische Wirkung bedeutet. Die von ihm gebrauchten Kulturlösungen von verschiedenen Konzentrationen, die heute in Amerika allgemein als "three salt solutions" bekannt sind, sind eigentlich mit besonderer Rücksicht auf den osmotischen Druck hergestellt worden. HAENSELER selbst hat die Konzentration in Atmosphären ausgedrückt.

Ausser den oben genannten wichtigen Momenten muss man noch eine ebensowichtige Konzentrationsbeziehung nicht vernachlässigen. Wird die Konzentration der Nährlösung, insbesondere der Nährsalze in Betracht gezogen, so ist es naheliegend, dass die Menge dieser Elektrolyte zur Veränderung der H-Ionenkonzentration sowie zur Pufferwirkung der Kulturlösung in inniger Beziehung steht. Folgende Versuche wurden angestellt, um zu diesem bisher oft ausser acht gelassenen Problem etwas beizutragen.

VERSUCH XIII.

Kulturlösungen :	(1)	(2)	(3)
Grundlösung	50		
verdünnte Grundlösung (1/10)		50	
verdünnte Grundlösung (1/100)			50
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
<hr/>			
Summe (in cem)	100	100	100
pH nach einstündiger Sterilisation :			
(1)	4.3		
(2)	4.3		
(3)	4.3		

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 cem Inhalt.

Tabelle XIII.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsture	Glukose	NESSLERSCHE Reaktion
1-1	7	1.463	2.1	0	+	+
1-2	„	1.467	2.1	0	+	+
1-3	„	1.471	2.0	0	+	+
1	7	1.467	2.1	0	+	+
2-1	7	0.893	1.6	+	+	-
2-2	„	0.781	1.6	+	+	-
2-3	„	0.855	1.6	+	+	-
2	7	0.843	1.6	+	+	-
3-1	7	0.318	1.6	+	+	-
3-2	„	0.323	1.6	+	+	-
3-3	„	0.260	1.6	+	+	-
3	7	0.300	1.6	+	+	-

VERSUCH XIV.

Kulturlösungen :	(1)	(2)
Grundlösung	50	5
Glukoselösung (m/8)	50	50
Umdest. Wasser		45
<hr/>		
Summe (in cem)	100	100
pH nach einstündiger Sterilisation :		
(1)	4.2	
(2)	4.3	

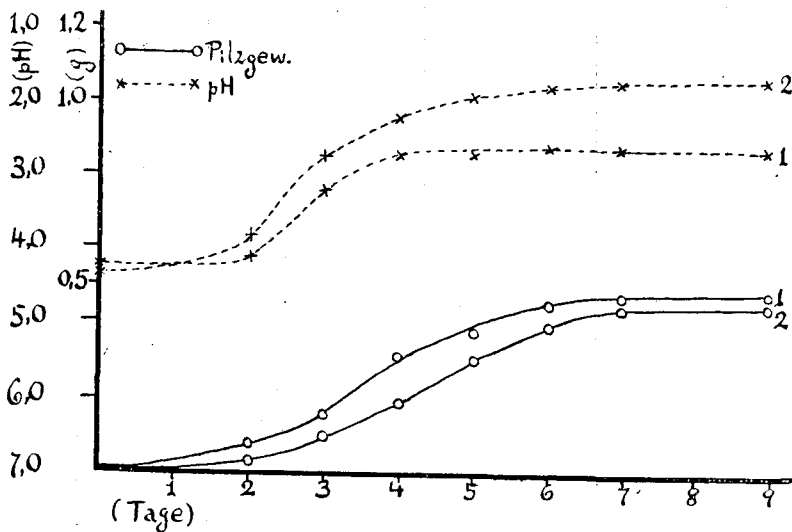
ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 cem Inhalt.

Tabelle XIV.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsture	Glukose	NESSLERSCHE Reaktion
1-1	2	0.066	4.0	0	+	+
1-2	„	0.097	4.1	0	+	+
1	2	0.082	4.1	0	+	+
2-1	2	0.038	3.8	0	+	+
2-2	„	0.037	3.8	0	+	+
2	2	0.038	3.8	0	+	+
1-3	3	0.171	3.1	0	+	+
1-4	„	0.144	3.2	0	+	+
1	3	0.158	3.2	0	+	+
2-3	3	0.106	2.7	0	+	+
2-4	„	0.100	2.7	0	+	+
2	3	0.103	2.7	0	+	+
1-5	4	0.355	2.7	0	+	+
1-6	„	0.278	2.7	0	+	+
1	4	0.317	2.7	0	+	+
2-5	4	0.173	2.3	0	+	+
2-6	„	0.183	2.3	Spur	+	+
2-7	„	0.235	2.1	+	+	-
2	4	0.197	2.2	Spur	+	Spur
1-7	5	0.377	2.7	0	+	+
1-8	„	0.395	2.7	0	+	+
1-9	„	0.390	2.7	0	+	+
1	5	0.387	2.7	0	+	+
2-8	5	0.267	1.9	Spur	+	-
2-9	„	0.330	1.9	+	+	-
2-10	„	0.339	1.9	+	+	-
2	5	0.312	1.9	+	+	-
1-10	6	0.445	2.6	0	+	-
1-11	„	0.464	2.6	0	+	+
1-12	„	0.469	2.6	0	+	+
1	6	0.459	2.6	0	+	+
2-11	6	0.422	1.9	+	+	+
2-12	„	0.418	1.7	+	+	-
2-13	„	0.359	1.8	+	+	-
2	6	0.400	1.8	+	+	-
1-13	7	0.485	2.6	0	+	-
1-14	„	0.470	2.6	0	+	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose	NESSLERSCHE Reaktion
1-15	7	0.486	2.6	0	+	+
1	7	0.480	2.6	0	+	+
2-14	7	0.463	1.7	+	+	-
2-15	"	0.382	1.8	+	+	-
2-16	"	0.462	1.7	+	+	-
2	7	0.436	1.7	+	+	-
1-16	9	0.489	2.6	0	0	+
1-17	"	0.490	2.6	0	0	+
1-18	"	0.491	2.6	0	0	+
1	9	0.490	2.6	0	0	+
2-17	9	0.459	1.7	+	+	-
2-18	"	0.426	1.7	+	0	-
2-19	"	0.470	1.7	+	Spur	-
2	9	0.452	1.7	+	Spur	-

Fig. XI.



Das Wachstum des Pilzes verläuft günstiger in höherer Konzentration. Trotz der niederen anfänglichen H-Ionenkonzentration erhöht sich die Acidität in verdünnter Lösung (Kultur 2, Versuch XIV) viel schneller als in der konzentrierten Kulturlösung 1, indem in beiden Lösungen

im früheren Kulturstadium keine Oxalsäure erzeugt wird. Es ist selbstverständlich, dass die Intensität der Pufferwirkung von Kulturlösungen mit gleichen Salzbestandteilen von ihren Konzentrationen abhängig ist. Deshalb dürfte es nicht unrichtig sein zu schliessen, dass die Veränderung der H-Ionenkonzentration, besonders im früheren Stadium in den obigen Versuchen, hauptsächlich von der Pufferwirkung abhängig ist. Andererseits tritt der Ammoniakmangel in verdünnter Lösung viel schneller zutage, was den Pilz zwingt, die Acidität der Lösung durch Konsum der befreiten Salpetersäure wieder zu erniedrigen. In dieser Beziehung ist eine interessante Tatsache im späteren Stadium der Kultur zu bemerken. Im Versuche XIV vom vierten Tag an und am Ende des Versuchs XIII kann man in den niedrigeren Konzentrationen deutlich die produzierte Oxalsäure nachweisen. Solche Oxalsäurebildung in einer so hohen Acidität ($\text{pH} = \text{ca. } 2.0$) habe ich auch in später zu besprechenden Versuchen konstatiert und sie ist kleinen Mengen von Ammoniumnitrat zuzuschreiben.¹⁾ Diese Tatsache ist deshalb nicht wenig von Interesse, weil sie uns zeigt, dass der Pilz selbst in höherer Acidität imstande ist, Oxalsäure zu erzeugen, sobald die Verschiebungstendenz²⁾ der Acidität nach der neutralen Seite hin in der Lösung auftritt. Die Ansicht, dass die Oxalsäurebildung von *Aspergillus niger* viel mehr von der Pufferwirkung der Kulturlösung abhängig sei als die H-Ionenkonzentration selbst, wird dadurch weiter gestützt. Nun ist es klar, dass es sehr schwierig, ja vergeblich wäre, die Grenzkonzentration der H-Ionen zu suchen, wo die Oxalsäure gebildet werden könnte.

In Erwägung der oben erwähnten Tatsachen kann man die ungünstigen Einflüsse der niedrigen Konzentration der Kulturlösung auf das Wachstum des Pilzes vor allem auf folgende Ursachen zurückführen:

1. Schwaches Puffervermögen im früheren Stadium.
2. Oxalsäurebildung bei Ammoniakmangel im späteren Kulturstadium erhöht weiter die Acidität, weil sie so schnell geschieht, dass die Herabsetzung der H-Ionenkonzentration infolge des Konsums der befreiten Salpetersäure zu langsam ist.

1) Bei dieser neuen Erzeugung von Oxalsäure kann man durch die NESSLERSCHE Reaktion schon die Abwesenheit des Ammoniaks nachweisen. Nach HEINZ (zit. n. BENECKE, S. 318) wird desto mehr Oxalsäure erzeugt, je schwächer die N-Quelle ist. Es ist mir aber nicht bekannt, was für eine Stickstoffverbindung als N-Quelle von ihm benützt worden ist. Wenn Ammoniumnitrat dabei gebraucht worden ist, so wäre auch dieses Ergebnis auf dieselbe Weise zu erklären.

2) Die Neigung möchte ich hier auch als Puffervermögen im modifizierten Sinne gegen die Erhöhung der Acidität verstehen.

3. Diese Oxalsäurebildung fügt dem Pilz einen beträchtlichen Energieverlust zu.

Das Zusammenwirken dieser Momente spielt möglicherweise eine das Pilzwachstum ungünstig beeinflussende Rolle.

In der Kulturlösung kommt dem Monokaliumphosphat unter allen Salzen die Hauptwirkung der Pufferung zu. Es ist daher notwendig, zunächst die Kulturen untereinander zu vergleichen, welche von Nährlösungen mit verschiedenen Mengen von Monokaliumphosphat, aber sonst von gleicher Konzentration herkommen.

VERSUCH XV.

Spezifische Grundlösung:

Ammoniumnitrat	4 g
Magnesiumsulfat	1 g
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen
Umdest. Wasser	100 ccm

Kulturlösungen:	(1)	(2)	(3)
Spez. Grundlösung	50	50	50
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
KH ₂ PO ₄ (in g)	(10)	(5)	(1.25)

Summe (in ccm)	100	100	100
----------------	-----	-----	-----

pH nach einstündiger Sterilisation:

(1)	4.2
(2)	4.2
(3)	4.2

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

Tabelle XV.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	7	1.193	2.3	0	+
1-2	„	1.505	2.2	0	+
1-3	„	1.651	2.1	0	+
1	7	1.450	2.2	0	+
2-1	7	1.105	2.0	0	+
2-2	„	1.313	2.1	0	+
2-3	„	1.313	2.1	0	+
2	7	1.244	2.1	0	+
3-1	7	1.146	1.7	0	+
3-2	„	1.135	1.8	0	+
3-3	„	1.013	1.8	0	+
3	7	1.108	1.8	0	+

Dass in keiner Kultur Oxalsäurebildung stattgefunden hat, ist deshalb begreiflich, weil Ammoniumnitrat in genügender Menge während der ganzen Kulturdauer dem Pilz zur Verfügung gestanden hat. Die Pilzernte wird geringer, je weniger Monokaliumphosphat zugesetzt wird. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich nicht in einer ungenügenden P- oder K-Menge zu suchen, sondern liegt eher in der schwachen Pufferwirkung. Diese Vermutung ist um so wahrscheinlicher, als die Kulturlösung 2 von der Konzentration der gewöhnlichen Grundlösung ist und in der phosphatarmen Kulturlösung die Acidität trotz mangelnder Oxalsäurebildung stärker erhöht wird als in den phosphatreichen Lösungen.

Um den Zusammenhang zwischen der Konzentration von Monokaliumphosphat und der Pufferwirkung der Kulturlösung weiter klar zu machen, habe ich noch den nächsten Versuch angestellt, zu dem das Phosphat in gleicher Menge, die sonstigen Nährstoffe aber in verschiedener Konzentration genommen wurden.

VERSUCH XVI.

Spezifische Grundlösung:			
Ammoniumnitrat	4 g		
Magnesiumsulfat	1 g		
Eisenchlorid (2%)	ein Tropfen		
Umdest. Wasser	100 ccm		
Kulturlösung:			
	(1)	(2)	(3)
Spez. Grundlösung	50		
Verd. spez. Grundlösung (1/10)		50	
Verd. spez. Grundlösung (1/100)			50
KH ₂ PO ₄ (in g)	(1)	(1)	(1)
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
Summe (in ccm)	100	100	100
pH nach einstündiger Sterilisation:			
(1)	4.1		
(2)	4.3		
(3)	4.2		

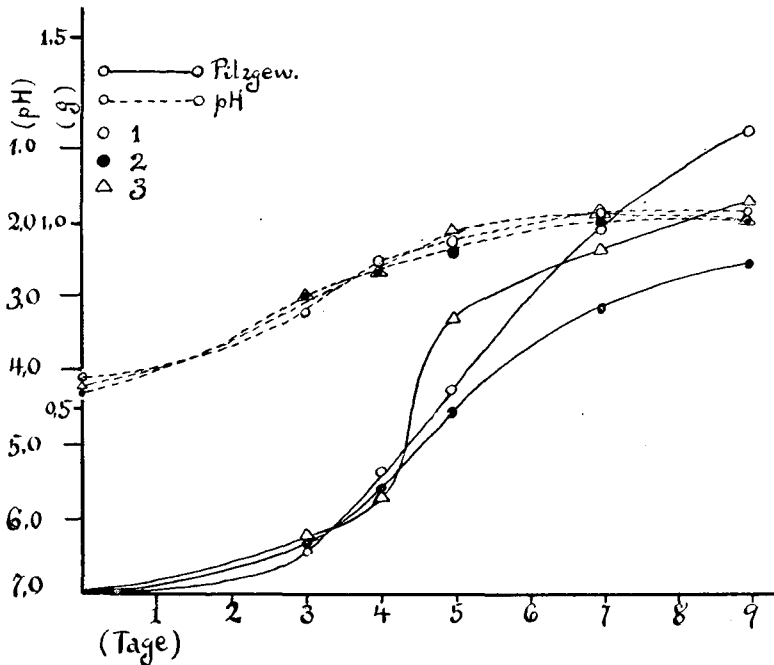
ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 ccm Inhalt.

Tabelle XVI.

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose	NESSLERSCHE Reaktion
1-1	3	0.105	3.2	0	+	+
1-2	„	0.145	3.1	0	+	+
1-3	„	0.111	3.2	0	+	+
1	3	0.120	3.2	0	+	+
2-1	3	0.135	3.0	0	+	+
2-2	„	0.142	3.0	0	+	+
2-3	„	0.140	3.0	0	+	+
2	3	0.139	3.0	0	+	+
3-1	3	0.148	3.0	0	+	+
3-2	„	0.143	3.0	0	+	+
3-3	„	0.152	3.0	0	+	+
3	3	0.148	3.0	0	+	+
1-4	4	0.360	2.5	0	+	+
1-5	„	0.254	2.7	0	+	+
1-6	„	0.390	2.4	0	+	+
1	4	0.335	2.5	0	+	+
2-4	4	0.255	2.7	0	+	+
2-5	„	0.242	2.6	0	+	+
2-6	„	0.345	2.5	0	+	+
2	4	0.281	2.6	0	+	+
3-4	4	0.226	2.7	0	+	+
3-5	„	0.233	2.7	0	+	+
3-6	„	0.365	2.5	0	+	+
3	4	0.275	2.6	0	+	+
1-7	5	0.560	2.3	0	+	+
1-8	„	0.542	2.3	0	+	+
1-9	„	0.561	2.2	0	+	+
1	5	0.554	2.3	0	+	+

Kultur	Kulturdauer Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose	NESSLETSCHKE Reaktion
2-7	5	0.480	2.4	0	+	+
2-8	„	0.494	2.4	0	+	+
2-9	„	0.499	2.4	0	+	+
2	5	0.491	2.4	0	+	+
3-7	5	0.679	2.2	0	+	+
3-8	„	0.781	2.0	0	+	+
3-9	„	0.760	2.1	0	+	+
3	5	0.740	2.1	0	+	+
1-10	7	1.015	1.8	0	+	+
1-11	„	0.971	2.0	0	+	+
1-12	„	0.963	1.9	0	+	+
1	7	0.983	1.9	0	+	+
2-10	7	0.622	2.1	+	+	-
2-11	„	0.834	1.9	+	+	-
2-12	„	0.851	2.0	+	+	-
2	7	0.769	2.0	+	+	-
3-10	7	0.742	2.0	+	+	-
3-11	„	1.020	1.8	+	+	-
3-12	„	0.941	1.9	+	+	-
3	7	0.921	1.9	+	+	-
1-13	9	1.208	1.8	0	+	+
1-14	„	1.115	1.8	0	+	+
1-15	„	1.442	1.7	0	+	+
1	9	1.255	1.8	0	+	+
2-13	9	0.901	1.9	+	+	-
2-14	„	0.870	1.9	+	+	-
2-15	„	0.901	1.9	+	+	-
2	9	0.892	1.9	+	+	-
3-13	9	0.780	1.9	+	+	-
3-14	„	1.408	1.9	+	+	-
3-15	„	1.008	1.8	+	+	-
3	9	1.064	1.9	+	+	-

Fig. XII.



Im Vergleich mit den Ergebnissen der vorhergegangenen Versuche kann man im Versuch XVI (Fig. XII) bemerken, dass der Unterschied des Veränderungsverlaufs der H-Ionenkonzentration aller Kulturlösungen verhältnismässig klein ist, und dass das Wachstum des Pilzes nicht so sehr von der Konzentration der gesamten Nährsalze abhängig ist. Die unregelmässig verlaufende Wachstumskurve darf man nicht ausser acht lassen. Diese Unregelmässigkeit ist hauptsächlich der Menge des Ammoniaks zuzuschreiben. Insbesondere in der Kultur 3, wo die Salze ausser dem Monokaliumphosphat in geringster Menge vorhanden sind, tritt die Erschöpfung des Ammoniaks viel schneller ein, weswegen die Oxalsäurebildung beginnt. In der Kultur 3 wächst der Pilz zuerst am schnellsten, dann aber langsamer, sobald die Oxalsäurebildung beginnt. Am Ende des neuntägigen Versuches beträgt daher das Pilzgewicht weniger als in der Kultur 1. Trotzdem zeigt der Pilz in der Kultur 3 die ganze Kulturdauer hindurch besseres Wachstum als in der Kultur 2.

NIKIINSKY ist der Ansicht, dass die Erhöhung der Konzentration der Kulturlösung bei *Aspergillus niger* keinen merklichen Einfluss auf

die Pilzernte ausübt. HAENSELER hat denselben Pilz in "three salt solutions"¹⁾ kultiviert, und er ist zum Schluss gekommen, dass der Pilz besser wächst je höher die Salzkonzentration ist, dass aber das Verhältnis zwischen der KH_2PO_4 - und der MgSO_4 -Menge weder beschleunigend noch hemmend auf das Wachstum einwirkt.

Diese Ergebnisse weichen etwas von den meinigen ab, und die oben genannten Autoren scheinen beim Versuch über die Konzentration der Kulturlösung ihre Pufferwirkung ausser acht gelassen zu haben. Wie schon erwähnt, scheint HAENSELER die Konzentration der Nährsalze hauptsächlich von dem Gesichtspunkte des osmotischen Druckes aus betrachtet zu haben, während er keine exakte H-Ionenkonzentration angegeben hat.²⁾

Überblicken wir die Versuchsergebnisse in diesem Kapitel, so halten wir uns zu folgendem Schluss berechtigt:

Obwohl der Einfluss des osmotischen Druckes auf das Wachstum des Pilzes eine grosse Rolle zu spielen vermag, so scheint es doch unrichtig, aus dem Versuche über den Einfluss der Konzentration der Kulturlösung auf das Pilzwachstum, ohne Rücksicht auf die Pufferwirkung, die Veränderungsgeschwindigkeit der Salzkonzentration usw. irgendwelche Schlüsse zu ziehen.

Einfluss der Ca-Salze auf das Wachstum des Pilzes.

WEHMER hat in seiner berühmten Arbeit über die Oxalsäurebildung von *Aspergillus niger* konstatiert, dass der Pilz bei Gegenwart von Calciumcarbonat oder Calciumphosphat diese Säure in ungeheurer Menge produziert, während dies beim Zusatz von Calciumnitrat sowie Calciumchlorid gar nicht oder nur in schwachem Grade stattfindet. Aus diesem Versuchsergebnisse hat er geschlossen, dass nicht das Calcium an der Oxalsäurebildung schuldig ist, sondern die Eigenschaft der Säureanionen, die mit dem Calcium sich verbinden können. Aus seinem Versuche geht auch hervor, dass bei Gegenwart von Calciumcarbonat oder Calciumphosphat die Kulturlösung für das Wachstum des Pilzes in einen ungünstigen Zustand übergeht.

1) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ oder NaNO_3 als N-Quelle.

2) Da die von ihm verwendete N-Quelle Nitrat gewesen ist, so wäre es unrichtig, seine Versuchsergebnisse mit den meinigen unmittelbar zu vergleichen.

YOUNG und BENNET haben die beschleunigende Wirkung von Calcium auf das Wachstum des Pilzes bestätigt; nach ihrer Meinung dient Calcium zur Regulation der Acidität (correcting of acidity) der Kulturlösung.

VERSUCH XVII.

Kulturlösungen:	(1)	(2)	(3)
Grundlösung	25	25	25
Glukoselösung (m/2)	50	50	50
CaCO ₃ (in g)		(5)	
CaCl ₂ (in g)			(5.55)
Umdest. Wasser	25	25	25
Summe (in cem)	100	100	100

Die Ca-Menge in den Kulturen 2 und 3 ist äquivalent, diejenige von CaCO₃ ist gleich derjenigen im Versuche von WEHMER

pH nach einstündiger Sterilisation:

(1)	4.2
(2)	6.4
(3)	3.9

ERLENMEYERSCHE Kolben von 300 cem Inhalt.

Tabelle XVII.

Kultur	Kulturdauer, Tage	Pilzgewicht g	pH	Oxalsäure	Glukose
1-1	10	1.443	1.7	0	+
1-2	„	1.451	1.6	0	+
1-3	„	1.730	1.4	0	+
1-4	„	1.795	1.4	0	+
1	10	1.605	1.5	0	+
2-1	10	0.310	4.7	+	+
2-2	„	0.290	4.5	+	+
2-3	„	0.379	4.3	+	+
2-4	„	0.471	4.4	+	+
2	10	0.363	4.5	+	+
3-1	10	1.571	1.4	0	0
3-2	„	1.425	1.4	0	0
3-3	„	1.610	1.4	0	0
3-4	„	1.415	1.5	0	0
3	10	1.505	1.4	0	0

Durch einen Zusatz von Calcium wird der Pilz in seinem Gedeihen günstig beeinflusst. Die CaCl_2 -haltige Kulturlösung wird von einer dicken weissen Pilzschicht bedeckt, die aber ohne Fruktifikation bleibt. Am Ende des Versuchs ist zwar die höchste Pilzernte nicht in der CaCl_2 -haltigen Kultur gewonnen worden, deswegen darf man aber den Zusatz von Calcium doch nicht niedrig einschätzen, weil zur Erntezeit die C-Quelle schon erschöpft war und die Abnahme des Pilzgewichtes begonnen hatte. Nun ist nicht zu zweifeln, dass bei Gegenwart von Calcium das Wachstum von *Aspergillus niger* auffallend beschleunigt wird. In diesem Falle dürfte man diese stimulierende Wirkung von Calcium nicht auf die Pufferwirkung der Calciumsalze, sondern zum Teil auf die antagonistische Wirkung der Ca-Ionen gegen die H-Ionen in bestimmter Konzentration usw. zurückführen, wie sie von BRENNER(2), PRIANISCHNIKOW, KAHHO und von mir selbst bei anderen Pflanzen bestätigt worden ist. Diese günstige Wirkung des Calciums wird manchmal von anderen Faktoren so eingeschränkt, dass kein so üppiges Wachstum erfolgt. Dies kann man beim Zusatz von Calciumcarbonat sowie-phosphat klar ersehen.¹⁾ Wie WEHMER schon hervorgehoben hat, beruht eine solche abweichende Wirkung der verschiedenen Calciumsalze auf gewissen Eigentümlichkeiten. Calciumcarbonat oder -phosphat, denen eine starke Pufferwirkung gegen den Anstieg der H-Ionenkonzentration zukommt, lassen den Pilz in ungeheurer Menge Oxalsäure produzieren. Der daraus resultierende grosse Energieverlust hebt den Vorteil der Pufferwirkung auf und das Pilzwachstum verschlechtert sich. Der erste Anreiz zu einer solchen lebhaften Oxalsäurebildung bei Zusatz von Calciumcarbonat oder -phosphat ist, wie oben erwähnt, die starke Pufferwirkung. Das Verbindungsvermögen zwischen dem Calcium und der Oxalsäure, wodurch Calciumoxalat in unlöslichem Zustand entsteht, ist nur als eine daraus hervorgehende sekundäre Erscheinung zu betrachten.

Zusammenfassung.

1. Die Kultur von *Aspergillus niger* in der Grundlösung zeigt, graphisch dargestellt, im Wachstum sowie in der Veränderung des pH-Wertes autokatalyseähnlichen J-förmigen Verlauf. Im Vergleich der Kurven des Wachstums und des pH-Wertes beträgt die optimale H-Ionenkonzentration etwa $\text{pH}=2.0$ für das fortgeschrittene Wachstum des Pilzmycels.

1) Auch bei WEHMER, BUTKEWITSCH.

2. Durch Zusatz des spezifischen Puffers zur Kulturlösung wird die Erhöhung der H-Ionenkonzentration während des Pilzwachstums mehr oder weniger gehemmt, was auf das Pilzwachstum günstig wirkt, indem die auf das Wachstum ungünstig wirkende höhere H-Ionenkonzentration verzögert wird.

3. Die starke Pufferwirkung sowie das aufs neue auftretende Neutralisationsvermögen der Kulturlösung ruft andererseits leicht, ja selbst in höherer Acidität, die Oxalsäurebildung durch den Pilz hervor, die in ökonomischer Hinsicht den Pilz sehr benachteiligt. Eine günstige Harmonie zwischen der Pufferwirkung und der Oxalsäurebildung gestattet *Aspergillus niger* üppiges Wachstum.

4. Das als N-Quelle verwendete Ammoniumsalz vermag möglicherweise wenigstens die folgenden zwei Einflüsse auf die Acidität der Kulturlösung auszuüben:

- a) Erhöhung der H-Ionenkonzentration durch die Dissoziation der disponibel gewordenen Säure.
- b) Einfluss als Puffer.

5. Auch beim Vergleich des Nährwertes verschiedener Ammoniumsalze als N-Quelle muss man die oben erwähnte Beziehung zwischen Pufferwirkung und Oxalsäurebildung in Betracht ziehen.

6. Obwohl der Einfluss des osmotischen Druckes auf das Wachstum des Pilzes eine grosse Rolle spielt, so wäre es doch falsch, wenn man lediglich gestützt auf den Versuch über den Einfluss der Konzentration der Kulturlösung auf das Gedeihen des Pilzes einen Schluss zöge, ohne Rücksicht auf die Pufferwirkung, die Veränderungsgeschwindigkeit der Salzkonzentration usw.

7. Calcium wirkt auf das Wachstum von *Aspergillus niger* beschleunigend, wenn die zugesetzten Calciumsalze nicht zu stark puffernd wirken. Das Verbindungsvermögen zwischen dem Calcium und der Oxalsäure, wodurch Oxalat im unlöslichen Zustande entsteht, ist in der Kultur von *Aspergillus niger* nur als eine aus der Oxalsäurebildung erfolgende sekundäre Erscheinung zu betrachten.

8. Die Pufferwirkung der Kulturlösung steht also mit der Art der N-Quelle, der Konzentration, der Gegenwart der spezifischen Puffer usw. in enger Beziehung.

9. Um verschiedene Kulturen zu vergleichen, muss man täglich oder möglichst oft das Pilzmycel ernten. Mehrere Kulturen sind mittels Kurven miteinander zu vergleichen. Wenn die Ernte nicht so oft

ausgeführt wird, so muss der übriggebliebene Zucker qualitativ oder quantitativ nachgewiesen werden, damit man bemerken kann, wann die Verringerung der Pilzernte beginnt. Eine einmalige Pilzernte ohne solche Zuckermessungen genügt oft nicht zum exakten Vergleich der Kulturen.

10. Die anfängliche H-Ionenkonzentration der Kulturlösung dient nur als Masstab für den Keimungsgrad der Sporen oder für den Wachstumsgrad des Mycels im frühesten Stadium. Wenn der Einfluss der H-Ionenkonzentration auf das Pilzwachstum während der ganzen Kulturdauer untersucht werden soll, so muss man der Pufferwirkung der Kulturlösung eine grosse Rolle zuerkennen. Arbeiten, in denen nur die anfängliche oder bisweilen auch die finale H-Ionenkonzentration der Kulturlösung mitgeteilt wird, dürften je nach den Umständen an Bedeutung einbüßen.

11. Die Kulturen sollten nicht zwecklos lange dauern und die Nährlösungen nicht zu stark verdünnt werden, weil die inzwischen verschiedenartig veränderten Bedingungen in jeder Lösung sekundäre Einflüsse auf das Gedeihen des Pilzes ausüben können.

Nachschrift.

Nachdem die Drucklegung bereits abgeschlossen vorlag, kamen mir noch drei Referate von den folgenden Arbeiten zu Gesicht;

1. ELVING, Fr., Über die Bildung organischer Säuren durch *Aspergillus niger*. Öfversigt af Finska Vetenskaps-Societetens Förhandlingar. 1918-1919. 61. Afd. A. No. 15. (Referat von KURT NOAK in der Zeitschr. f. Bot., Bd. 13 1921).
2. BACH, D., Variations de la concentration en ions hydrogène sous l'influence de l'assimilation des nitrates par l'*Aspergillus repens* DE BARY. C. R. Acad. Sc. Paris. 1924 178. (Referat von HOCHAPPEL im Botanischen Centralblatt Bd. 146. 1924).
3. BACH, D., Variations de la concentration des ions H au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux d'acids forts par l'*Aspergillus repens* DE BARY. C. R. Acad. Sc. Paris 1924. 178 (Referat von HOCHAPPEL im Botanischen Centralblatt, Bd. 146 1924).

Ich möchte aber an dieser Stelle diese Publikationen nachträglich nur zitieren, da sich mir in der nächsten Zukunft wieder eine Gelegenheit bieten wird, eingehend darauf zu sprechen zu kommen.

Literaturverzeichnis.

- BENECKE, W., Allgemeine Physiologie der Ernährung der Schizomyceten und der Eumyceten (Stoffwechsel). Allgemeine Ernährungsphysiologie. LAFERS Handbuch der Technischen Mykologie. Bd. I. 1904-1907.
- BRENNER, W. (1), Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. Centralb. Bakt. II Teilung. Bd. 40. 1914.
- BRENNER, W. (2), Über die Wirkung von Neutralsalzen auf die Säureresistenz, Permeabilität und Lebensdauer der Protoplasten. Ber. d. d. Bot. Gesell. Bd. 38. 1920.
- BUTKEWITSCH, Wl., Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhang mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 38. 1903.
- CLARK, W. M., The determination of hydrogen ions. 1923. Baltimore.
- CZAPEK, F., Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzen. 1911. Jena.
- HAENSELER, C. M., The effect of salt proportions and concentration on the growth of *Aspergillus niger*. Amer. Journ. Bot. Vol. 8. 1920.
- KAHO, H., Über die Einwirkung von Säuren auf die Hitzegerinnung des Pflanzenplasmas. Biochem. Zeitschr. Bd. 144. 1924.
- KARRE, J. L. and WEBB, R. W., Titration curve of certain liquid culture media. Ann. Missouri Bot. Gard. 8. 1920
- MICHAELIS, L. (1), Praktikum der physikalischen Chemie insbesondere der Kolloidchemie. 1922. Berlin.
- MICHAELIS, L. (2), Die Wasserstoffionenkonzentration. Bd. I. 1922. Berlin.
- NIKITINSKY, J., Ueber die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 40. 1904.
- Ōno, N., Ueber die Wachstumsbeschleunigung einiger Algen und Pilze durch chemische Reize. Journ. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo. Vol. 13. 1900.
- OSTWALD, Wo., Über die zeitlichen Eigenschaften der Entwicklungsvorgänge. Vorträge und Aufsätze über Entwicklungsmechanik der Organismen. Heft 5. 1903.
- PRIANISCHNIKOW, Zur Frage über die Bedeutung des Calcium für die Pflanzen. Ber. d. d. Bot. Gesell. Bd. 41. 1923.
- RITTER, G., Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. Ber. d. d. Bot. Gesell. Bd. 27. 1909.
- ROBBINS, W. J., An isoelectric point for plant tissue and its significance. Amer. Journ. Bot. Vol. 10. 1923.
- ROBBINS, W. J., Isoelectric point for the mycelium of Fungi. Journ. Gen. Physiol. Vol. 6. 1924.
- ROBERTSON, T. B., On the nature of the autocatalyst of growth. Arch. Entwicklungsmech. d. Organismen. Bd. 37. 1913.
- SAKAMURA, T., Über die Selbstvergiftung der Spirogyren im destillierten Wasser. Bot. Mag., Tokyo. Vol. 36. 1922.
- VERZÁR, F., NÁBÁRCZYK, J. und SZÁNYI, V., Die Stoffwechsel-Regulation durch Säure bei *Bac. coli* comm. Biochem. Zeitschr. Bd. 141. 1923.
- WEHMER, C., Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Zeitg. Jahrg. 49. 1891.
- YOUNG, H. C. and BENNET, C. W., Growth of some parasitic fungi in synthetic culture media. Amer. Journ. Bot. Vol. 9. 1923.