



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ueber die Bedeutung der H-Ionenkonzentration und die wichtige Rolle einiger Schwermetallsalze bei der Kugelzellbildung der Aspergillen
Author(s)	SAKAMURA, Tetsu; YOSHIMURA, Fuji
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 2(4), 317-331
Issue Date	1933
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26224
Type	departmental bulletin paper
File Information	2(4)_P317-331.pdf



Ueber die Bedeutung der H-Ionenkonzentration und die wichtige Rolle einiger Schwermetallsalze bei der Kugelzellbildung⁽¹⁾ der Aspergillen

Von

TETSU SAKAMURA und FUJI YOSHIMURA

Mit Tafel XVI.

Die Tatsache, dass bei der Kugelzellbildung von *Aspergillus oryzae* die H-Ionenkonzentration eine ausschlaggebende Rolle spielt, ist von SAKAMURA (1930) experimentell festgestellt worden. Aus den weiteren Untersuchungen geht aber hervor, dass Kugelzellbildung bei verschiedenen Aspergillen durch Verunreinigungen hervorgerufen wird, die gelegentlich in sehr kleinen Mengen den verwendeten Chemikalien beigemischt sind. Diese Sachverhältnisse veranlassten uns, unsere frühere Ansicht betreffs der Bedeutung der H-Ionenkonzentration bei dem Zustandekommen der Kugelzellbildung etwas zu modifizieren. In der vorliegenden Abhandlung sollen die Ergebnisse mitgeteilt werden, die bei *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus niger* erhalten wurden; die an anderen Aspergillen gewonnenen sollen später ausführlich behandelt werden.

Versuch 1

Die Versuchsmethode war im grossen und ganzen die gleiche wie bei den früheren Untersuchungen von SAKAMURA (1930). Reagenzgläser aus einheimischem, praktisch alkalienfreiem Glas wurden mit bestimmten Mengen der mit Phosphatgemisch gepufferten Kulturlösungen beschickt, mit Wattepfropfen verschlossen und im KOCHSchen Dampftopf eine Stunde lang sterilisiert. Nach dem Erkalten der Kulturlösung wurden 2 Tropfen der Konidiensuspension in jede Kultur übertragen und diese in einen Thermostat von 30°C gestellt. Nach 40 Stunden

(1) In einer früheren Abhandlung von SAKAMURA (1930) wurden derartige Zellen als „Blasenzellen“ bezeichnet. Aus verschiedenen Gründen scheint es uns jetzt angemessen, sie als „Kugelzellen“ zu bezeichnen.

wurden die gekeimten Mycelien mit Kapillarpipetten herausgenommen und unter Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenstellen :

Aspergillus oryzae (Fig. 1—3)

pH	2.4	2.6-3.8	4.0-6.6	7.0-7.7	7.9
Kugelzellbildung	s. hr schwaches Wachstum	+	-	+	keine Keimung

Aspergillus niger

pH	1.4	1.6-2.4	2.6-6.6	7.0-7.4	7.5
Kugelzellbildung	keine Keimung	+	-	+	keine Keimung

Bei *Aspergillus oryzae* liegt die Grenzacidität für Kugelzellbildung etwa bei pH 4.2, wie in der früheren Mitteilung, wo Kugelzellbildung auf dem alkalischen Gebiet allerdings nicht untersucht wurde. Aus den obigen Versuchen geht klar hervor, dass Kugelzellen nicht nur bei höheren Aciditäten, sondern auch im alkalischen Bereich sowohl bei *Aspergillus oryzae* als auch bei *Aspergillus niger* gebildet werden. *Aspergillus niger* ist bekanntlich widerstandsfähiger höherer Acidität gegenüber als *Aspergillus oryzae*. Es ist von grossem Interesse, dass auch die Grenzacidität für Kugelzellbildung beim ersteren höher liegt als beim letzteren, obwohl nicht nur die H-Ionenkonzentration, sondern auch ein anderer Faktor eine wichtige Rolle spielt, wie in folgendem geschildert werden soll. Im Verlauf der Untersuchungen haben wir eine ganz unerwartete Entdeckung gemacht, die über die Kugelzellbildung einen wichtigen Aufschluss gab.

Die verwendeten Chemikalien waren, mit nur wenigen Ausnahmen, MERCKsche oder KAHLBAUMsche Präparate. Bei den ersten Versuchen wurde Magnesiumsulfat von KAHLBAUM mit Garantieschein benutzt, wobei der Grenz-pH-Wert stets bei 3.8-4.0 gefunden wurde, ebenso wie bei Gebrauch von Magnesiumsulfat von MERCK (extra pure) oder des einheimischen Präparats. Bei Verwendung eines anderen Präparats von KAHLBAUM mit gleichem Garantieschein in den späteren Versuchen wurde ganz überraschend nicht mehr dieselbe Grenzacidität für Kugelzellbildung gefunden, sondern pH 2.8-3.1, also

ein ganz anderer Grenzwert als früher. Auf Grund dieses Befundes lag es nahe anzunehmen, dass bestimmte Verunreinigungen des Magnesiumsulfats bei der Kugelzellbildung eine wichtige Rolle spielen. Dass schon Spuren von Verunreinigungen Pilzkulturen beeinflussen können, ist vielen Forschern aufgefallen, und neuerdings sind Untersuchungen von einigen angestellt worden, mit besonderer Rücksicht auf die Beseitigung dieser Beimischungen. Die Adsorption mit Kohlen⁽¹⁾ oder CaCO₃-Pulver⁽²⁾ hat sich zu diesem Zweck als wirksam erwiesen.

Versuch 2

Von verschiedenen ausprobierten Methoden erwies sich die Adsorption mit „Carbo saccharis“ SCHERING-KAHLBAUM oder mit „Carbo medicinalis“ MERCK⁽³⁾ als erfolgreich, während dreimalige vorsichtige Umkristallisierung für unsere Zwecke unzureichend war. Bequemlichkeitshalber wurden für die Adsorption zuerst dreierlei Lösungen hergestellt, wobei natürlich metallfreies umdestilliertes Wasser zum Gebrauch kam.

A.	NH ₄ NO ₃	20 g
	KCl	5.479 g
	Na ₂ HPO ₄	17.81 g

Diese Chemikalien wurden zusammen auf 750 ccm gelöst. Die Lösung reagierte schwach alkalisch. Carbo medicinalis (22.5 g) wurde hinzugefügt.

- B. Fünf g von MgSO₄·7H₂O wurden auf 250 ccm gelöst. Die Lösung wurde mit NaOH schwach alkalisch gemacht und bekam einen Zusatz von 7.5 g von Carbo medicinalis.
- C. Glukose-Lösung (10%) wurde mit NaOH schwach alkalisch gemacht und 100 ccm davon wurden mit 3 g von Carbo medicinalis versetzt.

Die Kohlensuspensionen wurden geschüttelt und nach 2 Stunden durch Filtrierpapier und Membranfilter (1 μ) von der Membranfilter-Gesellschaft, Göttingen filtriert. Die Kultursalzlösungen wurden wie folgt hergestellt :

(1) „Carbo medicinalis“ MERCK (BORTELS 1927, ROBERG 1927).

(2) STEINBERG (1919), ROBERG (1927).

(3) Es unterliegt keinem Zweifel, dass die Verwendung von Carbo saccharis viel vorteilhafter ist als von Carbo medicinalis. Nur aus ökonomischen Gründen wurde der letztere bei den meisten Versuchen benutzt.

A 1.8									
B 0.6									
n/5 HCl ⁽¹⁾	2.4	2.0	1.65	1.5	1.4	1.3				
n/10 HCl							2.4	2.35	2.3	2.25 2.2
H ₂ O		0.4	0.75	0.9	1.0	1.1		0.05	0.1	0.15 0.2
pH	1.7	1.9	2.2	2.4	2.6	2.8	3.4	3.6	3.8	4.4 4.8

A 1.8									
B 0.6									
n/10 HCl	2.15	2.0	1.8	1.5	1.3	1.0	0.5	0.3		
n/10 NaOH									0.3	0.5
H ₂ O	0.25	0.4	0.6	0.9	1.1	1.4	1.9	2.1	2.4	2.1 1.9
pH	5.1	5.4	5.6	5.9	6.0	6.4	6.6	6.8	6.9	7.2 7.4

Die Reagenzgläser wurden mit den obigen Lösungen beschickt, mit Wattepfropfen verschlossen und sterilisiert. Die Glukose-Lösung wurde getrennt sterilisiert und je 0.625 ccm davon wurden zu je 4.8 ccm des obigen Salzgemisches vorsichtig unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. Die so vorbereiteten Kulturlösungen besaßen im grossen und ganzen die gleiche Zusammensetzung wie in der früheren Arbeit, unterscheiden sich aber dadurch, dass Cl extra erhalten war. Als Kontrolle wurden das nicht mit Kohle behandelte und das dreimal umkristallisierte MgSO₄·7H₂O zur Herstellung von Salzlösungen⁽²⁾ benutzt.

Kugelzellbildung bei *Aspergillus oryzae*

pH	MgSO ₄ nicht vorbehandelt		dreimal umkristallisiert		mit Kohle vorbehandelt	
	einheimisch	KAHLBAUM	einheimisch	KAHLBAUM	einheimisch	KAHLBAUM
2.4	+++	+++	+++	+++	+	+
2.6	+++	++	+++	+++	++	++
2.8	+++	+	+++	+++	—	—
3.1	+++	—	+++	+++	—	—
3.3	+++	—	+++	+++	—	—
3.6	+	—	++	—	—	—
3.8	—	—	++	—	—	—
4.0	—	—	—	—	—	—
4.2	—	—	—	—	—	—
4.6	—	—	—	—	—	—

(1) HCl war nicht vorbehandelt.

(2) Die anderen Salze waren mit Carbo medicinalis behandelt.

In der Kulturlösung, zu deren Herstellung das mit *Carbo medicinalis* behandelte Magnesiumsulfat, sowohl das einheimische wie das von KAHLBAUM bezogene benutzt wurde, fand die Kugelzellbildung in geringerem Masse statt, und die Grenzacidität lag höher. Dies war besonders bei Verwendung des einheimischen Präparats der Fall. Durch Rekristallisierung wurde die Kugelzellbildung nicht nur nicht geschwächt, sondern eher verstärkt, und die Grenzacidität lag niedriger (besonders beim Präparat von KAHLBAUM) als beim Gebrauch des unbehandelten Präparats. Aus diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass die Verunreinigungen, die als Beimischungen der gebrauchten Chemikalien, besonders von $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, in der Kulturlösung enthalten sind, für die Kugelzellbildung eine wichtige Rolle spielen, und durch die Adsorption mit Kohle leicht beseitigt werden können. Besondere Aufmerksamkeit muss darauf gerichtet werden, dass die vermutlichen Verunreinigungen durch Rekristallisierung nicht nur nicht vollständig beseitigt werden können, sondern dass Kugelzellen danach eher leichter gebildet werden. Dies scheint dafür zu sprechen, dass die Verunreinigungen nicht aus einer einzigen Substanz, sondern wenigstens aus zwei bestehen. Die eine wirkt fördernd und die andere hemmend auf die Kugelzellbildung, und das Resultat der antagonistischen Wirkung beider findet ihren Ausdruck in dem gefundenen Mass der Kugelzellbildung. Wir möchten vorläufig die erste Substanz α und die zweite β nennen. Wenn diese Annahme sich bewährt, dann ist es nicht unwahrscheinlich, dass durch *Carbo medicinalis* hauptsächlich die α -Substanz adsorbiert und durch die Rekristallisierung eher die β -Substanz beseitigt wird. Es ist natürlich bei der Pilzkultur wichtig und von grossem Interesse, die Beschaffenheit dieser vermutlichen Beimischungen aufzuklären. Am wahrscheinlichsten kann man Spuren von Schwermetallverbindungen annehmen, die sich bei der Fabrikation unvermeidlich mit den Chemikalien vermischen.

Unter den verschiedenen Schwermetallsalzen, die für Pilzkulturen von Wichtigkeit sind, dürften die Zn-Salze zuerst in Betracht gezogen werden. RICHARDS (1897), ŌNO (1900), JAVALLIER (1914), STEINBERG (1919), BORTELS (1927), ROBERG (1927) und FORGES (1932) haben gefunden, dass die eigentliche schwarze Farbe der Konidien von *Aspergillus niger* sich bei Zusatz von Zn-Salzen nicht entwickelt; sie weisen braune oder gelbe Färbung auf, während das Mycelwachstum beschleunigt

wird. Bei Zusatz von Zn-Salzen in grösseren Mengen soll sich eine vollständige Hemmung der Konidienbildung ergeben. BORTELS (1927) und PORGES (1932) haben bemerkt, dass die konidienfreie Myceldecke von *Aspergillus niger* bei Zusatz von Zn-Salzen stark gefaltet ist und eine relativ dünne Membran darstellt. Sehr bemerkenswert ist die Darlegung von STEINBERG (1919), dass eine Vermehrung der $MgSO_4$ -Menge die Entwicklung der braunen Konidien und Beschleunigung des Mycelwachstums bei der Kultur von *Aspergillus niger* hervorruft und dass die als Verunreinigung in sehr kleinen Mengen vorkommenden Zn-Salze dabei eine grosse Rolle spielen.

Versuch 3

Einheimisches und KAHLBAUMSches Präparat von $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ wurden zum Vergleich ohne Vorbehandlung zur Herstellung der Kulturlösung benutzt, und *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus niger* in ERLÉNMEYERSchen Kolben kultiviert.

Aspergillus oryzae

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	pH-Minimum	Konidien	Kugelnzellen	Trockengewicht (g)	Pilzdecke (Fig. 5)
KAHLBAUM	3.6	+++	±	0.286	bedeckt die Oberfläche der Kulturflüssigkeit, nicht gefaltet (b)
einheimisch	3.4	—	—	0.310	anfangs zahlreiche Mycelinseln auf der Oberfläche, nachher netzartig verbunden und stark gefaltet (a)

Aspergillus niger

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	pH-Minimum	Konidien	Kugelnzellen	Trockengewicht (g)	Pilzdecke
KAHLBAUM	2.0	+++ schwarz	nachher +	0.563	grobe Falten, weich
einheimisch	1.6	++ braun-schwarz	++	0.595	feine Falten, hart und zerbröckelnd

Wenn das einheimische Präparat von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ohne Vorbehandlung benutzt wurde, dann war die Konidientwicklung bei *Aspergillus oryzae* sowie bei *Aspergillus niger* stark gehemmt, die Pilzdecke auffällig gefaltet und Kugel- sowie dickwandige Riesenzellen wurden gebildet. Aus diesem Versuch kann man annehmen, dass Zn-Salze als Verunreinigung dem einheimischen Präparat von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ beigemischt sind.⁽¹⁾ Da nach ROBERG (1927) Fe-Salze gegen Zn-Salze antagonistisch wirken sollen, könnte die Beschleunigung der Kugelzellbildung bei Verwendung von rekristallisiertem $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ im Versuch 2 dadurch verursacht sein, dass verunreinigende Fe-Salze durch die Rekristallisierung leichter als Zn-Salze beseitigt werden können.

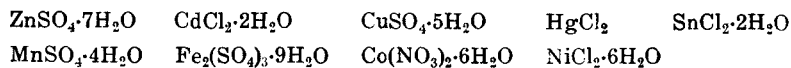
Wenn wir die mitgeteilten Literaturangaben und die angeführten Versuche überblicken, können wir folgendes sagen: Als eine der angenommenen α -Substanzen, die als Verunreinigung wenigstens in $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ vorkommen, kann eine Zn-Verbindung, und als eine der angenommenen β -Substanzen eine Fe-Verbindung genannt werden. Es wäre selbstverständlich falsch zu behaupten, dass nur Zn- und Fe-Verbindungen sich an dem Zustandekommen bzw. der Hemmung der Kugelzellbildung beteiligen. Wie nachher ausführlich geschildert, können andere Schwermetallverbindungen, so z. B. Cu-Verbindung, als wirksam in Betracht gezogen werden. Unsere Annahme fand eine experimentelle Bestätigung im Versuch 4, der künstliche Bildung von Kugelzellen durch Zusatz von einigen Schwermetallsalzen bezweckt.

Versuch 4

Die Herstellung der Kulturlösung und die Kulturmethode waren im ganzen und grossen wie im Versuch 2, wobei das KAHLBAUMSche Präparat von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sowie andere Chemikalien mit Carbo medicinalis vorher behandelt wurden. Die Menge von Na_2HPO_4 betrug aber nur 1/4 der im Versuch 2 gebrauchten und zwar wurden 4.453 g in der Lösung A benutzt. Zu je 100 ccm der verhältnismässig konzentrierten Schwermetallsalzlösung wurden 4 g von Carbo medicinalis zugesetzt und geschüttelt. Nach 2 Stunden wurde die Lösung filtriert und in verschiedenen Konzentrationen verdünnt.

(1) Dies soll nicht so gedeutet werden, dass besonders viele Verunreinigungen in einheimischen Präparaten vorkommen. Es gibt viele MERCKSche oder KAHLBAUMSche Präparate, die dieselbe Wirkung in Bezug auf die Kugelzellbildung ausüben.

Folgende Schwermetallsalze kamen zur Verwendung :



Alle Reagenzgläser sind mit der Kulturlösung von folgender Zusammensetzung beschickt worden :

Komplette Kulturlösung	4.8 ccm
Schwermetallsalzlösung	0.2 ccm

Als Versuchspflanze wurde *Aspergillus oryzae* gebraucht.

ZnSO₄. pH-Bereich des Versuchs: 2.4-5.0

Konzentration (mol)	0.02	0.01	0.005	0.001	0.0001	0
Kugelnzellen	++	+++	—	—	—	—
Wachstum	sehr schlecht	schlecht	schlecht	schlecht	schlecht	normal
Grenz-pH-Wert der Kugelnzellbildung ⁽¹⁾ : 3.7-4.0						
pH-Bereich der Fällung ⁽²⁾ : >3.7						

CdCl₂. pH-Bereich des Versuchs: 2.4-6.8

Konzentration	0.004	0.0002	0.00004	0.000004
Kugelnzellen	++	+++	++	—
Wachstum	sehr schlecht	schlecht	schlecht	normal
Grenz-pH-Wert der Kugelnzellbildung: 5.6				
Niederschlag: unsichtbar				

(1) und (2) Der pH-Wert ist im Durchschnitt angegeben.

CuCl_2 . pH-Bereich des Versuchs: 2.4-7.0

Konzentration	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.000025	0.00001
Kugelformzellen	+++	+++	+++	++	+	-
Wachstum	fast normal	fast normal	normal	normal	normal	normal
Grenz-pH-Wert der Kugelformbildung: 3.6-4.0						
pH-Bereich der Fällung: >3.6						

HgCl_2 . pH-Bereich des Versuchs: 2.4-4.2

Konzentration	0.00003	0.000012	0.000003
Kugelformzellen	-	-	±
Wachstum	sehr schlecht	sehr schlecht	ziemlich gut
Grenz-pH-Wert der Kugelformbildung: 2.6			

SnCl_2 . pH-Bereich des Versuchs: 2.4-4.0

Konzentration	0.0025	0.0005	0.00005
Kugelformzellen	-	-	-
Wachstum	keine Keimung	schlecht	schlecht

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. pH-Bereich des Versuchs: 2.4-5.2

Konzentration	0.005	0.001	0.0005	0.0001
Kugelformzellen	-	-	-	-
Wachstum	schlecht	normal	normal	normal

Co(NO₃)₂. pH-Bereich des Versuchs: 2.4-5.0

Konzentration	0.0034	0.00034	0.000034	0.0000034
Kugelnzellen	—	—	—	—
Wachstum	schlecht	fast normal	fast normal	normal

NiCl₂. pH-Bereich des Versuchs: 2.4-7.0

Konzentration	0.002	0.001
Kugelnzellen	+	+
Wachstum	schlecht	schlecht
pH-Bereich der Kugelnzellbildung: 2.4-7.0		

Aus diesem Versuch geht hervor, dass die Kugelnzellbildung auch in derjenigen Kulturlösung stattfindet, der die Fähigkeit diese Erscheinung hervorzurufen durch Vorbehandlung mit Carbo medicinalis entzogen wird, wenn man Cu-, Zn-, Cd- oder Ni-Salz aufs neue der Kulturlösung zusetzt. Auch in einem anderen Versuch mit *Aspergillus niger* bemerkten wir dieselben Verhältnisse, wenn Cu- oder Ni-Salze zugesetzt wurden; die Tendenz zur Kugelnzellbildung wurde aber durch die antagonistische Wirkung von Fe-, Mn- oder Co-Salzen vollständig oder teilweise gehemmt. Weiter ist es ersichtlich, dass die zugesetzten Schwermetallsalze sich bei niederen Aciditäten als Phosphatsalze niederschlagen. Dass die Fällung der Phosphatsalze der Schwermetalle sehr eng mit der H-Ionenkonzentration zusammenhängt, ist ausser Zweifel. Vorausgesetzt, dass die Schwermetallsalze nur im gelösten Zustand für die Bildung von Kugelnzellen gute Dienste leisten, muss eine innige Beziehung zwischen dem Grenz-pH-Wert der Kugelnzellbildung und demjenigen der Fällung von Phosphaten bestehen. Wenn die Schwermetallsalze in verhältnismässig kleiner Menge zugesetzt werden, so kann die bei der Kugelnzellbildung wirksame Konzentration der gelösten Schwermetallsalze erst bei höherer Aciditäten erreicht werden. Bei dem Versuch, eine exakte Bestimmung des Grenz-pH-Wertes der Kugelnzellbildung auszuführen, müssen daher die

Schwermetallsalze in einem geringen Ueberschuss zugesetzt werden, damit der pH-Wert, nicht aber die Menge der Schwermetallsalze, sich praktisch als Grenzfaktor geltend macht.

Die Kulturlösung war gleich derjenigen im Versuch 2, die mit Carbo medicinalis vorbehandelt wurde. Jede Kulturlösung wurde durch die Mischung von 4.8 ccm vollständiger Kulturlösung mit 0.2 ccm der Schwermetallsalzlösung hergestellt. Unter Schwermetallsalzen kamen CuSO_4 , NiCl_2 und ZnSO_4 zur Verwendung.

Versuch 5

	Grenz-pH-Wert der Fällung	Grenz-pH-Wert der Kugelzellbildung ⁽¹⁾	
		<i>Asp. oryzae</i>	<i>Asp. niger</i>
CuSO_4 (0.00025 mol)	3.1-3.4	3.8-4.0	3.1-3.4
ZnSO_4 (0.005 mol) ⁽²⁾	4.1-4.9	3.6-4.1	4.1-4.9
NiCl_2 (0.001 mol)	5.4-5.7	überall gebildet 2.2-7.2	5.4-5.7

Wenn wir die obigen Versuchsergebnisse überblicken, dann können wir bemerken, dass die Grenzacidität für Kugelzellbildung, besonders bei *Aspergillus niger*, mit derjenigen der Fällung fast übereinstimmt. In der Kulturlösungen, deren CuSO_4 -Konzentration mehr als 0.00025 mol beträgt, lassen sich die oben angegebenen Grenz-pH-Wert stets bestimmen, während die darunter liegenden Konzentrationen, so z. B. bei 0.0001 mol oder 0.00008 mol, die Grenzacidität herabgesetzt wird, wie in einem anderen Versuch festgestellt wurde.

Aspergillus oryzae erweist sich betreffs der oben erwähnten Eigenschaften als viel empfindlicher den Schwermetallsalzen gegenüber als *Aspergillus niger*. Zur Hervorrufung von Kugelzellbildung genügen beim ersteren kleinere Dosen von Schwermetallsalzen als beim letzteren. Wenn Schwermetallsalze über eine bestimmte Konzentration hinaus der Kulturlösung zugesetzt werden, so ergibt sich stets für

(1) Nur solcher Niederschlag wurde berücksichtigt, der mit blossen Augen sichtbar war.

(2) Die Phosphat-Menge betrug 1/4 der in der gewöhnlichen PFEFFERSchen Kulturlösung.

Aspergillus niger ein bestimmter relativ niedrigerer Grenz-pH-Wert der Kugelzellbildung als der für *Aspergillus oryzae* gefundene, indem sich der pH-Bereich beim letzteren erweitert. Besonders beim Zusatz von NiCl_2 findet die Kugelzellbildung bei *Aspergillus oryzae* erstreckt auf dem ganzen pH-Bereich des Versuchs statt.

Wenn wir das Ausbleiben von Kugelzellbildung bei niedriger Acidität dadurch erklären können, dass bei dieser das zugesetzte Schwermetallsalz in ein schwerlösliches Phosphatsalz übergeht und nur eine kleine Menge des wirksamen Teils gelöst bleibt, dann wäre es nicht unmöglich, durch die Regulierung der benutzten Phosphat-Mengen, nämlich durch die Variation der frei bleibenden Schwermetallionen, die Grenz-pH-Werte der Kugelzellbildung hin und her zu verschieben. Um ein Urteil darüber zu gewinnen, wurde folgender Versuch angestellt.

Versuch 6

Schwermetallsalzlösung: 0.001 mol CuSO_4

		Phosphat-Menge	
		Gleich der in der PFEFFERSchen Lösung	1/4
Grenz-pH-Wert der Fällung		3.4	3.9
Grenz-pH-Wert der Kugelzellbildung	<i>Asp. oryzae</i>	3.8-4.0	3.9-4.2
	<i>Asp. niger</i>	3.0-3.2	3.3-3.6

Diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, dass die Verschiebung des Grenz-pH-Werts der Kugelzellbildung im gewissen Grad auch von der zugesetzten Phosphat-Menge abhängig sei. Die Vermehrung der Phosphat-Menge erweitert den pH-Bereich der Fällung und verkleinert gleichzeitig denjenigen der Kugelzellbildung. Dieselbe Verhältnisse wurden auch bei Benutzung von verunreinigten Chemikalien, aber ohne Zusatz von Schwermetallsalzen, nachgewiesen.

Versuch 7

Mit Ausnahme von Na_2HPO_4 wurden die Lösungen der verwendeten Salze mit Kohlenpulver nicht behandelt. Die Na_2HPO_4 -Lösung

wurde mit *Carbo medicinalis* vorbehandelt und in verschiedenen Mengen der Kulturlösungen zugesetzt.

Aspergillus oryzae

Phosphat-Menge	Grenz-pH-Wert der Kugelzellbildung
Gleich der in der PFEFFERSchen Lösung	3.3-3.4
1/10	3.4-3.6
1/100	3.8-4.0

Wie beim Versuch mit künstlichem Zusatz von CuSO_4 kann man konstatieren, dass durch die Verminderung der gebrauchten Phosphat-Menge der pH-Bereich der Kugelzellbildung erweitert wird, weil die vermutlichen Schwermetallverbindungen als Verunreinigungen im Gestalt von unlöslichen Phosphaten in geringerem Masse beseitigt werden.

Schluss

In einer vorherigen Mitteilung hat SAKAMURA die exakte pH-Grenze für die Kugelzellbildung bei *Aspergillus oryzae* gefunden und diese hauptsächlich auf die Wirkung der H-Ionen selbst zurückgeführt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde aber festgestellt, dass die Bedeutung der H-Ionen bei der Kugelzellbildung eher als eine indirekte aufzufassen und die direkte Wirkung auf die als Verunreinigungen in sehr kleinen Mengen vorhandenen Substanzen zurückzuführen ist⁽¹⁾. Diese sind nicht nur in den gewöhnlichen Chemikalien „zur Analyse,“ sondern auch bisweilen in Präparaten von KAHLBAUM „mit Garantieschein“ gefunden worden; selbstverständlich weniger in den letztgenannten Präparaten. Auf Grund der angeführten Versuche und Literaturangaben liegt es nahe, diese Verunreinigungen als Schwermetallverbindungen, so z. B. Cu-, Zn-, u. a. Salze aufzufassen. Bei dieser Annahme sind die exakten pH-Grenze der Kugelzellbildung dahin zu deuten, dass die Schwermetallsalze durch die H-Ionenkonzentration

(1) Es liegt immer noch kein Grund vor, die Kugelzellbildung durch die schwache Resorption von Kalium zu erklären. Siehe SAKAMURA (1930, S. 13).

bald in gelösten wirksamen, bald in ungelösten unwirksamen Zustand gebracht werden. Auch Tamiya (1928) hat bemerkt, dass der Einfluss der Schwermetallsalze auf das Wachstum von *Aspergillus oryzae* merklich von der H-Ionenkonzentration abhängig ist und führt dies auf die Löslichkeit und Ionisation der Schwermetallsalze zurück.

Da die Mengen der Schwermetallsalze, die bei den oben angeführten Versuchen benutzt wurden, zweifellos viel grösser waren als die der vermutlichen Verunreinigungen, so darf man die beiden Erscheinungsgruppen nicht ohne weiteres ganz identisch ansehen. Mit diesem Vorbehalt bedarf unsere oben erwähnte Annahme keiner grossen Veränderung, weil es auch die Möglichkeit vorliegt, dass die Zusammenwirkung einiger noch stärker wirksamen Schwermetallverbindungen oder deren Komplexsalze die Kugelzellbildung erleichtern kann. Die Kugelzellbildung auf der alkalischen Seite, die auf noch komplizierteren Ursachen beruhen dürfte, bleibt fast unberührt dahingestellt. Die Untersuchungen darüber und auch über andere Probleme bezüglich der wichtigen Rolle von Schwermetallsalzen oder Verunreinigungen bei der Kultur von verschiedenen Aspergillen sollen später ausführlich mitgeteilt werden.

Nachschrift: Nach Abschluss unseres Manuskripts kam in unsere Hände eine Abhandlung von MIWA (1933) über die Bedeutung der Holzasche, besonders der darin enthaltenen Schwermetallsalze, für das Wachstum und die Konidienbildung bei *Aspergillus oryzae*. Wir können sie in der vorliegenden Mitteilung leider nicht mehr berücksichtigen.

Literaturverzeichnis

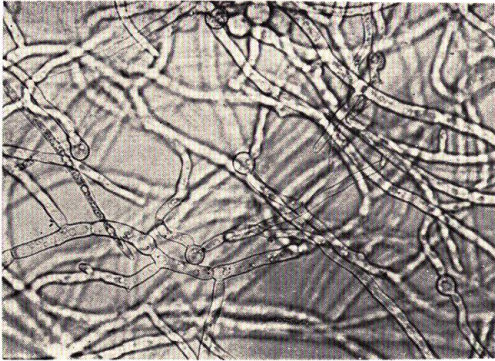
- BORTELS, H. (1927): Ueber die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen, unter besonderer Rücksichtigung von *Aspergillus niger*. Biochem. Zeitschr., **182**.
- JAVELLIER, M. (1908): La presence et rôle du Zinc chez les Plantes. Thèse. Paris.
- MIWA, D. (三輪大作) (1933): 種麴製造 = 於ケル木灰ノ意義. 醸造學雜誌, **11**.
- ŌNO, N. (1900): Ueber die Wachstumsbeschleunigung einiger Algen und Pilze durch chemische Reize. Journ. Coll. Science, Imp. Univ. Tokyo, **12**.
- PORGES, N. (1932): Chemical Composition of *Aspergillus niger* as modified by Zinc Sulphate. Bot. Gaz., **94**.

- RICHARDS, H. (1897): Die Beeinflussung des Wachstums einiger Pilze durch chemische Reize. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, **30**.
- ROBERG, M. (1927): Ueber die Wirkung von Eisen-, Zink-, und Kupfersalze auf Aspergillen. *Centralb. f. Bakt., Abt. II*, **74**.
- SAKAMURA, T. (1930): Experimentelle Studien über die Blasenzellbildung bei *Aspergillus oryzae*. *Journ. Fac. Science, Hokkaido Imp. Univ., Series V*, **1**.
- STEINBERG, R. (1919): A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. *Amer. Journ. Bot.*, **6**.
- TAMIYA, H. (1928): Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. II. *Acta Phytochimica*, **4**.

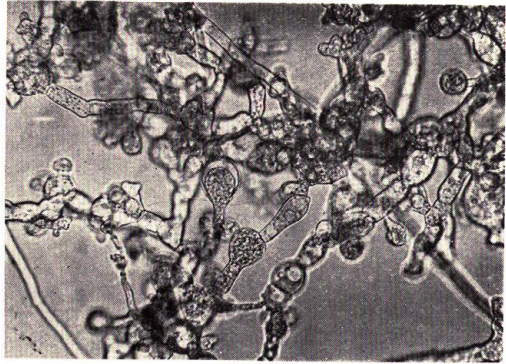
Figurenerklärung der Tafel XVI

- Fig. 1. Normale Mycelien von *Aspergillus oryzae*.
- Fig. 2. Kugelzellen von *Aspergillus oryzae*. pH = 3.3
- Fig. 3. Kugelzellen von *Aspergillus oryzae*. pH = 7.4
- Fig. 4. Kugelzellen von *Aspergillus oryzae* in der Kulturlösung, die mit *Carbo medicinalis* vorbehandelt und 0.0005 mol CuSO_4 enthält.
- Fig. 5. Myceldecken von *Aspergillus oryzae*.
- a, Auf der Kulturlösung mit einheimischem rekristallisiertem Präparat von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- b, Auf der Kulturlösung mit KAHLBAUMSchem Präparat von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
-

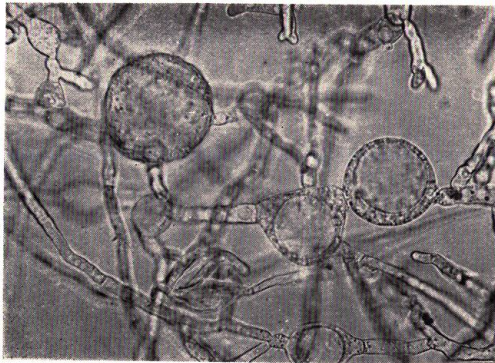
1



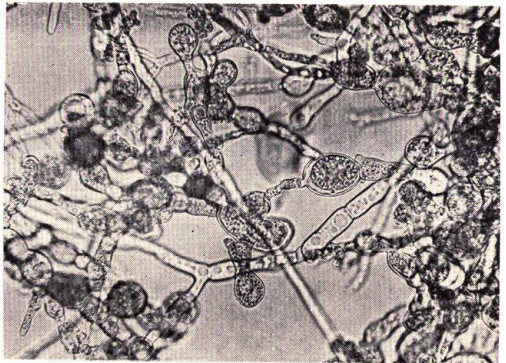
2



3



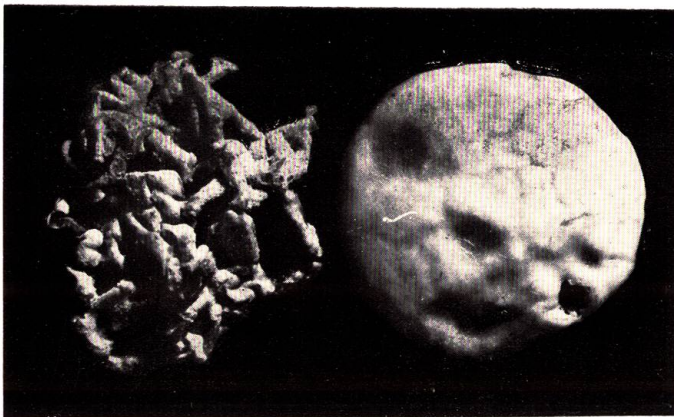
4



a

5

b



Sakamura u. Yoshimura : Kugelzellbildung der Aspergillen.