HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Ammonio- und Nitratophilie Asperbei gillus oryzae im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen |
| Author(s) | SAKAMURA, Testu |
| Citation | Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 3(4), 121-138 |
| Issue Date | 1934 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/26234 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 3(4)_P121-138.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# Ammonio- und Nitratophilie bei *Aspergillus oryzae*
## im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen

Von

TETSU SAKAMURA

Ammoniumnitrat ($NH_4NO_3$) kommt oft zur Verwendung für Kulturlösung, und es ist von beiden N-Quellen bekannt, dass sie für höhere sowie niedere Pflanzen leicht ausnutzbar sind. Der Kationen- und Anionenanteil dieses Salzes wird aber kaum in äquivalenter Menge resorbiert, und zwar $NH_3$ besser in niederer $C_H$ und $NO_3$ besser in der hohen $C_H$ aus diesem Salze, was die Veränderung der $C_H$ im Verlauf der Kultur hervorruft. Wenn die Kultur in der Anfangsreaktion beginnt, wo der pH-Wert verhältnismässig klein ist, so herrscht die Aufnahme von $NH_3$ vor und steigt die $C_H$. Erst nach der Steigung der $C_H$ übertrifft die Resorption von $NO_3$ diejenige von $NH_3$ und geht die Reaktion wieder zur schwächeren Acidität zurück. Diese Umkehr der $C_H$ in der $NH_4NO_3$-haltigen Kulturlösung geschieht nicht selten bei der Kultur der Schimmelpilze. In einer früheren Mitteilung (1930) habe ich die Eigenschaft von *Aspergillus oryzae* als „Ammoniophilie" oder „Nitratophilie" bezeichnet, je nachdem er besser Ammoniak bzw. Nitrat von $NH_4NO_3$ aufnimmt.[1] Dafür, dass die ungleiche Resorption von $NH_3$ und $NO_3$ durch Schimmelpilz von der $C_H$ der Kulturlösung abhängig ist, hat RIPPEL (1931) eine Erklärung durch die amphotere Eigenschaft des Protoplasmas versucht. Nach meinen Versuchsergebnissen ist die Ammonio- bzw. Nitratophilie aber abhängig von der Stammeigenschaft des Pilzes und den Bedingungen der Vorkultur, ja bisweilen auch von der Methode der Impfung, und es wurde gefunden, dass die Nitratophilie und der Rückgang der Reaktion zur schwächeren Acidität unter Umständen selbst nach der Steigung der $C_H$ nicht beginnen. Es war mir damals noch nicht gelungen, solche Faktoren in aller Strenge zu erfassen, die diesbezügliche Eigenschaften des Pilzes immer zur Folge haben. Abgesehen von der Wichtigkeit der vergleichenden Studien über den Nährwert, ist es zweifellos wichtig aufzuklären, unter welchen Beding-

1) Das Verschwinden von $NO_3$ aus der Kulturlösung kann auch durch die Nitratreduktion stattfinden. Hier wird aber angenommen, dass der Reduktionsprozess erst nach der Resorption eintrete.

ungen die Ammonio- oder die Nitratophilie überwiegt oder wie diese künstlich kontrolliert werden können, weil ungleiche Resorption von $NH_3$ und $NO_3$ die Veränderung der $C_H$ verursacht und die letztere Erscheinung umgekehrt wieder das Leben des Pilzes direkt oder indirekt bedingt. Soweit $NH_4NO_3$ zur Herstellung der Kulturlösung verwendet wird und die $C_H$ als ein wichtiger Faktor bei der Pilzkultur betrachtet wird, müssen die Untersuchungen über diese Neigung der Resorption von $NH_3$ oder $NO_3$ die Vorfrage im breiten Gebiete der physiologischen Forschung der Pilzkultur sein.

Dass schon Spuren von Schwermetallverbindungen als Verunreinigungen der benutzten Präparate in der Kulturlösung vorkommen und sie die Pilzkultur, so z. B. Wachstum, Konidienbildung u. a. beeinflussen, ist vielen Forschern aufgefallen, und Untersuchungen darüber sind von STEINBERG (1919), BORTELS (1927) und ROBERG (1927) angestellt worden, mit besonderer Rücksicht auf die Beseitigung dieser Beimischungen. Auch in meiner früheren Arbeit (1933) habe ich konstatiert, dass solche Verunreinigungen zur Kugelzellbildung bei *Aspergillus oryzae* und *Asp. niger* eine wichtige Rolle spielen. Diese Untersuchungen veranlassten uns, in unserem Laboratorium weitere Forschung über verschiedene Probleme bezüglich der Schwermetallverunreinigungen anzustellen, und dadurch teils sind wir dazu gekommen, den wichstigten Anhaltspunkt für die Aufklärung der Frage nach der Ammonio- bzw. Nitratophilie zu gewinnen. Es stellte sich nämlich heraus, dass ein grosser Unterschied der $C_H$-Veränderung zwischen den Kulturen bemerkt wird, welche mit den $NH_4NO_3$-Präparaten von verschiedenen Fabriken ausgeführt worden sind. Das Ergebnis des diesbezüglichen Versuchs soll als der Ausgangspunkt zu vorliegender Untersuchungen zunächst mitgeteilt werden.

Die Kultur geschah im grossen und ganzen gleich wie bei meinen früheren Untersuchungen. Als Kulturgefässe dienten ERLENMEYER-Kolben von 100 oder 250 ccm Inhalt, die aus einheimischem, praktisch alkalifreiem Glas hergestellt waren, ohne dass sie dabei trocken sterilisiert wurden. Zur Beseitigung der Verunreinigungen wurde das Adsorptionsverfahren mit Carbo medicinalis MERCK nach der Vorschrift von YOSHIMURA (1934) ausgeführt. Die Kohlenbehandlung bringt natürlich gewisse Nachteile mit sich, indem auch die anderen Bestandteile der Kulturlösung in gewissem Grade adsorbiert werden können, wie RENNERFELT (1934) behauptet. Die dadurch hervorgerufene Aenderung der Zusammensetzung der Kulturlösung stört aber nicht den Erklärungsversuch der vorliegenden Untersuchungsergebnisse, weil die vergleichende Kultur nur mit dem Unterschied

hinsichtlich der Schwermetallsalze ausgeführt wurde, deren Menge genau genommen werden kann. Der benutzte Pilz war *Aspergillus oryzae* 65.

Versuch 1.

Herstellung der Kulturlösung:

| | | |
|---|---|---|
| $NH_4NO_3$[1] | 4 g | Die Salzkonzentration entspricht der Hälfte derjenigen der PFEFFER-schen Lösung. pH = 4.3 |
| $KH_2PO_4$ | 2 g | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1 g | |
| Glukose | 18.01 g | |
| Umdest. Wasser | 800 ccm | |

ERLENMEYER-Kolben von 100 ccm Inhalt wurden mit 50 ccm Kulturlösung beschickt. Die Konidien wurden von einer Koji-Agarkultur entnommen, und deren Suspension wurde geimpft.

Tabelle I.

| $NH_4NO_3$ | Kulturdauer in Tagen | End-pH | Pilzgewicht in g |
|---|---|---|---|
| 1. SCHERING-KAHLBAUM "KAHLBAUM" pro analysi | 5 | 3.5 | 0.231 |
| 2. MERCK, cryst. | 5 | 2.6 | 0.220 |
| 3. MERCK, puriss cryst. | 5 | 2.8 | 0.172 |
| 4. TAKEDA | 5 | 2.6 | 0.137 |
| 5. KOJIMA | 5 | 2.6 | 0.225 |
| 1. | 7 | 3.8 | 0.360 |
| 2. | 7 | 2.6 | 0.252 |
| 3. | 7 | 2.6 | 0.305 |
| 4. | 7 | 2.6 | 0.310 |
| 5. | 7 | 2.6 | 0.345 |
| 1. | 9 | 3.9 | 0.535 |
| 2. | 9 | 2.2 | 0.348 |
| 3. | 9 | 2.4 | 0.263 |
| 4. | 9 | 2.4 | 0.340 |
| 5. | 9 | 2.3 | 0.335 |

Aus diesem Ergebnis ist ersichtlich, dass die $C_H$-Verschiebung in der Kulturlösung je nach den Chemikalien aus den verschiedenen Fabriken, ja selbst unter den von derselben Fabrik stammten Präparaten verschiedentlich

1) Präparate von verschiedenen Fabriken.

geschieht. Besonders bei Verwendung des $NH_4NO_3$-Präparates von SCHERING-KAHLBAUM fand der Rückgang der $C_H$ bald nach deren anfänglicher schwachen Steigung statt, während bei den Kulturen mit den Chemikalien von anderen Fabriken solcher $C_H$-Rückgang nicht bemerkt wurde und der pH-Wert sich bis zu 2.2–2.4 verminderte. Da aus den Ergebnissen meiner früheren Mitteilung (1930) hervorging, dass die $C_H$-Verschiebung meistens von der ungleichen Aufnahme von $NH_3$ und $NO_3$ abhängig ist, darf man hier annehmen, dass nur bei SCHERING-KAHLBAUM Präparaten die Nitratophilie bald die Stelle der Ammoniophilie einnehme, bei anderen aber nicht. Dieser Unterschied zwischen den benutzten Präparaten schien dafür zu sprechen, dass ein ähnliches Verhältnis in Bezug auf die Schwermetallverunreinigungen auch hier herrscht wie bei der Kugelzellbildung. Durch die Kohlenbehandlung wurde zunächst die Verunreinigung der Kulturlösung beseitigt und dann Fe und Cu in kleinen Mengen zugesetzt, welche als die allgemein vorkommenden Beimischungen schon von YOSHIMURA (1934) erwiesen worden sind und die best bekannten der wirksamen Schwermetalle sind.

Versuch 2.

Herstellung der Kulturlösung:

| | | |
|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ (MERCK) | 10 g | pH = 4.3 |
| $KH_2PO_4$ (KAHLBAUM) | 5 g | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (KAHLBAUM) | 2.5 g | |
| Glukose (TAKEDA) | 45.226 g | |
| gelöst mit umdestil. Wasser auf | 1000 ccm | |

Der pH-Wert dieser Lösung wurde durch einen Zusatz von 16 ccm n/10 NaOH zu 5.4 reguliert und dann auf 2000 ccm verdünnt. Die Lösung bekam einen Zusatz von 40 g Carbo medicinalis MERCK, wurde wiederholt geschüttelt und nach einer Stunde durch Toyo-Filtrierpapier Nr. 7 filtriert. Die Kulturlösung wurde in zwei Teile geteilt und $Fe_2(SO_4)_3$ und $CuSO_4$ wurden in folgenden Verhältnissen hinzugefügt:

| | Fe | Cu | pH |
|---|---|---|---|
| *A* | $10^{-6}$ mol | — | 5.7 |
| *B* | $10^{-6}$ mol | $5 \times 10^{-6}$ mol | 5.7 |

ERLENMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt wurden mit 100 ccm Kulturlösung beschickt. Die Konidien wurden von einer 10 Tage alten Koji-Agarkultur

entnommen, und je 1 ccm der Konidiensuspension mit einer sterilisierten Pipette in jede Kulturlösung übergeimpft.

Tabelle II.

| Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|
| *A*-1 | 5 | 2.7 | 0.218 | + |
| *A*-1 | 5 | 2.7 | 0.228 | + |
| *B*-1 | 5 | 2.3 | 0.336 | + |
| *B*-1 | 5 | 2.3 | 0.307 | + |
| *A*-2 | 7 | 2.7 | 0.293 | + |
| *A*-2 | 7 | 2.7 | 0.319 | + |
| *B*-2 | 7 | 2.1 | 0.438 | + |
| *B*-2 | 7 | 2.1 | 0.451 | + |
| *A*-3 | 10 | 3.0 | 0.311 | − |
| *A*-3 | 10 | 3.7 | 0.281 | − |
| *B*-3 | 10 | 2.1 | 0.491 | + |
| *B*-3 | 10 | 2.1 | 0.491 | + |

Die $C_H$ stieg bei kombiniertem Zusatz von Fe und Cu bis zum pH-Wert 2.1, während bei alleinigem Zusatz von Fe baldiger Rückgang der $C_H$ bemerkbar war. Ebenso zu beachten ist, dass im letzteren Falle der Zuckerverbrauch nicht proportional der Trockengewichtssteigerung geschah, nämlich dass der ökonomische Koeffizient stark sinkt. Dies dürfte der spezifischen Wirkung von Fe als Katalysator zuzuschreiben sein, wie neuerdings RENNERFELT (1934) bei *Aspergillus niger* angenommen hat. Wir werden später wieder darauf zurückkommen.

Ein anderer derartiger Versuch mit Kombination von Fe und Cu in verschiedenen Verhältnissen wurde ausgeführt.

Versuch 3.

| Cu (mol) / Fe (mol) | $10^{-4}$ | $10^{-6}$ | $10^{-8}$ |
|---|---|---|---|
| $10^{-4}$ | *A* (5.5) | *B* (5.5) | *C* (5.5) |
| $10^{-6}$ | *D* (5.7) | *E* (5.7) | *F* (5.7) |
| $10^{-8}$ | *G* (5.7) | *H* (5.7) | *I* (5.7) |

Die Zahl in der Klammer bedeutet den pH-Wert.

Tabelle III.

| Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|
| *A*-1 | 5 | 2.4 | 0.433 | + |
| *B*-1 | 5 | 2.5 | 0.425 | + |
| *C*-1 | 5 | 2.9 | 0.235 | + |
| *D*-1 | 5 | 2.3 | 0.407 | + |
| *E*-1 | 5 | 2.2 | 0.353 | + |
| *F*-1 | 5 | 3.3 | 0.267 | + |
| *G*-1 | 5 | 3.3 | 0.127 | + |
| *H*-1 | 5 | 2.9 | 0.229 | + |
| *I*-1 | 5 | 3.6 | 0.134 | + |
| *A*-2 | 7 | 2.6 | 0.407 | + |
| *B*-2 | 7 | 2.8 | 0.410 | Spur |
| *C*-2 | 7 | 4.0 | 0.249 | + |
| *D*-2 | 7 | 2.2 | 0.503 | + |
| *E*-2 | 7 | 2.1 | 0.429 | + |
| *F*-2 | 7 | 4.3 | 0.334 | + |
| *G*-2 | 7 | 2.9 | 0.239 | + |
| *H*-2 | 7 | 2.6 | 0.354 | + |
| *I*-2 | 7 | 3.8 | 0.186 | + |

Aus den obigen Versuchen kann man ersehen, dass merkwürdige Unterschiede der pH-Veränderung zwischen den Kulturen mit Kombinationen von Fe und Cu in verschiedenen Mengenverhältnissen vorhanden sind. Am Anfang der Kultur wies sich überall die Ammoniophilie mehr oder weniger stark auf und stieg die $C_H$ an. In einigen Kulturen (*F, F, I* u. a.) begann früher oder später die $C_H$ wieder zurückzugehen, während in den anderen (*E, D* u. a.) der pH-Wert 2.1 oder 2.2 selbst nach 7 Tagen noch anhielt. Der pH-Bereich, wo der Rückgang der $C_H$ begann, war verschieden je nach dem Mengenverhältnisse von Fe und Cu. Wie in Versuch 2 ersichtlich ist, wirkt der alleinige Zusatz von Fe in der Weise, dass die Nitratophilie verhältnismässig stark die Ammoniophilie überwiegt und die baldige $C_H$-Erniederung wieder stattfindet. Obwohl das Zusammenwirken von Fe und Cu diesen Rückgang der $C_H$ stark hemmt, so kann man dabei die starke Ammoniophilie nicht der spezifischen Wirkung von Cu beimessen, weil die Kultur mit dem alleinigen Zusatz von Cu keine solche starke Neigung zur Ammoniopilie zeigt.[1] Was das Pilzgewicht

1) Siehe folgende Versuche 4 und 7.

betrifft, so bemerkt man keine allgemein gültige Regel im Zusammenhang mit der Menge der zugesetzten Schwermetallsalze, obwohl die Neigung zu bestehen scheint, dass der gesteigerte Cu-Zusatz unter Mitwirkung von Fe die Vermehrung des Pilzgewichtes begünstigt.

Aus dem oben Erwähnten kann man schliessen, dass die gesteigerte Menge von Cu nicht immer $C_H$-Steigung begünstigt und die Vermehrung von Fe nicht immer baldigen Rückgang der $C_H$ hervorruft. Die $C_H$-Veränderung ist nicht von der spezifischen Wirkung einzelner Schwermetalle, sondern von deren Kombinationsverhältnissen abhängig. Der wichtige Anhaltspunkt für die Erklärung der Ammoniophilie sowie Nitratophilie, dessen Wahrnehmung bisher mir nicht gelungen war, lässt sich jetzt begreiflich machen. Es handelt sich nämlich hier auch um die Verunreinigungen der Schwermetallsalze, wie bei der Kugelzellbildung. Da solche Verunreinigungen gewöhnlich in den Chemikalien, ja oft in Präparaten mit Garantieschein, gefunden werden,[1] wäre es nicht unwahrscheinlich, die Verschiedenheit der bisher erworbenen Ergebnisse bezüglich der $C_H$-Veränderung bei der *Aspergillus*-Kultur hauptsächlich auf diese unerwarteten Beimischungen zurückzuführen. Ausser Fe und Cu können natürlich auch andere Schwermetalle in Betracht gezogen werden, aber besonders die Kombination jener beiden muss als der wichtigste Faktor berücksichtigt werden.

Dass mehrere Rassen oder Stämme von derselben Art des Schimmelpilzes existieren und in ihren morphologischen sowie physiologischen Eigenschaften auseinandergehen, ist manchmal von verschiedenen Autoren berichtet worden. Bei *Aspergillus oryzae* ist nicht nur aus praktischen Gründen, sondern auch aus wissenschaftlichen Untersuchungen bekannt, dass er zahlreiche Stämme in morphologischer sowie in physiologischer Hinsicht umfasst. In einer früheren Arbeit (1930) habe ich konstatiert, dass das Resorptionsverhältnis von $NH_3$ und $NO_3$, mithin dazu die $C_H$-Veränderung, bei diesem Pilz von der Stammeigenschaft und den Bedingungen der Vorkultur abhängig sind. Die Pilze der Stämme, welche unter bestimmten Bedingungen stark ammoniophil sich verhalten, kommen nicht selten vor. Aber selbst bei den Stämmen, die keine stark Ammoniophilie zeigen, ist das Auftreten dieser Eigenschaft nicht ausgeschlossen, wenn die Vorkultur unter anderen Bedingungen, so z. B. in einer Lösung bzw. auf einem Boden von anderer Zusammensetzung, ausgeführt wird. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die ammoniophile bzw. nitratophile

1) Sakamura und Yoshimura (1933), Yoshimura (1934).

Eigenschaft sehr veränderlich ist und die wiederholte Vorkultur durch mehrere Generationen, d. h. die Summierung der Eigenschaft in den einzelnen Generationen, die Entstehung einer ganz anderen Eigenschaft bezüglich der $C_H$-Veränderung veranlasst.

Die in den obigen Versuchen festgestellte Tatsache veranlasste mich, weiterhin Versuch anzustellen, um zu sehen, ob die Neigung der $C_H$-Veränderung während der Kultur von der Kombination bestimmter Schwermetallsalze abhängig sei. Diese Vermutung war nicht wenig wahrscheinlich, weil schon Spuren von Fe und Cu oft das Verhalten der Myceldecke, die Bildung und die Farbe der Konidien von *Aspergillus oryzae* merkwürdig bedingen[1] und diese durch die wiederholte Kultur verstärkt werden.

Versuch 4.

Die Herstellung der Kulturlösung war im grossen und ganzen die gleiche wie bei dem vorhergehenden Versuche. Da es schon bewiesen worden ist, dass Koji-Agarböden wenigstens Cu enthalten, geschah die Vorkultur in der Kulturlösung, mit deren 50 ccm ERLENMEYER-Kolben von 100 ccm Inhalt beschickt wurden. Die Konzentration und Kombination der zugesetzten Schwermetalle waren wie folgt:

| | Fe | Cu |
|---|---|---|
| *a* | $10^{-6}$ mol | — |
| *b* | $10^{-6}$ mol | $5 \times 10^{-6}$ mol |
| *c* | — | $10^{-6}$ mol |

Der pH-Wert betrug immer 5.7.

Bei der ersten Vorkultur wurden Konidien mit einer Platinöse von dem auf festen Koji-Agarböden gewachsenen Mycel einer 16 Tage alten Kultur entnommen und direkt in jede Vorkulturlösung übergeimpft. Weitere Vorkulturen wurden durch die Impfung mit der Konidiensuspension von derselben Vorkultur wiederholt. Jede Vorkultur dauerte durchschnittlich 7–8 Tage. Die End-pH-Werte jeder Vorkultur lassen sich in Tabelle IV ersehen.

Die Konzentration von Glukose in der Vorkultur betrug 1/8 mol in der Generation I–VII und 1/4 mol in der Generation VIII–XV. Zur wesentlichen Kultur dienten ERLENMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt, und

1) SAKAMURA und YOSHIMURA (1933), YOSHIMURA (1934). Auch STEINBERG (1919), ROBERG (1927) und BORTELS (1927) schon bei *Aspergillus niger*.

Tabelle IV.

| Generation | Kulturdauer in Tagen | *a* | | *b* | | *c* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | pH | Zucker | pH | Zucker | pH | Zucker |
| I | 6 | | | | | | |
| II | 7 | 2.3 | + | 2.1 | + | 2.2 | + |
| III | 7 | 2.3 | − | 2.1 | + | 2.2 | + |
| IV | 8 | 5.8 | − | 2.1 | + | 2.6 | + |
| V | 7 | 6.2 | | 2.1 | | 2.5 | |
| VI | 8 | 2.3 | Spur | 2.1 | + | 2.3 | + |
| VII | 8 | 3.5 | + | 2.1 | + | 2.3 | + |
| VIII | 7 | 3.5 | + | 2.1 | + | 2.6 | + |
| IX | 7 | 4.1 | Spur | 2.1 | + | 2.3 | + |
| X | 9 | 3.9 | + | 2.1 | + | 2.7 | + |
| XI | 7 | 3.7 | + | 2.1 | + | 2.7 | + |
| XII | 7 | 3.7 | + | 2.1 | + | 2.5 | + |
| XIII | 8 | 4.5 | + | 2.1 | + | 2.5 | + |
| XIV | 9 | 4.1 | + | 1.9 | + | 2.3 | + |
| XV | 12 | 6.6 | − | 2.1 | + | 2.6 | − |

100 ccm Kulturlösung kam in jedem Kolben zum Gebrauch. Die Konidien wurden vorsichtig von der Myceldecke der Vorkultur entnommen, ohne dass sie durch die Vorkulturlösung benetzt wurden. Je 1 ccm der Konidiensuspension wurde in jede Kulturlösung übergeimpft. Die Kulturergebnisse sind in Tabelle V, VI und VII zusammengestellt, wo die Zusammensetzung der Kulturlösung *A* gleich derjenigen der Vorkulturlösung *a* usw. ist.

Tabelle V.

Konidien wurden von der III. Vorkultur entnommen.

| Vorkultur | Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|---|
| *a* | *A* | 6 | 3.5 | 0.403 | + |
| *b* | *A* | 6 | 3.7 | 0.359 | + |
| *c* | *A* | 6 | 3.5 | 0.334 | + |
| *a* | *B* | 6 | 2.1 | 0.398 | + |
| *b* | *B* | 6 | 2.1 | 0.402 | + |
| *c* | *B* | 6 | 2.1 | 0.399 | + |
| *a* | *C* | 6 | 2.9 | 0.307 | + |
| *b* | *C* | 6 | 2.6 | 0.331 | + |
| *c* | *C* | 6 | 2.9 | 0.299 | + |

## Tabelle VI.

Konidien wurden von der VI. Vorkultur entnommen.

| Vorkultur | Kultur | Kulturdauer In Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|---|
| *a* | *A* | 5 | 3.3 | 0.297 | + |
| *b* | *A* | 5 | 2.8 | 0.180 | + |
| *c* | *A* | 5 | 2,9 | 0.280 | + |
| *a* | *B* | 5 | 2.4 | 0.376 | + |
| *b* | *B* | 5 | 2.3 | 0.369 | + |
| *c* | *B* | 5 | 2.4 | 0.409 | + |
| *a* | *C* | 5 | 3.2 | 0.199 | + |
| *b* | *C* | 5 | 3.0 | 0.180 | + |
| *c* | *C* | 5 | 3.0 | 0.195 | + |
| *a* | *A* | 10 | 3.9 | 0.740 | + |
| *b* | *A* | 10 | 2.3 | 0.471 | + |
| *c* | *A* | 10 | 4.1 | 0.720 | + |
| *a* | *B* | 10 | 2.1 | 0.480 | + |
| *b* | *B* | 10 | 2.1 | 0.420 | + |
| *c* | *B* | 10 | 2.1 | 0.463 | + |
| *a* | *C* | 10 | 2.9 | 0.512 | + |
| *b* | *C* | 10 | 2.2 | 0.518 | + |
| *c* | *C* | 10 | 2.5 | 0.593 | + |

## Tabelle VII.

Konidien wurden von der VIII. Vorkultur entnommen.

| Vorkultur | Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|---|
| *a* | *A* | 6 | 3.3 | 0.382 | + |
| *b* | *A* | 6 | 2.6 | 0.306 | + |
| *c* | *A* | 6 | 3.1 | 0.450 | + |
| *a* | *B* | 6 | 2.2 | 0.372 | + |
| *b* | *B* | 6 | 2.2 | 0.333 | + |
| *c* | *B* | 6 | 2.2 | 0.250 | + |
| *a* | *C* | 6 | 2.8 | 0.227 | + |
| *b* | *C* | 6 | 2.6 | 0.192 | + |
| *c* | *C* | 6 | 2.8 | 0.199 | + |
| *a* | *A* | 11 | 4.4 | 0.809 | + |
| *b* | *A* | 11 | 2.3 | 0.571 | + |
| *c* | *A* | 11 | 4.2 | 0.064 | + |
| *a* | *B* | 11 | 2.1 | 0.565 | + |
| *b* | *B* | 11 | 2.1 | 0.474 | + |
| *c* | *B* | 11 | 2.1 | 0.486 | + |
| *a* | *C* | 11 | 2.4 | 0.689 | + |
| *b* | *C* | 11 | 2.1 | 0.612 | + |
| *c* | *C* | 11 | 2.6 | 0.664 | + |

Ueberblicken wir die Versuchsergebnisse, so können wir immer die auffällig starke $C_H$-Steigung in den auf die Vorkultur *b* folgenden Kulturen bemerken. In den auf die Vorkultur *a* oder *c* folgenden Kulturen fand aber der baldige $C_H$-Rückgang nach der anfänglichen $C_H$-Steigung statt. Wenn man diese Ergebnisse, das Hauptgewicht auf das Verhältnis der Vorkultur legend, betrachtet, so ist es ersichtlich, dass der Einfluss der Vorkultur in den jungen Generationen, so z. B. der III. Vorkultur, kaum auftritt, obwohl die $C_H$-Steigung bei der Kultur *b-C* etwas stärker stattfand als bei der Kultur *a-C* oder *c-C*. Dieser Einfluss wurde aber desto merkwürdiger, je mehr die Generation der Vorkultur wiederholt wurde, was sich bei der VI. und VIII. Generation bemerken lässt, und besonders auffällig bei den *A*-Kulturen, unter denen die stärkste $C_H$-Steigung bei der Kultur *b-A* vor sich ging, und auch die Kultur *c-A* zeigte kleineren pH-Wert als die Kultur *a-A*.

Schwartz und Steinhart (1933) haben konstatiert, dass Cu aus der Kulturlösung in Mycelen und Konidien von *Aspergillus niger* übergeht und dort in ziemlich grossen Mengen aufgespeichert wird. Auch die Untersuchungen von Rennerfelt (1934) zeigen ein ähnliches Verhältnis hinsichtlich des Vorrats der Kationen in den Konidien. Aus dem obigen Versuche geht hervor, dass Cu einigermassen die Neigung zur $C_H$-Steigung begünstigt. Es wäre daher vielleicht anzunehmen, dass die $C_H$ in der Kultur *A*, welcher es an Cu mangelt, durch die Verwendung der vermutlich Fe- und Cu-haltigen Konidien von der Vorkultur *b* erhöht werden könne. Wenn diese Vermutung richtig wäre, so fände eine ebenso starke $C_H$-Steigung auch bei der Kultur *c-A* bei der Verwendung der Cu-haltigen Konidien von der Vorkultur *c*[1] statt wie bei der Kultur *b–A*. Da dies aber tatsächlich nicht der Fall ist, so lässt sich die Bedeutung der Vorkultur für die $C_H$-Veränderung im Zusammenhang mit der Schwermetallwirkung dadurch erklären, dass die durch Kombination von Fe und Cu in geeigneten Mengenverhältnissen hervorgerufene ammoniophile Eigenschaft mittels des Konidiums übertragen wird; aber nicht einfach dadurch, dass Cu oder Fe so viel aus dem Vorrat in den Konidien ergänzt wird, wie es der Lösung daran mangelt.

Nun stellt sich die Frage, ob die Bezeichnungen „Ammoniophilie" und „Nitratophilie" im strengen Sinne des Wortes aufgefasst werden dürften, nämlich ob das Zusammenwirken von Fe und Cu die mit Vorliebe ausgeübte

1) Es ist vorausgesetzt, dass durch die wiederholte Vorkultur durch mehrere Generationen die Konidien schon Fe-frei geworden sind.

Resorption von $NH_3$ und die alleinige Wirkung von Fe diejenige von $NO_3$ begünstigen könne. Um diese Frage zu beantworten, ist die Verwendung von $NH_4NO_3$ als *N*-Quelle nicht mehr geeignet. Wenn die Aufnahme der *N*-Quelle, mithin dazu das Pilzwachstum, vortrefflich geschähen, entweder bei der Verwendung von $NH_4Cl$ unter dem Zusammenwirken von Fe und Cu oder von $KNO_3$ unter der alleinigen Wirkung von Fe, so wäre es erlaubt, die Eigenschaft des Pilzes im strengen Sinne der beiden Bezeichnungen Ammoniophilie und Nitratophilie aufzufassen.

Versuch 5.

$NaNO_3$ wurde in äquivalenter Menge von N statt $NH_4NO_3$ verwendet. ERLENMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt wurden mit 100 cc Kulturlösung beschickt. Die Konzentration und Kombination der nach der Kohlenbehandlung zugesetzten Schwermetalle waren wie folgt:

| | Fe | Cu |
|---|---|---|
| *A* | $10^{-6}$ mol | — |
| *B* | $10^{-9}$ mol | $5 \times 10^{-6}$ mol |
| *C*[1] | — | $10^{-6}$ mol |

Der pH-Wert jeder Lösung betrug 5.7. Konidiensuspension von einer Koji-Agarkultur wurde übergeimpft.

Tabelle VIII.

| Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|
| *A* | 5 | 4.9 | 0.135 | + |
| *B* | 5 | 5.5 | 0.395 | + |
| *A* | 7 | 4.8 | 0.322 | + |
| *B* | 7 | 5.5 | 0.942 | + |
| *A* | 10 | 5.1 | 0.707 | + |
| *B* | 10 | 5.4 | 1.180 | + |

Versuch 6.

Die Kultur wurde etwa wie bei Versuch 5 ausgeführt. Der pH-Wert aber nach der Kohlenbehandlung mit Fe-freier HCl-Lösung zu 3.5 reguliert.

Tabelle IX.

| Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|
| *A* | 4 | 3.7 | 0.003 | + |
| *B* | 4 | 3.7 | 0.007 | + |
| *C* | 4 | 3.7 | 0.022 | + |
| *A* | 6 | 3.7 | 0.095 | + |
| *B* | 6 | 3.6 | 0.178 | + |
| *C* | 6 | 3.6 | 0.130 | + |
| *A* | 8 | 3.7 | 0.119 | + |
| *B* | 8 | 3.7 | 0.202 | + |
| *C* | 8 | 3.7 | 0.173 | + |
| *A* | 11 | 4.1 | 0.114 | + |
| *B* | 11 | 3.9 | 0.301 | + |
| *C* | 11 | 3.9 | 0.340 | + |
| *A* | 14 | 4.5 | 0.364 | + |
| *B* | 14 | 3.9 | 0.420 | + |
| *C* | 14 | 4.1 | 0.453 | + |

Versuch 7.

Die benutzten Konidien wurden von einer Vorkultur *a* (Generation XV) entnommen. Die Kultur geschah sonst gleich Versuch 6.

Tabelle X.

| Kultur | Kulturdauer In Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|
| *A* | 4 | 3.9 | 0.039 | + |
| *B* | 4 | 4.9 | 0.063 | + |
| *C* | 4 | 4.5 | 0.096 | + |
| *A* | 6 | 4.3 | 0.150 | + |
| *B* | 6 | 4.7 | 0.335 | + |
| *C* | 6 | 4.5 | 0.135 | + |
| *A* | 8 | 4.5 | 0.242 | + |
| *B* | 8 | 4.5 | 0.571 | + |
| *C* | 8 | 4.3 | 0.411 | + |
| *A* | 10 | 4.9 | 0.355 | + |
| *B* | 10 | 4.9 | 0.818 | + |
| *C* | 10 | 4.3 | 0.513 | + |
| *A* | 13 | 5.5 | 0.563 | + |
| *B* | 13 | 6.8 | 0.880 | + |
| *C* | 13 | 4.5 | 0.732 | + |

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass der alleinige Zusatz von Fe bei der Nitratkultur nicht immer günstiger auf das Pilzwachstum als derjenige von Fe und Cu zusammen wirkt. Obwohl Fe auf die Abnahme der $C_H$, wahrscheinlich auf die Resorption von $NO_3$ unter bestimmten Bedingungen, so z. B. erst nach bestimmtem Wachstum, günstig wirkt, so spricht dies nicht dafür, dass die Verarbeitung von $NO_3$ viel ökonomischer geschieht als bei dem Zusammenwirken von Fe und Cu oder bei der alleinigen Wirkung von Cu. Tatsächlich findet das Pilzwachstum oft viel üppiger bei der Kultur im Gegenwart von Cu statt, selbst bei der Verwendung von $NaNO_3$ als N-Quelle. Dies ist besonders bei Versuch 7 ersichtlich, wo der Einfluss der Vorkultur stark zu Tage tritt. Da das üppige Wachstum umgekehrt die Resorption der N-Quelle $NO_3$ beschleunigt, ist die $C_H$-Abnahme verhältnismässig stark bei der Kultur *B* bemerkbar.

Wenden wir uns jetzt der Wirkung der Schwermetalle auf die Ammoniophilie zu.

### Versuch 8.

Anstatt von $NH_4NO_3$ wurde $NH_4Cl$ in äquivalenter Menge der N-Quelle verwendet, und der pH-Wert jeder Kulturlösung betrug 5.5, sonst wurde die Kultur gleich dem Versuch 5 ausgeführt.

Tabelle XI.

| Kultur | Kulturdauer in Tagen | pH | Pilzgewicht in g | Zucker |
|---|---|---|---|---|
| *A* | 5 | 2.7 | 0.127 | + |
| *B* | 5 | 2.3 | 0.252 | + |
| *C* | 5 | 2.7 | 0.083 | + |
| *A* | 7 | 2.3 | 0.258 | + |
| *B* | 7 | 1.9 | 0.497 | + |
| *C* | 7 | 2.5 | 0.194 | + |
| *A* | 9 | 2.1 | 0.334 | + |
| *B* | 9 | 1.8 | 0.045 (?) | + |
| *C* | 9 | 2.3 | 0.265 | + |
| *A* | 12 | 2.1 | 0.431 | + |
| *B* | 12 | 1.7 | 0.711 | + |
| *C* | 12 | 2.1 | 0.447 | + |
| *A* | 14 | 2.0 | 0.509 | + |
| *B* | 14 | 1.7 | 0.688 | + |
| *C* | 14 | 2.1 | 0.500 | + |

Das Zusammenwirken von Fe und Cu begünstigt deutlich die Ammoniophilie, während Cu allein nicht stets vorteilhaft darauf wirkt, was schon in den vorhergehenden Zeilen geschildert worden ist. Sehr auffallend ist, dass Fe hier ohne Verfügung von $NO_3$ ebenso stark Ammoniophilie hervorruft wie Cu, ja bisweilen noch stärker. Auch dies deutet darauf hin, dass die Wirkung der einzelnen Schwermetalle auf die Aufnahme von $NH_3$ und $NO_3$ nicht einfach zu erklären ist und nur ihre Kombination in geeignetem Mengenverhältnisse die Eigenschaft des Pilzes ammoniophil macht.

Es ist eine bekannte Tendenz, dass $NH_3$ in niedriger $C_H$, und $NO_3$ in hoher $C_H$ von *Aspergillus oryzae* besser aufgenommen wird wie von anderen Schimmelpilzen. In der Fe- und Cu-haltigen Kultur mit dem anfänglichen pH-Wert 5.7 oder 4.3, wie bei der PFEFFERSCHEN Lösung, und sogar bei noch höherer $C_H$, kann man auffällige Ammoniophilie bestätigt finden, gleichgültig, ob $NH_4Cl$ oder $NH_4NO_3$ zur Verwendung kommt. Die günstige Wirkung des alleinigen Zusatzes von Fe auf die $C_H$-Abnahme, welche wahrscheinlich durch das Verschwinden von $NO_3$ verursacht wird, ist aber nur bei hoher $C_H$ bemerkbar, wo $NO_3'$ mit $H^+$ in Gestalt von Ionenpaar verhältnismässig leicht in die Zelle permeieren kann. Die „Ammoniophilie" ist die wesentliche Eigenschaft von *Aspergillus oryzae*, besonders auffällig in Gegenwart von Fe und Cu zusammen, während die Resorption von $NO_3$ nur gezwungen geschieht, selbst bei alleinigem Zusatz von Fe, der oft diese begünstigen. Bei der Verwendung von Nitrat als die alleinige N-Quelle, ohne Begleitung von $NH_3$, kommt die „Nitratophilie" im strengen Sinne, d. h. die Verarbeitung von $NO_3$ mit Vorliebe, nicht mehr zur Geltung, weil $NO_3$ bei junger Kultur oder bei grösserem pH-Wert sehr wenig aufgenommen wird, ja oft weniger als Kationen im letzteren Falle. Die $C_H$-Abnahme findet natürlich dabei nicht statt, sondern es tritt die $C_H$-Steigung auf.

Dass die Salpetersäure bei der N-Ernährung der höheren sowie niederen Pflanzen vorher der Reduktion unterworfen werden muss, wird oft behauptet, und diese Nitratreduktion wurde bei *Aspergillus oryzae* vor kurzem von YAMAGATA (1934) festgestellt. Die Tatsache, dass die Extra-Kohlensäure durch den Nitratreduktionsvorgang ausgeschieden wird, was von WARBURG und NEGELEIN bei *Chlorella* festgestellt wurde, ist auch bei *Aspergillus oryzae* von YAMAGATA bestätigt gefunden worden. Wie schon von diesen Autoren konstatiert wurde, wird die zur Reduktion erforderliche Arbeit durch einen mit der Reduktion gekoppelten Vorgang geliefert, in welchem Sauerstoff der Salpetersäure sich mit Kohlenstoff

organischer Verbindungen zur Kohlensäure vereinigt. Es wird seit den Untersuchungen von WARBURG (1921, 1923) im allgemeinen geglaubt, dass Fe im Atmungsmechanismus eine wichtige Rolle spiele. Wenn man mit WARBURG und NEGELEIN (1920, 1925) annehmen darf, dass Fe auch bei dieser gekoppelten Oxydoreduktion eine derartige katalytische Wirkung wie bei der gewöhnlichen Atmung ausübe, dürfte sich das leichte Verschwinden von $NO_3$ in höherer $C_H$ in der Fe-haltigen Nitratkultur, eilige und zwar aufgezwungene Oxydation der C-Quelle begleitend, vielleicht ohne grosse Schwierigkeit erklären lassen. Die Reduktion von $NO_3$ bis zu Ammoniak ist nötig nur für die Vorbereitung der Eiweissynthese, und die dabei freigemachte Energie, wie YAMAGATA experimentell bei *Aspergillus oryzae* bewiesen hat, geht nutzlos als Wärme verloren. Da diese Nitratreduktion als ein notwendiger, aber unwillkommener Vorgang für den Stoffwechsel des Pilzes aufzufassen ist und da, wie oben erwähnt, der Pilz selbst bei alleinigem Zusatz von Fe nicht mit besonderer Vorliebe $NO_3$ zum Wachstum benutzt, darf die Bezeichnung „Nitratophiile" nicht mehr der „Ammoniophilie" gleichgestellt werden. Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass Cu die einseitige Wirkung von Fe stark kontrollieren kann, dass nämlich die überwiegende Resorption von $NO_3$, die besonders bei alleiniger Verwendung von Fe stattfindet, durch die Mitwirkung von Cu stark gehemmt wird, obwohl es wahrscheinlich mit ähnlicher katalytischer Wirkung am oxydoreduktiven Vorgang des Stoffwechsels sich beteiligt wie Fe. Studien auf diesem Gebiete, besonders über den Antagonismus zwischen Cu und Fe, sind sehr wünschenswert.

Aus der $NH_4NO_3$-Kultur, wo die N-Quelle in zwei Formen sich bietet, wird hauptsächlich Ammoniak verarbeitet, und Nitrat kommt nur als von geringerer Bedeutung für die N-Ernährung in Betracht. Wenn die Rolle von $NO_3$ von $NH_4NO_3$ vorzugsweise versucht wird, so besteht sie darin, dass die Kultur der extremen $C_H$-Steigung infolge der einseitigen Aufnahme von $NH_3$ entgeht und die fortdauernde mässige Resorption von $NH_3$ begünstigt wird, soweit der Pilz mit dem Zucker in genügender Menge versorgt wird. In solcher, und zwar lang dauernder Kultur (z. B. Versuch 4), wo das ökonomische Verhältnis natürlich ausser Acht gelassen ist, erfolgt das Pilzwachstum viel besser bei alleiniger Wirkung von Fe als beim Zusammenwirken von Fe und Cu. Derartige Ergebnisse der Pilzkultur lassen sich manchmal bei der Verwendung von $NH_4NO_3$ als die N-Quelle bemerken, ohne vorher die Kohlenbehandlung der Kulturlösung usw. auszuführen. $NH_4NO_3$ wird bei gewöhnlicher Pilzkultur als die N-Quelle am häufigsten verwendet. Soweit die $C_H$-Veränderung, die durch

die ungleiche Resorption von $NH_3$ und $NO_3$ von diesem Salze verursacht wird, die Kultur in verschiedenen Beziehungen beeinflusst, muss die geschilderte merkwürdige Wirkung der Spuren von Schwermetallsalzen als ein wichtiges Moment in neuem Versuchsgebiete der Pilzkultur betrachtet werden.

## Zusammenfassung

1. Die $C_H$-Veränderung in der $NH_4NO_3$-Kultur von *Aspergillus oryzae* geschieht verschieden je nach den Chemikalien aus den verschiedenen Fabriken, ja selbst unter den aus derselben Fabrik stammenden Präparaten. Dieser Unterschied ist der Wirkung der Schwermetallverunreinigungen der Präparate zuzuschreiben.

2. Kombinierter Zusatz von Fe und Cu in geeignetem Mengenverhältnisse ruft stets die Ammoniophilie hervor. Die alleinige Wirkung von Fe begünstigt aber die Aufnahme von $NO_3$ von $NH_4NO_3$, während Cu in seiner Wirkungsweise etwa die Mitte zwischen Fe+Cu und Fe einnimmt.

3. Die einzelne Wirkung von Fe und Cu ist in dieser Hinsicht nicht einfach definitiv, sondern veränderlich. Nur beim Zusammenwirken von beiden kann man stetige Ammoniophilie bemerken.

4. Bei der $NH_4NO_3$-Kultur ist die Ammoniophilie die wesentliche Eigenschaft von *Aspergillus oryzae,* während die Aufnahme von $NO_3$ nur gezwungen unter der alleinigen Wirkung von Fe und zwar auf Kosten der Kohlenstoffverbindungen geschieht. Die Bezeichnung „Nitratophilie" im strengen Sinne des Wortes besteht daher nicht mehr und kann nicht der „Ammoniophilie" gleichgestellt werden.

5. Die ammoniophile Eigenschaft von *Aspergillus oryzae* wird durch wiederholte Vorkultur durch mehrere Generationen unter Zusammenwirken von Fe und Cu verstärkt und mittels des Konidiums übertragen. Durch diese Wahrnehmung kann man den Einfluss der Vorkultur auf die ungleiche Aufnahme von $NH_3$ und $NO_3$ und auf die $C_H$-Veränderung erklären.

## Literaturverzeichnis

Bortels, H. (1927): Ueber die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen, unter besonderer Berücksichtigung von *Aspergillus oryzae*. Biochem. Zeitschr., **182**.

Rennerfelt, E. (1934): Untersuchungen über die Salzaufnahme bei *Aspergillus niger*. Planta, **22**.

Rippel, K. (1931): Quantitative Untersuchungen über die Abhängigkeit der Stickstoffassimilation von der Wasserstoffionenkonzentration bei einigen Pilzen. Arch. f. Mikrobiol., **2**.

ROBERG, M. (1927): Ueber die Wirkung von Eisen-, Zink- und Kupfersalzen auf Aspergillen. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, **74.**

SAKAMURA, T. (1930): Die Resorption des Ammonium- und Nitratstickstoffs durch *Aspergillus oryzae.* Planta, **11.**

SAKAMURA, T. und YOSHIMURA, F. (1933): Ueber die Bedeutung der H-Ionenkonzentration und die wichtige Rolle einiger Schwermetallsalze bei der Kugelzellbildung der Aspergillen. Journ. Fac. Science, Hokkaido Imp. Univ. Series V, **2.**

SCHWARTZ, W. und STEINHART, H. (1933): Untersuchungen über die oligodynamische Wirkung des Kupfers. II Teil. Arch. f. Mikrobiol., **4.**

STEINBERG, R. (1919): A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger.* Amer. Journ. Bot., **6.**

WARGURG, O. (1921): Physikalische Chemie der Zellatmung. Biochem. Zeitschr., **119.**

WARBURG, O. (1923): Ueber die antikatalytische Wirkung der Blausäure. Biochem. Zeitschr., **136.**

WARBURG, O. (1925): Versuche über die Assimilation der Kohlensäure. Biochem. Zeitschr., **166.**

WARBURG, O. und NEGELEIN, E. (1920): Ueber die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. Biochem. Zeitschr., **110.**

YOSHIMURA, F. (1934): Spherical cell formation in *Aspergillus oryzae* with special reference to heavy metal impurities in culture solution. Journ. Fac. Science, Hokkaido Imp. Univ. Series V, **3.**