HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ueber einige fur die Kultur von Aspergillen notwendigen Schwermetalle und das Befreiungsverfahren der Nahrlosung von ihren Spuren
Author(s)	SAKAMURA, Tetsu
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 4(3), 99-116
Issue Date	1936
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26251
Type	departmental bulletin paper
File Information	4(3)_P99-116.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Ueber einige für die Kultur von Aspergillen notwendigen Schwermetalle und das Befreiungsverfahren der Nährlösung von ihren Spuren

Von

TETSU SAKAMURA

(Mit 2 Textfiguren)

Kohle als Adsorbens

Es ist heutigen Tages wohl allgemein anerkannt, dass die Nährlösung der Pilzkultur zunächst von jenen Verunreinigungen, etwa wie Zn, Fe, Cu, Mn u.a. in geringen Spuren, nahezu völlig befreit werden müsse, wenigstens soweit die Untersuchung sich auf die physiologische Wirkung der Schwermetallspuren bezieht. Unter verschiedenen Reinigungsmethoden für den oben erwähnten Zweck steht in erster Linie diejenige durch Adsorption an Kohle(1), Kalk(2) usw zu Verfügung. Auch in meinen früheren Arbeiten(3) habe ich die Adsorptionsmethode mit Carbo medicinalis MERCK für die Reinigung der Nährlösung bei der Kultur von Aspergillen verwendet, und YOSHIMURA (1934) hat in ihrer Arbeit über die Kugelzellbildung in *Aspergillus oryzae* verschiedene Bemerkungen über die Kohlenbehandlung der Kulturlösung mitgeteilt. Um zu sehen, in welchem Grade unsere Reinigung der Kulturlösung durch die Kohlenbehandlung erfolgte, soll das Mycelwachstum in meiner Kultur von *Aspergillus niger* hier zum Vergleich mit den Ergebnissen von anderen Autoren gezeigt werden (Tabelle 1). Die Kulturdauer in diesen Untersuchungen war meistens etwa eine Woche.

(1) BORTELS (1927) und ROBERG (1927).
(2) STEINBERG (1919).
(3) SAKAMURA und YOSHIMURA (1933) und SAKAMURA (1934).

Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Ser. V, Vol. IV, No. 3, 1936.

Tabelle 1

Autor	Pilz	Adsorptionsmittel	Pitzgewicht (g)
Mein Versuch	*Asp. niger*	Carbo medicinalis MERCK	0.248
STEINBERG (1919)	*Asp. niger*	$CaCO_3$	0.013–0.018
BORTELS (1927)	*Asp. niger*	Carbo medicinalis MERCK	0.012
ROBERG (1931)	*Asp. niger*	Carbo medicinalis MERCK	0.012–0.034
LOHMANN (1934)	*Asp. niger*	Carbo medicinalis MERCK	0.114
GOLLONICK (1936)	*Asp. niger*	Carbo animalis MERCK	0.012

Der oben gezeigte Vergleich weist darauf hin, dass die Befreiung der Nährlösung von Schwermetallspuren in meinem Fall gewissermassen unvollkommen war, wenn ein Urteil darüber nach dem Kulturergebnis gefällt wird. Um die genaue Kenntnis des Effekts der Kohlenbehandlung zu gewinnen, wurde auch aktive Kohle von Firma TAKEDA verwendet. Das pH-Bereich des Wachstums und die Kugelzellbildung wurden untersucht, wobei die Ergebnisse des Adsorptionsverfahrens mit Carbo medicinalis MERCK und mit aktiver Kohle TAKEDA miteinander verglichen wurden. In den folgenden Zeilen möchte ich der Einfachheit halber die beiden Kohlenarten mit Zeichen *M* bzw. *T.* veranschaulichen. Alles Wasser wurde in einem aus alkalienfreiem Glas bestehenden Destillationsapparat umdestilliert. Die Kulturlösung besass folgende Zusammensetzung:

NH_4NO_3 (MERCK's Reagens)	5 g
KH_2PO_4 (nach SÖRENSEN für Puffergemisch, SCHERING-KAHLBAUM)	2.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Zur Analyse mit Garantieschein, KAHLBAUM)	1.25 g
Glukose (wasserfrei, TAKEDA)	22.5 g
Umdestilliertes Wasser	1000 ccm

Die Kulturlösung wurde mit 5% Kohle versetzt und so behandelt, wie von YOSHIMURA (1934) angegeben worden ist.

Versuch 1

Mit je 5 ccm Kulturlösung wurde ein Reagenzglas beschickt, mit Wattepfropfen verschlossen und in KOCHschem Dampftopf 20 Minuten lang sterilisiert. *Aspergillus niger.* Vorkultur: Koji-Agar. Kulturdauer: 2 Tage. Temperatur: 30°C. (Tabelle 2).

Tabelle 2

Adsorptions-mittel	pH-Grenze für Wachstum in saurem Gebiete	Kugelzellbildung		
		ohne Cu-Zusatz	Cu(2×10^{-4} mol)	Cu(5×10^{-4} mol)
M	1.6	−	+	+
T	1.2	−	−	−

In der mit Kohle behandelten Nährlösung ohne Cu-Zusatz wuchs der Pilz bei *T* in höherer C_H als bei *M*, und die Kugelzellbildung bei dem Cu-Zusatz wurde leicht bei *M* hervorgerufen, aber nicht bei *T*. Aus diesem Ergebnis sind folgende zwei Möglichkeiten denkbar:

1. Abweichende Adsorptionsfähigkeit bei beiden Kohlensorten.
2. Beide Kohlensorten lassen Salze in ungleicher Menge in die Lösung gehen.

Folgender Versuch wurde angestellt, um zu sehen, ob die Kohle irgendwelche Substanzen in die Lösung abgibt.

Versuch 2

Die Grundlösung wurde doppelt so konzentriert hergestellt wie die Kulturlösung in Versuch 1. Wasser und Grundlösung, welche beide gleicherweise kohlenbehandelt worden waren, wurden in gleichem Verhältnis gemischt. Die so bereitete Kulturlösung war gleich derjenigen in Versuch 1 und ihr pH-Wert durch Zusatz der eisenfreien H_2SO_4 auf 1.6, 1.8, und 2.2 reguliert. 5 ccm Kulturlösung in Reagenzglas. *Aspergillus niger*. Vorkultur: Koji-Agar(1). Kulturdauer: 2 Tage. Temperatur: 30°C. Keine merkliche Veränderung des pH-Wertes im Laufe der Kultur. (Tabelle 3).

MG: Die mit *M* behandelte Grundlösung.
MW: Die mit *M* behandelte Wasser.
TG: Die mit *T* behandelte Grundlösung.
TW: Das mit *T* behandelte Wasser.

(1) Bei den nachherigen Versuchen in vorliegenden Untersuchungen wurden Konidienmaterialien alle der Koji-Agar-Kultur entnommen.

Tabelle 3

Kulturlösung	Kugelzellbildung		
	ohne Cu-Zusatz	Cu-(5×10^{-4} mol)	Cu(10^{-3} mol)
MG+MW	−	+	+
MG+TW	−	±	+
TG+TW	−	−	−
TG+MW	−	−	−

Versuch 3

Der Versuch wurde im grossen und ganzen fast gleich dem Versuch 2 angestellt, nur mit dem Unterschiede, dass das Volumverhältnis zwischen Grundlösung und Wasser 1:4 war. Der pH-Wert der Kulturlösung wurde auf 1.7, 1.8 and 2.0 reguliert (Tabelle 4).

Tabelle 4

Kulturlösung	Kugelzellbildung		
	ohne Cu-Zusatz	Cu(5×10^{-4} mol	Cu(10^{-3} mol)
MG+MW	−	+	+
MG+TW	−	−	±
TG+TW	−	−	−
TG+MW	−	−	−

Aus Versuch 2 and 3 geht hervor, dass die Kugelzellbildung nicht nur bei der *T*-Kulturlösung, sondern auch bei der mit dem *T*-Wasser verdünnten Grundlösung gehemmt wurde. Aus dieser Beziehung liegt es nahe anzunehmen, dass der Unterschied zwischen der *M*- und *T*-Kohlenbehandlung nicht auf die ungleiche Adsorptionsfähigkeit für die Schwermetalle, sondern auf die Abgabe derjenigen Stoffe der Kohle zurückzuführen sei, welche hemmend auf die Kugelzellbildung wirken. Da SAKAMURA und YOSHIMURA (1933) bestätigt gefunden haben, dass Fe und besonders Mn hemmend auf die Kugelzellbildung wirken, lässt sich Mn vor allem als einer der lösenden Stoffe in Betracht ziehen. Auch daraus, dass Mn das Wachstum von

Aspergillus in höherer Acidität begünstigt[1], kann man die Manganabgabe der *T*-Kohle vermuten, indem die *T*-Behandlung die höchste C_H-Grenze des Wachstums erweitert.

Eine 5%ige Suspension von *M*- sowie *T*-Kohle wurde nach der eine Stunde langen Erschütterung filtriert, das Filtrat wurde durch

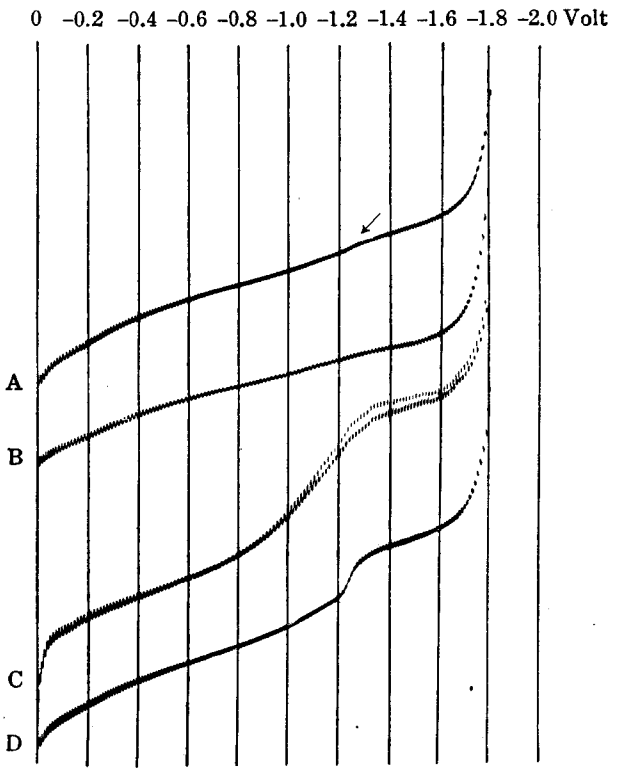

Fig. 1

A: Die unbehandelte Kulturlösung. Anodenpotential, +0.034 Volt.
B: Die mit Ca-Phosphat behandelte Kulturlösung. Anodenpotential, −0.058 Volt.
C: Die mit Carbo medicinalis MERCK behandelte Kulturlösung. Anodenpotential, −0.06 Volt.
D: Die mit Kohle von TAKEDA behandelte Kulturlösung. Anodenpotential, −0.068 Volt.
Der letzte starke Anstieg jeder Kurve deutet auf das Vorhandensein von Nitrate hin.

(1) TAMIYA (1928).

die Methode von REIMAN und MINOT (1920) der Mn-Prüfung unterworfen, und bei der *T*-Behandlung wurde Mn nachgewiesen, aber nicht bei der M-Behandlung. Die oben geschilderten Ergebnisse alle weisen auf die grosse Möglichkeit der Manganabgabe der *T*-Kohle hin, und wir können das Ausbleiben von Kugelzellbildung bei der *T*-Behandlung, selbst beim Zusatz von Cu, der als einer der wichtigen Faktoren für die Kugelzellbildung betrachtet werden kann, dadurch erklären, dass Mn gegen Cu antagonistisch wirkt[1].

Dass ausser Mn noch andere Stoffe in kleinster Menge von der *M*- oder *T*-Kohle abgegeben werden oder in der Kulturlösung zurückbleiben dürften, lässt sich vermuten, weil nach der Kohlenbehandlung der Pilz, und zwar ohne Zusatz von Fe oder Zn, welche beide als die unentbehrlichen Elemente für die Pilzkultur betrachtet werden können, ein bemerkbar gutes Wachstum ausführt.

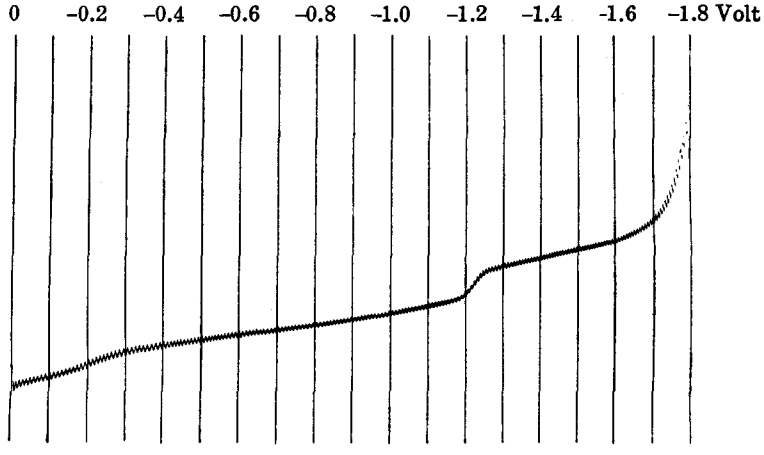

Fig. 2

Die mit Ca-Phosphat behandelte Kulturlösung mit Zn-Zusatz (2×10^{-5} mol). Anodenpotential, +0.018 Volt.

Die oben erwähnte Möglichkeit lässt sich auch aus den polarographischen Untersuchungen der mit Kohle behandelten Kulturlösung bestätigen, besonders die Gegenwart von Zn in der *T*-behandelten Kulturlösung (Fig. 1D und Fig. 2). Obwohl bei der *M*-behandelten Lösung das Vorhandensein bestimmter Schwermetalle polarographisch nicht nachgewiesen werden kann, deutet der auffallende

(1) SAKAMURA und YOSHIMURA (1933).

Anstieg der Kurve auf die Lösung irgendwelcher Substanzen hin (Fig. 1, C).

Die Kohlenbehandlung der Kulturlösung, selbst unter Verwendung von Carbo medicinalis MERCK, ist zum Zweck der Befreiung von Schwermetallspuren nicht geeignet, was uns veranlasste, andere Adsorptionsmittel zu suchen.

HOPKINS (1934) hat als Adsorbens zum Zweck der Befreiung der Nährlösung von Mn bei der Kultur von *Chlorella* mit Erfolg Ca-Phosphat benutzt. Da Ca-Phosphat in verhältnismässig reinem Zustande erhalten werden kann, ist die Möglichkeit der Abgabe unwillkommener Stoffe daraus viel kleiner als bei der Kohlenbehandlung, und das gelöste Ca-Salz wirkt auf das Pilzwachstum nicht spezifisch. Zunächst wurde Ca-Phosphat als Adsorptionsmittel einer Prüfung unterzogen.

Versuch 4

Die Kulturlösung wurde mit 1% Ca-Phosphat (MERCK), nicht ausgewaschen, versetzt und das Adsorptionsverfahren dauerte 2 Stunden lang. Der pH-Wert der Lösung nach der Behandlung betrug 5.6. Die Kultur geschah mit 100 ccm. Nährlösung im ERLENMEYER-kolben von 250 ccm Inhalt. Sterilisationsdauer: 20 Minuten lang. *Aspergillus niger*. Vorkultur: Koji-Agar. Kulturdauer: 5 Tage. Temperatur: 30°C. Zugesetzte Schwermetalle(1): Fe 2×10^{-6}mol. Zn, Mn und Cu 10^{-6}mol. (Tabelle 5).

Tabelle 5

Metallzusatz	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
–	3.3	±	0.042
Fe	3.0	++	0.080
Zn	3.3	+	0.176
Cu	3.3	+	0.027
Fe+Cu	2.6	+++	0.240
Fe+Cu+Zn	2.0	+++	0.640
Fe+Cu+Mn	2.8	+++	0.145
Fe+Zn+Cu	2.0	++	0.545
Zn+Cu+Mn	3.3	+++	0.036
Fe+Zn+Cu+Mn	3.0	+++	0.446

(1) Schwermetalle wurden als $Fe_2(SO_4)_3$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$ bzw. $CuSO_4$ zugesetzt.

Trotzdem im obigen Versuche Ca-Phosphat ungewaschen verwendet wurde, war der Adsorptionseffekt viel grösser als bei der Kohlenbehandlung. Ohne Schwermetallzusatz fand nur kümmerliches Wachstum auf der Oberfläche der Kulturlösung statt, während üppiges Gedeihen des Mycels erfolgte, wenn verschiedene Schwermetalle zusammen der Kulturlösung zugesetzt wurden. Die Unentbehrlichkeit von Fe und Zn wurde hervorragend bestätigt. Obwohl bei der Kultur ohne Schwermetallzusatz tiefer schwarze Konidien als bei der Kohlenbehandlung gebildet wurden, ist dies nicht gerade so aufzufassen, dass die Befreiung der Kulturlösung von Cu in diesem Versuch ungenügender sei, weil die Konidienfarbe nicht bloss von Cu abhängig sich entwickelt und ein späterer Versuch zeigte, dass der Zusatz von nur 10^{-7}mol Cu Einfluss auf die Entwicklung der Konidienfarbe hat. Da das Adsorptionsverfahren mit Ca-Phosphat für unseren Zweck als erfolgreich sich bewies, wurde ferner eine Reihe von Versuchen angestellt, um die Methodik der Adsorption zu verfeinern.

Auswaschung von Ca-Phosphat

Versuch 5

Fünfzig g Ca-Phosphat wurde in 1000 cm umdestilliertem Wasser 5 Stunden lang geschüttelt. Während dieses Verfahrens wurde das Wasser viermal gewechselt, und nach dem Abfiltrieren wurde Ca-Phosphat abgetrocknet, die Kulturlösung mit 0.5% Ca-Phosphat versetzt und sein pH-Wert auf 5.5 reguliert. Das Adsorptionsverfahren dauerte 2 Stunden lang. Der pH-Wert des Filtrats der so behandelten Lösung war 5.7. Zur Kontrolle habe ich unausgewaschenes Ca-Phosphat als Adsorptionsmittel verwendet. Die Kultur geschah mit 100 ccm Nährlösung in ERLENMEYERkolben(1) von 250 ccm Inhalt. *Aspergillus niger*. Vorkultur: Koji-Agar. Kulturdauer: 7 Tage. Temperatur: 30°C. Die Konzentrationen der zugesetzten Schwermetalle blieben dieselben wie in dem Versuch 4. (Tabelle 6).

(1) Die Kolben bestanden aus Terex Glas, dessen Eigenschaften nachher erwähnt werden sollen.

Tabelle 6

Metallzusatz	Ca-Phosphat (ausgewaschen)			Ca-Phosphat (nicht ausgewaschen)		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	3.5	+	0.002	3.5	±	0.009
Fe	3.4	+	0.003	3.6	+	0.011
Zn	3.6	+	0.002	3.5	±	0.007
Fe+Cu	3.9	+	0.002	3.8	+	0.006
Fe+Zn	2.2	±	0.185	2.2	+	0.222
Fe+Zn+Cu	2.0	+	0.449	2.0	+	0.441
Fe+Zn+Cu+Mn	2.2	+++	0.460	2.1	+++	0.743

Da die Verwendung des ausgewaschenen Ca-Phosphats besseren Adsorptionseffekt zu zeigen neigt und noch dazu die von verschiedenen Fabriken stammenden Präparate dieses Salzes als Verunreinigung Nitrat enthalten, ist das Waschverfahren als die notwendige Vorbehandlung erwünscht.

Menge von Ca-Phosphat

Versuch 6

Adsorptionsverfahren mit ausgewaschenem Ca-Phosphat, Kulturmethode usw waren gleich dem Versuch 5, nur mit dem Unterschiede, dass der ERLENMEYERkolben nicht aus Terex Glas bestand. Kulturdauer: 7 und 8 Tage. (Tabelle 7 und 8).

Tabelle 7

Kulturdauer: 7 Tage

Metallzusatz	2% Ca-Phosphat			1% Ca-Phosphat			0.5% Ca-Phosphat		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	3.4	+	0.001	3.4	+	0.007	3.4	+	0.005
Fe	3.2	+	0.027	3.3	+	0.037	3.6	+	0.032
Zn	3.3	+	0.014	3.4	+	0.023	3.6	+	0.015
Fe+Zn	2.1	±*	0.408	2.4	±*	0.139	2.4	±*	0.133
Fe+Zn+Cu	2.0	+	0.519	2.0	+	0.528	2.0	+	0.523
Fe+Zn+Cu+Mn	2.0	+++	0.842	2.1	+++	0.743	2.1	++	0.651

* Braune Konidien.

Tabelle 8

Kulturdauer: 8 Tage

Metallzusatz	0.5% Ca-Phosphat			0.25% Ca-Phosphat		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
–	3.2	+	0.003	3.2	+	0.005
Fe	3.3	+	0.020	3.2	+	0.025
Zn	3.0	++	0.046	3.0	++	0.037
Fe+Zn	2.0	±*	0.353	2.0	+*	0.479
Fe+Zn+Cu	2.1	+*	0.525	2.1	+*	0.553
Fe+Zn+Cu+Mn	1.9	++	0.584	1.9	++	0.651

* Braune Konidien.

Aus dem obigen Versuche geht hervor, dass der Effekt der Adsorption mit Ca-Phosphat von verschiedenen Stufen der Konzentration zwischen 2–0.25% gleichmässig erfolgt. In der Praxis ist daher 0.5% Ca-Phosphat zu empfehlen.

C_H der Kulturlösung bei dem Adsorptionverfahren

In den obigen Versuchen wurde das Adsorptionsverfahren in der schwachen Acidität (pH 5.7) ausgeführt. Um festzustellen, ob die Adsorption in alkalischer Reaktion noch erfolgreicher ist, habe ich dann noch einen Versuch folgender Art angestellt.

Versuch 7

Das Adsorptionsverfahren geschah in schwach alkalischem Medium (pH 7.4). Um den Niederschlag von Ammonium-Mg-Phosphat zu vermeiden, wurde die Kulturlösung in zwei Teile A und B getrennt, und diese wurden einzeln mit Ca-Phosphat behandelt.

A	NH_4NO_3	3.5 g	B	K_2HPO	0.56 g
	K_2HPO_4	0.56 g		$MgSO_4.7HO$	0.875 g
	Glukose	15.75 g			

Nach dem Adsorptionsverfahren wurden die Lösungen A und B zusammengemischt, und der pH-Wert wurde mit H_2SO_4 auf 5.2

reguliert. Die Kulturmethode und -bedingungen waren gleich den obigen Versuchen. Die Kulturdauer: 7 Tage. (Tabelle 9).

Tabelle 9

Metallzusatz	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	3.4	—	0.002
Fe	3.0	+*	0.022
Zn	3.4	+	0.007
Fe+Zn	2.2	+*	0.170
Fe+Zn+Zn	1.8	+	0.503
Fe+Zn+Cu+Mn	1.9	+++	0.562

* Braune Konidien.

Der obige Versuch ergab, dass der Adsorptionseffekt in alkalischer Reaktion nicht merklich von demjenigen im sauren Medium sich unterscheidet. Da das Adsorptionsverfahren in alkalischer Lösung aber viel Mühe kostet und noch die Reinheit der zur pH-Regulierung benutzten Säure berücksichtigt werden muss, kann man die schwach saure Reaktion als vorteilhafter vorziehen.

Eigenschaften der Gläser

Wie aus einer Reihe von Untersuchungen mehrerer Forscher ersichtlich ist, unterliegt es wohl keinem Zweifel mehr, dass die Eigenschaften der Gläser ausschlaggebende Bedeutung bei der Pilzkultur haben. Da die Abgabe von Schwermetallen aus der Glaswand höchst wahrscheinlich ist, so ist die Auswahl der Gläser ein wichtiges Moment, besonders wenn es sich um die physiologische Wirkung der Schwermetallspuren handelt. Unter unseren jetzigen Umständen ist es zu kostspielig, Jenaer oder Pyrex Gläser zu verwenden. Neuerdings bringt die Tokyo Elektrische A. G. ein Glas mit der Bezeichnung „Terex" in den Handel, das für unseren Zweck passend zu sein schien. Nach der Mitteilung der Firma lassen Terex Gläser keine Menge ihrer Wandsubstanz in die Lösung gehen, und sie werden als „Zn-frei" bezeichnet. Zum Vergleich habe ich auch die bisher gebrauchten alkalienfreien Glaskolben verwendet, die der Bequem-

lichkeit halber hier als „*S*" bezeichnet werden. Als Versuchspilze dienten *Aspergillus niger, Asp. oryzae* und *Asp. tamarii.*

Versuch 8

Adsorptionsverfahren wurde mit 2% ausgewaschenem Ca-Phosphat ausgeführt. Sterilisationsdauer: 20 Minuten. Kulturdauer: 6 Tage. Sonst gleich den obigen Versuchen. (Tabelle 10, 11 und 12).

Tabelle 10

Aspergillus niger.

Metallzusatz	Terex			*S*		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	3.6	±	0.001	3.6	±	0.002
Fe	3.2	+*	0.017	3.0	+*	0.017
Fe+Cu	3.1	++	0.024	3.2	++	0.033
Fe+Zn	2.2	+§	0.320	2.1	+§	0.251
Fe+Zn+Cu	1.9	++	0.647	1.9	++	0.581
Fe+Zn+Cu+Mn	2.1	+++	0.791	2.0	+++	0.635

* Braune Konidien.
§ Gelbbraune Konidien.

Tabelle 11

Aspergillus oryzae.

Metallzusatz	Terex			*S*		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	4.3	±	0.008	4.2	±	0.007
Fe	4.4	±	0.031	4.2	±	0.075
Fe+Cu	4.3	±	0.011	3.2	+	0.088
Fe+Zn	4.0	—	0.169	3.9	—	0.138
Fe+Zn+Cu	2.8	—	0.135	3.0	—	0.134
Fe+Zn+Cu+Mn	2.8	++	0.576	2.2	++	0.610

Tabelle 12

Aspergillus tamarii. Kulturdauer: 9 Tage.

Metallzusatz	Terex			*S*		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
Fe+Cu+Mn	5.0	+	0.042	3.0	+++	0.181
Fe+Cu+Mn+Zn	2.2	++	0.418	2.2	++	0.302

Aspergillus niger: Kein Unterschied des Pilzgewichts bestand zwischen *S* und Terex, aber in der Kultur ohne Zn-Zusatz entwickelte sich die Pilzdecke ringförmig die Glaswand berührend bei jenem, während bei diesem gleichmässig auf der Oberfläche der Kulturlösung.

Aspergillus oryzae: In der Kultur ohne Zn-Zusatz bestand ein Unterschied des Pilzwachstums zwischen *S* und Terex. Aehnlicher Unterschied der Pilzdecke zwischen den beiden Glassorten war ersichtlich wie bei *Aspergillus niger.*

Aspergillus tamarii: Der Unterschied des Pilzwachstums sowie des Deckenzustandes zwischen den beiden Glassorten war noch auffallender als bei *Aspergillus niger* oder *Asp. oryzae.* Aus den Kulturergebnissen kann man bemerken, dass es bei *S* sehr schwierig ist, Zinkabgabe der Glaswand in biologisch wirksamer Menge möglichst zu vermeiden. Solcher Nachteil kann bei der Verwendung von Terex Gläsern minimal vermindert werden, und in der Praxis kann dadurch eine schwermetallfreie Kulturbedingung erreicht werden. Im obigen Versuche dauerte die Dampfsterilisation 20 Minuten, aber ein noch grösserer Unterschied des Pilzwachstums zwischen *S* und Terex kann erwartet werden, wenn eine noch länger dauernde Sterilisation ausgeführt wird.

Versuch 9

Aspergillus niger. Adsorptionsmittel: 0.5% Ca-Phosphat. Je 100 ccm Kulturlösung in einem ERLENMEYERkolben von 250 ccm Inhalt. Fe 2×10^{-6}mol, Zn und Cu 10^{-6}mol. Versuchsdauer: 8 Tage. (Tabelle 13 und 14).

Tabelle 13

Sterilisationsdauer: 20 Minuten.

Metallzusatz	Terex			*S*		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
–	3.4	+	0.004	3.4	+	0.009
Fe	3.3	+	0.014	2.6	+	0.037
Fe+Cu	3.4	+	0.020	2.8	++	0.051
Fe+Zn	1.9	++*	0.428	1.9	+*	0.417

* Braune Konidien.

Tabelle 14

Sterilisationsdauer: 60 Minuten.

Metallzusatz	Terex			*S*		
	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
–	3.3	+	0.002	3.3	+	0.014
Fe	3.3	+	0.027	2.6	+	0.188
Fe+Cu	3.4	+	0.022	2.5	++	0.188
Fe+Zn	1.9	++*	0.415	1.9	+*	0.391

* Braune Konidien.

Bei der einstündigen Sterilisation erfolgte das Pilzwachstum in der Kultur ohne Zn-Zusatz besser bei *S* als bei Terex, und beim Fe- oder (Fe + Cu)-Zusatz neigte die Pilzdecke dazu, ringförmig die Glaswand berührend sich zu entwickeln, was alles darauf hinzudeuten scheint, dass die Kolben noch grössere Mengen ihrer Glaswandsubstanz, so z.B. Zn, durch die längere Erhitzung in die Kulturlösung gehen lassen. Im Gegensatz dazu wuchs der Pilz bei Terex fast unabhängig von der Sterilisationsdauer im Bereich von 5–60 Minuten. Wir möchten bei den weiteren Versuchen die 5–20 Minuten lange Sterilisation bei 100°C im Dampftopf zur Ausführung bringen. Ebenfalls hat ROBERG (1928) schon eine so kurze Sterilisation, wie von 5 Minuten, empfohlen.

Zusammenfassung des Adsorptionsverfahrens mit Ca-Phosphat

Wir möchten die brauchbare Methodik des Adsorptionsverfahrens mit Ca-Phosphat folgendermassen zusammenfassen:

1. Die Salzkonzentration der Kulturlösung entspricht der Hälfte derjenigen der PFEFFERschen Lösung, und die Glukosekonzentration beträgt m/8 oder m/4.
2. Das mit Glasdestillierapparat umdestillierte Wasser wird gebraucht.
3. Fünfzig g Ca-Phosphat wird in 1000 ccm umdestilliertem Wasser suspendiert, und die Suspension wird 5 Stunden lang geschüttelt. Während dieses Waschverfahrens wird Wasser viermal gewechselt, und nach der Filtration Ca-Phosphat unter Verwendung aschenfreien Filtrierpapiers(1) luftgetrocknet.
4. Die Kulturlösung wird mit 0.5% Ca-Phosphat versetzt und mittels NaOH auf pH 5.5 gebracht. Das Adsorptionsverfahren geschieht 2 Stunden lang auf dem Schüttelapparat. Die Suspension zweimal filtriert, und das Filtrat, dessen pH-Wert meistens 5.7 beträgt, kommt fertig zum Gebrauch als die Kulturlösung.
5. Kulturgefäss muss kein Zink enthalten und auch keine anderen Schwermetalle in die Lösung gehen lassen. Bei uns ist z.B. Terex Glas brauchbar für diesen Zweck.
6. Je nach dem Versuchszweck wird eine bestimmte gemessene Menge der Schwermetalle in die Kulturlösung zugesetzt.
7. Keine Trockensterilisation des Kulturgefässes. Die Dampfsterilisation der Kulturlösung im Kulturgefäss dauert 20 Minuten bei 100°C im Dampftopf.

Mögliche Grenze der Befreiung der Kulturlösung von Schwermetallen

Inwieweit die Kulturlösung der oben zusammenfassend erwähnten Methode gemäss von Schwermetallen befreit werden kann, ist in folgendem Versuche zu ersehen.

Versuch 10

Kulturgefässe bestanden aus Terex Glas. Sterilisationsdauer: 20 Minuten. Die Konzentration von drei Schwermetallen blieb

(1) Z.B. Toyo Filtrierpapier Nr. 7.

konstant und ein anderes Schwermetall wurde in variierter Menge zugesetzt. Die Versuchsanordnung war sonst gleich wie im Versuch 9. (Tabelle 15, 16 und 17).

Tabelle 15

Zn-Zusatz	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	3.4	+	0.038
10^{-9}	3.4	+	0.040
10^{-8}	3.4	+	0.036
10^{-7}	3.2	+	0.119
10^{-6}	2.0	+++	0.708
10^{-5}	1.9	+++	0.755

Tabelle 16

Cu-Zusatz	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)
—	2.1	+*	0.615
10^{-9}	2.2	+*	0.502
10^{-8}	2.3	+*	0.496
10^{-7}	2.1	++§	0.672
10^{-6}	2.0	+++	0.754
10^{-5}	2.0	+++	0.775

* Braune Konidien.
§ Bräunlich-schwarze Konidien.

Tabelle 17

Mn-Zusatz	End-pH	Konidien	Pilzgewicht (g)	Pilzdecke
—	3.4	++	0.628	faltig
10^{-9}	3.4	++	0.682	,,
10^{-8}	3.4	++	0.659	,,
10^{-7}	3.2	++	0.736	,,
10^{-6}	2.0	+++	0.779	schwach faltig
10^{-5}	1.9	+++	0.737	glatt

Die Beseitigung der Schwermetalle in der Kulturlösung erfolgte nach unserer Methode in dem Mass, dass *Aspergillus niger* die zugesetzten Schwermetalle in folgenden Konzentrationen empfinden konnte:

Fe 10^{-7}mol (nach dem Pilzgewicht)
Zn 10^{-7}, deutlicher 10^{-6}mol (nach dem Pilzgewicht)
Cu 10^{-7}mol (nach der Konidienfarbe)
Mn 10^{-6}mol (nach der Kugelzellbildung(1) und der Faltung der Pilzdecke)
Das Pilzgewicht bei der schwermetallfreien Kultur: 0.001–0.004 g.

Am Ende sei kurz die Rede von den polarographischen Untersuchungen über den Effekt des Adsorptionsverfahrens mittels Ca-Phosphat. Die polarographische Kurve zeigte, dass Ca-Phosphat keine merklich wirksame Substanz in auffälliger Menge abgibt und dass das Adsorptionsverfahren damit die Kulturlösung reinigen kann (Fig. 1, B). Hier ersieht man z.B. das Sinken der Kurve an der Ort, die der mit ↓ bezeichneten Stelle der Kurve A entspricht; was wahrscheinlich auf die Beseitigung von Zn hindeutet.

Der Stiftung Hattori Hôkôkwai sind wir für die Unterstützung unserer Arbeiten zu grösstem Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis

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

GOLLONICK, F. (1936): Der Einfluss von Zink, Eisen, Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von *Aspergillus niger*. Centralbl. f. Bakt., Abt. II. **93**.

HOPKINS, E. F. (1934): Manganese an essential element for green plants. Memoir of Cornell Univ., Agr. Exp. Station. **51**.

LOHMANN, G. (1934): Nährstoffwirkung und Giftwirkung bei *Aspergillus niger*. Arch. f. Mikrobiol., **5**.

REIMAN, C. K. and MINOT, A. S. (1920): A method for manganese quantitation in biological material together with data on the manganese content of human blood and tissues. Journ. Biol. Chem., **42**.

(1) Dies wurde bei vielen anderen Versuchen bestätigt gefunden.

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

SAKAMURA, T. (1934): Ammonio- und Nitratophilie bei *Aspergillus oryzae* im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen. Journ. Fac. Science, Hokkaido Imp. Univ. Series V., **3**.

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. Seres V, **2**.

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**.

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**.