



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	EXPERIMENTELLE STUDIEN UBER DIE BLASENZELL BILDUNG BEI ASPERGILLUS ORYZAE
Author(s)	SAKAMURA, Tetsu
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 1(1), 1-26
Issue Date	1930
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26200
Type	departmental bulletin paper
File Information	1(1)_P1-26.pdf



EXPERIMENTELLE STUDIEN ÜBER DIE BLASENZELL- BILDUNG BEI *ASPERGILLUS ORYZAE*

Von

Tetsu SAKAMURA

Mit Tafel I.

Die Blasen- bzw. Riesenzellbildung bei der Pilzkultur ist bisher von RACIBORSKI (1905), RITTER (1909, 1912), KIESEL (1913), WEHMER (1913), BOAS (1916, 1919), MOLLIARD (1924), BACH (1925), FREY (1927) u.a. untersucht worden. Auch in meiner früheren Arbeit (1930) wurde festgestellt, dass bei *Aspergillus oryzae* Riesenzellen in der höheren Acidität der Kulturlösung gebildet werden.

Die Meinung bezüglich ihrer Entstehung ist bei den Autoren verschieden. Nach BOAS, WEHMER, RITTER, BACH u.a. steht Säurewirkung mit der Blasen- bzw. Riesenzellbildung in inniger Beziehung. Dass die Riesenzelle bei künstlichem Säurezusatz entsteht, wurde von BREFELD (1873), KLEBS (1896), RITTER (1907) bei der Pilz- oder Algenkultur bestätigt.

MOLLIARD und FREY betrachteten die Wirkung der C_H auf die Riesenzellbildung bei der Pilzkultur als indirekt, indem diese Autoren sie durch schwache Resorption von Kalium in der höheren Acidität erklärten. Entgegen der Meinung von WEHMER, dass die Riesenzellbildung bei der Kultur von *Aspergillus* hauptsächlich von der Acidität abhängig sei, sagte KÜSTER (1916, S. 371): „Die Berechtigung dieser Verallgemeinerung wird sich zurzeit schwerlich erweisen lassen.“ RACIBORSKI beschrieb Riesenzellen bei *Aspergillus niger* in der höheren Konzentration der Kulturlösung oder bei Zusatz einer sehr kleinen Menge Jod.

Auch RITTER und WEHMER, welche beide auf die Säurewirkung das Hauptgewicht gelegt haben, sind in Bezug auf die Mechanik der

Riesenzellbildung nicht ganz einig. Der erstere erklärte die Riesenzellbildung dadurch, dass die Dehnbarkeit der Zellwand direkt durch die höhere Acidität beeinflusst und die Regulation zwischen der Dehnbarkeit der Membran und der osmotischen Verhältnisse gestört werde. Der letztere verstand die Riesenzellbildung eher in der Weise, dass die Dehnbarkeit erst nach der stofflichen Veränderung der Membran sich erhöhe; C_H rufe zunächst chemische Veränderung der Membran hervor, und sie wirke daher indirekt auf die Riesenzellbildung ein. In der Tat kann man mit WEHMER die Cellulosereaktion mit Chlorzinkjod in der dickwandigen Riesenzelle bei den verschiedenen Pilzarten nachweisen. Diese Membraneigenschaft wurde auch von FREY (1927) und BOAS (1916) bestätigt.

Es wurde in meiner früheren Arbeit (1930) gefunden, dass, wie im Falle von BOAS, viele Riesenzellen bei *Aspergillus oryzae* auftreten, wenn C_H in der Glukose-Ammoniumnitrat-Kultur sich erhöhten (Fig. 1). Es schien mir schon damals, dass die Riesenzellbildung nicht wenig von C_H abhängig sei.

Die bisher von verschiedenen Autoren angegebene sogen. Blasen- zelle kann als die vorher auftretende Zellform der dickwandigen Riesenzelle bestätigt gefunden werden, und sie wird in Kugel-oder bisweilen in basidienähnlicher Form ohne Veränderung der Membrandicke gebildet. Bei der Untersuchungen über die Riesenzellbildung ist es daher notwendig, zunächst den Zusammenhang zwischen der Blasenzellbildung und C_H genau zu erklären, worauf bisher schon von vielen Autoren aufmerksam gemacht wurde. Da aber mehrfach bestätigt wurde, dass C_H sich während der Pilzkultur immer verändert, ist es schwer, die Beziehung zwischen Blasenzellbildung und C_H bei der gewöhnlichen, lang dauernden Kultur zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurden bei der vorliegenden Untersuchung Konidien von *Aspergillus oryzae* in Kulturlösung von verschiedenen pH eingimpft und die Form der gekeimten Myzelien vor der merklichen Veränderung der C_H der Kulturlösung untersucht.

Methode

Bei den vorliegenden Untersuchungen bediente ich mich hauptsächlich einer Nährlösung von folgender Zusammensetzung:

Grundlösung:

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%)	1 Tropf
Umdestilliertes Wasser	100 ccm

Zum Gebrauch wurde die Grundlösung mit Glukoselösung, Phosphatgemischlösung, HCl-Lösung, Konidiensuspension, usw. mehr oder weniger verdünnt.

Die Reagenzgläser aus einheimischem, praktisch alkalifreiem Glas wurde mit einer bestimmten Menge der Kulturlösung beschickt und bestimmte Tropfenzahl der Konidiensuspension von verschiedenen Vorkulturen von *Aspergillus oryzae*⁽¹⁾ darin eingimpft, ohne dass dabei die Lösung sterilisiert wurde. Die Reagenzgläser wurden mit Wattepropfen schwach verschlossen, die Kulturen in einem Thermostat gestellt und die Temperatur auf 30°C reguliert. Nach 18 Stunden wurden die gekeimten Myzelien mit Kapillarpipetten herausgenommen und unter dem Mikroskop untersucht.

Versuch 1

Kultursalzlösung:

Grundlösung .	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
$\text{H}_3\text{PO}_4(\text{m}/5)$.	12,5	7	4	2	1										
$\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{m}/5)$.	12,5	19	21	23	24	25	24,5	24	22	20	15	10			
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{m}/5)$.							0,5	1	3	5	10	15	25	25	25
$\text{NaOH}(\text{m}/10)$.													10	20	30
H_2O	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
pH	2,4	2,6	2,8	3,3	3,7	4,2	4,7	5,0	5,2	5,4	5,9	6,2	6,3	6,5	7,2

(1) Die Vorkultur geschah auf festen 2%igen Agarböden. Siehe meine Arbeit (1930).

Kulturlösung :

{ Kultursalzlösung	3 ccm
{ Glukoselösung (10%)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 3 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 A.

TABELLE I.

Anfangs-pH	End-pH	Blasenzelle
2,6	2,4	+
2,6	2,6	+
2,8	2,8	+
3,3	3,3	+
3,7	3,4	+
4,2	4,2	—
4,7	4,6	—
5,0	5,1	—
5,4	5,4	—
5,9	5,8	—
6,2	6,0	—
6,5	6,4	—
6,8	6,6	—
7,2	7,0	—

(Fig. 2-4)

Versuch 2

Kultursalzlösungen waren gleich denjenigen von Versuch 1.

Kulturlösung :

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung (10%)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 5 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

(Tabelle II)

Aus diesen Versuchsergebnissen geht hervor, dass die Grenzacidität der Blasenzellbildung bei pH 3, 7—4, 2 liegt. Da die Na-Menge in jedem Puffergemisch verschieden genommen wurde, indem die Phos-

TABELLE II.

Anfangs-pH	End-pH	Blasenzelle
2,4	2,4	+
2,6	2,6	+
2,8	2,8	+
3,3	3,3	+
3,7	3,5	+
4,2	4,0	—
4,7	4,5	—
5,0	4,6	—
5,2	5,1	—
5,4	5,2	—
5,9	5,8	—
6,2	5,9	—
6,5	6,5	—
6,8	6,8	—
7,2	7,1	—
7,4	7,4	—

phatmenge gleich blieb, so wurden auch weitere Versuche angestellt wo die Na-Menge gleich genommen wurde, um zu wissen, inwieweit Phosphat-und Na-Ionen die Grenzacidität beeinflussten.

Versuch 3

Kultursalzlösung A :

Grundlösung . .	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
H ₃ PO ₄ (m/5) . .	12,5	9	4	2	1	0,5						
NaH ₂ PO ₄ (m/5) .	12,5	16	21	23	24	24,5	25	24,5	24	23	22	20
Na ₂ HPO ₄ (m/5) .								0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
H ₂ O	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
pH	2,4	2,7	2,9	3,3	3,6	3,8	4,2	4,7	5,0	5,2	5,4	5,7

Phosphat-Mengen waren gleich in allen Lösungen A.

Kultursalzlösung B:

Grundlösung	. 25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Na ₂ HPO ₄ (m/5)	. 10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
H ₃ PO ₄ (m/5)	. 20	15	13,5	12,5	12	11	10,5	10,25	10	9,5	9,0	7,0
H ₂ O		auf 100 ccm verdünnt										
pH		2,5	2,7	3,0	3,1	3,3	3,7	3,9	4,2	4,5	4,9	5,1 5,4
Na-Mengen waren gleich in allen Lösungen B.												

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung (10%)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 K₁.

TABELLE III.

A			B		
Anfangs-pH	End-pH	Blasenzelle	Anfangs-pH	End-pH	Blasenzelle
2,4	2,4	+	2,5	2,5	+
2,7	2,7	+	2,7	2,8	+
2,9	2,9	+	3,0	3,0	+
3,3	3,3	+	3,1	3,1	+
3,6	3,6	+	3,3	3,3	+
3,8	3,8	+	3,7	3,7	+
4,2	4,2	—	3,9	3,9	—
4,7	4,7	—	4,2	4,2	—
5,0	5,0	—	4,5	4,5	—
5,2	5,2	—	4,9	4,9	—
5,4	5,4	—	5,1	5,1	—
5,7	5,6	—	5,4	5,4	—

(Fig. 5 und 6)

Versuch 4

Kulturlösungen waren gleich denjenigen von Versuch 3. Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

Grenzacidität der Blasenzellbildung :

A, pH 3,8 — 4,2

B, pH 3,7 — 3,9

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

Versuch 5

Kulturlösungen waren gleich denjenigen von Versuch 3. Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 P.

Grenzacidität der Blasenzellbildung :

A, pH 3,8 — 4,2

B, pH 3,7 — 3,9

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

Versuch 6

Kulturlösungen waren gleich denjenigen von Versuch 3. Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 E.

Grenzacidität der Blasenzellbildung :

A, pH 3,8 — 4,2

B, pH 3,7 — 3,9

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

In obigen Versuchen, die mit Pilzmaterialien aus verschiedenen Vorkulturen angestellt wurden, liegt die Grenzacidität zwischen pH 3,8 und 4,2 bei der gleichen Phosphatmenge und zwischen pH 3,7 und 3,9 bei der gleichen Na-Menge.

Es war nicht ausgeschlossen, dass andere Grenzaciditäten gefunden wurden, was aus den folgenden Versuchen ersichtlich ist.

Versuch 7

Kultursalzlösungen A :

Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25	25
H ₃ PO ₄ (m/5)	2	1	0,8	0,5	0,35	0,2	0,1		
NaH ₂ PO ₄ (m/5)	23	24	24,2	24,5	24,65	24,8	24,9	25	24,5
Na ₂ HPO ₄ (m/5)									0,5
H ₂ O	50	50	50	50	50	50	50	50	50
pH	3,3	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0	4,1	4,2	4,7

Phosphat-Mengen waren gleich in allen Lösungen A.

Kultursalzlösung B :

Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Na ₂ HPO ₄ (m/5)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
H ₃ PO ₄ (m/10)	24	23	22	21,5	21	20,7	20,2	20,0	19,6
H ₂ O	41	42	43	43,5	44	44,3	44,8	45,0	45,4
pH	3,3	3,5	3,7	3,8	3,9	4,0	4,1	4,2	4,4

Na-Mengen waren gleich in allen Lösungen B.

Kulturlösung :

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung (10%)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension.

Versuchsmaterialien :

Aspergillus oryzae 65 K₁, K₂, K, E, C, P.

Grenzacidität (pH) der Blasenzellbildung :

	A	B
K ₁	3,6—3,7	3,5—3,7
K ₂	3,7—3,8	3,5—3,7
K _{1/3}	3,8—3,9	3,7—3,8
E	3,8—3,9	3,7—3,9
C	3,7—3,9	3,8—3,9
P	3,8—3,9	3,8—3,9

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

Im allgemeinen kann man zusammenfassend sagen, dass die Grenzacidität der Blasenzellbildung bei *Aspergillus oryzae* von verschiedenen Vorkulturen liegt :

zwischen pH 3,6 und 4,2 bei gleicher Phosphatmenge,

zwischen pH 3,5 und 3,9 bei gleicher Na-Menge

Die Grenzacidität neigt bei der letzteren Kultur etwas höher zu sein, als bei der ersteren. Wenn die Konidien aus derselben Vorkultur entnommen werden, kann man fast konstante Grenzacidität der Blasenzellbildung finden. Die Variation der Grenzacidität deutet darauf hin, dass die hauptsächlich durch C_H bestimmte Grenze mehr oder weniger durch andere Ionen, Vorkultureigenschaften oder Alter des Pilzes modifiziert werde. Dass diese anderen Faktoren ausser C_H aber nur eine kleine Rolle spielen, wenn das Wachstum gleichmässig fortschreitet, kann man auch durch folgenden Versuch bestätigen, wo verschiedene Aciditäten mit HCl ausser Phosphatgemischen hergestellt wurden.

Versuch 8

Kulturlösung:

A, gleich denjenigen von Versuch 3 A.

B, gleich denjenigen von Versuch 3 B.

C,

Kultursalzlösung:

Grundlösung . . .	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
HCl (n/10) . . .	3,5	1,5	0,8	0,4					
HCl (n/100) . . .					0,15	0,42	0,87	2,22	
H ₂ O.	19,0	21,0	21,7	22,1	22,35	22,08	21,63	20,28	
pH	2,5	2,8	3,1	3,5	3,7	3,8	3,9	4,1	
{ Kultursalzlösung C			4 ccm						
{ Glukoselösung (10%)			0,5 ccm						

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

Grenzacidität der Blasenzellbildung:

A, pH 3,7 — 3,9

B, pH 3,6 — 3,8

C, pH 3,5 — 3,8

Keine merkliche pH-Veränderung während der Kultur.

Es gibt keinen merklichen Unterschied der Grenzacidität unter diesen verschiedenen Kulturlösungen.

Die organischen Säuren wirken auf die Blasenzellbildung etwas anders als die anorganischen Säuren (d.h. starke dissoziierbare) ein, weil ihre Moleküle neben C_H biologisch spezifische Wirkung aufweisen.

Versuch 9

Kultursalzlösung 1:

Grundlösung	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Essigsäurelösung (n/10)	22,5	15,0	6,0	1,5	1,2	0,3
H ₂ O	0	7,5	16,5	21,0	31,3	22,2
pH	3,1	3,5	3,6	3,7	3,9	4,0

Kultursalzlösung 2:

Grundlösung	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Oxalsäurelösung (n/10)	12,0	3,0	1,5			
Oxalsäurelösung (n/100)				2,00	1,00	0,50
H ₂ O	10,5	19,5	21,5	16,5	19,5	21,9
pP	2,3	2,8	3,1	3,5	3,7	4,1

Kultursalzlösung 3:

Grundlösung	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Citronensäurelösung (n/10)	15,0	6,0	1,5	0,9	0,6	0,3
H ₂ O	7,5	16,5	21,0	21,6	21,9	22,2
pH.	2,7	3,0	3,4	3,6	3,7	3,8

Kultursalzlösung 4:

Grundlösung	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Weinsäurelösung (n/10)	12,0	3,0				
Weinsäurelösung (n/100)			9,0	4,5	3,0	1,05
H ₂ O	10,5	19,5	13,5	18,0	19,5	21,0
pH	2,6	3,1	3,4	3,6	3,7	4,0

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukcse Lösung (10%)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 3 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

TABELLE IX.

Anfangs-pH ⁽¹⁾	Blasenzelle			
	Essigsäure	Oxalsäure	Citronensäure	Weinsäure
2,3		nicht keimen		(+) schlechtes Wachstum
2,6				
2,7			(+) schlechtes Wachstum	
2,8		+		
3,0			+	
3,1	nicht keimen	+		+
3,4			—	+
3,5	nicht keimen	+		
3,6			—	—
3,7	schlechtes Wachstum	—	—	—
3,8		—	—	—
3,9	schlechtes Wachstum			
4,0	—			—
4,1		—		

Auch in den Kulturlösungen, deren Aciditäten mit den organischen Säuren in verschiedenen Graden reguliert wurden, kann die Blasenzellbildung hauptsächlich von pH abhängig sein. Dazu kommt noch ein anderer wichtiger Faktor, der die Riesenzellbildung bedingt, nämlich die organischen Säuren in den Molekülformen. Diese, wie auf anderen Funktionen, wirken giftig auf das Pilzwachstum, wodurch die Grenzacidität etwas verschoben wurde. Dies war besonders bei Essigsäure und etwas bei Citronensäure merklich. Sowohl in diesem als in anderen Versuchen kann man bemerken, dass die Blasenzellbildung im allgemeinen bei schlechtem Wachstum schwer stattfindet.

Nach MOLLIARD und FREY soll die Riesenzellbildung durch schwache Resorption von Kalium hervorgerufen werden. Weil der Pilz in einer K-freien Kulturlösung natürlich nicht das normale Wachstum ausführen kann, dürfte man nicht berechtigt sein, aus einem solchen Kulturversuche den Zusammenhang zwischen der Riesenzellbildung in der voll-

(1) Der pH-Wert änderte sich nur um $\pm 0,1$ in einigen Fällen während der Kultur.

ständigen Kultur und den K-Mangel ohne weiters zu diskutieren. Doch ist es nicht unzweckmässig, die Tendenz der Blasenzellbildung bei der K-freien Kultur zu untersuchen, um die Bedeutung des K-Mangels zu prüfen.

Versuch 10

Spezifische Grundlösung:

NH_4NO_3		4 g
NaH_2PO_4		2,02 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		1 g
FeCl_3 (2%)		1 Tropf
Umdest. Wasser		100 ccm

Kultursalzlösung 1:

Spez. Grundlösung	. .	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Na_2HPO_4 (m/5)	. . .	10	10	10	10	10	10	10	10	10
H_3PO_4 (m/10)	. . .	30	25	24	21,5	20,5	20	19,5	18,5	16,5
H_2O		35	40	41	43,5	44,5	45	45,5	46,5	48,5
pH		2,8	3,1	3,3	3,7	3,9	4,2	4,5	4,9	5,3

Na-Mengen waren gleich in allen Lösungen 1.

Kultursalzlösung 2 (Kontrolle): Gleich denjenigen von Versuch 7 B.

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung (10%)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C,
Grenzacidität der Blasenzellbildung:

Kulturlösung 1, pH 3,1–3,3

Kulturlösung 2 (Kontrolle), pH 3,5–3,7

Keine merkliche pH-Veränderung während der Kultur.

Aus diesem Versuche geht hervor, dass die Blasenzellbildung durch den vollständigen K-Mangel nicht begünstigt, sondern eher erschwert wird.

Versuch 11

Kultursalzlösungen waren gleich denjenigen 1 von Versuch 10

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukose-KCl-Lösung ⁽¹⁾	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert. Die K-Mengen in diesen Kulturlösungen waren immer kleiner als in den gewöhnlichen Grundlösung-Kulturen:

	K-Menge(g) in 1 ccm Kulturlösung
Grundlösung-Kultur	0,00517
Mit 1 mol. KCl-Lösung zugesetzte Kultur	0,00434
„ 0,5 mol. „ „ „ „	0,00217
„ 0,1 mol. „ „ „ „	0,00043

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

Die Kultur dauerte 42 Stunden in diesem Versuche.

Die Grenzacidität der Blasenzellbildung liegt fast gleichmässig bei pH 3,9–4,2, mit Ausnahme der Kontrolle, wo das Wachstum besonders arm, die Myzelien sehr dünn und die Blasenzone nur selten sichtbar in allen Kulturen war.⁽²⁾ Unter Voraussetzung, dass je die K-Menge kleiner ist, desto weniger das Kalium durch den Pilz resorbiert wird, kann man aus diesen Versuchen keinen die Behauptung von MOLLIARD und FREY begünstigen Schluss ziehen, wonach die Blasenzellbildung durch die verhinderte K-Resorption verursacht wird.⁽³⁾

Um zu erfahren, wie Ca-Salz, welches bei der Pilzkultur oft als entbehrlich betrachtet wird, die Blasenzellbildung beeinflusst, wurde folgender Versuch beiläufig angestellt.

-
- (1) 1, 1,0 0,1 molare KCl-Lösung (Die Lösungsmittel: 10 % ige Glukoselösung) und KCl-freie Glukoselösung als Kontrolle.
 - (2) In diesem Versuche schritt das Wachstum im allgemeinen langsamer fort, als im Versuche 10.
 - (3) In meiner noch nicht publizierten Arbeit wurde festgestellt, dass das Kalium durch den Wurzel von *Zea Mays* nicht immer weniger, sondern oft stärker in den höheren Aciditäten resorbiert wird.

Versuch 12

Kultursalzlösung:

Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25	25
HCl (n/10)	12	5	2,7	1,3					
HCl (n/100)					10	7,7	2,9	1,1	0,5
H ₂ O	63	70	72,3	73,7	63,5	67,3	72,1	73,9	74,5
pH	2,5	2,8	3,1	3,4	3,6	3,7	3,8	4,0	4,1

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukose-CaCl ₂ -Lösung ⁽¹⁾	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Imfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

TABELLE XII.

Anfangs-pH ⁽²⁾	Blasenzelle			
	CaCl ₂ (0,5 mol)	Ca ₂ Cl (0,25 mol)	CaCl ₂ (0,1 mol)	Kontrolle
2,5	+	+	+	+
2,8	+	+	+	+
3,1	+	+	+	+
3,4	+	+	+	+
3,6	+	+	+	+
3,7	+	+	+	—
3,8	+	+	+	—
4,0	+	+	+	—
4,1	+	+	+	—

Durch einen Zusatz von Calcium wurde die Blasenzellbildung merklich beschleunigt.

Es ist schon bekannt, dass Konidien in einer salzfreien Zuckerlösung keimen können und die jungen Myzelien mehr oder weniger wachsen

(1) 0,5, 0,25 und 0,1 molare CaCl₂-Lösung (Die Lösungsmittel: 10 % ige Glukose-lösung) und CaCl₂-freie Glukoselösung als Kontrolle.

(2) Der pH-Wert änderte sich nur um $\pm 0,1$ in einigen Fällen während der Kultur.

können, wie bei keimenden Pollenkörnern. Falls die Blasenzone in der höheren Acidität solcher Kultur gebildet würde, wäre es nicht unmöglich, die Grenzacidität zu finden, welche durch andere Salze nicht beeinflusst wird.

Versuch 13

Kulturlösung:

HCl (n/100)	5,8	2,6	1,48	0,58	0,28	0,22	0,10	0,20
Glukoselösung (10%) . .	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
H ₂ O	14,2	17,4	18,52	19,42	19,72	19,78	19,90	19,98
pH	2,5	2,9	3,0	3,3	3,5	3,7	3,8	4,1

4,5 ccm jeder Kulturlösung wurden genommen und 2 Tropfen von Konidien-suspension von *Aspergillus oryzae* 65 C wurden darin übergeimpft.

TABELLE XIII.

Anfangs-pH	End-pH	Blasenzelle
5,5	2,5	nicht keimen
2,9	2,9	(—) schlechtes Wachstum
3,0	3,2	„
3,3	3,5	„
3,5	3,7	„
3,7	3,8	„
3,8	4,4	„
4,1	4,5	„

Wenn auch Konidien in den Nährsalzfreien Zuckerlösungen von verschiedenen Aciditäten keimen können, ist die Gegenwart der Nährsalze doch für die Blasenzonebildung unentbehrlich. Man kann die Grenzacidität der Blasenzonebildung in einer salzfreien Kultur nicht bestimmen; auch das Wachstum ist also in gewissem Grade ein notwendiger Faktor dafür. Die zur Blasenzonebildung notwendige Konzentration der Nährsalze wurde daher im Versuch 14 bestimmt.

Versuch 14

Kulturlösung:

Verdünnte Grundlösung ⁽¹⁾	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
HCl (n/100)	2,90	1,30	0,74	0,29	0,19	0,14	0,11	0,05	0,01
Glukoselösung (20%)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
H ₂ O	4,6	6,2	6,76	7,21	7,31	7,36	7,39	7,45	7,49
pH	2,5	2,9	3,0	3,4	3,6	3,7	3,9	4,4	4,6

4 ccm jeder Kulturlösung wurden genommen und 2 Tropfen von Konidien-suspension von *Aspergillus oryzae* 65 C übergeimpft.

TABELLE XIV.

Anfangs-pH	G.I./10		G.I./100		G.I./1000		G.I./10000	
	End-pH	Blasen-zelle	End-pH	Blasen-zelle	End-pH	Blasen-zelle	End-pH	Blasen-zelle
2,5	2,5	+	2,5	—	2,5	—	2,5	—
2,7	2,7	+	2,9	—	2,9	—	2,9	—
2,9	2,9	+	3,0	—	3,0	—	3,0	—
3,1	3,1	+	3,2	—	3,2	—	3,3	—
3,6	3,5	—	3,3	—	3,4	—	3,5	—
3,7	3,6	—	3,4	—	3,5	—	3,7	—
3,9	3,7	—	3,4	—	3,6	—	3,9	—
4,0	3,7	—	3,5	—	3,8	—	4,2	—
4,4	3,7	—	3,8	—	4,1	—	4,8	—

Die Konzentration der Grundlösung/10 war genügend, um die Blasenzellbildung hervorzurufen, während in der Konzentration der Grundlösung/100 man keine Blasenzone mehr finden konnte.⁽²⁾

Die für Pilzwachstum notwendigen Nährsalze sind bereits bekannt, aber der Zusammenhang zwischen der Blasenzellbildung und dem einzelnen Salz muss hier untersucht werden.

(1) G.I./10, G.I./100, G.I./1000, G.I./10000,

(2) Es wäre aber nicht ausgeschlossen, dass bei länger dauernden Kultur und bei weiter fortschreitendem Wachstum die Riesenzelle noch in niedrigerer Konzentration gebildet werden kann.

Versuch 15

Kultursalzlösung 1:

KH_2PO_4 20 g	}	. . .	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g										
H_2O 1000 ccm										
HCl (n/10)			3,0	2,5	1,5	0,9				
HCl (n/100)							4,0	2,5	1,0	0,5
H_2O			19,5	20,0	21,0	21,6	18,5	20,0	21,5	22,0
pH			2,6	2,7	3,0	3,1	3,6	3,7	3,9	4,1

Kultursalzlösung 2:

NH_4NO_3 40 g	}	. . .	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g										
H_2O 1000 ccm										
HCl (n/100)			9,0	4,0	2,22	0,87	0,57	0,42	0,33	
H_2O			13,5	18,5	20,28	21,63	21,93	22,08	22,17	
pH			2,7	3,0	3,4	3,8	4,0	4,1	4,2	

Kultursalzlösung 3:

NH_4NO_3 40 g	}	. . .	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
KH_2PO_4 20 g										
H_2O 1000 g										
HCl (n/10)			3,4	2,5	1,0	0,7				
HCl (n/100)							4,0	2,5	1,0	0,5
H_2O			19,0	20,0	21,5	21,8	18,5	20,0	21,5	22,0
pH			2,5	2,6	3,0	3,2	3,5	3,7	3,9	4,1

Kultursalzlösung 4:

KH_2PO_4 20 g	}	. . .	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
H_2O 1000 ccm										
HCl (n/10)										
HCl (n/100)			3,5	2,5	1,0	0,7				
HCl (n/100)							4,0	2,5	1,0	0,5
H_2O			19,0	20,0	21,5	21,8	18,5	20,0	21,5	22,0
pH			2,5	2,7	2,9	3,1	3,5	3,7	3,9	4,1

Kultursalzlösung 5:

NH_4NO_3 40 g	}	. . .	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
H_2O 1000 ccm										
HCl (n/100)										
HCl (n/100)			9,00	4,00	2,22	0,87	0,57	0,42	0,33	0,20
H_2O			13,5	18,5	20,28	21,63	21,93	22,08	22,17	22,30
pH			2,7	2,9	3,2	3,7	3,9	4,0	4,2	4,4

Kultursalzlösung 6:

MgSO ₄ 7H ₂ O 10 g	}	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
H ₂ O 1000 ccm									
HCl (n/10)		1,4	0,9	0,4					
HCl (n/100)					2,22	0,87	0,57	0,42	0,25
H ₂ O		21,1	21,6	22,1	20,28	21,63	21,93	22,08	22,25
pH		2,5	2,7	2,9	3,3	3,6	3,9	4,0	4,3

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung (10 %)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

TABELLE XV.

Anfangs- pH	1		2		3		4		5		6	
	B.z.	End- pH	B.z.	End- pH	B.z.	End- pH	B.z.	End- pH	B.z.	End- pH	B.z.	End- pH
2,5					schlechtes Wachstum (-)	2,5	nicht keimen	2,5			+	2,5
2,6	+	2,5			„	2,6						
2,7	+	2,7	+	2,7			„	2,7	schlechtes Wachstum (-)	2,7	+	2,7
2,9							„	3,0	„	2,9		
3,0	-	2,9	+	3,1	„	3,0					+	3,0
3,1	-	3,1					„	3,1				
3,2					„	3,2			„	3,2		
3,3											-	3,3
3,4			-	3,4								
3,5					„	3,5	„	3,5				
3,6	-	3,6									-	3,7
3,7	-	3,7			„	3,7	„	3,7	„	3,7		
3,8			-	3,8								
3,9	-	4,0			„	3,9	„	4,0	„	3,9	-	3,9
4,0			-	3,9					„	4,0	-	4,1
4,1	-	4,1	-	4,1	„	4,1	„	4,2				
4,2			-	4,1					„	4,2		
4,3											-	4,3
4,4									„	4,3		

Die angeführten Ergebnisse sprechen dafür, dass alle Nährsalze für Blasenzellbildung notwendig sind und besonders die Gegenwart von Magnesiumsulfat. Dass ferner besonders das Magnesium des letztgenannten Salzes unentbehrlich dafür ist, kann man im Versuch 16 bestätigen.

Versuch 16

1. Mg-freie spezifische Grundlösung :

NH_4NO_3	40 g
KH_2PO_4	20 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	13,07 g
H_2O	1000 ccm

2. SO_4 -freie spezifische Grundlösung :

NH_4NO_3	40 g
KH_2PO_4	20 g
MgCl_2	8,24 g
H_2O	1000 ccm

Kultursalzlösung :

spez. Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Na_2HPO_4 (m/5)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
H_3PO_4 (m/10)	40	30	25	24	21,5	21	20,5	20	19,5
H_2O	25	35	40	41	43,5	44	44,5	45	45,5
pH	2,5	2,8	3,1	3,3	3,5	3,7	3,8	3,9	4,2

Na-Mengen waren gleich in allen Lösungen.

Kulturlösung :

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung (10 %)	0,5 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.
Die Kultur danerte 42 Stunden in diesem Versuche.

TABELLE XVI.

Anfangs-pH	1, Mg-freie Lösung		2, SO ₄ -freie Lösung	
	End-pH	Blasenzelle	End-pH	Blasenzelle
2,5	2,5	(-) schlechtes Wachstum	2,5	+
2,8	2,8	„	2,8	+
3,1	3,1	„	3,1	+
3,3	3,3	„	3,2	+
3,5	3,5	„	3,5	+
3,7	3,7	„	3,7	—
3,8	3,7	„	3,8	—
3,9	3,8	„	3,9	—
4,2	4,1	„	4,1	—

Was die Beziehung zwischen der Konzentration der Kulturlösung und der Blasenzellbildung betrifft, bemerkte RACIBORSKI die letztere bei der höheren Konzentration, und erklärte RITTER diese als Folge der Störung der Harmonie zwischen der Dehnbarkeit der Zellmembran und den osmotischen Verhältnissen. Wenn diese letztere Erklärung richtig ist, so wäre es nicht fernliegend anzunehmen, dass je grösser der Unterschied der osmotischen Werte zwischen ausser- und innerhalb der Zelle sei, desto mehr die Blasenzellbildung begünstigt werde. Es darf aber nicht vernachlässigt werden, dass bei der Untersuchung über den Einfluss der Konzentration diejenige der Salze nicht variiert, sondern nur die Konzentration des verhältnismässig indifferenten Zuckers verschieden genommen werden muss, weil die Blasenzellbildung direkt von der Variation der Salzkonzentration abhängig ist.

Versuch 17

Kultursalzlösungen A und B waren gleich denjenigen von Versuch 7, und dazu kamen noch folgende Lösungen:

Zu den Kultursalzlösungen A,

Grundlösung		25	25
H ₃ PO ₄ (m/5)		9	4
NaH ₂ PO ₄ (m/5)		16	21
H ₂ O		50	50
pH		2,7	2,9

Zu den Kultursalzlösungen B,

Grundlösung	25
H ₃ PO ₄ (m/10)	30
Na ₂ HPO ₄ (m/5)	10
H ₂ O	35
pH	2,7

Kulturlösung

{ Kultursalzlösung 4 ccm

{ Glukoselösung von verschiedenen Konzentrationen⁽¹⁾ 1 ccm

Der pH-Wert der Kultursalzlösung blieb bei der Verdünnung unverändert.

Impfung mit 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

TABELLE XVII.

A

Anfangs-pH	Blasenzelle			
	1,5 mol	1,0 mol	0,5 mol	0,25 mol
2,7	+	+	+	+
2,9	+	+	+	+
3,3	+	+	+	+
3,6	—	—	+	+
3,8	—	—	+	+
4,1	—	—	—	—

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

TABELLE XVIII.

B

Anfangs-pH	Blasenzelle			
	1,5 mol	1,0 mol	0,5 mol	0,25 mol
2,7	+	+	+	+
3,3	+	+	+	+
3,5	—	—	—	+
3,7	—	—	—	+
3,9	—	—	—	—
4,1	—	—	—	—

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

1) 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 mol.

Versuch 18

Kultursalzlösung A:

Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25
H ₃ PO ₄ (m/5)	6	4	2	1	0,8	0,4	0,1
NaH ₂ PO ₄ (m/5)	19	21	23	25	24,2	24,6	24,9
H ₂ O	50	50	50	50	50	50	50
pH	2,7	2,9	3,2	3,6	3,7	3,9	4,2

Phosphat-Mengen waren gleich in allen Kultursalzlösungen A.

Kultursalzlösung B:

Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25
Na ₂ HPO ₄ (m/5)	10	10	10	10	10	10	10
H ₃ PO ₄ (m/10)	30	27	24	22	21	20,7	20
H ₂ O	35	38	41	43	44	44,3	45
pH	2,8	3,0	3,3	3,6	3,8	3,9	4,1

Na-Mengen waren gleich in allen Kultursalzlösungen B.

Kulturlösung:

{ Kultursalzlösung	4 ccm
{ Glukoselösung von verschiedenen Konzentrationen ⁽¹⁾	0,5 ccm

Impfung von 2 Tropfen von Konidiensuspension von *Aspergillus oryzae* 65 C.

TABELLE XIX.

A

Anfangs-pH	Blasenzelle			
	1,5 mol	1,0 mol	0,5 mol	0,25 mol
2,7	+	+	+	+
2,9	+	+	+	+
3,2	+	+	+	+
3,6	—	+	+	+
3,7	—	+	+	+
3,8	—	—	+	+
4,0	—	—	—	—

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

(1) 0,25, 0,5 1,0 1,5 mol.

TABELLE XX.

B

Anfangs-pH	Blasenzelle			
	1,5 mol	1,0 mol	0,5 mol	0,25 mol
2,8	+	+	+	+
3,0	+	+	+	+
3,3	+	+	+	+
3,6	—	+	+	+
3,8	—	+	+	+
3,9	—	—	—	+
4,1	—	—	—	—

Keine pH-Veränderung während der Kultur.

Aus den Versuchsergebnissen kann man bemerken, dass eine innige Beziehung zwischen der Blasenzellbildung und der Konzentration der Kulturlösung besteht, d.h. je kleiner die Zuckerkonzentration ist, desto leichter kann die Blasenzelle durch starken Turgordruck gebildet werden. Deshalb kann man sagen, dass bei der variierten Konzentration der Kulturlösung die Blasenzellbildung mehrfach in Bezug auf osmotische Wirkung, Salzwirkung und Nährstoffmenge beeinflusst wird.

Bei der dickwandigen Riesenzelle ist die chemische Eigenschaft der Zellmembran anders als diejenige der Blasenzelle, deren Membran die chemische Veränderung noch nicht ausgeführt hat. Es kann aber nicht bezweifelt werden, dass die Dehnbarkeit der Membran und des Cytoplasmas des jungen Myzels mit dem osmotisch hervorgerufenen Turgordruck zusammen für solche Blasenzellbildung eine wichtige Rolle spielt, wie RITTER behauptete. Was die Wirkung der C_H auf die Blasenzellbildung anbetrifft, so sind wir geneigt, diese eher durch die direkte Wirkung der C_H zu erklären als durch die induzierte schwache K-Resorption. Es wäre nicht ausgeschlossen, dass auch die Anatonose d.h. die Erhöhung des osmotischen Drucks infolge von Produktion

löslicher Substanz innerhalb der Zelle bei der höheren Acidität ein anderer Faktor für die Blasezbildung sein kann. Diese Möglichkeit soll durch weitere Untersuchungen entschieden werden.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Grund eines mir von der Imperial Academy zur Förderung wissenschaftlicher Arbeiten gewährten Stipendiums ausgeführt, wofür ich hier meinen besten Dank aussprechen möchte.

Literaturverzeichnis

- BACH, D., Contribution a l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* DE BARY. 1925.
- BOAS, F., Jodbläuernde stärke-und zelluloseähnliche Kohlenhydrate bei Schimmelpilzen als Folge der Wirkung freier Säuren. Ber. d. D. Bot. Ges. **34**, 1916.
- BOAS, F., Untersuchungen über Säurewirkung und Bildung löslicher Stärke bei Schimmelpilzen (*Aspergillus niger*). Beih. Bot. Centralb. I. **36**, 1919.
- BREFELD, O., *Mucor racemosus* und Hefe. Flora 1873.
- FREY, A., La formation des cellules géantes du "*Strigmatocystis nigra*." Rev. gén. d. Bot. No. 461, 1927.
- KLEBS, G., Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena, 1896.
- KIESEL, A., Changements morphologiques de l'*Aspergillus niger* en présence divers acides et sels acides. Ann. Inst. Pasteur. **27**, 1913.
- KÜSTER, E., Pathologische Pflanzenanatomie. 2. Aufl. Jena, 1916.
- MOLLIARD, M., Retentissement de la composition minérale du milieu nutritif sur la structure du *Strigmatocystis nigra*. C.R. Ac. Sc. **178**, 1924.
- RACIBORSKI, M., Einige Chemomorphosen bei *Aspergillus niger*. Bull. Intern. Ac. Sc., Cracovie. 777, 1905.
- RITTER, G., Über Kugelhefen und Riesenzellen bei einigen Mucoraceen. Ber. d. D. Bot. Ges. **25**, 1907.
- RITTER, G., Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. Ber. d. D. Bot. Ges. **27**, 1909.
- RITTER, G., Die giftige und formative Wirkung der Säuren auf die Mucoraceen und ihre Beziehung zur Mucorhefebildung. Jahrb. f. wiss. Bot. **52**, 1912.
- SAKAMURA, T., Die Resorption des Ammonium-und Nitratstickstoffs durch *Aspergillus oryzae*. Planta. **11**, 1930.
- WEHMER, C., Selbstvergiftung in *Penicillium*-Kulturen als Folge der Stickstoff-Ernährung. Ber. d. D. Bot. Ges. **31**, 1913.

Figurenerklärung der Tafel

Die Mikrophotogramme wurden mit Hilfe von LEITZ „Makam“-Apparat (Objektiv 7 $\times$ Periplanokular 8 von LEITZ) aufgenommen. Vergrößerung etwa $\times 470$. Pilzmaterial *Aspergillus oryzae*.

Fig. 1. Dickwandige Riesenzellen in einer 5 tägigen Kultur (pH=2,6).

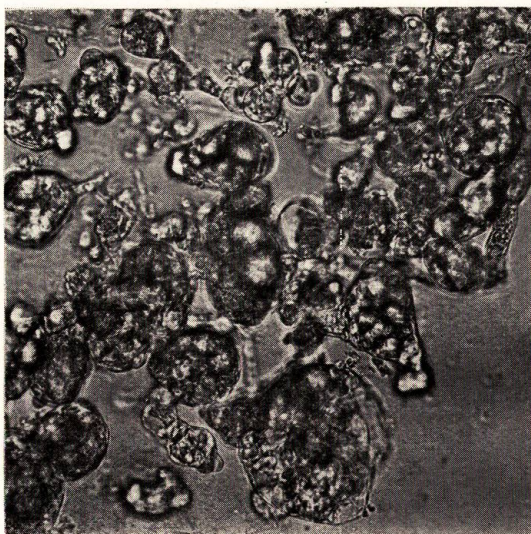
Fig. 2. Normale Mycelien im Versuch 1. pH=4,2.

Fig. 3. Blasenzellen im Versuch 1. pH=3,7.

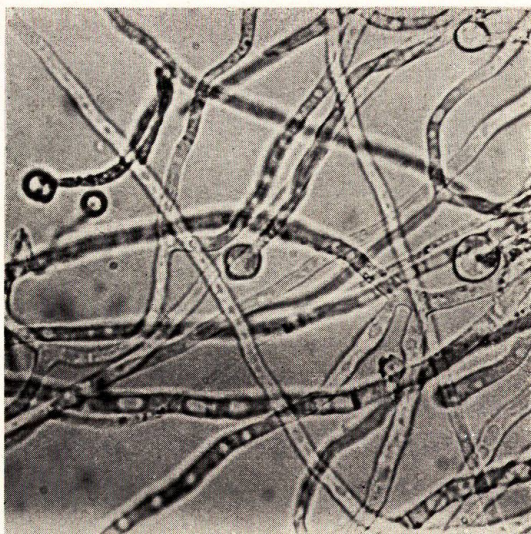
Fig. 4. Blasenzellen im Versuch 1. pH=2,4.

Figs. 5 und 6. Blasenzellen im Versuch 3. pH=3,3.

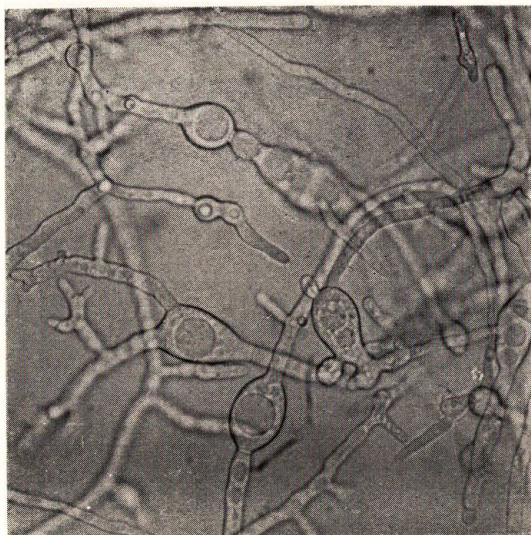
1



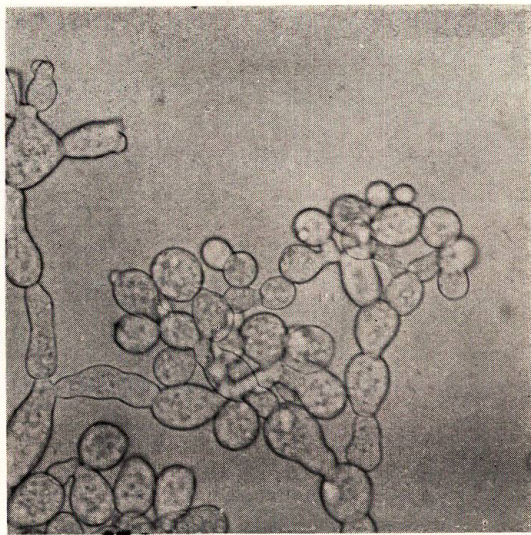
2



3



4



5



6



Sakamura Photo.