



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ueber die Ammoniak- und Nitrataufnahme bei <i>Aspergillus oryzae</i> , mit besonderer Rücksicht auf die Wirkung einiger Schwermetalle und Zuckerarten
Author(s)	SAKAMURA, Tetsu
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 5(1), 177-239
Issue Date	1941
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26256
Type	departmental bulletin paper
File Information	4(5)_P177-239.pdf



Ueber die Ammoniak- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus oryzae*, mit besonderer Rücksicht auf die Wirkung einiger Schwermetalle und Zuckerarten

Von

TETSU SAKAMURA

Einleitung

Es ist eine schon bekannte Tatsache, daß bei der Ammonium-nitratkultur von *Aspergillus oryzae* der pH-Wert der Nährlösung während der Kultur je nach den Bedingungen entweder bis auf 2,0 sich erniedrigt oder diese pH-Abnahme bald sich unterbricht und der Wert wieder zu steigen beginnt. Der Einfachheit halber sei der pH-Rückgang im letzteren Fall unten als „pH-Umkehr“ bezeichnet. Daß die pH-Veränderung der Nährlösung hauptsächlich auf ungleicher Aufnahme des durch Hydrolyse von Ammoniumnitrat entstandenen Basen- und Säureanteils beruht, ist aus meiner früheren Arbeit (1930) ersichtlich. Es ist seinerzeit auch festgestellt worden, daß diese zweierlei pH-Verläufe einerseits von der Eigentümlichkeit des Pilzes selbst, andererseits von der Kulturbedingung abhängig sind, so z. B. von der Eigenschaft des als C-Quelle benutzten Zuckers. Wenn Glukose als C-Quelle verwendet wurde, sank der pH-Wert immer niedriger bis auf 2,0, während die pH-Umkehr geschah, wenn Fruktose oder Saccharose zur Verwendung kam. Zu jener Zeit war aber nicht entschieden, ob die bei pH-Veränderung sichtbare Stammeigentümlichkeit des Pilzes von der ~~Bedingung~~ der Vorkultur abhändig oder von erblicher Natur sei. Nach einigen Jahren wurde von mir (1934) gefunden, daß Fe-Zusatz zur Kulturlösung, die durch das Adsorptionsverfahren mit Carbo medicinalis MERCK von Verunreinigungen gesäubert ist, die pH-Umkehr hervorruft, während Fe unter Mitwirkung von Cu einseitig nur die pH-Erniedrigung verursacht. Bemerkenswert ist auch, daß die Eigenschaft des

Pilzes, die dazu neigt, den pH-Wert zu erniedrigen, durch wiederholte Vorkultur durch mehrere Generationen unter Zusammenwirken von Fe und Cu verstärkt und mittels des Konidiums auf die folgende Kultur übertragen wird.

Ausgehend aus der oben geschilderten Tatsache, schien es mir wichtig, auch die Möglichkeit der Wirkung anderer Schwermetalle in dieser Richtung zu untersuchen, vor allem von Zn und Mn, die heute für die Pilzkultur als notwendig betrachtet werden. Da aber die Schwermetalle schon in Spuren bei der Pilzkultur wirksam sind und sie gewöhnlich in den als Nährstoff benutzten Chemikalien als Verunreinigungen vorkommen, ist es in erster Linie notwendig, treffliche Reinigungsmethode zu ermitteln. In der anderen Arbeit (1936) habe ich mittels des Polarographs nachgewiesen, daß die mit Kohle behandelte Kulturlösung noch Mn und andere unbekannte Stoffe in Spuren enthält, die von der Kohle abgegeben werden oder darin zurückbleiben dürften. Es war mir also klar geworden, daß die Kohlenbehandlung, selbst unter Verwendung von Carbo medicinalis MERCK, zum Zwecke der Befreiung der Nährlösung von Schwermetallspuren nicht geeignet ist. Diese Sachlage veranlaßte mich, andere Adsorptionsmittel zu suchen, und zuletzt wurde Calciumphosphat zu diesem Zwecke als brauchbar nachgewiesen.¹⁾ Die ausführliche Schilderung der Adsorptionsmethode und der Herstellung der Nährlösung befindet sich in meiner früheren Arbeit (1936).

Durch diese verbesserte Methode wurden eingehendere Untersuchungen über die Abhängigkeit der während der Kultur stattfindenden pH-Veränderung von der Schwermetallwirkung an *Aspergillus oryzae* erneut unternommen, zugleich mit Berücksichtigung der Eigenschaft des Zuckers, die schon vom mir (1930) als wichtiger Faktor erwiesen worden war. Da, wie schon erwähnt wurde, die pH-Veränderung hauptsächlich auf der ungleichen Aufnahme des Basen- und Säureanteils von Ammoniumnitrat beruht, beziehen sich die vorliegenden Untersuchungen auf die Erklärung des Mechanismus der Salzabsorption in die Zelle. Zum Vergleich wurden daher auch die Kulturversuche mit alleiniger N-Quelle, so z. B. mit Ammoniumsulfat oder Natriumnitrat ausgeführt.

1) Die Ca-Ionen, die möglicherweise in der Nährlösung in geringer Menge vorkommen, wirken auf das Pilzwachstum nicht spezifisch.

Methoden

Die Kultur geschah in großen Zügen gleich meiner früheren Arbeit (1936), und die Nährlösung besaß folgende Zusammensetzung:

NH_4NO_3 (MERCK's Reagens)	5 g
KH_2PO_4 (nach SÖRENSEN für Puffergemisch, SCHERING-KAHLBAUM)	2,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (zur Analyse mit Garantieschein, KAHL- BAUM)	1,25 g
Glukose (TAKEDA)	45 g (m/4)
Umdestilliertes Wasser	1000 ccm

Diese Lösung ist im folgenden als „Standardlösung“ bezeichnet. Je nach Bedürfnis wurden folgende Salze und Zucker als N- bzw. C-Quelle anstatt des Ammoniumnitrats und der Glukose je in äquivalenter Menge in 1000 ccm Lösung gelöst:

KNO_3	6,81 g
NaNO_3	5,80 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7,37 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,12 g
Fruktose (MERCK)	45 g (m/4)
Saccharose (MERCK)	42,78 g (m/8) ¹⁾

Die benutzten Schwermetallsalze waren FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 und CuSO_4 . Die Mengenverhältnisse wurden in molarer Konzentration ausgedrückt. Wenn es notwendig ist, kann die in 100 ccm Lösung enthaltene Menge jedes Schwermetalls aus der molaren Konzentration umgerechnet werden. Alles Wasser wurde in einem aus Terex-Glas bestehenden Destillationsapparat umdestilliert.

Vor dem Schwermetallzusatz wurde die Kulturlösung mit 0,5% Calciumphosphat als Adsorptionsmittel versetzt und mittels NaOH auf pH 5,5 gebracht. Das Adsorptionsverfahren geschah zwei Stunden lang auf einem Schüttelapparat. Die Suspension von Calciumphosphat wurde zweimal filtriert, und das Filtrat, dessen pH-Wert bei der NH_4NO_3 - oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Kultur 5,7 und bei der NaNO_3 - oder KNO_3 -Kultur 5,5 betrug, kam als fertige Nährlösung zum Gebrauch. Als Kulturgefäße dienten Terex ERLÉNMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt, die keine Zink enthalten und auch keine

1) Mit Rücksicht auf die totale Inversion wurde die Saccharosemenge auf die Hälfte derjenige der Glukose reduziert.

anderen Schwermetalle in die Lösung gehen lassen. Je nach dem Versuchszweck wurden die Schwermetallsalze von bestimmten gemessenen Mengen in die Kulturlösung zugesetzt¹⁾. Keine Trockensterilisation der Kulturgefäße fand statt. Die Kulturkolben wurden mit je 100 ccm Nährlösung beschickt, und deren Dampfsterilisation dauerte 20 Minuten bei 100°C im Dampftopf.

Die Befreiung der Nährlösung von Schwermetallen erfolgte nach dieser Methode in dem Maß, daß *Aspergillus oryzae* die zugesetzten Schwermetalle in der Konzentration 10^{-7} mol empfinden konnte.

Der Pilzstamm war *Aspergillus oryzae* 65, der auch in meinen früheren Arbeiten benutzt worden war. Die Vorkultur geschah mindestens durch 100 Generationen auf festen 2% Agarböden der einmal von Schwermetallen befreiten Standardlösung, in der allerdings Fe und Zn von je 10^{-6} mol zugesetzt wurden. Bei den Versuchen wurden Konidien mit einer Platinöse von dem auf festen Agarböden gewachsenen Mycel entnommen und dreimal in 20 ccm sterilisiertes Wasser suspendiert. Je 1 ccm Konidiensuspension wurde mit einer sterilisierten Pipette in jedes Gefäß übergeimpft. Nach der Aussaat wurde die Kulturen in den Thermostat gestellt und die Temperatur auf 30°C reguliert.

Der pH-Wert der Kulturlösung wurde mit Hilfe der Indikatoren von CLARK und LUBS bestimmt. Die Kulturflüssigkeit wurde mit samt der Pilzmasse durch Filtrierpapier von bekanntem Gewicht filtriert. Das Filtrat, von dem ein Teil zur Bestimmung des pH-Wertes benutzt wurde, und das Waschwasser wurden vereint, weiter auf 500 ccm verdünnt und dann der Analyse unterworfen.

Die Zuckerbestimmung wurde nach der BERTRAND-Methode ausgeführt. Bei der Saccharosekultur wurde der Zucker mit Säure invertiert und alles in der Menge der reduzierenden Zucker angegeben. Ammoniak wurde nach Mikro-KJEHLDAHL bestimmt. Die Nitratbestimmung geschah nach der Phenoldisulfonsäuremethode. Wie in meiner früheren Arbeit (1930) konstatiert wurde, kann diese Methode für unseren Zweck praktisch als brauchbar betrachtet werden, und übt der Gehalt an Zucker keinen Einfluß auf diese Farbenreaktion aus, obwohl die Frage entstehen dürfte, ob die

1) Die Stammlösungen der Schwermetallsalze wurden kurz vor dem Zusatz in die Kulturlösung bereitet, weil die Konzentration der Schwermetalle, zumal von Zn, während der Reservierung zu allmählicher Abnahme neigt, was wahrscheinlich auf die Adsorption an dem Glaswand zurückzuführen ist.

Bestimmung in Gegenwart von Fruktose oder Glukose durch ihre Kalamerisationsfarbe gestört werde. Die Kalium-Bestimmung erfolgte im Prinzip nach der Methode von KRAMER und TISDALLS. Die Ammoniak-, Nitrat- und Kaliummenge in der Nährlösung wurde durch die Molarität ausgedrückt. In den Tabellen wurden die Mengen dieser Stoffe angegeben, die in der Nährlösung vorhanden waren.

Ammoniumnitrat-Kultur

I. Wirkung der Schwermetalle.

Die Glukose(m/4) enthaltende Standardlösung wurde hauptsächlich für die Kultur benutzt, sofern nichts anderes erwähnt wird. Anfangs-pH: 5,7.

1. Eisen.

VERSUCH 1

Schwermetalle: Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 10^{-5} mol. (Tabelle 1).

Tabelle 1

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,4	0,353	+
2	6	2,6	0,385	+
3	6	2,6	0,402	+
1	8	2,1	0,551	+
2	8	2,4	0,643	+
3	8	2,6	0,687	+
1	12	2,1	0,647	+
2	12	2,7	0,929	+
3	12	2,8	0,978	+

In diesem Versuch wurden vier Arten des Schwermetalls in willkürlicher Konzentration kombiniert gegeben. Je größer die Konzentration von Fe war, desto merklicher fand die pH-Umkehr statt und desto üppiger war das Pilzwachstum. Wie schon in meiner früheren Arbeit bemerkt wurde, muß die Wirkung jedes Schwermetalls nicht unabhängig von derjenigen von anderen beurteilt werden. Dies gilt auch in dem vorliegenden Fall, wenn die Bedeutung der Schwermetalle für die pH-Umkehr untersucht wird. Da

aus den vorläufigen Versuchen¹⁾ klar ersehen werden konnte, daß Zn und Cu dazu neigen, die pH-Umkehr bei der NH_4NO_3 -Kultur zu verhindern, wurden folgende Versuche über die Rolle von Fe mit Rücksicht darauf ausgeführt.

VERSUCH 2

Um die pH-Umkehr zu erleichtern, wurde Cu bei der Herstellung der Nährlösung ausgeschlossen und die Zn-Menge möglichst vermindert.

Schwermetalle: Zn 5×10^{-7} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 5×10^{-7} mol, (2) Fe 10^{-6} mol, (3) Fe 5×10^{-6} mol. (Tabelle 2).

Tabelle 2

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	5	3,1	0,598	+
2	5	3,0	0,332	+
3	5	3,0	0,310	+
1	8	3,1	0,695	+
2	8	3,0	0,642	+
3	8	3,4	0,624	+
1	12	3,2	0,675	+
2	12	3,7	0,810	+
3	12	4,1	1,055	+

Wie später in Versuch 6 dargetan wird, begünstigte Zn von dieser Konzentration die pH-Umkehr, unabhängig von der Fe-Konzentration. Wenn diese vermehrt wurde, ging die pH-Umkehr um so leichter vor sich und wuchs der Pilz um so üppiger.

VERSUCH 3

Schon in meiner früheren Arbeit (1930) war es analytisch bewiesen worden, daß die pH-Veränderung bei der NH_4NO_3 -Kultur hauptsächlich auf der ungleichen Aufnahme des Basen- und Säureanteils dieses Salzes, nämlich von Ammoniak und von Nitrat, beruht. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Restmenge von diesen beiden Anteilen in der Nährlösung bei einigen Versuchen bestimmt und daraus das Verhältnis $[\text{NH}_3] : [\text{NO}_3]$ berechnet. Wenn das Ver-

1) Die Einzelheiten der Ergebnisse davon sind hier nicht angegeben.

hältnis mehr als eins beträgt, ist es nicht unberechtigt anzunehmen, daß Nitrat in relativ großer Menge aufgenommen werde¹⁾.

Schwermetalle: Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 2×10^{-6} mol, (2) Fe 2×10^{-5} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0621 mol. NH_3 : 0,062 mol. (Tabelle 3).

Tabelle 3

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	$\text{NH}_3 : \text{NO}_3$
1	6	2,5	0,380	3225	0,0455	0,0533	0,8536
2	6	2,8	0,393	3175	0,0468	0,0509	0,9114
1	9	2,5	0,479	2225	0,0397	0,0533	0,7261
2	9	3,8	0,679	2000	0,0409	0,0433	1,1957
1	12	2,4	0,798	1375	0,0349	0,0509	0,6858
2	12	3,9	0,892	1150	0,0388	0,0375	1,0347

Der Versuch zeigte, daß der Zusatz von Fe in großer Menge die Absorption von Nitrat fördert. Bei der Kultur, wo Fe in 2×10^{-5} mol gegeben wurde, stieg das Verhältnis $[\text{NH}_3] : [\text{NO}_3]$ oft über eins an, was natürlich eine relativ große Aufnahme von Nitrat bedeutet.

VERSUCH 4

In der vorliegenden Arbeit wurde überhaupt FeSO_4 als Fe-Quelle verwendet. Es wäre nicht unerforderlich zu entscheiden, ob auch $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ dieselbe Wirkung auf die pH-Umkehr und das Pilzwachstum ausüben könne.

Schwermetalle: Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 2×10^{-5} mol, (2) Fe 2×10^{-5} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0624 mol. NH_3 : 0,0624 mol. (Tabelle 4).

Tabelle 4

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	$\text{NH}_3 : \text{NO}_3$
1	6	3,4	0,349	3050	0,0485	0,0480	1,0104
2	6	2,8	0,362	3400	0,0467	0,0541	0,8632
1	9	4,0	0,533	2750	0,0433	0,0419	1,0334
2	9	4,0	0,716	2400	0,0430	0,0411	1,0481
1	11	4,0	0,926	2075	0,0411	0,0400	1,0275
2	11	4,0	1,123	1825	0,0411	0,0400	1,0275
1	14	4,0	0,977	1550	0,0397	0,0387	1,0258
2	14	4,0	1,194	800	0,0388	0,0380	1,0211

1) Es bedeutet aber nicht immer, daß Nitrat mehr als Ammoniak absorbiert werde. Siehe unten.

Bis am 6ten Tag neigte der pH-Wert bei der Ferro-Kultur zu etwas größerer Höhe als bei der Ferri-Kultur, aber nach dem 9ten Tag geschah die pH-Umkehr bei dieser ebenso stark wie bei jener. Daß die Neigung der pH-Aenderung hauptsächlich auf das Verhältnis zwischen der Ammoniak- und Nitrataufnahme zurückzuführen ist, ist aus der Größe des Verhältnisses $[\text{NH}_3]:[\text{NO}_3]$ ersichtlich. Der kleinere pH-Wert bei der Ferri-Kultur im früheren Stadium scheint dahin zu deuten, daß Fe^{++} für die Nitrataassimilation stärker wirksam als Fe^{+++} und die Reduktion von Fe^{+++} dafür erforderlich sei. Das Wachstum war immer bei der Ferri-Kultur größer als bei der Ferro-Kultur.

2. Zink.

Einige vorläufige Versuche zeigten, daß Zn von einer Konzentration unter 10^{-6} mol die pH-Umkehr verursacht, aber über 10^{-6} mol dieses Metall den pH-Wert einseitig nach und nach erniedrigt. In folgenden Versuchen wurde geprüft, in welchem Ausmaß die pH-Veränderung, also das Verhältnis $[\text{NH}_3]:[\text{NO}_3]$ durch Zn von variierter Konzentration beeinflusst wird.

VERSUCH 5

Schwermetalle: Fe und Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 10^{-6} mol, (2) Zn 5×10^{-6} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0626 mol. NH_3 : 0,063 mol. (Tabelle 5).

Tabelle 5

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	$\text{NH}_3:\text{NO}_3$
1	5	3,0	0,199	3900	0,0467	0,0457	1,0218
2	5	2,3	0,296	3400	0,0426	0,0536	0,7957
1	7	2,4	0,400	3075	0,0420	0,0493	0,8519
2	7	2,2	0,390	2875	0,0395	0,0549	0,7195
1	9	2,3	0,560	2475	0,0371	0,0432	0,8564
2	9	2,1	0,542	2075	0,0333	0,0495	0,6727
1	12	2,1	0,821	2275	0,0312	0,0522	0,6724
2	12	1,9	0,612	1950	0,0312	0,0464	0,5934

VERSUCH 6

Schwermetalle: Fe und Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 5×10^{-7} mol. (2) Zn 5×10^{-6} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0624 mol. NH_3 : 0,0625 mol. (Tabelle 6).

Tabelle 6

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	3,2	0,268	3525	0,0458	0,0453	1,0110
2	6	2,2	0,366	3075	0,0390	0,0445	0,8764
1	9	3,9	0,595	2925	0,0411	0,0368	1,1168
2	9	2,2	0,493	2550	0,0351	0,0421	0,8346
1	12	4,3	0,768	2625	0,0444	0,0396	1,1212
2	12	2,1	0,640	2038	0,0276	0,0400	0,6900
1	14	4,3	0,910	2025	0,0424	0,0366	1,1132
2	14	2,0	0,699	1775	0,0267	0,0426	0,6314

Diese zwei Versuche ergaben, daß die von Zn-Konzentration abhängige pH-Veränderung gleich verläuft wie bei den vorläufigen Versuchen und sie durch die vorzügliche Aufnahme entweder von Ammoniak oder von Nitrat bedingt wird. Bemerkenswert war auch, daß um so besser das Pilzwachstum geschieht, je niedriger die Zn-Konzentration liegt, und zwar in den späteren Stadien, trotzdem dieses Metall für das Gedeihen des Pilzes als unentbehrlich bewiesen ist.

3. Mangan.

Nach BURSTRÖM (1939 a, b, 1940) soll für die Nitrataufnahme durch Weizenwurzel und nach NOACK und PIRSON (1940) für die Nitrataufnahme von *Chlorella Mn* katalytisch eine wichtige Rolle spielen, während dem oftmals erwähnten Eisen derartige Funktion fehlt. Wäre dies auch bei *Aspergillus oryzae* gültig, so wäre nicht ausgeschlossen, daß Mn den pH-Verlauf beeinflußt.

VERSUCH 7

Um die pH-Umkehr klar sichtbar zu machen, wurde Cu nicht benutzt und Zn nur in einer niedrigen Konzentration verwendet.

Schwermetalle: Fe 2×10^{-6} mol. Zn 10^{-6} mol. Kultur: (1) Mn 2×10^{-6} mol, (2) Mn 2×10^{-5} mol. Zucker: 4500 mg. NO₃:0,0624 mol NH₃:0,0624 mol. (Tabelle 7).

Obwohl der pH-Wert nicht extrem sank, ließ sich keine pH-Umkehr in beiden Zn-Konzentrationen erkennen. Das Verhältnis [NH₃]:[NO₃] war gleichwertig bei beiden Kulturen, aber das Wachstum ergab sich besser bei Zusatz von Mn in größerer Menge.

Tabelle 7

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	3,0	0,293	3550	0,0480	0,0456	1,0626
2	6	2,6	0,356	3000	0,0463	0,0517	0,8955
1	9	2,4	0,558	2700	0,0428	0,0525	0,8152
2	9	2,5	0,531	2700	0,0424	0,0520	0,8154
1	12	2,4	0,684	2075	0,0391	0,0458	0,8539
2	12	2,5	0,737	1975	0,0397	0,0458	0,8668
1	14	2,6	0,777	1175	0,0377	0,0458	0,8227
2	14	2,4	0,857	1225	0,0372	0,0466	0,7982

Aus diesem Ergebnis ist es kaum möglich, unter anderem Mn für die Nitratassimilation oder -aufnahme als besonders unentbehrlich zu betrachten. Derartige Folgerung wäre wahrscheinlich auch aus dem Ergebnis von Versuch 33 zu ziehen.

4. Kupper.

Eine Reihe von vorläufigen Versuchen zeigte, daß Cu das Mycelwachstum sowie die vollständige Konidienbildung bei *Aspergillus oryzae* fördert, aber nicht berechtigt, ihn als unbedingt notwendiges Element zu betrachten.

VERSUCH 8

Schwermetalle: Fe und Mn 2×10^{-6} mol. Zn 10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 5×10^{-6} mol. Zucker: 4500 mg. NO₃: 0,0625 mol. NH₃: 0,0625 mol. (Tabelle 8).

Tabelle 8

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	3,0	0,025	3750	0,0499	0,0456	1,0943
2	6	2,4	0,302	3500	0,0465	0,0525	0,8846
1	8	2,4	0,350	3275	0,0410	0,0506	0,8102
2	8	2,2	0,453	2700	0,0391	0,0525	0,7371
1	10	2,2	0,548	2525	0,0407	0,0528	0,7708
2	10	2,1	0,600	2125	0,0327	0,0522	0,6264
1	13	2,2	0,581	1925	0,0359	0,0461	0,7787
2	13	2,0	0,662	1550	0,0273	0,0454	0,6012

Fe und Zn wurden in derjenigen Konzentration verwendet, die die pH-Umkehr nicht erlaubt. Die Neigung zu einseitiger pH-

Abnahme wurde durch Zusatz von Cu weiter verstärkt, und das Pilzwachstum wurde dabei beschleunigt.

VERSUCH 9

Schwermetalle: Fe 2×10^{-5} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Zn 10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 5×10^{-6} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0624 mol. NH_3 : 0,0624 mol. (Tabelle 9).

Tabelle 9

Kul- tur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH_3 : NO_3
1	6	3,1	0,343	3500	0,0478	0,0493	0,9693
2	6	2,5	0,417	3275	0,0455	0,0507	0,8974
1	7	3,6	0,462	2925	0,0462	0,0429	1,0769
2	7	2,5	0,584	2750	0,0434	0,0488	0,8893
1	10	3,9	0,777	2000	0,0427	0,0391	1,0921
2	10	2,6	0,931	1625	0,0378	0,0488	0,7745
1	13	4,0	0,877	1150	0,0407	0,0400	1,0175
2	13	2,6	1,051	178	0,0344	0,0454	0,7575

Wie schon aus den früheren Versuchen ersichtlich ist, kann Fe in dieser hohen Konzentration die pH-Umkehr hervorrufen. Ohne Cu ging diese Umkehr sehr deutlich vor sich, und die Aufnahme von Nitrat überwog diejenige von Ammoniak. Die Verwendung von Cu verhinderte die pH-Umkehr, verkleinerte das Verhältnis $[\text{NH}_3]:[\text{NO}_3]$, aber verbesserte das Pilzwachstum.

VERSUCH 10

Schwermetalle: Fe 2×10^{-6} mol. Zn 5×10^{-7} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 2×10^{-6} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0624 mol. NH_3 : 0,0624 mol. (Tabelle 10).

Tabelle 10

Kul- tur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH_3 : NO_3
1	6	3,4	0,213	3750	0,0537	0,0535	1,0037
2	6	3,3	0,180	3775	0,0520	0,0535	0,9719
1	10	3,9	0,401	3225	0,0503	0,0488	1,0309
2	10	3,5	0,376	3150	0,0492	0,0480	1,0250
1	14	3,9	0,576	2625	0,0463	0,0453	1,0221
2	14	3,2	0,383	2450	0,0414	0,0480	0,8625

Die Zn-Menge wurde so vermindert, daß die pH-Umkehr geschehen konnte. Beim Fehlen von Cu fand die pH-Umkehr statt, während unter dessen Verwendung diese Umkehr je nach seiner Konzentration mehr oder weniger stark gehemmt wurde und das Pilzwachstum abnahm.

Aus den obigen Versuchen kann man schließen, die Einwirkung von Cu auf die pH-Veränderung bestehe darin, daß die Tendenz des pH-Verlaufs, woran in erster Linie Fe und Zu von bestimmter Konzentration schuldig sind, durch Zusatz von Cu modifiziert wird. Das Mycelwachstum wird durch die Verwendung von Cu nicht immer begünstigt, weil verschiedene sekundäre Effekte infolge des pH-Sinkens auftreten.

II. Wirkung der Zuckerarten.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, habe ich in meiner früheren Arbeit (1930) gefunden, daß Glukose die pH-Erniedrigung und Saccharose und Fruktose die pH-Umkehr bei der Kultur von *Aspergillus oryzae* verursachen. Damals war die Bedeutung der Schwermetalle für die pH-Veränderung ganz unbekannt, und daher wurden die Versuche ohne Rücksicht darauf ausgeführt. Es ist jetzt klar, daß die Schwermetalle in dieser Beziehung nicht mehr vernachlässigt werden dürfen. Da der Zweifel aber nicht ausgeschlossen ist, ob der erwähnte Unterschied je nach der Zuckerart auf das mögliche Vorkommen der mit Zucker vermischten Schwermetallspuren zurückzuführen sei, ist es jetzt notwendig, die Ergebnisse der früheren Versuche unter Verwendung der verbesserten Reinigungsmethode der Nährlösung nachzuprüfen, um zu sehen, ob die Zucker tatsächlich je nach ihren Eigenschaften bezüglich der Ammoniak- und Nitrataufnahme sich verschieden verhalten.

VERSUCH 11

Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Fruktose m/4, (3) Saccharose m/8. Zucker: 4500 mg NO_3 :0,0622 mol. NH_3 :0,0624 mol. (Tabelle 11).

Kein merklicher Unterschied des Wachstums war zwischen der Glukose- und Fruktosekultur ersichtlich, und der pH-Wert sank immer niedriger bis auf 2,0 oder 2,1 bei beiden Kulturen¹⁾. Im

1) Der pH-Wert neigte allerdings bei der Fruktosekultur zu etwas höherer Zunahme als bei der Glukosekultur.

Tabelle 11

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	2,1	0,478	3050	0,0382	0,0498	0,7671
2	6	2,2	0,490	3000	0,0399	0,0493	0,8093
3	6	3,5	0,661	2700	0,0422	0,0400	1,0550
1	9	2,0	0,595	2625	0,0295	0,0421	0,7007
2	9	2,1	0,551	2675	0,0347	0,0479	0,7301
3	9	4,1	1,018	1300	0,0314	0,0314	1,2194
1	11	2,0	0,633	2350	0,0290	0,0400	0,7250
2	11	2,1	0,565	2325	0,0337	0,0464	0,7263
3	11	4,1	1,071	1350	0,0358	0,0280	1,2783

Gegensatz dazu kamen in der Saccharosekultur die pH-Umkehr und die überwiegende Aufnahme von Nitrat zum Vorschein, und das Mycelwachstum war merklich üppiger als bei den zwei anderen Zuckerarten. In meiner früheren Arbeit (1930) fand die pH-Umkehr beträchtlicher bei der Fruktosekultur statt als bei der Saccharosekultur, aber jetzt trat ein umgekehrtes Verhältnis auf. Um zu sehen, ob dieser Unterschied auf der verschiedenen Fabrikation des Zuckers beruhe, wurde der folgende Versuch ausgeführt unter Verwendung von Fruktose aus einer anderer Fabrik (TAKEDA), während in der vorliegenden Arbeit für alle übrigen Versuche nur Fruktose von MERCK benutzt wurde.

VERSUCH 12

Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Fruktose (TAKEDA) m/4, (3) Saccharose m/8. Zucker: (1) 4500 mg, (2) 4300 mg, (3) 4500 mg. NO₃: 0,0624 mol. NH₃: 0,0625 mol. (Tabelle 12).

Tabelle 12

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	2,1	0,513	2900	0,0363	0,0506	0,7154
2	6	2,4	0,483	2800	0,0361	0,0470	0,7689
3	6	3,7	0,567	2550	0,0415	0,0437	0,9496
1	8	2,1	0,578	2450	0,0312	0,0508	0,6157
2	8	2,2	0,579	2200	0,0318	0,0453	0,7019
3	8	4,0	0,856	2000	0,0365	0,0353	1,0341
1	11	2,1	0,632	1975	0,0288	0,0461	0,6249
2	11	2,1	0,622	1900	0,0292	0,0400	0,7030
3	11	4,1	1,142	1125	0,0324	0,0316	1,0253

Der Versuch ergab sich gleich wie Versuch 11, also ist der Unterschied der Ergebnisse zwischen der früheren und vorliegenden Arbeit auf andere Ursachen zurückzuführen als auf die Verschiedenheit der Fabrikation.

Es ist eine nötige Maßregel, gleichzeitig auch die Wirkung der Schwermetalle zu berücksichtigen, wenn die Bedeutung der Zuckerarten für die Ammoniak- und Nitrataufnahme studiert wird, und zwar kann dadurch die Rolle der Schwermetalle in dieser Richtung festgestellt werden. In einer Reihe von Versuchen wollen wir uns im folgenden mit dieser Frage beschäftigen.

VERSUCH 13

Schwermetalle: Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Cu 5×10^{-6} mol. Fe (A) 10^{-6} mol, (B) 2×10^{-5} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Saccharose m/8, (Tabelle 13).

Tabelle 13

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
A1	6	2,3	0,453	+
A2	6	2,9	0,440	+
B1	6	2,4	0,575	+
B2	6	3,4	0,540	+
A1	9	2,2	0,408	+
A2	9	3,4	0,690	+
B1	9	2,5	0,881	+
B2	9	3,8	0,751	+
A1	13	2,0	0,664	+
A2	13	3,7	0,858	+
B1	13	2,9	1,198	+
B2	13	3,8	0,949	+

Während die Vermehrung der Fe-Konzentration erfolgreich die pH-Umkehr bei der Glukosekultur verursacht, kam die besondere Wirkung von Fe bei der Saccharosekultur nicht deutlich zum Vorschein, wo eigentlich die Neigung zur pH-Umkehr bestand. Bei hoher Konzentration von Fe ergab sich ein besseres Wachstum bei Glukose als bei Saccharose, aber bei kleiner Konzentration von Fe herrschte ein umgekehrtes Verhältnis. Die merkliche Verbesserung des Wachstums bei der Glukosekultur im letzteren Fall erfolgte vielleicht infolge gesteigerter Nitrataufnahme.

VERSUCH 14

Saccharose m/8. Schwermetalle: Fe, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 5×10^{-7} mol, (2) Zn 5×10^{-6} mol. (3) Zn 10^{-5} mol. (Tabelle 14).

Tabelle 14

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	3,2	0,276	+
2	6	3,0	0,700	+
3	6	3,0	0,753	+
1	9	3,4	0,440	+
2	9	3,6	1,200	+
3	9	3,6	1,103	+
1	13	3,2	0,593	+
2	13	4,4	1,354	+
3	13	4,2	1,323	+

Bei der Saccharosekultur war auch die für die pH-Umkehr spezifische Wirkung von Zn von geringer Konzentration durch diejenige des Zuckers verdeckt, und sie trat kaum deutlich auf. Der Pilz wuchs um so üppiger, je stärker die Konzentration von Zn vermehrt wurde, ohne das Optimum zu überschreiten.

VERSUCH 15

Die Wirkung von Cu wurde untersucht.

Schwermetalle: Fe 10^{-6} mol. Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 5×10^{-6} mol. Zucker: (A) Glukose m/4, (B) Fruktose m/4, (C) Saccharose m/8. (Tabelle 15).

Bei der Glukosekultur sollte diese Kombination der Metalle, ungeachtet des Fehlens des Kupfers, eigentlich nur das pH-Sinken herbeiführen. Diese Neigung wurde aber durch Cu-Zusatz weiter verstärkt. Bei der Fruktosekultur sank der pH-Wert in Gegenwart von Cu, während er bei dessen Abwesenheit steigend umkehrte, und diese Kultur stand der Glukosekultur an Wachstum nach. Bei der Saccharosekultur ließ sich das pH-Sinken unter möglichen Bedingungen der Schwermetalle verhindern, und die pH-Umkehr konnte sich deutlich ergeben. Das beste Wachstum war bei der mit Cu beschickten Saccharosekultur ersichtlich.

Tabelle 15

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1A	5	3,2	0,206	+
1B	5	3,3	0,278	+
1C	5	3,7	0,318	+
2A	5	2,4	0,377	+
2B	5	2,7	0,327	+
2C	5	2,9	0,438	+
1A	9	2,9	0,458	+
1B	9	3,8	0,378	+
1C	9	4,0	0,510	+
2A	9	2,1	0,615	+
2B	9	2,2	0,608	+
2C	9	3,5	0,675	+
1A	13	2,1	0,822	+
1B	13	3,8	0,558	+
1C	13	4,2	0,608	+
2A	13	1,9	0,952	+
2B	13	2,1	0,812	+
2C	13	3,8	0,965	+

VERSUCH 16

Dieser Versuch wurde angestellt, um zu sehen, wie Fruktose im Vergleich mit Glukose und Saccharose, den pH-Verlauf beeinflusst, wenn die Schwermetalle in der Weise kombiniert gegeben werden, daß bei der Glukosekultur die pH-Umkehr entweder erschwert oder erleichtert werden kann.

Schwermetalle: (A) Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. (B) Fe 5×10^{-6} mol. Zn 10^{-6} mol. Ohne Cu. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Fruktose m/4, (3) Saccharose m/8. (Tabelle 16).

In der Kombination (A) der Schwermetalle, die der Glukosekultur keine pH-Umkehr ermöglicht, waren bei der Fruktosekultur gleicher pH-Verlauf und gleiches Wachstum ersichtlich wie in jener Kultur. Aber in der Kombination (B), die die pH-Umkehr bei der Glukosekultur erlaubte, zeigte die Fruktosekultur dieselbe Neigung zur pH-Umkehr, und zwar etwa so stark wie bei der Saccharosekultur, während für das Pilzwachstum die Fruktosekultur denjenigen mit anderen Zuckerarten nachstand.

Tabelle 16

(A)

Kul- tur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	2,2	0,503	3225	0,0394	0,0545	0,7229
2	6	2,4	0,504	2950	0,0423	0,0530	0,7943
3	6	3,4	0,565	?	?	?	?
1	9	2,1	0,671	2275	0,0320	0,0453	0,7064
2	9	2,2	0,656	2175	0,0330	0,0453	0,7306
3	9	4,0	0,889	1700	0,0376	0,0366	1,0273
1	12	2,0	0,714	1725	0,0464	0,0464	0,6358
2	12	2,1	0,714	1750	0,0400	0,0400	0,7275
3	12	4,1	1,140	975	0,0320	0,0320	1,1000

(B)

1	6	2,8	0,258	+			
2	6	3,6	0,265	+			
3	6	3,6	0,252	+			
1	9	2,8	0,437	+			
2	9	3,8	0,309	+			
3	9	4,0	0,341	+			
1	12	3,9	0,722	+			
2	12	4,2	0,651	+			
3	12	4,2	0,801	+			

VERSUCH 17

Ein Gemisch von Glukose und Fruktose in der Menge, die derjenigen des Invertzuckers entspricht, wurde als C-Quelle benutzt, und es wurde untersucht, in welcher Beziehung das Gemisch zu dem pH-Verlauf und dem Wachstum steht.

Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Glukose+Fruktose m/4, (3) Saccharose m/8. (Tabelle 17).

Aus diesem Ergebnis ist die merkwürdige Tatsache ersichtlich, daß bei Verwendung dieses Zuckergemisches die pH-Umkehr so stark stattfindet wie bei der Saccharosekultur, und das Wachstum üppiger vor sich geht als bei der letzteren; also eine neu entstehende Tendenz, die in der Kultur mit einzelner Zuckerart nie auftreten kann. Aus dieser Tatsache läge es nahe anzunehmen, daß die spezifische Wirkung von Saccharose in Bezug auf die pH-Umkehr und auf das Wachstum der charakteristischen Zusammenwirkung von Glukose und Fruktose zuzuschreiben sei, die beide durch enzymatische Hydrolyse während der Kultur gebildet werden.

Tabelle 17

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,3	0,395	+
2	6	3,2	0,520	+
3	6	3,2	0,473	+
1	9	2,0	0,640	+
2	9	3,8	0,877	+
3	9	3,9	0,827	+
1	12	2,0	0,705	+
2	12	3,7	1,073	+
3	12	4,2	0,943	+

Ammoniakkultur

Obwohl die Wirkung der Schwermetalle und der Zuckerarten auf die pH-Veränderung und auf das Pilzwachstum bei der Ammoniak- oder Nitratkultur etwas anders als bei der NH_4NO_3 -Kultur sich ergibt, so ist es notwendig die Bedeutung dieser Faktoren für die Aufnahme des Ammoniaks oder Nitrats auch bei der Kultur mit alleiniger N-Quelle zu studieren. Im vorliegenden Abschnitt kam die Ammoniakkultur in Betracht, und als N-Quelle wurde Ammoniumsulfat in äquivalenter Menge verwendet.

I. Wirkung der Schwermetalle.

Als C-Quelle wurde Glukose (m/4) in allen Kulturen verwendet. Anfangs-pH: 5,7.

1. Eisen.

VERSUCH 18

Schwermetalle: Zn, Mn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 10^{-5} mol. (Tabelle 18).

Tabelle 18

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,2	0,473	+
2	6	2,2	0,501	+
3	6	2,2	0,500	+
1	9	2,0	0,540	+
2	9	2,0	0,661	+
3	9	2,0	0,672	+
1	12	1,9	0,727	+
2	12	1,8	0,724	+
3	12	1,8	0,837	+

VERSUCH 19

Schwermetalle: Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) 5×10^{-6} mol, (3) 2×10^{-5} mol. (Tabelle 19).

Tabelle 19

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,4	0,334	+
2	6	2,5	0,338	+
3	6	2,5	0,413	+
1	10	2,2	0,556	+
2	10	2,2	0,551	+
3	10	2,1	0,615	+
1	15	1,9	0,740	+
2	15	1,9	0,790	+
3	15	1,9	0,841	+

Die Fe-Konzentration bei der Kultur (3) war so hoch wie diejenige bei der NH_4NO_3 -Kultur, wo die pH-Umkehr stattfinden sollte. Je größer die Fe-Konzentration war, desto üppiger geschah das Wachstum, aber der pH-Wert erniedrigte sich gleich schnell in beiden Kulturen.

2. Zink.

VERSUCH 20

Schwermetalle: Fe, Mn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 10^{-6} mol. (2) Zn 5×10^{-6} mol, (3) Zn 10^{-5} mol. (Tabelle 20).

Tabelle 20

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,4	0,400	+
2	6	2,1	0,564	+
3	6	2,1	0,559	+
1	9	2,1	0,764	+
2	9	2,0	0,793	+
3	9	2,0	0,778	+
1	14	1,9	0,834	+
2	14	1,8	0,813	+
3	14	1,9	0,801	+

Das Wachstumsoptimum befand sich bei der Kultur (2), und die höhere Konzentration von Zn begünstigte nicht immer das Wachstum.

3. Mangan.

VERSUCH 21

Schwermetalle: Fe, Zn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Mn 10^{-6} mol, (2) Mn 5×10^{-6} mol, (3) Mn 10^{-5} mol. (Tabelle 21).

Tabelle 21

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,1	0,486	+
2	6	2,1	0,533	+
3	6	2,1	0,544	+
1	9	2,0	0,522	+
2	9	1,9	0,669	+
3	9	1,9	0,723	+
1	12	1,9	0,647	+
2	12	1,8	0,783	+
3	12	1,8	0,832	+

Je größer die Mn-Konzentration war, desto besser fand das Wachstum statt. Keine großen Unterschiede der pH-Erniedrigung wurden unter verschiedenen Mn-Konzentrationen bemerkt.

4. Kupfer.

VERSUCH 22

Schwermetalle: Fe, Zn und Mn 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Cu 10^{-6} mol, (2) Cu 5×10^{-6} mol, (3) Cu 10^{-5} mol. (Tabelle 22).

Tabelle 22

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	7	2,1	0,545	+
2	7	2,1	0,527	+
3	7	2,1	0,558	+
1	10	1,9	0,668	+
2	10	1,9	0,707	+
3	10	1,9	0,726	+
1	14	1,8	0,810	+
2	14	1,8	0,840	+
3	14	1,8	0,846	+

VERSUCH 23

Schwermetalle: (A) Fe 2×10^{-5} mol. Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. (B) Fe 2×10^{-6} mol. Zn 5×10^{-7} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 5×10^{-6} mol. (Tabelle 23).

Tabelle 23

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
A1	6	2,4	0,508	+
A2	6	2,3	0,496	+
B1	6	2,8	0,392	+
B2	6	3,0	0,424	+
A1	9	2,1	0,546	+
A2	9	2,1	0,579	+
B1	9	2,4	0,401	+
B2	9	2,4	0,443	+
A1	13	1,9	0,752	+
A2	13	1,9	0,796	+
B1	13	2,3	0,559	+
B2	13	2,3	0,584	+

Die Fe-Konzentration in (A) und die Zn-Konzentration in (B) wurden in solchen Mengen genommen, daß die pH-Umkehr möglich war, wenn Ammoniumnitrat als N-Quelle benutzt wurde.

Aus Versuchen 22 und 23 geht hervor, daß Cu-Zusatz das Wachstum immer fördert.

II. Wirkung der Zuckerarten.

VERSUCH 24

Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Fruktose m/4, (3) Saccharose m/8. (Tabelle 24).

Tabelle 24

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,2	0,483	+
2	6	2,2	0,556	+
3	6	2,2	0,437	+
1	9	2,0	0,780	+
2	9	2,1	0,643	+
3	9	2,1	0,678	+
1	14	1,8	0,866	+
2	14	1,8	0,870	+
3	14	1,8	0,910	+

In Bezug auf das Wachstum und auf die pH-Veränderung ließ sich keine Besonderheit bemerken, die von der Eigenschaft des Zuckers abhängig ist.

VERSUCH 25

Es wäre in Versuch 24 auch möglich, daß Saccharose ihre vorteilhafte Wirkung auf das Pilzwachstum praktisch nicht ausüben konnte, weil die schnell gehende Steigung der Acidität die nötige enzymatische Inversion stark hemmen dürfte. Um dieses mögliche Hindernis zu vermeiden, wurde Saccharose vorher der Inversion unterworfen. Eine Saccharoselösung (m/8) wurde mittels bestimmter Menge Salzsäure auf pH 3,0 gebracht und im KOCHSchen Dampftopf 30 Minuten lang bei 100°C geheizt. Nach dem Abkühlen wurden die nötigen Nährsalze darin gelöst, und die Lösung wurde mittels NaOH auf pH 5,5 gebracht, um sie sofort in das Adsorptionsverfahren in gewöhnlicher Weise überzuführen. Daß Saccharose vollständig invertiert wurde, ließ sich durch Analyse ermitteln.

Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Invertzucker m/4. (Tabelle 25).

Tabelle 25

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,2	0,602	+
2	6	2,2	0,617	+
1	9	2,0	0,732	+
2	9	2,0	0,746	+
1	11	1,8	0,814	+
2	11	1,8	0,774	+
1	13	1,8	0,815	+
2	13	1,8	0,790	+

Der Versuch ergab, daß in Bezug auf das Pilzwachstum sowie auf den pH-Verlauf dem Invertzucker keine spezifische Wirkung zukam, gleich wie bei Gebrauch von Saccharose in Versuch 24.

In den folgenden Versuchen wurde die Wirkung von Saccharose bei der Ammoniakkultur untersucht mit gleichzeitiger Berücksichtigung der Schwermetalle.

VERSUCH 26

Schwermetalle: Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 2×10^{-5} mol. (Tabelle 26).

Tabelle 26

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,6	0,228	+
2	6	2,6	0,316	+
3	6	2,7	0,360	+
1	10	2,4	0,371	+
2	10	2,4	0,540	+
3	10	2,3	0,597	+
1	13	2,2	0,620	+
2	13	2,1	0,700	+
3	13	2,0	0,750	+

Die Zunahme der Fe-Menge vermehrte das Pilzgewicht und beschleunigte das pH-Sinken.

VERSUCH 27

Schwermetalle: Fe und Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 5×10^{-7} mol, (2) Zn 5×10^{-6} mol, (3) Zn 2×10^{-5} mol. (Tabelle 27).

Tabelle 27

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	3,0	0,213	+
2	6	2,3	0,310	+
3	6	2,4	0,285	+
1	10	3,0	0,344	+
2	10	2,0	0,568	+
3	10	2,0	0,540	+
1	13	2,3	0,426	+
2	13	2,0	0,621	+
3	13	2,0	0,593	+

Das Pilzwachstum war üppiger bei der Zn-Konzentration 5×10^{-6} mol als bei 5×10^{-7} und 2×10^{-5} mol.

VERSUCH 28

Schwermetalle: Fe und Mn 2×10^{-6} mol. Zn 10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 2×10^{-5} mol. (Tabelle 28.)

Tabelle 28

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	2,4	0,398	+
2	6	2,3	0,459	+
1	10	2,1	0,655	+
2	10	2,2	0,639	+
1	13	2,1	0,791	+
2	13	1,9	0,855	+
1	15	1,9	0,847	+
2	15	1,9	1,002	+

In Gegenwart von Cu von 2×10^{-5} mol wuchs der Pilz besser als ohne Cu.

Nitratkultur

I. Wirkung der Schwermetalle

Als N-Quelle wurde hauptsächlich Natriumnitrat in äquivalenter Menge mit derjenigen von Ammoniumnitrat verwendet, und Glukose kam als C-Quelle zur Benutzung. Der Anfangs-pH-Wert betrug 5,5, wenn anders nicht angegeben ist.

1. Eisen.

VERSUCH 29

Schwermetalle: Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 10^{-5} mol. pH: (A) 5,5 (B) 2,5 (darauf gebracht mit verdünnter Schwefelsäure). (Tabelle 29).

Im allgemeinen nahm das Mycelgewicht mit der Fe-Konzentration zu, und der pH-Verlauf war von der Fe-Konzentration fast unabhängig. Bei der Kultur, deren Anfangs-pH 5,5 betrug, neigte der pH-Wert ein wenig zum Sinken, aber er stieg allmählich an, wenn der Ausgangswert 2,5 betrug. Im Laufe der Kultur näherten sich die pH-Werte der beiden Kulturen, und am letzten Tag, also am 15ten Tag, betrugen sie beide gleich 5,0.

Tabelle 29

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
A1	4	5,6	0,130	+
A2	4	5,6	0,167	+
B1	4	3,0	0,092	+
B2	4	2,9	0,098	+
A1	7	5,0	0,195	+
A2	7	5,0	0,205	+
B1	7	3,3	0,265	+
B2	7	3,3	0,297	+
A1	10	5,0	0,296	+
A2	10	4,9	0,347	+
B1	10	4,4	0,457	+
B2	10	4,5	0,627	+
A1	15	5,2	0,602	+
A2	15	5,2	0,555	+
B1	15	5,0	0,738	+
B2	15	5,2	0,919	+

VERSUCH 30

Schwermetalle: Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 2×10^{-5} mol. (Tabelle 30).

Tabelle 30

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	4,9	0,129	+
2	6	5,0	0,165	+
3	6	5,2	0,198	+
1	10	4,5	0,203	+
2	10	4,6	0,226	+
3	10	5,3	0,272	+
1	15	4,8	0,452	+
2	15	4,6	0,526	+
3	15	4,8	0,523	+

Die Fe-Konzentration in der Kultur (3) wurde so reichlich genommen, daß die pH-Umkehr möglich war, wenn Ammoniumnitrat als N-Quelle verwendet wurde. Je mehr Fe verwendet wurde, desto besser wuchs der Pilz und desto höher stieg der pH-Wert.

VERSUCH 31

Schwermetalle: Zn, Mn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 10^{-5} mol. (Tabelle 31).

Tabelle 31

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Nitrat in mol
1	7	5,5	0,202	3350	0,0545
2	7	5,7	0,242	3575	0,0552
3	7	5,9	0,322	3550	0,0555
1	10	5,5	0,324	3200	0,0545
2	10	5,6	0,382	3075	0,0549
3	10	5,7	0,391	3150	0,0554
1	14	5,5	0,554	2700	0,0467
2	14	5,7	0,628	2550	0,0467
3	14	6,0	0,644	2500	0,0475

Das Wachstumverhältnis war gleich wie bei Versuch 30. Bei der Kultur mit größerer Fe-Menge lag der pH-Wert höher, trotzdem Nitrat relativ wenig aufgenommen wurde. Aus dieser Tatsache läßt sich vermuten, daß in diesem Fall der pH-Wert nicht nur von der Nitrataufnahme abhängig sei und die mögliche NaOH-Aufnahme sehr zurücktrete.

2. Zink.

VERSUCH 32

Schwermetalle: Fe, Mn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 5×10^{-7} mol, (2) Zn 10^{-6} mol, (3) Zn 5×10^{-6} mol. (Tabelle 32).

Tabelle 32

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,0	0,250	+
2	6	5,2	0,253	+
3	6	5,2	0,243	+
1	8	4,5	0,318	+
2	8	4,7	0,316	+
3	8	4,7	0,271	+
1	11	4,2	0,476	+
2	11	4,3	0,480	+
3	11	4,5	0,447	+

Kein merklicher Unterschied des Wachstums ließ sich zwischen den Zn-Konzentrationen 5×10^{-7} mol und 10^{-6} mol ersehen, aber bei

5×10^{-6} mol war die Pilzernte viel kleiner als bei den anderen Konzentrationen. Der pH-Wert nahm bei jeder Kultur nach und nach ab.

3. Mangan.

VERSUCH 33

Schwermetalle: Fe, Zn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Mn 10^{-6} mol, (2) Mn 5×10^{-6} mol, (3) Mn 10^{-5} mol. (Tabelle 33).

Tabelle 33

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	4,4	0,244	+
2	6	4,7	0,238	+
3	6	5,0	0,224	+
1	9	4,2	0,387	+
2	9	4,3	0,409	+
3	9	4,3	0,340	+
1	12	4,2	0,628	+
2	12	4,3	0,651	+
3	12	4,5	0,602	+

Das Pilzwachstum war besser bei der Mn-Konzentration 5×10^{-6} mol als bei 10^{-6} und 10^{-5} mol. Der pH-Wert nahm im Verlaufe des Wachstums bei allen Kulturen ab, und diese pH-Erniedrigung ging um so langsamer, je höher die Mn-Konzentration stand.

4. Kupfer.

VERSUCH 34

Schwermetalle: Fe 10^{-6} mol. Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 5×10^{-6} mol. (Tabelle 34).

Tabelle 34

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	11	4,0	0,211	+
2	11	4,6	0,260	+
1	13	4,0	0,247	+
2	13	4,8	0,335	+
1	15	4,2	0,325	+
2	15	4,8	0,474	+

Die Zugabe von Cu begünstigte das Wachstum, und daher gab es keinen Grund, eine Hemmungswirkung von Cu auf die Nitrat-

aufnahme anzunehmen. Der pH-Wert nahm am Anfang ab, um sich dann wieder zu vergrößern. In Gegenwart von Cu zeigte die Kultur die Neigung, den pH-Wert zu erhöhen. Ähnliches Ergebnis ist auch aus den folgenden Versuchen ersichtlich.

VERSUCH 35

Schwermetalle: Fe 10^{-6} mol. Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 10^{-6} mol, (3), Cu 5×10^{-5} mol, Anfangs-pH: 3,2 (Tabelle 35).

Tabelle 35

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	3,7	0,172	+
2	6	3,7	0,130	+
3	6	4,6	0,315	+
1	9	4,0	0,210	+
2	9	4,2	0,292	+
3	9	5,3	0,453	+
1	12	4,4	0,302	+
2	12	4,9	0,497	+
3	12	5,8	0,677	+

Der Versuch ergab sich fast gleich dem Versuch 34.

VERSUCH 36

Schwermetalle: (A) Fe 2×10^{-5} mol. Zn 10^{-6} mol. Mn 2×10^{-6} mol. (B) Fe 2×10^{-6} mol. Zn 5×10^{-7} mol, Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 5×10^{-6} mol. (Tabelle 36).

Tabelle 36

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
A1	6	4,8	0,220	+
A2	6	5,3	0,163	+
B1	6	5,2	0,147	+
B2	6	5,7	0,257	+
A1	9	4,1	0,223	+
A2	9	4,8	0,336	+
B1	9	4,0	0,268	+
B2	9	4,5	0,305	+
A1	13	3,9	0,228	+
A2	13	4,4	0,364	+
B1	13	4,4	0,305	+
B2	13	4,3	0,408	+

Die Fe-Konzentration in (A) und die Zn-Konzentration in (B) wurden so viel genommen, daß die pH-Umkehr möglich sein konnte, wenn Ammoniumnitrat als N-Quelle benutzt wurde.

II. Wirkung der Zuckerarten

VERSUCH 37

N-Quelle KNO_3 . Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Fruktose m/4, (3) Saccharose m/8. (Tabelle 37).

Tabelle 37

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,2	0,261	+
2	6	6,3	0,459	+
3	6	5,9	0,415	+
1	8	4,8	0,286	+
2	8	6,4	0,661	+
3	8	6,2	0,658	+
1	12	4,8	0,519	+
2	12	6,4	0,724	+
3	12	6,3	0,952	+

Bei der Verwendung von Fruktose ging die pH-Zunahme so schnell vor sich und geschah das Wachstum so gut, und sogar bisweilen besser, wie bei der Verwendung von Saccharose.

VERSUCH 38

N-Quelle: KNO_3 . Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Invertzucker (Saccharose wurde mit HCl hydrolysiert) m/4, (2) Saccharose m/8. (Tabelle 38).

Tabelle 38

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	6,0	0,404	+
2	6	6,0	0,311	+
1	8	6,2	0,639	+
2	8	6,1	0,536	+
1	10	6,2	0,756	+
2	10	6,2	0,691	+
1	12	6,2	0,872	+
2	12	6,2	0,835	+

Das Wachstum fand besser bei der Invertzuckerkultur statt als bei der Saccharosekultur. Der pH-Wert nahm während der Kultur zu, und zwar in gleicher Geschwindigkeit bei beiden Zuckerarten.

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, wie verschiedene Schwermetalle das Wachstum bei der Nitrat-Saccharosekultur beeinflussen und wie verschieden diese Einflüsse von denjenigen bei der Nitrat-Glukosekultur sind. Als N-Quelle wurde Natriumnitrat benutzt.

VERSUCH 39

Schwermetalle: Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 5×10^{-7} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 5×10^{-5} mol. (Tabelle 39).

Tabelle 39

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,2	0,193	+
2	6	5,7	0,363	+
3	6	5,6	0,327	+
1	10	5,0	0,265	+
2	10	5,9	0,505	+
3	10	5,8	0,590	+
1	16	5,1	0,588	+
2	16	6,3	0,975	+
3	16	6,4	0,927	+

Die pH-Aenderung und das Wachstum gingen beide fast gleich wie bei den Kulturen (2) und (3) vor sich. Aber in der Kultur (1), wo Fe in der geringsten Menge zugegeben war, nahm der pH-Wert am Anfang schwach ab, und nachher blieb er fast unverändert. Das geringste Wachstum fand bei der Kultur (1) statt.

VERSUCH 40

Schwermetalle: Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol. Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 5×10^{-7} mol, (2) Fe 5×10^{-6} mol, (3) Fe 5×10^{-5} mol. Anfangs-pH: 3,2. (Tabelle 40).

Je größer die Fe-Konzentration war, desto besser konnte, wenn auch mit wenigen Ausnahmen, der Pilz wachsen und desto schneller nahm der pH-Wert zu. Bei der Fe-Konzentration von 5×10^{-7} mol war aber die pH-Steigung gar nicht merklich, und sogar zeigte der pH-Wert die Tendenz, sich zu vermindern.

Tabelle 40

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,4	0,417	+
2	6	5,4	0,533	+
3	6	5,6	0,558	+
1	9	5,5	0,468	+
2	9	5,9	0,777	+
3	9	5,9	0,827	+
1	13	5,2	0,570	+
2	13	6,4	1,120	+
3	13	6,2	0,874	+

VERSUCH 41

Schwermetalle: Fe, Mn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Zn 5×10^{-7} mol, (2) Zn 10^{-6} mol, (3) Zn 5×10^{-6} mol. (Tabelle 41).

Tabelle 41

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,6	0,214	+
2	6	5,8	0,307	+
3	6	6,0	0,459	+
1	8	5,5	0,329	+
2	8	5,9	0,457	+
3	8	6,5	0,930	+
1	11	5,2	0,428	+
2	11	5,7	0,682	+
3	11	7,0	1,317	+

Die Zusammensetzung der Kulturlösung war gleich wie bei Versuch 32 und zwar wurde der Versuch mit diesem gleichzeitig ausgeführt. Wie schon bei jenem Versuch festgestellt wurde, zeigte die Glukosekultur mit Zn von 5×10^{-6} mol nicht immer das beste Wachstum, aber es wurde bei der Saccharosekultur bewiesen, daß ohne Ausnahme das Wachstum mit der Zunahme der Zn-Konzentration befördert wurde. Bei der Zn-Konzentration von 5×10^{-7} mol nahm der pH-Wert ab, bei 10^{-6} mol veränderte er sich nicht merklich, und bei 5×10^{-6} mol stieg er immer höher.

VERSUCH 42

Schwermetalle: Fe, Zn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultur: (1) Mn 10^{-6} mol (2) Mn 5×10^{-6} mol, (3) Mn 10^{-5} mol. (Tabelle 42).

Tabelle 42

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	6,0	0,428	+
2	6	6,2	0,506	+
3	6	5,9	0,322	+
1	9	6,6	1,246	+
2	9	6,6	1,196	+
3	9	6,5	0,991	+
1	12	7,0	1,331	+
2	12	6,9	1,342	+
3	12	6,8	1,262	+

So wie bei der Glukosekultur in Versuch 33, der gleichzeitig mit dem vorliegenden Versuch ausgeführt wurde, fand das beste Wachstum bei der mäßig großen Konzentration von Mn (5×10^{-6} mol) statt, während sowohl die kleinere als auch die größere Mn-Konzentration an Pilzwachstum jener nachstand. Die Beziehung zwischen der Mn-Konzentration und dem pH-Verlauf konnte nicht entscheidend bestimmt werden, aber bei allen Kulturen nahm der pH-Wert im Verlauf des Pilzwachstums zu.

VERSUCH 43

Schwermetalle: Fe 5×10^{-5} mol, Zn $1,5 \times 10^{-6}$ mol, Mn 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) ohne Cu, (2) Cu 10^{-6} mol, (3) Cu 5×10^{-5} mol. (Tabelle 43).

Tabelle 43

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,4	0,275	+
2	6	5,9	0,367	+
3	6	6,1	0,461	+
1	13	5,2	0,550	+
2	13	6,0	0,619	+
3	13	6,1	0,648	+
1	16	6,5	0,954	+
2	16	6,3	1,128	+
3	16	6,6	1,255	+

VERSUCH 44

Versuchsbedingung war gleich dem Versuch 43. (Tabelle 44)

Tabelle 44

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	5,8	0,670	+
2	6	5,9	0,768	+
3	6	6,0	0,667	+
1	9	5,8	0,715	+
2	9	6,2	0,845	+
3	9	6,3	0,944	+
1	13	6,5	0,969	+
2	13	6,4	1,033	+
3	13	6,5	1,095	+

Gleich wie bei der Glukosekultur förderte Cu-Zusatz das Pilzwachstum, und dessen so hohe Konzentration wie 5×10^{-5} mol ergab das beste Wachstum, ohne irgend eine Hemmung auszuüben. Der pH-Wert nahm im Verlauf der Kultur zu, und zwar unter Verwendung von Cu in höherer Konzentration.

Nitrakultur mit verschiedenen Kationen

VERSUCH 45

C-Quelle: Glukose m/8. Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) KNO_3 , (2) NaNO_3 , (3) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Anfangs-pH: (1) und (2) 5,5, (3) 4,6 (Niederschlag!). (Tabelle 45).

Tabelle 45

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	4	5,5	0,098	+
2	4	5,5	0,088	+
3	4	4,2	0,133	+
1	6	4,8	0,234	+
2	6	4,8	0,245	+
3	6	3,8	0,190	+
1	8	5,1	0,241	+
2	8	4,2	0,251	+
3	8	3,6	0,194	+
1	11	4,8	0,278	+
2	11	4,8	0,307	+
3	11	4,2	0,288	+
1	13	4,0	0,432	+
2	13	4,6	0,482	+
3	13	3,9	0,283	+

Zwischen der KNO_3 - und NaNO_3 -Kultur war kein merklicher Unterschied bezüglich des Wachstums ersichtlich, aber bei der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Kultur ging es sehr kümmerlich vor sich.

VERSUCH 46

C-Quelle: Glukose m/4. Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 5×10^{-6} mol. Kultrüe: (1) KNO_3 , (2) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Anfangs-pH: (1) 5,5, (2) 4,6 (Niederschlag!). Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0624 mol. (Tabelle 46).

Tabelle 46

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol
1	6	5,5	0,189	3850	0,0003	0,0485
2	6	4,0	0,155	3850	0,0003	0,0515
1	8	5,0	0,359	3375	0,0003	0,0399
2	8	3,5	0,158	3675	0,0003	0,0400
1	13	4,8	0,570	2325	0,0003	0,0440
2	13	3,5	0,229	3225	0,0003	0,0400

So wie bei Versuch 45 war das Pilzwachstum bei der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Kultur sehr schlecht, aber es ist merkwürdig, daß diese Kultur der anderen an Nitrataufnahme nicht sehr nachstand. Aus dieser Tatsache geht hervor, daß Calcium nicht die Nitrataufnahme selbst, sondern die nachfolgende Assimilation oder Körperbildung nachteilig beeinflußt.

VERSUCH 47

Da, wie bei den vorigen Versuchen bewiesen wurde, Saccharose und Fruktose, verschieden von Glukose, bei der Nitratkultur Vorteil bringen, wäre es nicht ohne Interesse zu sehen, ob jene Zuckerarten auch bei der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Kultur sich gleich verhalten.

N-Quelle: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Glukose m/4, (2) Fruktose m/4, (3) Saccharose m/8. Anfangs-pH 4,8 (Niederschlag!) (Tabelle 47).

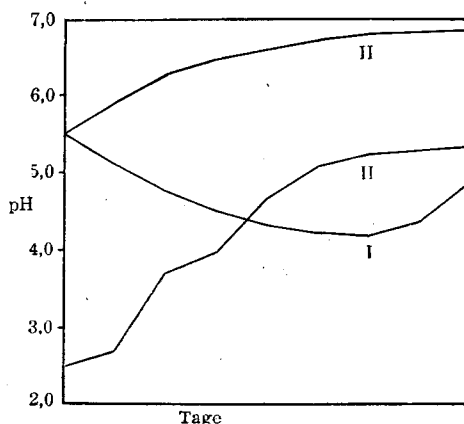
Wie erwartet, wurde die nachteilige Wirkung von Ca durch Verwendung von Saccharose oder Fruktose fast vollständig beseitigt, und das Pilzwachstum ergab sich so gut wie bei der NaNO_3 - oder KNO_3 -Kultur.

Tabelle 47

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
1	6	4,3	0,140	+
2	6	5,0	0,347	+
3	6	5,0	0,376	+
1	10	4,4	0,182	+
2	10	5,0	0,581	+
3	10	5,2	0,661	+
1	13	4,6	0,368	+
2	13	5,2	0,781	+
3	13	5,4	0,887	+

pH-Veränderung bei der Nitratkultur

Mit Ausnahme von NH_4NO_3 werden Nitrate im allgemeinen als physiologisch alkalische N-Quellen betrachtet. Wird *Aspergillus oryzae* in einer nitrathaltigen Nährlösung mit einem Anfangs-pH von 5,5 kultiviert, wie gewöhnlich in vorliegender Arbeit der Fall war, so steigt der pH-Wert nicht in allen Fällen, und unter Umständen nimmt er ab, wenigstens im früheren Stadium. Wie bekannt, bildet dieser Pilz Kojisäure, deren Dissoziation aber von untergeordneter Bedeutung für die pH-Veränderung ist, und die Bildung anderer starken Säuren ist unwahrscheinlich. Solche pH-Abnahme im früheren Stadium ist daher nur dadurch zu erklären, daß der Basenanteil verhältnismäßig mehr als Nitrat aufgenommen werde. Es sei aber bemerkt, daß in diesem Fall der Basenanteil, so z.B. KOH, bisweilen, aber nicht immer, mehr als die äquivalente Nitratmenge aufgenommen werden darf, um die pH-Abnahme zu ermöglichen. Der Puffer der Nährlösung wirkt in der Weise, daß die pH-Abnahme durch die Aufnahme des Basenanteils leichter gemacht wird, als die pH-Zunahme durch die Nitrataufnahme.



Diese pH-Erniedrigung bei der Nitratkultur wurde oftmals

bei den vorigen Versuchen wahrgenommen und scheint darauf hinzudeuten, daß für die Nitrataufnahme auch das Eindringen des Basenanteils eine wichtige Rolle spielt.

Ob die pH-Veränderung zu sinken oder zu steigen neigt, hängt nicht wenig von dem Anfangs-pH-Wert ab, aber aus den erwähnten Versuchen wurden auch andere dafür verantwortliche Momente kennen gelernt. Die bisher ermittelten Neigungen der pH-Veränderung bei der Nitratkultur sollen hier zusammengefaßt, in zwei Typen eingeteilt und kurvenmäßig, wenn auch nur schematisch, gezeigt werden.

Als die pH-Veränderung bedingende Faktoren lassen sich Zuckerarten, Menge von Fe und Zn und Anfangs-pH nennen, die in folgenden möglichen Kombinationen vorkommen:

1. Fe und Zn je wenigstens von 10^{-6} mol.
 - a) Glukose.
 - b) Saccharose oder Fruktose.
2. Fe und Zn je von weniger als 10^{-6} mol.
 - a) Glukose.
 - b) Saccharose oder Fruktose.

Einige Beispiele der pH-Veränderung seien aus den obigen Versuchen entnommen und nach dem Typus klassifiziert.

Typus I

- 1-a. Versuche 29(A), 32, 33, 37(1).
- 2-a. Versuch wurde nicht ausgeführt, aber sehr wahrscheinlich.
- 2-b. Versuche 39(1), 40(1), 41(1 und 2).

Typus II

- 1-b. Versuche 29(B), 37(2 und 3), 39(2 und 3), 40(2 und 3), 42.

Um das Absorptionsverhältnis zwischen Nitrat und KOH bei Typus I analytisch zu bestimmen, wurde der folgende Versuch ausgeführt.

VERSUCH 48

N-Quelle: KNO_3 . C-Quelle: Glukose m/4. Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Zucker: 4500 mg. NO_3 : 0,0624 mol. K: 0,0809 mol. (Tabelle 48).

Tabelle 48

Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Nitrat in mol	Kalium in mol
6	5,5	0,183	3810	0,0491	0,0799
9	4,9	0,365	3100	0,0485	0,0763
11	4,6	0,520	2800	0,0505	0,0806
14	5,2	0,691	1675	0,0480	0,0806
16	5,5	0,871	1525	0,0429	0,0806

Die Restmenge des Nitrats schwankte mitsamt der pH-Veränderung, und das anfangs absorbierte Kalium wurde nachher wieder abgegeben.

VERSUCH 49

Wenn der Anfangs-pH-Wert unter Bedingung von 1-a etwas weniger betrug, so war das Verhältnis etwas anders. Ein Beispiel dafür sei hier erwähnt.

N-Quelle: NaNO_3 . C-Quelle: Glukose m/4. Schwermetalle: Zn und Mn 10^{-6} mol. Kultur: (1) Fe 10^{-6} mol, (2) Fe 10^{-5} mol. Anfangs-pH: (A) 5,5 (B) 2,5. (Tabelle 49).

Tabelle 49

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker
A1	5	5,1	0,129	+
A2	5	5,2	0,178	+
B1	5	2,7	0,241	+
B2	5	2,7	0,188	+
A1	7	4,7	0,150	+
A2	7	4,8	0,145	+
B1	7	4,5	0,155	+
B2	7	4,6	0,157	+
A1	10	4,2	0,177	+
A2	10	4,3	0,236	+
B1	10	3,5	0,273	+
B2	10	3,3	0,282	+
A1	12	4,5	0,272	+
A2	12	4,4	0,275	+
B1	12	4,5	0,395	+
B2	12	4,3	0,403	+
A1	18	5,0	0,469	+
A2	18	5,4	0,498	+
B1	18	5,2	0,585	+
B2	18	5,7	0,653	+

VERSUCH 50

N-Quelle: KNO_3 . C-Quelle: Glukose 1,5/4 mol. Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Zucker: 6750 mg. NO_3 : 0,0624 mol. K: 0,0808 mol. (Tabelle 50).

Tabelle 50

Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Nitrat in mol	Kalium in mol
5	5,9	0,210	6600	0,0568	0,0807
7	5,7	0,305	6100	0,0560	0,0807
10	5,6	0,328	5850	0,0495	0,0777
12	5,6	0,395	5700	0,0505	0,0769
14	5,6	0,531	5250	0,0505	0,0771
17	5,6	0,703	4850	0,0480	0,0744
19	5,9	0,705	4650	0,0464	0,0755

Selbst bei der Kultur mit einem Anfangs-pH von 5,5 unter der Bedingung 1-a verlief die pH-Veränderung nicht nach dem Typus I, wenn Glukose in einer größeren Menge gebraucht wurde. Der pH-Wert nahm zunächst zu, und nachher betrug er fortdauernd so groß wie am Anfang. Kalium wurde anfangs gar nicht aufgenommen, aber später neigte seine Menge zur Abnahme, abgesehen von kleinen Schwankungen.

Ueberblicken wir die pH-Veränderung in den Nitratkulturen, so können wir die Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen: Bei der Glukosekultur mit einem Anfangs-pH von 5,5 unabhängig von der Menge der Schwermetalle, sank der pH-Wert zunächst. Wenn aber der Anfangs-pH-Wert kleiner, z.B. 2,5 war, oder Glukose in genügender Menge zugegeben wurde, stieg der pH-Wert zunächst, sank dann einmal, um wieder zu steigen. Bei Gebrauch von Saccharose tritt einseitige Neigung zum pH-Steigen auf. Dies war der Fall, wenn Fe und Zn in genügender Menge verwendet wurde, sonst sank der pH-Wert immer niedriger. Aus dem Ergebnis, so z.B. des Versuchs 48, kann man ersehen, daß die pH-Veränderung bei der Nitratkultur einerseits auf der Nitrataufnahme, andererseits auf der Aufnahme des Basenanteils beruht, und daß auch der Austritt der beiden Anteile daran schuldig ist, obwohl es schwer war, zwischen dem Verhältnis $[\text{K}]:[\text{NO}_3]$ und dem pH-Wert einen zahlenmäßigen Zusammenhang zu ermitteln.

Bei der Saccharose- oder Fruktosekultur wurde Nitrat besonders stark aufgenommen und stieg der pH-Wert immer höher.

Einfluß von Vitaminen B₁ und B₂ auf die pH-Veränderung bei der Ammoniumnitratkultur

BÜNNING (1934) hat angegeben, daß bei der Glukosekultur von *Aspergillus niger* Vitamine B₁ und B₂ sowie A- und B-Wuchsstoffe derartige pH-Veränderung herbeiführen, die der pH-Umkehr in vorliegendem Fall ähnlich ist. Da *Aspergillus oryzae* viel leichter als *Aspergillus niger* Nitrat verarbeiten kann, läßt es sich erwarten, daß an jenem Pilz derartige Wirkung von Vitaminen viel deutlicher als an diesem zum Vorschein kommen kann.

VERSUCH 51

Nach dem Adsorptionsverfahren wurden die Schwermetalle und Vitamine B₁ und B₂ folgendermaßen zur Standardlösung zugegeben, und dann wurde diese sterilisiert:

Schwermetalle: Fe, Zn, Mn und Cu 2×10^{-6} mol. Kultur: (1) Vitamin B₁ (ROCH) 0,5 mg in 100 ccm Nährlösung, (2) Vitamin B₂ (ROCH) 0,5 mg in 100 ccm Nährlösung, (3) ohne Vitamine. Anfangs-pH: 5,7. Zucker: 4500 mg. NO₃: 0,0624 mol. NH₃: 0,0620 mol. (Tabelle 51).

Tabelle 51

Kultur	Kulturdauer in Tagen	pH	Pilzgewicht in g	Zucker in mg	Ammoniak in mol	Nitrat in mol	NH ₃ :NO ₃
1	6	2,2	0,437	2850	0,0546	0,0411	0,7527
3	6	2,4	0,395	3150	0,0501	0,0380	0,7584
1	8	2,1	0,521	2375	0,0467	0,0359	0,7631
2	8	2,4	0,925	1755	0,0494	0,0407	0,8239
3	8	2,2	0,518	2500	0,0467	0,0356	0,7623
1	11	2,1	0,621	1920	0,0467	0,0302	0,6439
3	11	2,0	0,644	2050	0,0469	0,0298	0,6354
1	14	2,0	0,701	1625	0,0475	0,0288	0,6062
2	14	2,6	1,386	0	0,0400	0,0378	0,9035
3	14	2,0	0,660	1725	0,0445	0,0278	0,6247

Da es schwer war, reine Vitamine in genügender Menge zu bekommen, ließ sich der Kulturversuch nicht wiederholen. Doch aus einem Versuch war es mir nicht unmöglich die allgemeine Tendenz des Wachstums und der pH-Veränderung bei den vitaminhaltigen Kulturen zu erblicken, im Vergleich zu derjenigen bei der Kultur ohne Vitamine.

Uebereinstimmend mit BÜNNINGS Ergebnis an *Aspergillus niger*, wirkte nur Vitamin B₂ (Lactoflavin) wachstumsfördernd auf *Aspergillus oryzae*, während Vitamin B₁ fast keine derartige Wirkung ausübte. Wenn auch Zusatz von Vitamin B₁ einigermaßen das Wachstum zu fördern schien, fiel der Zahlenwert nicht sicher außerhalb der Fehlergrenzen.

Vitamin B₂ konnte die pH-Umkehr herbeiführen und die Nitrataufnahme fördern, aber diese Fähigkeiten fehlten Vitamin B₁. Nach der Ansicht von BÜNNING (1934) soll die unter dem Einfluß von Vitamine B₁ und B₂ gesteigerte Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger* auf einer erleichterten Sauerstoffübertragung und dadurch bedingten Atmungssteigerung beruhen. YAMAGATA (1938, 1939) hat bei der bakteriellen Nitrat- und Nitritreduktion je einen Zwischenakzeptor im Dehydrasesystem angenommen, der aktivierten Wasserstoff zur Nitrat- bzw. Nitritreduktase¹⁾ überträgt. Da Flavinenzym, das mit großer Möglichkeit aus Vitamin B₂ (Lactoflavin) abgeleitet werden kann, als derartiger Zwischenakzeptor oft bei der Koppelreaktion der biologischen Oxyd-Reduktion tätig ist, ist es nicht ausgeschlossen, daß die durch Vitamin B₂ beförderte Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger* und *Asp. oryzae* auf dieser Beziehung beruht.

Obwohl Vitamin B₂ die Nitrataufnahme fördern und die pH-Umkehr herbeiführen kann, so war die Wirkung nicht so merklich wie bei der Kultur unter Verwendung von Fe und Zn in optimaler Konzentration oder von Saccharose. Ob Vitamin B₂ als Verunreinigung soviel Fe enthalte, daß die pH-Umkehr dadurch ermöglicht werden kann, und ob die pH-Umkehr, die bei Verwendung von Vitamin B₁ geschehen möchte, durch Verunreinigungen Cu und Zn gehemmt werde, erfordert noch weitere Untersuchungen.

Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse

Ammoniumnitratkultur

1. Bei der Glukosekultur wurde die gesteigerte Nitrataufnahme und somit die pH-Umkehr durch die Verwendung von Fe in relativ großer Konzentration und von Zn in relativ geringer Konzentration herbeigeführt. Diese Erscheinung wurde durch Cu-Zusatz verhindert.

1) Siehe unten S. 218.

2. Die Verwendung von Saccharose als C-Quelle förderte die Nitrataufnahme und damit die pH-Umkehr, unabhängig von der Konzentration von Fe und Zn.

3. Die pH-Umkehr neigte oft dazu, üppiges Wachstum zu begleiten.

Ammoniak- und Nitratkultur.

1. Durch Vermehrung der Schwermetalle in der nötigen Menge wurden das Pilzwachstum befördert und die pH-Erniedrigung bei der Ammoniakkultur und die pH-Erhöhung bei der Nitratkultur beschleunigt.

2. Zum Unterschied von anderen Schwermetallen konnte Zn von mittelmäßiger, aber nicht von höherer Konzentration das beste Wachstum herbeiführen. Die optimale Konzentration von Zn für das Wachstum bei der Nitratkultur unterschied sich von derjenigen bei der Ammoniakkultur.

3. Saccharose begünstigte das Pilzwachstum bei der Nitratkultur und beschleunigte die pH-Steigung, aber bei der Ammoniakkultur kam solche spezifische Wirkung diesem Zucker nicht zu.

4. Auch bei der Nitratkultur fand die pH-Erniedrigung im früheren Kulturstadium statt, die bisweilen von pH-Zunahme gefolgt wurde.

Besprechung

Wie schon bisher von mehreren Forschern und auch von uns¹⁾ festgestellt worden ist, sind Fe und Zn für verschiedene *Aspergillus*-arten unentbehrliche Elemente, und auch Mn und Cu sind notwendig für ihre normale Entwicklung. Wahrscheinlich stellen diese Metalle mit bestimmten organischen Substanzen Komplexverbindungen her, die beim Bau- und Betriebsstoffwechsel katalytische Wirkungen ausüben. Wenn auch die biochemische Wirkungsweise dieser Metalle bei der Assimilation der N-Quelle durch die Pilze noch unklar bleibt, so kann man wenigstens zwei Reaktionsstufen annehmen, an denen die Metalle teilnehmen: Nitratreduktion und Aminosäuresynthese oder weitere synthetische Prozesse.

1) SAKAMURA (1936), SAKAMURA und YOSHIMURA (1933), YOSHIMURA (1934, 1936).

Bevor Nitrat als N-Quelle zum Körperaufbau benutzt werden kann, muß es notwendigerweise innerhalb der Zelle reduziert werden. Daß Fe auf diese Reaktion katalytisch wirksam sein mag, ist nicht unwahrscheinlich, weil YAMAGATA (1938, 1939) bewiesen hat, daß die Nitratreduktase und Nitritreduktase, die von ihm aus Bakterien entnommen wurden, mit KCN gehemmt werden. Nach der Ansicht von BURSTRÖM (1939a, 1939b, 1940) soll aber für die Nitratassimilation in Weizenwurzeln dem Eisen keine Bedeutung zukommen, während Mn dafür wirksam ist. Dieselben Ergebnisse sind vor kurzem von NOACK und PIRSON (1940) an *Chlorella* erreicht worden. ITZEROTT (1936) hat eine von mir gefundene Tatsache¹⁾, daß bei der NH_4NO_3 -Kultur von *Aspergillus oryzae* Fe auf die Nitrataufnahme günstig wirkt, berücksichtigt und hat einen Versuch angestellt, um zu prüfen, ob dasselbe Verhältnis auch bei *Aspergillus niger* gültig sei. Es scheint mir aber von vornherein wahrscheinlich, daß es sich wohl nicht so verhalten dürfte und *Aspergillus niger* zum Zweck derartiger Untersuchung nicht geeignet ist, weil dieser Pilz nach seinem Wesen mit besonderer Vorliebe Ammoniak angreift und dazu neigt, Nitrat in der Nährlösung zurückzulassen. Da überdies aus meinen angeführten Versuchsergebnissen keineswegs ein überzeugender Beweis für die Bedeutung von Mn bei der Nitratassimilation besteht, wäre es voreilig die Teilnahme von Fe an der Nitratreduktion bei *Aspergillus oryzae* durchaus zu bestreiten.

Bei der Ammoniak- oder Nitratkultur beeinflußt Fe gemäß seiner Konzentration das Wachstum fördernd. Durch die Kulturversuche mit alleiniger N-Quelle kann man daher die pH-Umkehr, die bei der NH_4NO_3 -Kultur unter Anwendung von Fe in großer Konzentration stattfindet, nicht ohne Schwierigkeit erklären.

Die pH-Umkehr, die bei der NH_4NO_3 -Kultur unter Benutzung von Zn in niedriger Konzentration (5×10^{-7} mol) geschieht, wird möglicherweise aus den Ergebnissen der Versuche mit alleiniger N-Quelle erklärt. Zum Unterschied von anderen Schwermetallen kann Zn nur von mittelmäßiger, aber nicht von höherer Konzentration im benutzten Bereich das beste Wachstum herbeiführen. Diese optimale Konzentration von Zn für das Pilzwachstum bei der Nitratkultur unterscheidet sich von derjenigen bei der Ammoniakkultur. Bei der Nitratkultur ist kein merklicher Unterschied des Wachstums

1) SAKAMURA (1934).

zwischen 5×10^{-7} mol und 10^{-6} mol ersichtlich, und schon bei 5×10^{-6} mol tritt die Wachstamsabnahme auf. Bei der Ammoniakkultur geschieht noch ein besseres Wachstum bei 5×10^{-6} mol als bei niedrigeren Konzentrationen, und die Wachstumerniedrigung ereignet sich erst bei 10^{-5} mol. Hier läßt sich also ein Unterschied der Zn-Wirkung auf das Wachstum und damit auf die Assimilation der N-Quelle zwischen der Nitrat- und Ammoniakkultur erkennen. Bei jener Konzentration von Zn, die noch das Pilzwachstum in der Ammoniakkultur begünstigt, beginnt dieses in der Nitratkultur etwas abzunehmen. Diese Tatsache zeigt, zwar auf umwegen, daß die Nitrataassimilation bei der NH_4NO_3 -Kultur mit Zusatz von Zn in geringerer Konzentration sich relativ vorteilhaft ergibt.

Es ist schwer, aus dem Ergebnis der Kultur mit alleiniger N-Quelle die Wirkung von Cu zu erklären, die das pH-Sinken, somit die vorzügliche Ammoniakaufnahme, bei der NH_4NO_3 -Glukose-Kultur fördert, weil Zusatz von Cu das Pilzwachstum überhaupt bei allen Kulturarten verbessert, ohne die Stickstoffernährung bei der Nitratkultur zu verhindern. Dazu kommt noch als anderes Verhältnis, daß die pH-Veränderung bei der Kultur mit alleiniger N-Quelle ziemlich weit von derjenigen bei der NH_4NO_3 -Kultur abweicht, was im allgemeinen solchen Erklärungsversuch der Cu-Wirkung erschwert. Die Erklärung ist also nur unter Berücksichtigung des Unterschiedes der fördernden Wirkung von Cu auf das Wachstum möglich, der zwischen der Ammoniak- und Nitratkultur in gewissem Grad möglicherweise angenommen werden kann.

Die Verschiedenheit der pH-Änderung, die bei der NH_4NO_3 -Kultur unter Umständen stattfindet, ist überhaupt darauf zurückzuführen, daß das Gleichgewicht zwischen der Ammoniak- und Nitrataufnahme infolge des Förderungs- oder Hemmungseffektes, der abhängig von Schwermetallmengen ist, in verschiedener Weise verloren geht. Es ist nicht wenig wahrscheinlich, daß die absorbierten Schwermetalle als intrazelluläre Faktoren eine für die Nitrat und Ammoniakaufnahme wichtige Rolle spielen. Dieselbe Bedeutung kommt auch den Zuckerarten zu.

Bei der NH_4NO_3 -Kultur fördert Saccharose die Nitrataufnahme und somit die pH-Umkehr viel stärker als Glukose, und dieselbe günstige Wirkung kommt auch der Fruktose zu, wenn die Konzentrationen von Fe und Zn geeignet reguliert werden. Für diese eigentümliche Tätigkeit von Saccharose ist aber wesentlich der Invertzucker verantwortlich, der durch das Pilzenzym in der Nährlösung

aus jenem Zucker entsteht. In der Tat kann auch bei der Kultur mit einem Gemisch von bereitstehender Glukose und Fruktose in äquivalenter Menge eine ähnliche Tendenz bewiesen werden. Es ist aber schwer zu verstehen, warum derartige Wirkung einzig der Glukose oder Fruktose fehlt. Fruktose übertrifft an Förderung der Nitrataufnahme die Glukose, aber für das Pilzwachstum steht jene auch bei Verwendung von anderen N-Quellen dieser nach. Aus dieser Tatsache kann man vermuten, daß Fruktose in der Funktion sich von Glukose unterscheidet, d.h. Glukose hauptsächlich für den Körperaufbau, während Fruktose für Atmung, Nitratreduktion usw. dienen könne. Damit Glukose für die Nitrataassimilation gute Dienste leisten kann, muß Fe in relativ großer Konzentration als Hilfsmittel dem Pilz gegeben werden. Wenn diese beiden Zuckerarten zusammen oder Saccharose bei der NH_4NO_3 -Kultur benutzt werden, so lassen sich die Nitrataufnahme und gleichzeitig auch das Pilzwachstum fördern, indem dieses wieder jene vermehrt, was eine Vergrößerung des Verhältnisses $[\text{NH}_3]:[\text{NO}_3]$ ergibt.

Bemerkenswert ist, daß derartige eigentümliche Wirkung von Saccharose, die bei der Nitratkultur und bei der NH_4NO_3 -Kultur das Pilzwachstum und die Nitrataufnahme fördert, bei der Ammoniakkultur sich nicht betätigt. Diese Tatsache scheint darauf hinzudeuten, daß die Funktion von Saccharose mit der Nitrataufnahme, aber weder mit der Ammoniakaufnahme noch mit den nachfolgenden synthetischen Prozessen zu tun hat. Ist die Kultur mit dieser spezifischen Tätigkeit von Saccharose¹⁾ verknüpft, so erscheinen die Wirkungen der Schwermetalle etwas anders als bei der Glukosekultur, und zwar kann dadurch die Bedeutung der Schwermetalle für Pilzkultur noch deutlicher erklärt werden.

In dieser Beziehung kommt Fe in erster Linie in Betracht. Eisen von höherer Konzentration führt bei der Glukose- NH_4NO_3 -Kultur die pH-Umkehr herbei, aber bei der Saccharosekultur wird diese spezifische Wirkung von Fe durch diejenige von Saccharose verdeckt und tritt undeutlich auf (Versuch 13). Bei der Saccharosekultur mit alleiniger N-Quelle kommt der Eisenwirkung keine Besonderheit zu, und die Erhöhung der Fe-Konzentration begleitet die Wachstumsförderung wie bei der Glukosekultur.

Die pH-Umkehr und das gute Wachstum, die beide bei der

1) Eine nähere Schilderung derartigen Wirkung des Gemisches von Glukose und Fruktose und auch alleinig von Fruktose ist unten oft erspart worden, sofern nichts anderes erwähnt wird.

Glukose- NH_4NO_3 -Kultur unter Benutzung von Zn von geringer Konzentration auftreten, sind bei der Saccharosekultur nicht mehr sichtbar, und beide Erscheinungen werden dabei durch größere Konzentration von Zn eher gefördert. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Wachstumsabnahme, die bei der Glukosekultur mit alleiniger N-Quelle unter Verwendung von Zn von großer Konzentration geschieht, bei der Saccharosekultur nicht der Fall ist. Die Wirkung von Zn auf die pH-Aenderung kommt bei der Saccharosekultur nicht mehr in Frage, weil die Wirkung dieses Zuckers in derselben Richtung vorherrscht.

Kupfer verhindert die pH-Umkehr bei der NH_4NO_3 -Kultur, und die Hemmung ist je nach der Zuckerart verschieden. Für die Hemmungswirkung gilt eine Reihe Glukose > Fruktose > Saccharose. Diese schwache Hemmung bei der Saccharosekultur wird vielleicht dadurch erklärt, daß die Tätigkeit von Saccharose, die mehr die Nitrataufnahme als die Ammoniakaufnahme zu erleichtern neigt, die entgegengesetzte Tendenz der Cu-Wirkung überwiegt. Der Saccharose kommt also die Fähigkeit zu, das Pilzwachstum und die Nitrataufnahme ohne besondere Kontrolle der Schwermetallmenge zu fördern.

In meiner früheren Arbeit (1930) zeigte sich, daß Fruktose fähig ist, die pH-Umkehr bei der NH_4NO_3 -Kultur von *Aspergillus oryzae* gleich oder noch leichter herbeizuführen wie Saccharose. Trotz der Verwendung desselben Pilzstamms, der seinerzeit benutzt worden war, ergaben sich die Versuche (z.B. Versuche 11 und 12) in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die pH-Umkehr ganz anderes; also fand keine pH-Umkehr statt. Wie die Ergebnisse von Versuchen 11 und 12 zeigen, hat dieser Unterschied mit der Verschiedenheit der benutzten Chemikalien nichts zu tun. Als wichtige Kulturbedingung, die allerdings seinerzeit unbemerkt war, kann die Verwendung der Schwermetalle von exakten Konzentrationen erwähnt werden. Versuch 16 in der vorliegenden Arbeit ergab, daß die pH-Umkehr bei der Fruktosekultur wirklich geschehen kann wie bei der Saccharosekultur, wenn jene mit viel Fe und wenig Zn, aber ohne Cu ausgeführt wird, während mit wenig Fe, viel Zn und auch mit Cu dies nicht der Fall ist. Außerdem zeigt es sich in Versuch 15, daß die pH-Umkehr bei der Fruktosekultur nur in Abwesenheit von Cu bemerkbar ist, daß in dessen Gegenwart aber diese pH-Aenderung nur auf die Saccharosekultur beschränkt ist.

Aus den oben erwähnten Tatsachen kann man schließen, daß

der Unterschied der pH-Aenderung bei der Fruktosekultur zwischen meiner früheren und vorliegenden Arbeit hauptsächlich auf die Schwermetallbedingungen zurückzuführen sei.

Hinsichtlich der Bedeutung des Zuckers bei der Nitratkultur ist noch zu bemerken, daß $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ unter anderem als N-Quelle für *Aspergillus oryzae* ungeeignet ist, wenn Glukose als C-Quelle verwendet wird. Nach BURSTRÖM (1939 b) soll Calcium auf die Nitratassimilation der Weizenkeimlingen starke Hemmung ausüben. Er hat diese Hemmung darauf zurückgeführt, daß das für Nitratassimilation notwendige Mangan besonders stark durch Calcium verdrängt wird, obwohl dieselbe Wirkung auch dem Eisen, Zink und Kupfer zukommt. Man geht aber zu weit, wenn man dasselbe Sachverhältnis auch an *Aspergillus oryzae* geltend machen will, weil die Versuchsergebnisse keine Tatsache zeigen, die besonders für die Notwendigkeit von Mn bei der Nitratassimilation spricht. Noch wichtiger ist die Tatsache, daß dieser Nachteil bei Benutzen von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ nur auf die Glukosekultur beschränkt ist, während bei der Saccharose- und Fruktosekultur der Pilz so gut wachsen kann wie bei Verwendung von NaNO_3 oder KNO_3 . Man kann hier eine Schutzwirkung der Saccharose gegen das durch Calcium ausgeübte Verdrängen von Mn sich kaum vorstellen. Ebenso wenig wahrscheinlich ist es, diesen Nachteil bei der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Kultur hauptsächlich dem Herabsetzen der Permeabilität des Protoplasmas für Nitrat zuzuschreiben, weil es auch schwer denkbar ist, daß die Permeabilität durch einen solchen Anelektrolyt wie Saccharose beeinflußt werde. Manches bleibt noch unerklärt bezüglich der günstigen Wirkung von Saccharose bei der $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Kultur, aber soviel ist wahrscheinlich, daß die Hemmung durch Calcium erst nach der Nitrataufnahme auftritt.

Ammoniumnitrat wird als N-Quelle für Schimmelpilze sowie für höhere Pflanzen darum oft benutzt, erstens weil der Basen- und Säureanteil dieses Salzes eine doppelte N-Quelle darbieten können, zweitens weil eilige und extreme pH-Aenderung durch balanzierte Aufnahme der beiden Anteile vermieden werden mag. Gegen Erwartung ist der letzte Grund aber in meisten Fällen nicht gültig, weil in der Regel Ammoniak vorzugsweise besser als Nitrat aufgenommen wird und der pH-Wert der Nährlösung dadurch sich vermindert. Wenn auch Nitrat zugleich mit Ammoniak absorbiert werden kann, steht die Aufnahme des ersteren überhaupt zurück und nimmt erst nach dem pH-Sinken zu. Es ist aber nicht aus-

geschlossen, daß Nitrat unter Umständen vornehmlich aufgenommen wird, und es ist einigermaßen von der Eigentümlichkeit der Pflanze abhängig, ob vorzugsweise Ammoniak oder Nitrat absorbiert wird. *Aspergillus niger* greift z.B. Ammoniak mit großer Vorliebe an, und der pH-Wert wird dadurch endlich bis auf 1,7 oder 1,5 erniedrigt und bleibt dort unveränderlich. Bei der Kultur von *Aspergillus oryzae* sinkt der pH-Wert bisweilen auf 2,0, oder findet bisweilen die pH-Umkehr statt, und die pH-Veränderung der NH_4NO_3 -haltigen Nährlösung hängt einerseits von der Stammeigenschaft und anderseits von der Kulturbedingung ab. Da diese zweierlei Neigung der pH-Aenderung darauf beruht, daß vorzugsweise der Basen- oder Säureanteil aufgenommen wird, gewährt eine ausführliche Analyse der pH-Aenderung bei der NH_4NO_3 -Kultur dieses Pilzes einen Anhaltspunkt für das Studium über den Mechanismus der Aufnahme von Ammoniak und Nitrat.

Die Permeabilität des Protoplasmas bildet eigentlich die Voraussetzung für die Absorption, oder jene läßt sich oft als ein Teil dieser auffassen, obwohl es unbestritten richtig ist, daß beide nicht als identisch betrachtet werden dürfen. Die Permeabilität ist die Eigenschaft des Protoplasmas, die den gelösten Stoffen das Durchgehen erlaubt. Es handelt sich daher beim Permeabilitätsproblem um das Hindernis des Protoplasmas für die durchgehenden Stoffe. Bei der Forschung der Absorption darf die Permeabilität natürlich nicht ignoriert werden, aber das Hauptgewicht ist dabei lieber auf die Kraft zu legen, die den Eintritt des gelösten Stoffs in die Zelle bzw. dessen Austritt bedingt.

Die Stoffwanderung in einer Lösung findet statt, wenn ein Gefälle der Konzentration oder des thermodynamischen Potentials des Stoffs zwischen zwei Phasen ohne Hindernis ausgeglichen wird. Wird diese Idee zur Stoffwanderung zwischen dem Zellinneren und der äußeren Lösung angewendet, so besteht der Grundbegriff der Absorption an der Zelle. Bei der Untersuchung über die Absorption eines Elektrolyten durch die Zelle kommt es daher in Frage, wie das Konzentrationsgefälle der freien Ionen oder der undissoziierten Anteile zwischen dem Zellinneren und der umgebenden Lösung geschaffen und ausgeglichen wird, vorausgesetzt, daß das Protoplasma permeabel für diesen Elektrolyt ist.

STERN (1933, S. 246) erwähnt in seiner „Pflanzen-thermodynamik“ Folgendes: „Vorläufig liefern uns wenigstens bei undissoziierten Teilchen die Konzentrationen ein annäherndes Maß für die

chemischen Potentiale. Sofern diese Teilchen einen durch die Natur der Plasmamembran bedingten Moleküldurchmesser nicht überschreiten (RUHLAND, SCHÖNFELDNER) und wasserlöslich sind, scheinen sonstige Hemmungen gegen den Ablauf von Uebergangsreaktion, die nach Gleichheit des chemischen Potentials tendieren, im allgemeinen nicht vorhanden zu sein, während für Ionen,, die Verhältnisse komplizierter liegen“. Daß ein Elektrolyt (Säure oder Base) in undissoziierter Form viel leichter in die Zelle eindringen kann als in Ionenform, ist bisher wenigstens bei den schwachen Elektrolyten tatsächlich bewiesen worden. Diese Eigenschaft als solche kann aber bei starken Säuren oder Basen nicht erwartet werden, weil hier die undissoziierten Anteile gewöhnlich nicht in meßbarer Konzentration vorhanden sind.

OSTERHOUT (1925) hat über die Permeabilität der pflanzlichen Zelle folgende Theorie¹⁾ aufgestellt:

Die schwachen Säuren und Basen in der elektroneutralen undissoziierten Form dringen leicht in die Zelle ein, oder werden durch diese aufgenommen. Dies gilt auch für diejenigen schwachen Säuren und Basen, die aus den Salzen durch die Hydrolyse entstanden sind. Das Konzentrationsgefälle von solch undissoziierten Teilchen zwischen dem Zellinneren und der umgebenden Lösung bedingt das thermodynamische Potential und bringt die Kraft hervor, wodurch dieser Stoff absorbiert werden kann. Wenn das thermodynamische Potential eines Stoffs in undissoziierter Form im Zellinneren und in der umgebenden Lösung im Gleichgewicht ist, findet keine Stoffwanderung statt. Damit ein Stoff fortdauernd in die Zelle aufgenommen oder aus der Zelle abgegeben werden kann, muß das Potentialgefälle immer wieder hergestellt werden. Diese für die schwachen Elektrolyten gültige Betrachtungsweise kann auch auf die starken Elektrolyten erwartet werden, bei denen allerdings gar keine meßbaren Konzentrationen undissoziierter Anteils vorhanden sind. Stellen wir uns z.B. eine Zelle vor, die in eine KNO_3 enthaltenden Lösung eingetaucht ist, so mag die durch Hydrolyse entstandene Salpetersäure in undissoziierter Form in die Zelle aufgenommen werden, aber nicht abhängig von deren Konzentrationsgefälle, weil der undissoziierte Anteil von HNO_3 ja außen keine

1) Diese Theorie hat aber nicht nur mit der Permeabilität, sondern auch viel mit dem Problem der Elektrolytenaufnahme zu tun. OSTERHOUT hat seitdem zahlreiche Arbeiten über diese Theorie veröffentlicht.

„Konzentration“ hat.¹⁾ Bei einer starken Säure, z.B. bei Salpetersäure wird es aber durch Zusammenstöße immer einmal zur Bildung undissoziierter Säure (HNO_3) kommen, nur eben nicht häufig genug, um eine meßbare HNO_3 zu erzeugen. Die Wahrscheinlichkeit, daß es hierzu kommt, wächst mit dem Produkt $[\text{NO}_3'][\text{H}']$. Dasselbe gilt auch für starke Basen. So z.B. bei KOH kommt das Ionenprodukt $[\text{K}'][\text{OH}']$ in Betracht. In der Lösung einer starken Säure oder Base ist das Molekül bereits als dissoziiert anzusehen, aber die hier auftretenden Kationen und Anionen werden bei der Absorption als Ionenpaare mit OH' bzw. H' betrachtet. Diese Theorie über die Absorption läßt sich also auch bei den starken Elektrolyten anwenden, wenn anstatt der Konzentration der undissoziierten Teilchen das thermodynamische Potential des Ionenpaares, das vom Ionenprodukt d.h. Aktivitätsprodukt abhängig ist, in Betracht gezogen wird. Gemäß des Potentialgefälles zwischen dem Zellinneren und der Nährlösung findet entweder die Aufnahme oder die Abgabe eines Elektrolyten statt.

Nach der Theorie des thermodynamischen Potentials ist es verständlich, daß die Absorption eines Elektrolyten nicht nur von der Aktivität von H' der OH' in der äußeren Lösung, sondern auch von derjenigen im Zellinneren und auch von der Aktivität der begleitenden Ionen abhängig ist. Da es aber sehr schwer ist, das thermodynamische Potential im Zellinneren bei beliebigen Materialien genau zu bestimmen, ist es bisher noch nicht gelungen, diese Theorie einwandfrei zu beweisen. Daher ist sie bisher mehrfach kritisiert worden, und von mehreren Forschern wurden Einwände gegen sie erhoben. Der Hauptpunkt dieser Einwände besteht darin, daß gegen die Behauptung dieser Theorie zunehmender pH-Wert der äußeren Lösung nicht immer die Aufnahme der Kationen und abnehmender pH-Wert nicht immer die Aufnahme der Anionen fördert²⁾.

Es ist ohne Zweifel nicht richtig, die Theorie des thermodynamischen Potentials als einwandfrei bewiesen zu betrachten, aber es wäre voreilig, die Theorie nur aus der gelegentlich vorkommenden Unabhängigkeit der Elektrolytenaufnahme vom pH-Wert der Nährlösung in Abrede zu stellen, weil neben H' und OH' auch andere

1) STERN (1933. S. 247).

2) PIRSCHLE (1931), COLLANDER (1935), JACQUES (1936), ARNON (1937), STEWARD und MARTIN (1937) WADLEIGH und SHIVE (1939), HOAGLAND und BROYER (1940), BURSTRÖM (1940).

begleitende Ionen immer gleichzeitig in Betracht gezogen werden müssen.

HOAGLAND und BROYER (1940) behaupten, daß die Salzakkumulation in Gerstenwurzel mit dem pH-Wert der umgebenden Lösung, also mit dem thermodynamischen Potential, nicht in Zusammenhang stehe. Aber es ist noch bezweifelt, ob die metabolische Aktivität nach dieser Schule mit dem thermodynamischen Potential gar nichts zu tun habe. Aus gleicher Betrachtungsweise wäre es nicht notwendig, die Theorie der Anionenatmung von LUNDEGÅRDH prinzipiell als verschieden von der Theorie von OSTERHOUT aufzufassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche über die Ammoniak- und Nitrataufnahme durch *Aspergillus oryzae* werden durch die Theorie des thermodynamischen Potentials am besten erklärt. Die Abhängigkeit der Ammoniak- und Nitrataufnahme von dem pH-Wert der umgebenden Nährlösung spricht schon für diese Theorie.

ITZEROTT (1936) hat die wichtige Bedeutung des pH-Wertes der Nährlösung für die Assimilation des Ammoniak- und Nitratstickstoffs bei der Kultur von *Aspergillus niger* bestätigt und versucht die Absorption des Ammoniakstickstoffs durch die Theorie des thermodynamischen Potentials zu erklären, aber über den Mechanismus der Nitrataufnahme hat diese Forscherin keine eingehende Erörterung angestellt. Als wichtiger Faktor für die Nitrataufnahme durch *Aspergillus niger* hat BÜNNING (1936), dessen Arbeit gleichzeitig mit derjenigen von ITZEROTT in derselben Zeitschrift veröffentlicht steht, die Adsorptionstätigkeit des Zellsaftkolloides von amphoterer Natur betrachtet, und er hat gefunden, daß bei $\text{pH} < 4,4$ Nitrat adsorbiert und gespeichert wird, weil das Kolloid positiv geladen ist, aber daß bei $\text{pH} > 4,4$ Nitrat kaum adsorbiert wird, weil es negativ geladen ist. Seiner Ansicht nach soll der Ladungssinn des Oberflächenkolloides des Protoplasmas in dieser Beziehung von keiner Bedeutung sein.

Aus den oben geschilderten Versuchen geht hervor, daß die Nitrat- sowie Ammoniakaufnahme nicht nur von dem pH-Wert der Nährlösung, sondern auch von der Menge der nötigen Schwermetalle und der Zuckerarten abhängig ist, und zwar erscheint bei der NH_4NO_3 -Kultur dieser Zusammenhang sehr deutlich. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die Absorption nicht nur auf den pH-Wert der Nährlösung, sondern auch auf die intrazelluläre Bedingung sich bezieht. Um die Aufnahme des Ammoniak- oder Nitratstickstoffs zu fördern, muß also im Zellinneren das Streben bestehen der pH-

Wert zu regulieren oder $[\text{NH}_4^+]$ bzw. $[\text{NO}_3^-]$ möglichst zu vermindern.

Es ist allerings fast unmöglich, den intrazellularen pH-Wert¹⁾ so genau zu bestimmen, wie in der äußeren Lösung, und es ist sehr schwer zu entscheiden, ob der Zellsaft eine Lösung oder hauptsächlich von kolloider Natur sei. Wenn man auch mit BÜNNING annehmen darf, daß die Nitrataufnahme auf die Adsorption an positiv geladene Zellsaftkolloide zurückzuführen sei, wäre es nicht unmöglich, daß die hohe Acidität, die innerhalb der Zelle den Dissoziationszustand des amphoteren Zellsaftkolloides bedingen kann, ohne weiteres ein Gefälle des thermodynamischen Potentials herstellt, wodurch Nitrat in die Zelle aufgenommen wird.

Damit derartiges Potentialgefälle hergestellt wird, darf eine ebenso große Bedeutung auch der Aufräumung des aufgenommenen Nitrats oder Ammoniaks innerhalb der Zelle beigemessen werden. Als solche Aufräumungsprozesse möchten wir beispielsweise die Nitratreduktion, die Aminosäuresynthese aus Ammoniak, den nachfolgenden Körperaufbau usw. rechnen. Derjenige Faktor, der an derartigem Prozesse beteiligt ist, sei hier Aufräumungsfaktor oder kurz Aufräumer genannt.

Aus den oben Erwähnten kann man zwei wichtige Faktorengruppen nennen, die die Nitrat- oder Ammoniakaufnahme bedingen: pH-Regulator und Aufräumer. Ein gewisser Teil der metabolischen Aktivität (HOAGLAND), der durch die Anionenatmung geleisteten Arbeit (LUNDEGÅRDH) und der Speichierungsfähigkeit (BÜNNING)²⁾ dürfen etwa zu diesen zwei Gruppen gehören.

Wir wissen heute noch fast gar nichts über die biochemischen Wirkung der Schwermetalle und über die Bedeutung des Zuckers für die Nitrat- und Ammoniakassimilation bei der Kultur der Schimmelpilze. Deshalb sind wir noch nicht imstande, den Absorp-

1) Bei verschiedenen *Aspergillus*arten beträgt der pH-Wert innerhalb des Mycels immer mehr als derjenige in der umgebenden Lösung. Nach BÜNNING (1936) soll der pH-Wert des Zellsafts von *Aspergillus niger* zwischen 4,2 und 5,2 betragen, während in der Nährlösung der Wert zwischen 2,5 und 3,0 liegt. Ähnliches Verhältnis des pH-Wertes zwischen dem Zellinneren und -äußeren wurde von BACH und DESBORDES (1937) bei *Aspergillus repens* bestimmt: innen pH 6-7, außen pH 3,0-3,5.

2) Während BÜNNING (1936) seine Theorie der Adsorption an Zellsaftkolloiden behauptet, äußert er an verschiedenen Orten auch die Ansicht über den Absorptionsmechanismus, die von der hier vorgeschlagenen Auffassung prinzipiell nicht verschieden scheint.

tionsmechanismus dieser N-Quellen unter Berücksichtigung der Schwermetalle und der Zuckerarten von biochemischer Seite aufzuklären. Da es aber nicht bezweifelt ist, daß irgend wichtige Bedeutung den Schwermetallen als Katalysatoren und den Zuckerarten als Substraten der enzymatischen Wirkungen oder als Baumaterialien für die Assimilation dieser N-Quellen beigemessen werden kann, liegt es nahe anzunehmen, daß diese Faktoren als Aufräumer des Nitrats und Ammoniaks innerhalb der Zelle dienen und daß das thermodynamische Potential dadurch bedingt werden. Es wäre aber auch möglich, daß irgend ein Schwermetall in bestimmter Konzentration als Paralysator der Assimilation wirksam ist, der die Herstellung des Potentialgefälles erschwert.

In verschiedenen Beziehungen unterscheidet sich die Nitrat- oder Ammoniakaufnahme aus NH_4NO_3 von derjenigen von alleinigen N-Quelle. In jenem Fall kommen besonders das Gleichgewicht zwischen den Aufnahmen der beiden N-Quellen und die durch die Schwermetalle oder Zucker bedingte pH-Veränderung in Frage. Aber gemeinsam bei diesen verwendeten N-Quellen bedingen bestimmte Faktoren das thermodynamische Potential, also das Ionenprodukt $[\text{NH}'][\text{OH}']$ oder $[\text{NO}_3'][\text{H}']$, im Zellinneren und in der Nährlösung. Als solche Faktoren seien die folgenden genannt:

In der Nährlösung

A. Faktoren, die den pH-Wert bedingen.

- a) Anfangs-pH.
- b) Physiologische Acidität und Alkalität.
- *c) Puffervermögen¹⁾.
- *d) Ausscheidung der organischen Säure.

B. Anfängliche Konzentration der gegebenen N-Quelle.

Innerhalb der Zelle.

A. Faktoren, die den pH-Wert bedingen.

- a) Eigentümlicher pH-Bereich, innerhalb dessen die intrazelluläre Acidität veränderlich ist.
- b) Menge des aufgenommenen Ammoniaks und Nitrats.
- c) Aufräumung oder Anhäufung des Ammoniaks und Nitrats.
- *d) Bildung der organischen Säure oder der Kohlensäure.

1) Die mit Stern * bezeichneten Faktoren sind hier überhaupt außer Betracht gelassen.

- B. Aufräumung oder Anhäufung des Ammoniaks und Nitrats.
- a) Art und Menge der C-Quelle, die zum Körperaufbau nutzbar ist.
 - b) Katalysatoren oder Substrate, die bei der Nitratreduktion oder bei den nachfolgenden Synthesen wirksam sind. Möglicherweise bestimmte Schwermetalle oder Zuckerarten.
 - c) Paralysatoren. Möglicherweise Zn von höherer Konzentration.
- *C. Spezielle intrazelluläre Wirkungen, die mit der Funktion einer Saugpumpe verglichen werden können. Metabolische Aktivität nach HOAGLAND, Anionenatmung nach LUNDEGÅRDH. Einige davon gehören zu den Kategorien A und B.

Ammoniakaufnahme.

Wenn Ammoniak und Nitrat gleichzeitig zusammen als N-Quelle verwendet werden, so läßt sich jenes viel leichter aufnehmen und assimilieren als dieses, und dies macht sich an höheren Pflanzen sowie an Schimmelpilzen geltend. Der Erklärungsversuch des Absorptionsmechanismus selbst scheint bei Ammoniak¹⁾ viel leichter zu sein.

Ammoniak in der Form von NH_4OH oder NH_3 kann leicht durch das Protoplasma permeieren und bei Pilzkultur bietet sich oft die Gelegenheit dazu, daß Ammoniak in undissoziierter Form in die Zelle aufgenommen wird, wenn der pH-Wert der Nährlösung ziemlich hoch liegt. In solchem Fall darf der Absorptionsvorgang selbst einfach als Diffusion der elektroneutralen Teilchen betrachtet werden. Dieselbe Erklärungsweise gilt auch bei der Abgabe von Ammoniak aus der Zelle, wenn der intrazelluläre pH-Wert relativ hoch liegt.

Wenn auch undissoziiertes Ammoniak in meßbaren Konzentration bei niedrigem pH-Wert nicht vorhanden ist²⁾, so kann man doch das Vorhandensein des thermodynamischen Potentials von NH_4OH annehmen, das vom Ionenprodukt $[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]$ abhängig ist. Innerhalb der Zelle läßt sich absorbiertes Ammoniak durch die syn-

1) LUNDEGÅRDH (1937).

2) Schon bei pH-Wert 5,7, womit überhaupt jede NH_4NO_3 - oder Ammoniakkultur der vorliegenden Arbeit begann, erreicht die Dissoziation von Ammoniak praktisch beinahe ihr Maximum.

thetischen Prozesse sofort assimilieren und beseitigen, ohne sich dort anzuhäufen, wodurch es möglich wird, das innere Ionenprodukt $[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]$, und somit das intrazelluläre thermodynamische Potential von Ammoniak immer wieder zu erniedrigen.

Diese Verhältnisse erlauben der Zelle selbst bei einem niedrigen pH-Wert der Nährlösung Ammoniak aufzunehmen, der während der Ammoniakkultur von *Aspergillus oryzae* gewöhnlich erreicht wird, indem das thermodynamische Potential der umgebenden Lösung ziemlich stark sich erniedrigt. Wieweit der Pilz die erhöhte Acidität der Nährlösung ertragen kann, d.h. wieweit das Potentialgefälle von außen nach innen hin trotz der pH-Abnahme der Nährlösung durch die Tätigkeit der Zelle hergestellt werden kann, hängt von der Eigentümlichkeit der Zelle ab. Bei der NH_4NO_3 -Kultur erträgt z.B. *Aspergillus niger* eine so hohe Acidität wie pH 1,7, während an *Aspergillus oryzae* das erreichte pH-Minimum nur 2,0 beträgt¹⁾. Der Widerstand gegen die hohe Acidität besteht daher wenigstens an diesen Pilzen nicht nur in der Vermeidung einer Beschädigung der Zelle, sondern auch in der inneren aktiven Regulierungsfähigkeit²⁾ zugunsten der Stoffaufnahme. Je höher dieser minimale pH-Wert liegt, desto kleiner ist die Regulierungsfähigkeit, also desto leichter wird die Stoffaufnahme durch die pH-Veränderung der äußeren Lösung beeinflusst.

Gemäß der Eigenschaft des Pilzes oder je nach der Kulturbedingung, mag absorbiertes Ammoniak oft nicht sofort assimiliert werden, sondern diffundiert infolge der Akkumulation aus der Zelle hinaus. BACH und DESBOERDES (1937) haben bei der KNO_3 -Kultur von *Aspergillus repens* gesehen, daß der bei der Nitratreduktion entstandene Ammoniakstickstoff von diesem Pilz nicht leicht verarbeitet werden kann und in die umgebende Nährlösung ausgeschieden wird, wenn der äußere pH-Wert so wenig wie 1,6 beträgt. Diese Autoren haben zur Erklärung dieses Ammoniakaustritts das Hauptgewicht auf die meßbare Konzentration von Ammoniak in undissoziierter Form gelegt. Auch bei der NH_4NO_3 -Kultur ist an diesem Pilz ein ähnliches Verhältnis beobachtet worden. Solcher leichte Ein- und Austritt undissozierten Ammoniaks an *Aspergillus repens* sind von

1) Die mögliche Grenze der pH-Abnahme d.h. der Wendepunkt der pH-Umkehr wurde an verschiedenen *Aspergillus*-arten von uns bestimmt. Die Ergebnisse davon werden an anderen Orte mitgeteilt werden.

2) Der Aufräumungsfaktor ist als derartige Regulierungsfähigkeit zu rechnen.

ihnen auf das Konzentrationsgefälle zwischen dem Zellinneren und -äußeren zurückgeführt worden. BÜNNING (1936) hat diesen Austritt des bei der Nitratreduktion entstandenen Ammoniaks bei *Aspergillus repens* nicht so sehr als die Ursache, sondern eher als die Folge geringer Synthese aufgefaßt. Bei *Aspergillus niger* ist von ihm gefunden worden, daß das bei der Nitratreduktion entstandene Ammoniak innerhalb der Zelle leicht assimiliert werden kann, ohne aus der Zelle hinauszudiffundieren, selbst wenn der pH-Wert der Nährlösung sich vermindert. In diesen Fällen wäre nicht ausgeschlossen, daß die zufällig der Zelle zur Verfügung stehenden Schwermetallspuren, vor allem Cu, als Aufräumer des Ammoniaks eine wichtige Rolle spielen.

Als Aufräumer des Ammoniaks kommen auch verschiedene Zucker in Betracht, weil diese zum Körperaufbau Ammoniak mitnehmen. PRIANISCHNIKOW (1935) hat bei einer Reihe von Untersuchungen seit 1900 konstatiert, daß bei der NH_4NO_3 -Kultur der etiolierten höheren Pflanzen, die selbstverständlich an Kohlehydrat Mangel haben, das absorbierte oder bei der Nitratreduktion entstandene Ammoniak aus der Wurzel ausgeschieden wird, ohne weiter assimiliert zu werden. Ammoniak, das gewöhnlich bei Zuckermangel aus dem Mycel ausgeschieden wird, kommt teils infolge der Autolyse, teils aber stammt es aus demjenigen, das als solches vom Pilz absorbiert worden oder aus Nitrat entstanden ist. KLEIN, EIGNER und MÜLLER (1926) haben bei der Kultur von *Aspergillus niger* festgestellt, daß das bei der Nitratreduktion entstandene Ammoniak mitsamt den anderen Reduktionsprodukten aus der Zelle abgegeben wird, wenn die Eiweißsynthese, so z.B. wegen der Untauglichkeit der gegebenen C-Quelle, sistiert wird. Der schnelle Austritt des Ammoniaks bei dem Zuckermangel in der Pilzkultur spricht jedenfalls dafür, daß überhaupt der Aufräumungsfaktor bei der Aufnahme des Ammoniaks eine wichtige Rolle spielt.

Nitrataufnahme¹⁾.

Der Mechanismus der Nitrataufnahme ist viel komplizierter als derjenige bei Aufnahme von Ammoniak. Da der intrazelluläre pH-Wert bei der Pilzkultur gewöhnlich größer ist als derjenige der Nährlösung, ist das thermodynamische Potential von HNO_3 im Anfangsstadium selbstverständlich außen höher als innen. Verschieden

1) Salpetersäureaufnahme im strengen Sinne.

von der Ammoniakassimilation ist aber eine Reihe von Reduktionsprozessen bei der Nitratassimilation benötigt, was dazu neigt, die Anhäufung des Nitrats im Zellinneren und daher den Ausgleich des Gefälles des thermodynamischen Potentials von HNO_3 zu veranlassen, wenn die Reduktion nicht glatt erfolgt. Nicht nur die Nitratreduktion, sondern auch die nachfolgenden synthetischen Prozesse, beeinflussen als Aufräumer die Nitrataufnahme. Wenn die letztgenannten synthetischen Prozesse gestört werden, kann Nitrat nicht mehr aufgenommen werden, und sogar diffundiert das aus Nitrat entstandene Ammoniak hinaus. Wie schon KLEIN, EIGNER und MÜLLER (1926) bei der Nitratkultur von *Aspergillus niger* gesehen haben, treten Aminosäure, Ammoniak und auch Nitrit aus der Zelle aus, wenn die Eiweißsynthese gestört wird. Die Schwermetalle in bestimmten Kombinationen und Saccharose können als wirksame Aufräumer des Nitrats genannt werden. Aus meinen Versuchen 5 und 8 ist ersichtlich, daß bei der Cu-entbehrenden NH_4NO_3 -Kultur die Restmenge des Nitrats im späteren Kulturstadium wieder zunimmt, während bei der Cu-haltigen Kultur die Nitratmenge in der Nährlösung im Verlaufe des Wachstums immer wieder sich vermindert. Dies läßt sich dadurch erklären, daß ohne Cu die Eiweißsynthese nicht glatt fortschreiten kann und daß Nitrat infolge dessen Anhäufung innerhalb der Zelle wieder in die Nährlösung abgegeben wird¹⁾. Die Nitritabgabe, die bisweilen bei der Pilzkultur bemerkt wird, kann in gleicher Weise erklärt werden. Es unterliegt natürlich keinem Zweifel, daß in solchen Fällen der pH-Regulator nicht wenig die Nitrataufnahme sowie -abgabe beeinflusst.

Da Fe, Zn, Mn und Cu mit der Zunahme ihrer Menge immer mehr bis zum gewissen Grad das Pilzwachstum bei der Nitratkultur fördern, gibt es keinen Grund anzunehmen, daß irgendwie diese Metalle unter Umständen die Nitrataufnahme verhindern dürften; nur mit Ausnahme von Zn und Mn von hoher Konzentration (Versuche 32 und 33).

Saccharose besitzt eine eigentümliche Fähigkeit, die Nitrataufnahme merklich zu begünstigen, deshalb kann man diesen Zucker als einen ausgezeichneten Aufräumer des Nitrats betrachten. Nach BURSTRÖM (1937, 1939b) soll Glukose für die Nitratassimilation in Weizenwurzel, und besonders in den abgeschnittenen, benötigt

1) Derartige Nitratgabe mag aber auch beim genügenden Zusatz der Schwermetalle unter anderen Bedingungen möglich sein.

werden. Aber er ist der Ansicht, daß die Reduktion und die Anhäufung des Nitrats dessen Aufnahme nicht beeinflussen, sondern diese eher mit der Zusammensetzung (Nitratmenge) der Nährlösung und mit dem Mechanismus der aktiven Absorption¹⁾ in inniger Beziehung stehe. Es sei aber bemerkt, daß bei höheren Pflanzen die Absorptions- und Assimilationsorte weit voneinander getrennt sind und überdies die Kontrolle der für die Nitratreduktion oder für die Eiweißsynthese erforderlichen C-Quelle viel schwieriger ist als bei Schimmelpilzen und Bakterien. Trotz der abweichenden Ansicht von BURSTRÖM, die allerdings mit anderem Material aufgestellt worden ist, wäre es nicht nötig, den Einfluß der Aufräumung des Nitrats, z.B. der Nitratreduktion, auf den Absorptionsmechanismus bei *Aspergillus oryzae* zu unterschätzen.

Beim Erklärungsversuche des Mechanismus der Nitratabsorption ist die begleitende Aufnahme des Basenanteils zu berücksichtigen, worüber schon im vorigen Abschnitt ziemlich ausführlich die Rede war. Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß selbst bei der Nitratkultur der pH-Wert nicht immer steigt und unter Umständen infolge der gleichzeitigen Aufnahme des Basenanteils wenigstens in früherem Kulturstadium sinkt.

Eine gleichartige Erscheinung ist von HOAGLAND und BROYER (1940) bei der Nitrataufnahme in Gerstenwurzel mitgeteilt worden. Diese Autoren bereiteten in der Vorkultur die sogen. „metabolisch aktiven Wurzeln“, die wenig Kalium, aber viel Kohlehydrat enthalten. In der Vorkultur wurden auch andersartige Wurzeln kultiviert, in denen im Gegensatz zu metabolisch aktiven Wurzeln nicht wenig Kalium, aber wenig Kohlehydrat aufgespeichert war. Die bei KNO_3 -Kultur stattfindende pH-Änderung wurde auch von diesen Autoren der ungleichen Aufnahme von Kalium und Nitrat zugeschrieben. Ihre Versuchsergebnisse zeigten, daß an den metabolisch aktiven Wurzeln die pH-Änderung den Verlauf nimmt, der dem oben erwähnten Typus I in meinem Fall entspricht, daß nämlich der pH-Wert anfangs sinkt und nachher zunimmt. Bei den metabolische inaktiven Wurzeln verläuft aber die pH-Änderung nach dem Typus II; der pH-Wert steigt nämlich immer höher. Nach diesen Autoren sollen die pH-Abnahme und -zunahme auf der vorzüglichen Absorption von Kalium bzw. von Nitrat beruhen. Es läßt sich also be-

1) Die aktive Absorption dürfte als eine durch die Anionenatmung geleistete Arbeit aufgefaßt werden.

merken, daß bei Gerstenwurzel eine ähnliche Beziehung zwischen der Nitrataufnahme und dem pH-Verlauf entsteht, wie bei *Aspergillus oryzae*.

Bei der Nitrat-Glukosekultur dieses Pilzes mit einem Anfangs-pH von 5,5 nimmt der pH-Wert zunächst ab, um wieder zuzunehmen, unabhängig von der Schwermetallbedingung. Bei der Saccharosekultur, sonst unter gleichen Bedingungen, steigt der pH-Wert immer höher, ausgenommen, daß bei Gebrauch von Fe und Zn, beide von kleinen Mengen, der pH-Wert fortdauernd abnimmt. Diese Tatsache scheint darauf zu beruhen, daß Saccharose samt diesen Schwermetallen von genügender Menge absorbiertes Nitrat schnell aufräumen können und dadurch die Nitrataufnahme fördern, während der Glukose eine derartige Fähigkeit fehlt. Es läßt sich vermuten, daß der pH-Wert innerhalb des jungen keimenden Mycels in diesem Fall vielleicht nicht sehr von demjenigen der Nährlösung (5,5) sich unterscheidet. Schon infolge der Aufnahme des Nitrats von geringer Menge wird das Gleichgewicht des Potentialgefälles bei der Glukosekultur bald erreicht, weil eine genügende Aufräumungsfähigkeit hier nicht erwartet werden kann, wenn auch das anfängliche Ionenprodukt $[\text{NO}_3'][\text{H}']$ in der Nährlösung ein wenig höher ist als im Zellinneren. Damit die Nitrataufnahme selbst bei der Glukosekultur mit einem großen Anfangs-pH beginnen oder nach der pH-Steigung fort dauern kann, ist spezifische Wirkung außer derjenigen des Nitrataufräumers erforderlich. Als solcher Faktor mag eine der Saugpumpenleistung ähnliche Tätigkeit möglich sein¹⁾. Bei Säurebildnern wie *Aspergillus niger* wäre es auch möglich, daß die vom Pilz gebildete Oxalsäure, Citronensäure usw. ausgeschieden werden und der pH-Wert der Nährlösung dadurch erniedrigt wird, wenn dieser Wert anfänglich relativ höher liegt. Neben diesen auf dem Betriebsstoffwechsel begründeten aktiven Tätigkeiten, die zum Zwecke der Herstellung des Gefälles des thermodynamischen Potentials von HNO_3 und damit nach dessen weiterer Aufnahme streben, ist auch eine physikalische Zwangsläufigkeit denkbar, wovon die Nitrataufnahme abgeleitet werden kann.

Wenn das Ionenprodukt des Basenanteils in der Nährlösung, so z.B. $[\text{Na}'][\text{OH}']_{\text{außen}}$, mehr als dasjenige im Zellinneren beträgt, auch wenn $[\text{OH}']_{\text{außen}} < [\text{OH}']_{\text{innen}}$, aber noch stärker $[\text{Na}']_{\text{außen}} >$

1) LUNDEGÅRDH (1940, S. 185): „Die Anionenatmung ist der aktive Hebel für Salzaufnahme.“

$[\text{Na}']_{\text{innen}}$, so tritt zunächst möglicherweise das Ionenpaar Na^+ und OH^- gemäß des Potentialgefälles in die Zelle ein. Derartige vorhergehender Eintritt des Basenanteils sei hier Ableitungs- oder Induktionsabsorption genannt. Durch diesen Prozeß erniedrigt sich der pH-Wert der Nährlösung, und es läßt sich dabei eine wahrscheinliche Erhöhung des intrazellularen pH-Werts vermuten. Bei zahlreichen *Aspergillus*-arten kann man tatsächlich ansehen, daß die Zu- und Abnahme des intrazellularen pH-Wertes infolge der Erhöhung bzw. Erniedrigung desjenigen der Nährlösung hervorgerufen wird, indem die Reihe $\text{pH}_{\text{innen}} > \text{pH}_{\text{außen}}$ immer unveränderlich bleibt. Diese Ableitungsabsorption des Basenanteils kann soweit schreiten, als der dadurch erhöhte pH-Wert des Zellinneren und der erniedrigte pH-Wert der Nährlösung genug sind, um ein neues Potentialgefälle von HNO_3 und damit die Bedingung für die Nitrataufnahme herzustellen. Der Ableitungsaufnahme des Basenanteils folgt die Nitratabsorption, wofür selbstverständlich wichtig auch die Mitwirkung der intrazellularen Aufräumer des Nitrats ist. Die abgeleitete Nitratabsorption ruft natürlich die pH-Steigung der umgebenden Lösung hervor. Daß die Nitrataufnahme dessenungeachtet nicht merklich abnimmt, dürfte auf die Verstärkung der Aufräumungstätigkeit im Zellinneren zurückzuführen sein, die durch die weitere Absorption und Anhäufung der notwendigen Schwermetalle, des Zuckers usw. und auch durch die Neubildung der dafür wirksamen Stoffe¹⁾ erreicht wird. Dazu kommt noch die Ableitungsabsorption der neu gebildeten Mycelien, wodurch das pH-Sinken der Nährlösung hervorgerufen wird. Bei der schwachen Aufräumung häuft sich das bei der Nitratreduktion entstandene Ammoniak innerhalb der Zelle an, was den pH-Wert dort so hoch erhöht, daß das Ammoniak selbst und auch andere Basenanteile austreten. Da auch Nitrat innerhalb der Zelle schon gesättigt ist, ist seine Aufnahme nicht mehr möglich und diffundiert²⁾ es mitsamt den Basenanteilen aus der Zelle hinaus (Versuch 48). Genaue Erklärung dieser komplizierten Erscheinung des Ein- und Austritts der beiden Anteile von einem Nitratsalz erfordert noch weitere Untersuchungen.

1) Vitamine oder andere Wachstumsstoffe (BÜNNING 1934 und der obige Versuch 51).

2) ITZEROTT (1936) und BÜNNING (1936) haben auch bei *Aspergillus niger* gesehen, daß Nitrat durch geringere C_H wieder aus den Zellen verdrängt werden kann.

Bei der Glukosekultur mit einen niedrigeren Anfangs-pH, so z.B. von 2,5 (Versuch 49), findet aber keine Ableitungsabsorption des Basenanteils statt, und infolge der einseitigen Nitrataufnahme steigt der pH-Wert immer höher, weil das äußere Ionenprodukt $[\text{NO}_3'] [\text{H}']_{\text{außen}}$ schon so hoch ist, daß neue Schaffung eines Gefälles des thermodynamischen Potentials für die Nitrataufnahme nicht erforderlich ist. Eine merkliche pH-Zunahme, damit eine bestimmte Abnahme des thermodynamischen Potentials von HNO_3 im äußeren Medium, die aus dessen Eintritt erfolgt, veranlaßt jetzt umgekehrt die Aufnahme des Basenanteils¹⁾, die eine zeitweilige Erniedrigung des pH-Werts begleitet.

Bei der Anwendung von Saccharose, die als stark wirksamer Aufräumer des Nitrats betrachtet werden kann, tritt keine Ableitungsabsorption des Basenanteils auf und steigt der pH-Wert einseitig.²⁾ Aber es sei bemerkt, daß selbst in diesem Fall der pH-Wert immer wieder zum Sinken neigt, wenn der Pilz an den Schwermetallen Mangel hat.

Ein anfängliches pH-Sinken und ein darauf folgendes pH-Steigen, die von HOAGLAND und BROYER (1940) bei ihrem Versuch über die Nitratabsorption in den an Kalium armen sogen. metabolisch aktiven Gerstenwurzeln festgestellt worden sind, können mit der an *Aspergillus oryzae* erreichten Kenntnis in der Weise aufgefaßt werden, daß zunächst zwangsläufig die Ableitungsabsorption von K' und OH' in Gestalt von Ionenpaar stattfindet und die Nitrataufnahme dadurch abgeleitet wird. Daß bei den an Kalium reichen Wurzeln aber dagegen der pH-Wert der umgebenden Lösung immer höher steigt, ist darauf zurückzuführen, daß der intrazelluläre pH-Wert seinerseits bereits so viel beträgt, daß Nitrat ohne weiteres aufgenommen werden kann.

Bei der NH_4NO_3 -Kultur von *Aspergillus oryzae* wird Ammoniak zunächst vorwiegend aufgenommen, und die Absorption dauert ziemlich lang fort, ohne eilig aufzuhören, weil das intrazelluläre thermodynamische Potential von Ammoniak durch dessen ausgezeichnete Assimilierbarkeit immer wieder erniedrigt werden kann. Andererseits ist es auch möglich, daß diesem Ammoniakeintritt in früherem Stadium die Bedeutung der Ableitungsabsorption beigemessen wird. Da absorbiertes Ammoniak schnell der Assimilation unterworfen

1) Eine kleine Ableitungsabsorption.

2) Dasselbe Verhältnis ist einigermaßen auch bei Verwendung von Glukose in großer Konzentration ersichtlich (Versuch 50).

wird, so der intrazelluläre pH-Wert nicht so hoch steigen, daß die Nitrataufnahme dadurch abgeleitet werden kann. Die Ableitungsabsorption des Ammoniaks kann daher lieber zur Erhöhung des thermodynamischen Potentials von HNO_3 in der Nährlösung durch die pH-Abnahme beitragen, als zur Erniedrigung derselben im Zellinneren. Es wäre eine mögliche Folgerung, daß die pH-Umkehr bei der NH_4NO_3 -Kultur aus einer Konkurrenz zwischen der Ammoniakaufnahme im Sinne der Ableitungsabsorption und der dadurch induzierten Nitrataufnahme, und zwar unter Mitwirkung der Aufräumung absorbiertener N-Quelle im Zellinneren erfolgt. Der für jede Pilzart charakteristische Wendepunkt der pH-Umkehr bei der NH_4NO_3 -Kultur hängt natürlich davon ab, wieweit die Ableitungsabsorption des Basenanteils vor sich gehen kann.

Zusammenfassung

Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse der NH_4NO_3 -, Ammoniak- und Nitratkulturen von *Aspergillus oryzae* ist auf S. 216–217 angegeben.

In der Besprechung.

1. Die Bedeutung der Schwermetalle (Fe, Zn, Mn und Cu) und einiger Zuckerarten für das Wachstum und für die Nitrat- und Ammoniakaufnahme wurde erörtert.
2. Die Mechanismen der Ammoniak- und Nitrataufnahme wurden gestützt auf die Theorie des thermodynamischen Potentials erklärt.
3. Es wurde betont, daß nicht nur der pH-Wert, sondern auch die Aufräumung des absorbierten Ammoniaks und Nitrats innerhalb der Zelle in Betracht gezogen werden müssen, damit die Aufnahme dieser N-Quellen gestützt auf diese Theorie erklärt wird.
4. Die Schwermetalle je von bestimmter Konzentration scheinen als solche Aufräumungsfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Auch Saccharose kann als ausgezeichnete Aufräumer für Nitrat betrachtet werden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Stipendiums ausgeführt, das mir vom Unterrichtsministerium gewährt wurde.

Literaturverzeichnis

- ARNON, D. J. (1937): Ammonium and nitrate nitrogen nutrition of barley at different seasons in relation to hydrogen ion concentration, manganese, copper, and oxygen supply. *Soil Sci.*, **44**.
- BACH, D. et DESBORDE, J. (1937): Sur les mécanismes physicochimiques réglant l'assimilation des sels ammoniacaux et des nitrates par les végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, **49**.
- BÜNNING, E. (1934): Wachstum und Stickstoffassimilation bei *Aspergillus niger* unter dem Einfluß von Wachstumsregulatoren und Vitamin B. *Ber. d. d. Bot. Ges.*, **52**.
- (1936): Ueber die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. *Flora*, **31**.
- BURSTRÖM, H. (1937): Ueber die Verarbeitung von Nitrat in Weizenpflanzen. *Ann. Landw. Hochsch. Schwed.*, **6**.
- (1939a): Ueber die Schwermetallkatalyse der Nitrataufnahme. *Planta*, **29**.
- (1939b): Die Rolle des Mangans bei der Nitrataufnahme. *Planta*, **30**.
- (1940): Studies on the relation between H-ion concentration and nitrate utilization by wheat plants. *Ann. Agri. College of Sweden*, **8**.
- COLLANDER, R. (1935): Salzpermeabilität und Salzaufnahme der Zellen von *Chara ceratophylla* und *Tolypellopsis stilligera*. *Proc. 6th Int. Bot. Congr. II. Amsterdam, Proc.*, **2**.
- HOAGLAND, D. R. and BROYER, T. C. (1940): Hydrogen-ion effects and the accumulation of salt by barley roots as influenced by metabolism. *Amer. Journ. Bot.*, **27**.
- ITZEROTT, D. (1936): Ueber die Bedingungen der Stickstoffaufnahme, vor allem der Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. *Flora*, **31**.
- JACQUES, A. G. (1936): The kinetics of penetration XII. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **22**.
- KLEIN, G., EINGER, A. und MÜLLER, H. (1926): Nitrataufnahme bei Schimmelpilzen. *HOPPE-SEYLER'S Zeitschr. für physiol. Chemie*, **201**.
- LUNDEGÅRDH, H. (1937): Untersuchungen über die Anionenatmung. *Biochem. Zeitschr.*, **290**.
- (1940): Anionenatmung und Blüten. *Planta*, **31**.
- NOACK, K. und PIRSON, A. (1940): Die Wirkung von Eisen und Mangan auf die Stickstoffassimilation von *Chlorella*. *Ber. d. d. Bot. Ges.*, **57**.
- OSTERHOUT, W. J. (1932): Is living protoplasm permeable to ions? *Journ. Gen. Physiol.*, **8**.
- PIRSCHLE, K. (1931): Nitrate und Ammonsalze als Stickstoffquellen für höhere Pflanzen bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration. *Planta*, **14**.
- PRIANISCHNIKOW, D. (1935): Ueber den Einfluß des Entwicklungsstadiums auf die Ausnutzung des Ammoniak- und Nitratstickstoffs durch die Pflanzen. *Trans. 3rd Intern. Cong. Soil Sci.*, **1**.
- SAKAMURA, T. (1930): Die Resorption des Ammonium- und Nitratstickstoffs durch *Aspergillus oryzae*. *Planta*, **11**.

- SAKAMURA, T. (1934): Ammonio- und Nitratophilie bei *Aspergillus oryzae*, im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen. Journ. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Series V, **3**.
- (1936): Ueber einige für die Kultur von Aspergillen notwendigen Schwermetalle und das Befreiungsverfahren der Nährlösung von ihren Spuren. Journ. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Series V, **4**.
- 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. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Series V, **2**.
- STERN, K. (1933): Pflanzenthermodynamik. Berlin.
- STEWART, F. C. and MARTIN, J. C. (1937): The distribution and physiology of *Valonia* at the Dry Tortugas, with special reference to the problem of salt accumulation in plants. CARNEGIE Inst. Washington Pub., **31**.
- WADLEIGH, C. H. and SHIVE, J. W. (1939): Organic acid content of corn plants as influenced by pH of substrate and form of nitrogen supplied. Amer. Journ. Bot., **26**.
- YAMAGATA, S. (1938): Ueber die Nitratreduktase von *Bacterium Coli*. Untersuchungen über die biologischen Reduktionen, I. Acta Phytochimica, **10**.
- (1939): Ueber die Nitratreduktase und die „Nitritreduktase“, ein neues Enzym, von *Bacillus pyocyaneus*. Untersuchungen über die biologische Reduktion, II. Acta Phytochimica, **11**.
- YOSHIMURA, F. (1934): Spherical cell formation in *Aspergillus oryzae* with special reference to heavy metal impurities in culture solution. Journ. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Series V, **3**.
- (1936): The action of copper and manganese upon the formation and color of conidium of some species of *Aspergillus*. Journ. Fac. Sci., Hokkaido Imp. Univ., Series V, **4**.