



Title	Die Resorption des Ammonium- und Nitratstickstoffs durch <i>Aspergillus Oryzae</i>
Author(s)	Sakamura, Tetsu
Description	Sonderabdruck aus "Planta", Bd. 11 Heft 4. 1930
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University. Ser. 5, Botany, 1(2), 766-814
Issue Date	1930
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/28050">https://hdl.handle.net/2115/28050</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	1(2)_tenki1.pdf



## DIE RESORPTION DES AMMONIUM- UND NITRATSTICKSTOFFS DURCH ASPERGILLUS ORYZAE.

Von

TETSU SAKAMURA

(Sapporo, Japan).

(Eingegangen am 22. April 1930.)

### Einleitung.

Auch wenn die gegebene N-Quelle sonst als nahrhaft bekannt ist und andere unentbehrliche Nährstoffe in gut assimilierbarer Form dargeboten werden, wird bei Kultur der Schimmelpilze nicht selten bemerkt, daß das Wachstum nicht merklich vor sich geht. Die Resorptionsfähigkeit des Pilzes für wichtige Nährstoffe und auch das Wachstum selbst werden dabei durch während der Kultur stattfindenden Bedingungswechsel beeinflusst und gehemmt. In solchem Falle kann es sehr wichtig, ja bisweilen sogar sehr notwendig sein, die Bedingungen, welche die erwähnten Einflüsse auf die Wachstumserscheinung ausüben, eingehend zu untersuchen. Es folgt nun ein entsprechendes Beispiel:

LAURENT (1889) schloß aus Kulturresultaten mit *Aspergillus glaucus*, *Cladosporium herbarum* und *Mucor racemosus*, daß diese Schimmelpilze besser Nitrat resorbieren und assimilieren als Ammoniak. Er bezeichnete derartige Pilze aus diesem Grunde als Nitratorganismen und stellte sie den Ammoniakorganismen gegenüber. RITTER (1909) äußerte sich bezüglich dieser Erscheinung etwas anders, nämlich daß die genannten Pilze ebensogut in der Ammoniak enthaltenden Nährlösung wachsen wie in der Nitratkulturlösung, wenn die Ammoniumsalze der schwachen Säuren dabei als N-Quelle verwendet werden. Auf Grund dieser Tatsache wies er darauf hin, daß es nicht richtig sei, die Pilze in Bezug auf die Ernährungsweise in Ammoniak- und Nitratorganismen einzuteilen.

Unter den Faktoren, durch die die Kultur im erwähnten Sinne beeinflusst wird, muß man vor allem die Wirkung der Säuren oder Basen, welche aus den Ammonium- bzw. Nitratsalzen während der Kultur disponibel werden, in Betracht ziehen, weil dies den Nährwert der gegebenen Nährsalze nicht wenig bedingt<sup>1</sup>.

Die Wirkung der Säure auf das Wachstum des Pilzes ist nicht eindeutig klar. Ihre Moleküle, dissoziierte H-Ionen und Anionen, müssen zweifellos als wirksam in Betracht gezogen werden. Obwohl es natürlich

<sup>1</sup> Diesbezügliche Literatur in BACH (1925) und TAMIYA (1927).

unrichtig ist, die Wirkung der Säure einseitig nur auf  $C_H$ <sup>1</sup> zurückzuführen, und obwohl die Bedenken gegen die Allmacht des  $p_H$  schon heute ziemlich verbreitet sind, so muß doch seine direkte sowie indirekte Wirkung immer noch als wichtiger Faktor in der Pilzkultur betrachtet werden.

In meinen früheren Arbeiten (1924, 1927) über die Kultur von *Aspergillus niger* habe ich folgende Ergebnisse mitgeteilt:

Das Pilzwachstum wird durch die starke Erhöhung der  $C_H$ , die durch die Dissoziation der aus Ammoniumsalzen disponibel werdenden Säure verursacht wird, ungünstig beeinflusst. Durch Zusatz des spezifischen Puffers oder Verwendung des Ammoniumsalzes der schwachen Säure wird die Erhöhung der  $C_H$  mehr oder weniger stark gehemmt oder vermieden, und der Pilz zeigt sodann günstiges Wachstum. Daß eine solche ungünstige Kulturbedingung überhaupt bei Verwendung der Ammoniumsalze der starken Säuren als N-Quelle auffällig wird und daß sie mit der starken Erhöhung der  $C_H$  in inniger Beziehung steht, wurde auch schon früher von NIKITINSKY (1904), RITTER (1909, 1911, 1912, 1914), BRENNER (1914), BACH (1924, 1925) u. a. mitgeteilt, und BACH erkannte auch die günstige Wirkung des Pufferzusatzes bei der Kultur von *Aspergillus repens*.

Wenn man von der Säurewirkung bei der Pilzkultur spricht, ist es sehr schwierig, die Wirkungen der Moleküle, Anionen und H-Ionen klipp und klar auseinanderzuhalten, weil heute noch keine Versuchsmethoden bestehen, um nach Belieben nur einen dieser Faktoren, z. B.  $C_H$ , unabhängig von den anderen zu behandeln. Deshalb kann nur eine indirekte Methode zum Versuche der Analyse der Säurewirkung verwendet werden. So kann auch ein Schluß aus den Versuchsergebnissen dabei immer nur beschränkt gezogen werden und das Hauptgewicht ruht auf einer höchst wahrscheinlichen, und zwar allgemein gültigen Möglichkeit, obwohl die anderen Faktoren nicht vernachlässigt werden sollen. Ich möchte daher weder in den früheren Arbeiten noch in vorliegender eine  $p_H$ -Allmacht behaupten, wenn auch die Wirkung der  $C_H$  vorwiegend in Betracht kommt.

Vor einigen Jahren veröffentlichte TAMIYA (1927) seine umfangreiche Arbeit über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*, wobei er seine Meinung bezüglich der Pufferwirkung der Kulturlösung äußerte. TAMIYA erklärte die günstige Wirkung des zugesetzten Phosphats oder der Salze von organischen Säuren auf das Pilzwachstum in der Weise, daß spezifische Wirkungen der Anionen oder Moleküle der Säuren dieser Puffersalze angenommen werden müßten, daß aber der Zusatz dieser Salze nicht im Sinne der Pufferung eine Beförderung des Wachstums bewirke. Diese Annahme wurde von ihm auch auf *Aspergillus niger* be-

<sup>1</sup> Wasserstoffionenkonzentration.

zogen, gestützt darauf, daß dieser Pilz gegen höhere  $C_H$  viel resistenzfähiger wie *Aspergillus oryzae* ist.

In vorliegender Arbeit wurden Untersuchungen angestellt, um zu prüfen, ob bei der Kultur von *Aspergillus oryzae* tatsächlich der Pufferwirkung der zugesetzten Salze keine besondere Wichtigkeit zukomme und nur gelegentlich bemerkt werden könne. Aus einer Reihe von Versuchen geht hervor, daß auch bei der Kultur dieses Pilzes, wenn  $C_H$  während der Kultur immer mehr gesteigert wird, das Puffervermögen der als Regulatoren zugesetzten Salze das Pilzwachstum auffällig günstig beeinflussen kann. Im Verlaufe der Untersuchungen wurde mir klar, daß wenn man sich mit diesem Problem beschäftigt, es notwendig ist, zunächst die Aufnahme von  $NH_3$  und  $NO_3$  aus dem als N-Quelle zugegebenen  $NH_4NO_3$  eingehend zu untersuchen.

Seit einigen Jahren stellt man sich in unserem Laboratorium die Aufgabe, die Resorption der Elektrolyte und Nichtelektrolyte von höheren sowie niederen Pflanzen zu untersuchen. Besonderes Gewicht wird auf die Aufnahme von  $NH_3$  und  $NO_3$  gelegt, weil  $NH_4NO_3$  oft für Kulturlösungen verwendet wird und es von beiden N-Quellen bekannt ist, daß sie für höhere sowie niedere Pflanzen leicht ausnutzbar sind. Die vorliegende Mitteilung umfaßt also einen Teil dieser im hiesigen Laboratorium angestellten Untersuchungen. Wie der Titel andeutet, werden hier die Resultate der Untersuchungen über die Resorption von  $NH_3$  und  $NO_3$  durch *Aspergillus oryzae*, die im Zusammenhang damit stattfindende Aciditätserhöhung und die wichtige Rolle der Pufferwirkung behandelt.

### Methoden.

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

Ammoniumnitrat ( $NH_4NO_3$ ) . . . . .	4 g	} Grundlösung
Monokaliumphosphat ( $KH_2PO_4$ ) . . . . .	2 g	
Magnesiumsulfat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) . . . . .	1 g	
Eisenchlorid ( $FeCl_3$ ) (2%) . . . . .	1 Tropfen	
Umdestilliertes Wasser . . . . .	100 ccm	

Zum Gebrauch wurde diese Grundlösung mit umdestilliertem Wasser und Zuckerlösung, oft auch mit den Phosphatgemischen verdünnt. Falls andere Salze als N-Quelle dargeboten wurden, wurden der Ammoniak- oder Nitratstickstoff in äquivalenten Mengen genommen. Als C-Quelle kam MERCKSCHE wasserfreie Glukose, Saccharose und auch Fruktose zur Anwendung. Alle gebrauchten Chemikalien waren MERCKSCHE oder KAHLBAUMSCHE Präparate.

Als Kulturgefäße dienten ERLÉNMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt, die aus einheimischem, praktisch alkalifreiem Glas hergestellt waren. Vor dem Gebrauch wurden die Gefäße mit Wattepfropfen verschlossen und im Trockenschrank sterilisiert. Wenn Zucker verschiedener Art mit Salzlösung zusammen im KOCHSCHEN Dampftopf sterilisiert wird, so verändern die Zucker ihre Eigenschaften, und wird die Kultur dadurch mehr oder weniger indirekt beeinflußt<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> SAKAMURA (1927).

Um diesen Übelstand zu vermeiden, wurden Salzlösung, Zuckerlösung und Phosphatpuffer getrennt im Kochschen Dampftopf 1 Stunde lang sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde aus diesen Lösungen mit einer sterilisierten Pipette je eine bestimmte Menge in den sterilen Kolben übergeführt und die so hergestellte komplette Kulturlösung einige Tage ruhig stehengelassen. Erst nach der Bestätigung der Keimfreiheit kam die Kulturlösung zum Gebrauch.

Konidien wurden mit einer Platinöse von dem auf festen Agarböden gewachsenen Mycel entnommen und mehrmals im sterilisierten Wasser suspendiert (A-Suspension). Konidiensuspensionen wurden dann und wann noch in anderer Weise hergestellt (vgl. TAMURA 1927, S. 58). Man öffnet ein Kulturröhrchen, fügt 10 ccm von sterilem Wasser hinzu, verschließt es mit Wattepfropfen, und schüttelt es so lange, bis das zugesetzte Wasser eine dichte Konidiensuspension wird. Die so hergestellte dichte Suspension wurde weiter mit sterilem Wasser verdünnt (B-Suspension). Daß diese Art der Konidiensuspension bisweilen andere Resultate verursacht als die A-Suspension wird später gezeigt werden.

Die Vorkultur geschah auf festen 2%igen Agarböden von folgenden Zusammensetzungen:

K-Agar: Kojiextrakt-Agarkultur. Das Konidienmaterial für die erste Kultur stammte von K-Agar des Laboratoriums für angewandte Mykologie der hiesigen Universität.

M-Agar: Malzextrakt-Agarkultur. Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von K-Agar entnommen.

S-Agar: (SAKAMURA 1927, S. 246).

Grundlösung . . . . .	25 ccm	} p <sub>H</sub> 6,2
Saccharoselösung (10%) . . . . .	50 ccm	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	10 ccm	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	15 ccm	

Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von K-Kultur entnommen.

E-Agar:

Grundlösung . . . . .	25 ccm	} p <sub>H</sub> 4,2
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50 ccm	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	25 ccm	

Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von K-Agar entnommen.

D-Agar:

Spezifische Grundlösung <sup>1</sup> . . . . .	25 ccm	} p <sub>H</sub> 4,2
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50 ccm	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	25 ccm	

Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von K-Agar entnommen.

C-Agar:

Grundlösung . . . . .	25 ccm	} p <sub>H</sub> 6,2
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	50 ccm	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	10 ccm	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	15 ccm	

Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von S-Agar entnommen.

G-Agar:

Grundlösung . . . . .	25 ccm	} p <sub>H</sub> 6,2
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50 ccm	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	10 ccm	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	15 ccm	

<sup>1</sup> An Stelle von NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> wurde NH<sub>4</sub>Cl in äquivalenter Menge als N-Quelle gebraucht.

K<sub>1</sub>-Agar: Kojiextrakt-Agarkultur. Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von E-Agar entnommen.

K<sub>2</sub>-Agar: Kojiextrakt-Agarkultur. Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von D-Agar entnommen.

K<sub>1/2</sub>-Agar: Kojiextrakt wurde auf 1/2 verdünnt. Das Konidienmaterial für die erste Kultur wurde von K<sub>2</sub>-Agar entnommen.

Je 1 ccm der Konidien suspension wurde mit einer sterilisierten Pipette entnommen und in jede Kulturlösung überimpft. Die Impfung der Konidien geschah bisher in verschiedener Weise je nach den Autoren. Die merkwürdige Tatsache, daß die Resorption von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> einigermaßen von der Art und Weise der Impfung abhängt, wird an den betreffenden Stellen geschildert werden.

Nach der Aussaat wurden die Kulturen in den Thermostaten gestellt und die Temperatur auf 30° C reguliert.

Zur Erntezeit wurde die Kulturflüssigkeit mitsamt der Pilzmasse durch Filtrierpapier von bekanntem Gewicht filtriert. Bei der Messung der C<sub>H</sub> wurde das Filtrat direkt verwendet. Die Erntemasse wurde weiter wiederholt mit destilliertem Wasser gespült und dann in einem elektrisch geheizten Trockenschrank getrocknet. Nach ihrem Erkalten im Exsikkator wurde das Gewicht durch Subtraktion des Filtrierpapiergewichtes vom Gesamtgewicht bestimmt.

Die C<sub>H</sub> der Nährlösung wurde mit Hilfe der Indikatoren von CLARK und LUBS bestimmt und durch den p<sub>H</sub>-Wert ausgedrückt.

Das Filtrat, von dem ein Teil zur Bestimmung der C<sub>H</sub> gebraucht wurde, und das Washwasser wurden vereint, weiter auf 500 ccm verdünnt und unter Zusatz von einem Stück Thymol aufbewahrt. Diese verdünnte Lösung wurde dann der Analyse unterworfen.

Ammoniakbestimmung: Das Ammoniak wurde mit dem Mikro-KJEHLDAHL-Destillationsapparat mit Wasserdampf in eine titrierte Salzsäure (n/100) überdestilliert. Die überschüssige HCl der Vorlage wurde mit NaOH (n/100) (Indikator: alizarinsulfonsaures Natron) zurücktitriert. 10 ccm des auf 500 ccm verdünnten Filtrats wurden nochmals auf 250 ccm verdünnt. Von der so verdünnten Lösung wurden 12,5 ccm als Probe entnommen und analysiert. Die Ammoniakbestimmung in der Kulturlösung von genau 10 ccm wurde durch die Normalität ausgedrückt. Der Versuchsfehler beträgt ± 0,001 normal.

Nitratbestimmung: NO<sub>3</sub> wurde nach der Phenoldisulfonsäuremethode mit dem UKENASCHEN Kolorimeter bestimmt. 10 ccm des auf 500 ccm verdünnten Filtrats wurden nochmals auf 250 ccm verdünnt. Von der so verdünnten Lösung wurden 2 ccm als Probe entnommen und analysiert. Die Nitratmenge in der Kulturlösung von genau 100 ccm wurde durch die Normalität ausgedrückt. Der Versuchsfehler beträgt ± 0,004 normal.

Nun entstand die Frage: Kann NO<sub>3</sub> während der Analyse in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Fruktose oder Glukose unangegriffen bleiben? Die quantitative Analyse von NO<sub>3</sub> in der Kontrollösung, welche KNO<sub>3</sub> oder NH<sub>4</sub>Cl als N-Quelle in bestimmter Konzentration enthält, wurde nach den erwähnten Methoden ausgeführt. In der verdünnten Lösung, welche als Probe genommen wurde, beträgt die Konzentration von NO<sub>3</sub> oder NH<sub>3</sub> n/800 und diejenige von Fruktose oder Glukose m/2. Diese Konzentrationen sind nicht niedriger als diejenigen bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Es wurde aber bestätigt, daß bei der KNO<sub>3</sub>-haltigen Lösung kein Ammoniak und bei der NH<sub>4</sub>-haltigen keine Salpetersäure nachzuweisen war. Diese Methode kann daher für unseren Zweck praktisch als brauchbar betrachtet werden, wenn der Versuchsfehler berücksichtigt wird.

Der Pilzstamm, den ich als Versuchspflanze verwendet habe, stammte hauptsächlich von Material ab, das im Laboratorium für angewandte Mykologie der hiesigen Universität seit langem unter der Bezeichnung Nr. 65 auf Kojiagar rein kultiviert worden war. Auch andere Stämme aus demselben Laboratorium sind zu Versuchszwecken verwendet worden.

Kojisäurebestimmung: Kojisäure wurde nach der Methode von TAMIIYA (1927, S. 61) zu jeder Erntezeit kolorimetrisch, allerdings ohne Standardskala, nur relativ bestimmt. Man ist deshalb nicht berechtigt, die zu verschiedenen Erntezeiten bestimmten relativen Mengen von Kojisäure miteinander zu vergleichen. Man brachte 10 ccm der Kulturlösung in ein Reagenzglas, setzte 2 ccm Salzsäure und 1 ccm 0,5%ige Eisenchloridlösung hinzu, und verglich die Farbtöne miteinander.

Die Bestimmung der relativen Menge der Kojisäure und die Beobachtung der Riesenzellbildung in den höheren Aciditäten wurden nur beiläufig ausgeführt. Die eingehende Erörterung wird auf eine andere Gelegenheit verschoben.

### H-Ionenkonzentration und Pufferwirkung.

Es kann nicht bezweifelt werden, daß das Pilzwachstum durch die Veränderung des Mediums direkt oder indirekt beeinflußt wird und diese umgekehrt durch jenes hervorgerufen wird. Die H-Ionenkonzentration der Kulturlösung ändert sich sehr leicht während des Pilzwachstums und der anfängliche  $p_H$ -Wert dient nur als Maßstab für den Keimungsgrad der Sporen oder für den Wachstumsgrad des Mycels im frühesten Stadium. Wenn der Einfluß der  $C_H$  auf das Pilzwachstum während der ganzen Kulturdauer untersucht werden soll, so muß man der Pufferwirkung der Kulturlösung eine große Rolle zuerkennen. Darauf habe ich schon in der früheren Arbeit (1924) hingewiesen. Die Veränderung der  $C_H$  ist abhängig von den Eigenschaften des Pilzes, der Zusammensetzung der Kulturlösung usw., deshalb läßt sich diese Erscheinung nicht immer ohne weiteres erklären. Was die Eigenschaften des Pilzes betrifft, so müssen die Unterschiede der Stämme und die Nachwirkung der Vorkultur berücksichtigt werden.

Vor etwa 6 Jahren, als die vorliegende Arbeit noch nicht begonnen war, haben wir an einem Stamm von *Aspergillus oryzae* eine Tendenz der  $C_H$ -Veränderung konstatiert, die ich zunächst kurz mitteilen möchte, weil sie für die vorliegende Untersuchung von großer Wichtigkeit ist.

#### Versuch 1 und 2 (bearbeitet von NAKAYAMA).

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: K. Impfung mit 1 ccm Konidiensuspension.

Kulturlösung:

Grundlösung . . . . .	25
Glukoselösung (m/2) . . .	50
Umdestilliertes Wasser	25
Summe (ccm)	100
	$p_H$ 4,2

Die gemischte Lösung wurde sterilisiert. Die Durchschnittswerte der drei Kulturen betragen (Tabelle 1 a und b):

Tabelle 1a.

Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>	Reduzierende Zucker
3	0,206	3,1	+
5	0,385	2,4	+
7	0,412	2,4	+
9	0,507	2,0	+
11	0,615	2,0	+

Tabelle 1b.

Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>	Reduzierende Zucker
2	0,210	3,5	+
4	0,367	2,7	+
6	0,445	2,3	+
8	0,445	2,2	+

Versuch 3 (bearbeitet von NAKAYAMA).

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: M. Impfung mit 1 ccm von Konidien-suspension.

Kulturlösung:

Grundlösung . . . . .	25
Glukoselösung (m/2) . .	50
Umdestilliertes Wasser .	25
Summe (ccm) 100	
p <sub>H</sub> 4,2	

Glukose von KAHLBAUM; Lösung etwas braun gefärbt. Grundlösung und Glukoselösung wurden gemischt sterilisiert. Der Durchschnittswert der zwei Kulturen betrug (Tabelle 2):

Tabelle 2.

Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>	Reduzierende Zucker
3	0,175	3,5	+
5	0,561	3,6	+
7	0,911	3,4	+
9	1,138	3,7	wenig
11	1,154	3,9	Spur

Das Kulturergebnis von Versuch 1 und 2 ist anders als dasjenige von Versuch 3, und die Vorkultur und das Glukosepräparat sind in den beiden Fällen verschieden. In jenen Kulturen stieg C<sub>H</sub> der Kulturlösung bis auf p<sub>H</sub> 2,0, während in 3 die Lösung keine hohe Acidität erreichte, indem sie am 3.—5. Tage wieder zu sinken begann und bis auf p<sub>H</sub> 3,8—4,0 zurückging.

Bei den Kulturversuchen von TAMIYA (1927) wurde eine so starke Aciditätserhöhung nie beobachtet und seine Kulturergebnisse können

vielleicht mit denjenigen unseres Versuchs 3 verglichen werden. Dieser Unterschied bezüglich der  $C_H$ -Veränderung dürfte zum Teil auf die Zusammensetzung der Kulturlösung und die Nachwirkung der Vorkultur zurückgeführt werden. TAMIYA (1927) verwendete damals eine Lösung von folgender Zusammensetzung für die Standardkultur:

Grundlösung (gleich der unserigen) . . . . .	25
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25
Summe (ccm)	100
$p_H$	4,3

Die Vorkultur erfolgte bei ihm auf Agarböden, welche die obige Kulturlösung enthielten und dauerte 2—4 Wochen.

Nach Hinweis auf so verschiedenartige Tendenzen der  $C_H$ -Veränderung während der Kultur von *Aspergillus oryzae* wollen wir nun auf die Beziehung zwischen dem Pilzwachstum und der Pufferwirkung der Kulturlösung etwas näher eingehen.

Ist die Pufferwirkung bei der Kultur von *Aspergillus oryzae* tatsächlich von geringer Bedeutung? TAMIYA (1927) hat aus dem Kulturergebnis mit einer durch Phosphat gepufferten Saccharosegrundlösung geschlossen, daß die  $C_H$ -Veränderung dadurch gemäßigt, doch das Pilzwachstum so gut wie nicht beeinflußt wurde. Bei *Aspergillus niger* habe ich dagegen früher (1924 und 1927) konstatiert, daß der Zusatz von Phosphatgemisch die Pilzernte stark erhöhen kann, und habe dies als Pufferungseffekt aufgefaßt.

Bevor wir weiter von Pufferwirkung sprechen, muß meine Definition dieses Ausdruckes für die vorliegende Arbeit noch etwas näher erklärt werden, um etwaige Mißverständnisse möglichst zu vermeiden.

In der früheren Arbeit (1927, S. 66) habe ich die Pufferwirkung bei der Kultur von *Aspergillus niger* folgendermaßen definiert:

„In der vorliegenden Arbeit verstehe ich unter Pufferwirkung der Bequemlichkeit halber diejenigen Wirkungen der Lösung, welche die Erhöhung der H-Ionenkonzentration hemmen, entweder im echten Sinne der Pufferung oder die aus dem Stoffwechsel resultierende Verminderungstendenz der H-Ionenkonzentration.“ Dabei habe ich auch bei einer solchen Lösung von einer starken Pufferwirkung gesprochen, deren anfängliche  $C_H$  niedriger ist, und welche sonst die gleiche Zusammensetzung besitzt.

Auch in vorliegender Arbeit möchte ich die Pufferwirkung auf die Hemmung der Aciditätserhöhung dartun, will aber die letzterwähnte bequeme Auffassung, da sie leicht mißverstanden werden mag, nun nicht mehr beibehalten, sondern statt dessen eine solche Lösung als von der extremen hohen Acidität entfernt bezeichnen.

Als Puffer werden heute verschiedene Gemische benutzt, unter denen

dasjenige organischer Säure mitsamt ihrem Salz für unseren Zweck nicht geeignet ist, weil noch andere Möglichkeiten nicht ausgeschlossen sind; so kann organische Säure auch als C-Quelle<sup>1</sup> vom Pilze benutzt werden und sowohl ihre Moleküle als auch ihre Ionen können eine spezifische Wirkung ausüben. Aus diesem Grunde kann man als brauchbarste die Phosphatgemische verwenden. Selbst bei Zusatz von Phosphatgemischen als Puffer läßt sich aber noch gegen den Pufferungseffekt einwenden, daß die Phosphat- und andere sie begleitende Ionen das spezifisch Wirk-same sind. Dann kann die Entscheidung der Frage nur nach dem Urteil des Forschers erfolgen, ob eine Wirkung der H-Ionen bzw. des Puffers als allgemein bemerkbarer Faktor oder im Gegensatz dazu eine undeutliche spezifische Wirkung anderer Faktoren als wahrscheinlich angesehen werden muß. Die Bestätigung der Wirkung dieser anderen Ionen usw. kann aber kein Gegenbeweis für die Rolle der H-Ionen und der Pufferwirkung sein, soweit das Vorhandensein letzterer nicht in Abrede gestellt wird.

## Versuch 4.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, zweimalig, 4 Tage lang. Impfung mit 1 ccm einer A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)	(3)
Grundlösung . . . . .	50	50	50
Glukoselösung (m/2) . . . . .	25	25	25
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	25	—	—
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	—	25	—
Umdestilliertes Wasser . . . . .	—	—	25
Summe	100	100	100
p <sub>H</sub>	4,3	6,5	4,3

Aus diesem Versuche (Tabelle 3) ersieht man, daß auch bei *Aspergillus oryzae* der Pufferzusatz nicht bloß die Erhöhung der Acidität hemmt, sondern auch auf das Pilzwachstum günstig wirkt wie bei *Aspergillus niger*, und daß der Pilz um so besser gedeiht, je größer der anfängliche p<sub>H</sub>-Wert der gepufferten Lösung ist. Wenn man hierbei, ohne sich auf eine sichere Beweisführung zu stützen, nur subjektiv behaupten wollte, daß diese günstige Wirkung des Phosphatzusatzes auf der Mengenzunahme dieses Nährsalzes oder auf seinen verschiedenen Ionenformen beruhen dürfte, nicht aber auf der Wirkung der H-Ionen bzw. der Pufferung, so möchte ich vorläufig auf eine Diskussion darüber verzichten. Beim heutigen Stande der Forschung kann niemand eine derartige Frage durch direkte oder indirekte Methoden einwandfrei lösen.

<sup>1</sup> Oxalsäure, die der Kultur von *Aspergillus niger* zugesetzt wurde, wird nur in molekularem Zustande, d. h. bei einer höheren Acidität als p<sub>H</sub> 3,5, verbraucht (SAKAMURA 1927, S. 260). Trotz derartiger Möglichkeiten muß man eine mehr oder weniger ausgesprochene günstige Pufferwirkung beim Gebrauch organischer Puffergemische anerkennen.

Tabelle 3.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>	Kojlsäure	Reduzierende Zucker
1-1	3	0,198	3,4		
1-2	3	0,146 <i>0,172</i>	3,4		
2-1	3	0,275	6,0		
2-2	3	0,245 <i>0,260</i>	6,0		
3-1	3	0,129	3,4		
3-2	3	0,125 <i>0,127</i>	3,4		
1-3	6	0,373	2,8	+++	
1-4	6	0,416 <i>0,395</i>	2,8	+++	
2-3	6	0,627	5,4	+++	
2-4	6	0,531 <i>0,579</i>	5,5	+++	
3-3	6	0,168	2,6	+	
3-4	6	0,180 <i>0,174</i>	2,6	+	
1-5	8	0,597	2,6	+	
1-6	8	0,609 <i>0,603</i>	2,8	+	
2-5	8	0,706	5,1	+++	
2-6	8	0,786 <i>0,748</i>	5,1	+++	
3-5	8	0,267	2,6	+++	
3-6	8	0,289 <i>0,278</i>	2,6	+++	
1-7	12	0,879	2,4	+	+
1-8	12	0,822 <i>0,851</i>	2,3	++	+
2-7	12	0,849	5,5	+++	Spur
2-8	12	0,795 <i>0,822</i>	5,3	+++	Spur
3-7	12	0,428	2,3	+	+
3-8	12	0,470 <i>0,449</i>	2,3	++	+

Eine merkwürdige Tatsache bei Versuch 4 ist, daß während der Kultur C<sub>H</sub> der Lösung ohne Pufferzusatz sich bis auf p<sub>H</sub> 2,3 erhöhte. Wird diese C<sub>H</sub>-Veränderung mit derjenigen im Kulturversuche von TAMIYA (1927) verglichen, wo man keinen Pufferungseffekt nachweisen konnte, so können wir einen auffälligen Unterschied zwischen beiden Fällen erkennen. In den von TAMIYA ohne Pufferzusatz ausgeführten Kulturen fand die

Aciditätserhöhung nicht in solchem Maße statt wie bei meinem Versuch 4, vielmehr fing  $C_H$  sogar bald in der Nähe von  $p_H$  3,0 an wieder zu sinken. Dieser Unterschied ist von großer Wichtigkeit für die Erklärung der Bedeutung der Pufferwirkung der Kulturlösung. Eine Aciditätserhöhung wie im Versuch 4 findet nicht selten statt, und die erhöhte  $C_H$  wird ziemlich lange beibehalten, ohne daß eine Rückkehr zur schwächeren Acidität eintritt. Folgender Versuch bietet ein weiteres Beispiel dafür:

Versuch 5 (bearbeitet von NAKAYAMA).

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S. Impfung mit 1 ccm einer A-Konidien-suspension.

Kulturlösung:

Grundlösung . . . . .	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25
Summe (ccm)	100
$p_H$	4,2

Tabelle 4.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	$p_H$	Reduzierende Zucker
1	3	0,061	3,6	+
2	5	0,132	2,6	+
3	6	0,131	2,6	+
4	7	0,216	2,6	+
5	9	0,319	2,4	+
6	12	0,355	2,2	+
7	14	0,449	2,1	+
8	15	0,470	2,1	+
9	16	0,488	2,1	+
10	51	0,446	2,1	+

Daß das Pilzwachstum in  $C_H$  von  $p_H$  2,5 oder in der noch höheren ungünstig beeinflußt wird, ist eine bestätigte Tatsache, obwohl noch nicht geklärt worden ist, ob der Einfluß der H-Ionen ein direkter oder indirekter ist. Selbst bei *Aspergillus niger*, der als äußerst säureresistent (maximale Acidität  $p_H$  1,6—1,7) bekannt ist, ist das Wachstum in höherer  $C_H$  ungünstig. Nach den Untersuchungen der verschiedenen Forscher kann nicht mehr bezweifelt werden, daß die Erhöhung der  $C_H$  bei der Verwendung von  $NH_4NO_3$  als N-Quelle durch den überwiegenden Verbrauch von  $NH_3$  und die Dissoziation der dabei frei werdenden Salpetersäure verursacht wird. *Aspergillus oryzae* ist viel weniger widerstandsfähig gegen die hohe Acidität und kann in einer Kulturlösung von saurerer Reaktion als  $p_H$  2,0 kein merkliches Wachstum mehr erreichen. Dieser Pilz kann aber in der  $NH_4NO_3$ -haltigen Kulturlösung oft eine passende Lebensweise annehmen, um die für ihn ungünstige Erhöhung der  $C_H$  zu vermeiden. Wie aus den Versuchen von TAMIYA und dem Versuch 3 vor-

liegender Arbeit hervorgeht, fängt dieser Pilz manchmal in der Nähe von  $p_H$  2,8—3,0 an, die einmal erhöhte Acidität wieder zu erniedrigen, wahrscheinlich durch dabei beginnende überwiegende Resorption von  $NO_3$ . Wenn sowohl bei *Aspergillus niger* als auch bei *A. oryzae*  $C_H$  der Kulturlösung durch das Pilzwachstum in ziemlich hohem Grade gesteigert wird, ist es nicht unberechtigt, einen günstigen Pufferungseffekt auf das Pilzwachstum anzunehmen. Im Gegensatz dazu ist der Pufferzusatz überflüssig und übt keine besonders günstige Wirkung auf das Wachstum aus, wenn sowohl  $NO_3$  als  $NH_3$  gleichmäßig resorbiert werden. Eine fast gleichmäßige Resorption beider N-Quellen schafft dem Pilz zweifach günstige Wachstumsbedingungen, erstens eine Hemmung der  $C_H$ -Erhöhung und zweitens eine Vermehrung der nutzbaren N-Quelle. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß eine etwa wahrzunehmende Wertlosigkeit des Pufferzusatzes sich bei *Aspergillus oryzae* auf eine solche Kultur bezieht. Im Falle, wo der Pilz die Aciditätserhöhung ohne Puffer bremsen kann, brauchen wir natürlich nicht dessen Vorteil zu betonen. Diese Erscheinung kann man noch deutlicher bemerken, wenn  $NH_4Cl$  statt des Ammoniumnitrats als N-Quelle verwendet wird (Versuch V von TAMIYA 1927 und Versuch 19 vorliegender Arbeit). Wenn TAMIYA am Anfang seiner Untersuchungen denjenigen Pilz, welcher die  $C_H$  schnell erhöhen kann und welcher tatsächlich in dem Versuch XXVI seiner zweiten Arbeit (1928) gebraucht wurde, verwendet hätte, so würde er zu einem anderen Schlusse gekommen sein. Es ist eine beachtenswerte Tatsache, daß in Versuch XXVII der zweiten Arbeit von TAMIYA (1928, S. 133) die Acidität der Lösung sich um so weniger veränderte und ein um so besseres Wachstum hervortrat, je größer der Phosphatzusatz war. Dabei sagte er: „Daß dieses Vermögen (Puffervermögen)<sup>1</sup> an sich selbst für das Wachstum und die Säurebildung ohne wesentliche Bedeutung ist, habe ich schon anderswo erörtert.“ Nun sei aber bemerkt, daß dieser Schluß nicht zum kleinen Teil aus dem Ergebnis des Versuchs II seiner ersten Mitteilung (1927) von ihm gezogen wurde, welches Ergebnis von dem oben geschilderten ganz verschieden ist, obwohl die Versuche in beiden Fällen fast auf gleiche Weise ausgeführt worden waren. Die an sich bedeutungsvollen Versuchsergebnisse von TAMIYA (1927) bieten aber keinen Anlaß, die Bedeutung der Pufferwirkung der Kulturlösung gering einzuschätzen, wenn sich auch die Möglichkeit anderer Wirkungen des Puffers zeigen sollte<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Von mir eingeschaltet.

<sup>2</sup> Auch die günstige Wirkung des organischen Puffers kann man nicht durchaus zurückweisen.

**Einfluß der Vorkultur auf die Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$ .**

Ammoniak und Nitrat sind als wichtige anorganische N-Quellen bei der Kultur der saprophytischen Schimmelpilze bekannt und werden in verschiedenen zusammengesetzten Kulturlösungen als N-Quellen verwendet. Besonders in der PFEFFERSchen Lösung sind diese beiden N-Quellen gleichzeitig in der Form  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  enthalten. Von verschiedenen Gesichtspunkten aus ist es sehr wichtig, einerseits die Synthese der höheren N-Verbindungen aus Ammoniak oder Nitrat, andererseits den Mechanismus und die Bedingungen der Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  vergleichend zu untersuchen. Es ist sehr selten, daß aus  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  die Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  in äquivalenter Menge vor sich geht. Infolgedessen geschieht die Veränderung der  $C_H$  je nach den Resorptionsbedingungen bald in der Richtung höherer, bald niedrigerer Acidität, was umgekehrt das Pilzwachstum und andere physiologische Funktionen verschiedenartig beeinflusst. Die Erfahrung lehrt uns, daß es fast unmöglich ist, die Acidität der Kulturlösung konstant zu halten, auch wenn diese ziemlich stark gepuffert wird. Daß die Erhöhung der  $C_H$  in solchem Falle zum Teil auch durch Bildung organischer Säuren von Pilzen hervorgerufen wird, ist nicht ausgeschlossen und von verschiedenen Forschern angenommen worden. Meines Erachtens spielt aber die Säurebildung manchmal keine so große Rolle für die Vermehrung der  $C_H$ , die vielmehr hauptsächlich primär durch die überwiegende Resorption des basischen Anteils, wie z. B.  $\text{NH}_4\text{OH}$  aus  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , und die Dissoziation der dabei frei werdenden Salpetersäure verursacht wird. Das umgekehrte Verhältnis besteht auch bei der Erniedrigung der  $C_H$ . Natürlich ist es auch möglich, daß die stärkere Resorption des basischen Anteils<sup>1</sup> aus irgendeinem anderen Nährsalz für die  $C_H$ -Veränderung bis zu einem gewissen Grade verantwortlich ist. In der Tat geht aber die Resorption der anderen Salze langsamer vor sich als diejenige von  $\text{NH}_3$  oder  $\text{NO}_3$ , worin der Grund liegt, daß diese letztere bei der  $C_H$ -Veränderung der Kulturlösung hauptsächlich berücksichtigt werden muß. Daher wäre es oft nicht berechtigt, umgekehrt auf die überwiegende Resorption von  $\text{NH}_3$  oder  $\text{NO}_3$  aus der  $C_H$ -Veränderung zu schließen, soweit stark dissoziierbare organische Säure nicht neu gebildet wird. Diese Beziehung tritt durch die Analyse von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  in den später geschilderten Versuchen hervor.

Nun möchte ich einen Pilz als „ammoniophil“ oder „nitratophil“ bezeichnen, je nachdem er besser Ammoniak oder Nitrat aus  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aufnimmt; dies sind aber Bezeichnungen ganz anderer Art als sie bei den LAURENTSchen „Ammoniak- oder Nitratorganismen“ gemeint sind. Bei schwacher Ammoniophilie erhöht sich also  $C_H$  nicht so stark wie bei starker, oder eine solche Kultur geht oft im Gegenteil zur Nitratophilie

<sup>1</sup> Daß besonders die basischen Anteile der anderen Salze vorwiegend resorbiert werden, lehren uns die später angegebenen Analysenresultate.

über. Mit dieser Benennung kann man natürlich die Eigenschaft von *Aspergillus oryzae* bezüglich der Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  nur relativ bezeichnen. Deshalb ist es sehr schwer und fast unmöglich, zwischen beiden Bezeichnungen einen definitiven Unterschied zu machen. Der ammoniophile Pilz nimmt mehr oder weniger auch Nitrat auf, und der nitratophile auch Ammoniak. Die Ammoniphilie bzw. Nitratophilie kann tatsächlich durch das Verhältnis  $\text{NH}_3/\text{NO}_3$  bestimmt werden. Zwischen den beiden extremen Eigenschaften kommen gewöhnlich Ammoniphilie und Nitratophilie kombiniert in verschiedenen Verhältnissen vor, und in den meisten Fällen erweist sich der Pilz als mehr ammoniophil in der ersten Stufe der Kultur, um bald darauf sich nicht selten eine überwiegende Nitratophilie zuzuwenden. *Aspergillus niger* kann in Bezug auf diese Eigenschaft als ausgesprochen ammoniophiler Pilz betrachtet werden. Der Bequemlichkeit der Erklärung halber möchte ich in vorliegender Arbeit die Pilze als „stark ammoniophil“, „schwach ammoniophil“ oder „nitratophil“ bezeichnen, je nach dem Grade der  $\text{C}_\text{H}$ -Veränderung:  $\text{C}_\text{H}$ -Erhöhung über  $\text{p}_\text{H}$  2,9 hinaus, bis  $\text{p}_\text{H}$  2,9 oder  $\text{C}_\text{H}$ -Erniedrigung.

Daß mehrere verschiedene Rassen oder Stämme von derselben Art des Schimmelpilzes existieren und in ihren morphologischen sowie physiologischen Eigenschaften auseinandergehen, ist manchmal von verschiedenen Autoren berichtet worden, wie z. B. von BRENNER (1914, S. 17) für *Aspergillus niger*.

Bei *Aspergillus oryzae*, der von alters her von unserem Volk zur Sakébrauerei benutzt wird, ist aus wissenschaftlichen Untersuchungen bekannt, daß er zahlreiche Stämme nicht nur in morphologischer, sondern auch in physiologischer Hinsicht umfaßt (TAKAHASHI u. YAMAMOTO 1913).

Auch zur Beantwortung der Frage, wie und in welchem Grade bei *Aspergillus oryzae* die Vorkultur das Resorptionsverhältnis von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  beeinflusst, ist es sehr wichtig, zunächst einen Versuch anzustellen unter Verwendung einiger Stämme dieses Pilzes, welche hunderte von Generationen hindurch auf Böden von einer bestimmten Zusammensetzung kultiviert worden sind. Diese Studien wurden mir erleichtert durch freundliche Überlassung von Pilzmaterial aus vielen Stämmen, die im Laboratorium von Herrn Professor HANZAWA seit langem rein kultiviert worden sind. Einige von diesen Stämmen sind diejenigen, die früher TAKAHASHI u. YAMAMOTO in der oben erwähnten Arbeit benutzt haben, andere stammten entweder aus den Kulturen der Versuchsstation für Brauerei zu Tokyo oder waren aus käuflichem Moyashi<sup>1</sup> isoliert worden. Nach der Beschreibung von TAKAHASHI u. YAMAMOTO sind die morpho-

<sup>1</sup> Etiolierte Sojabohnenkeimlinge.

Versuch 6.

Die Konidien wurden aus den Agarkulturen mit einer Platinöse entnommen einmalig direkt in die verschiedenen Glukosegrundlösungen eingimpft und diese in einen Thermostaten von 30° C gebracht. Die benutzten Pilzstämmen waren folgende:

Nr. von HANZAWA	Bezeichnung von TAKAHASHI	Bezeichnung der Versuchsstation	Isoliert von	Vorkultur auf
65		Saké A	Saké-Koji	Koji- Agarböden
66		Saké B	"	
68		Saké D	"	
69		Saké E	"	
71	Soja G		Shoyu-Koji	
76	Tamari L		Tamari-Koji	
77	Tamari M		"	
78	Tamari N		"	
79	Tamari O		"	
80	Tamari P		"	
121			Moyashi	
125			"	

Tabelle 5.

Kultur	Vorkultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH
71	8 Tage, 30° C	5		3,2
76	"	5		3,1
77	"	5		3,2
78	"	5		3,3
79	"	5		3,2
80	"	5		3,2
121	"	5		3,5
125	"	5		3,0
71	8 Tage, 30° C	7	0,505	3,5
76	"	7	0,128	3,1
77	"	7	0,124	3,3
78	"	7	0,535	3,5
79	"	7	0,172	3,4
80	"	7	0,183	3,5
121	"	7	0,259	3,6
125	"	7	0,128	3,3
71	8 Tage, 30° C	10	0,882	3,9
76	"	10	0,149	3,4
77	"	10	0,161	3,7
78	"	10	0,642	3,5
79	"	10	0,217	3,8
80	"	10	0,261	3,7
121	"	10	0,231	3,9
125	"	10	0,176	3,5

Tabelle 6.

Kultur	Vorkultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH
71	72 Tage, 30° C	10	0,628	2,7
76	„	10	0,127	3,2
77	„	10	0,168	3,0
78	„	10	0,705	3,3
79	„	10	0,232	2,6
80	„	10	0,117	2,7
121	48 Tage, 30° C	10	0,269	2,8
125	„	10	0,110	2,8

Tabelle 7.

Kultur	Vorkultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH
65	26 Tage, 30° C	6	0,282	2,5
66	„	6	0,051	2,9
68	50 Tage, 30° C	6	0,292	2,9
69	„	6	0,202	2,8
65	26 Tage, 30° C	10	0,336	2,3
66	„	10	0,093	3,7
68	50 Tage, 30° C	10	0,712	3,9
69	„	10	0,295	2,6

Tabelle 8.

Kultur	Vorkultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH
65	5 Tage, 30° C	6	0,232	2,9
67	8 Tage, 30° C	6	0,126	2,9
69	5 Tage, 30° C	6	0,151	2,9
65	5 Tage, 30° C	10	0,407	3,2
67	8 Tage, 30° C	10	0,166	3,5
69	5 Tage, 30° C	10	0,190	2,8

logischen Eigenschaften unseres auf Koji-Agarböden kultivierten Materials äußerlich etwas verschieden von den originalen. Ich möchte aber hier nicht näher auf diesen Punkt eingehen.

Ein grundsätzlicher Unterschied bezüglich der C<sub>H</sub>-Veränderung kann zwischen den Saké-Kojistämmen und den Shoyu- oder Tamari-Kojistämmen nicht bemerkt werden. Solche Unterschiede hängen eher von anderen Bedingungen ab, besonders vom Alter der Vorkultur. Die Kulturen, deren Vorkultur auf dem Koji-Agarboden ziemlich lange (etwa 1 Monat) dauerte, neigen im allgemeinen stark zur Ammoniphilie, mit-

hin dazu,  $C_H$  ziemlich stark zu erhöhen. In der Kultur, die mit derselben Lösung ausgeführt wurde, deren Vorkultur aber weniger lange gedauert hatte (etwa 10 Tage), war das Verhältnis ganz anders. Der Pilz war schwach ammoniophil und nachher nitratophil;  $C_H$  erhöhte sich nur schwach, z. B. steigerte sich  $C_H$  bei Stamm 65 bis auf  $p_H$  2,3, wenn eine alte Vorkultur als Material verwendet wurde, während beim Gebrauch der verhältnismäßig jungen Vorkultur die  $C_H$ -Veränderung gemäß  $p_H$  4,3 → 2,9 → 3,2 verlief. Dies Verhalten ergab sich auch in Versuch 16. Die Beziehung zwischen der Ammoniophilie und der Dauer der Vorkultur ist nicht immer dieselbe. Mit dem Koji-Agarmaterial ruft lange Dauer der Vorkultur leicht die Ammoniophilie, während andererseits bei dem Material von S-Agar kurze Dauer der Vorkultur ihr Auftreten begünstigt. Diese Eigenschaften beruhen aber nicht nur auf der Art der Vorkultur; sie sind oft schon je nach dem Stamme verschieden. Unter derselben Bedingung in der Vorkultur sowie der Kultur verhielten sich einige Stämme stark ammoniophil, während andere sich schwach ammoniophil oder nitratophil zeigten. Man muß also eine erblich fixierte Stammeigenschaft annehmen. Die Pilze der Stämme, welche unter bestimmten Bedingungen sich stark ammoniophil verhalten, sind nicht selten. Selbst bei den Stämmen, die in den oben geschilderten Kulturen keine starke Ammoniophilie zeigten, wäre das Auftreten dieser Eigenschaft nicht ausgeschlossen, wenn die Vorkultur unter anderen, aber noch unbekanntem Bedingungen ausgeführt würde. Daß der Pilzstamm, welcher in der ersten Mitteilung von TAMIIYA (1927) verwendet wurde und dabei schwach ammoniophil oder nitratophil gewesen war,  $C_H$  in den Versuchen seiner zweiten Arbeit (1928) stark erhöhte, dürfte vielleicht darauf zurückzuführen sein.

Eine starke Ammoniophilie folgt auch auf Vorkultur auf S-Agar. In diesem Falle bedarf es dazu keiner langen Dauer derselben. Einige Beispiele bieten die folgenden Versuche, deren Resultate anderswo ausführlich geschildert werden:

- Versuch 4, zweimalige 4tägige S-Vorkultur.
- Versuch 7, fünfmalige 10tägige S-Vorkultur.
- Versuch 9, sechsmalige 25tägige S-Vorkultur.

Außerdem kann man derartige Resultate auch durch folgenden Versuch erhalten.

Versuch 7.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: a) S, dreimalig, 4 Tage lang; b) S, viermalig, 8 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:

Grundlösung . . . . .	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	52
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25
	Summe (ccm) 100

(Tabelle 9).

$p_H$  4,3

Daß ammoniophiles oder nitratophiles Verhalten auch durch die Generationszahl und die Art und Konzentration des Zuckers beeinflusst wird, ist aus Versuch 8 ersichtlich.

## Versuch 8.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, vierzehnmilig, 4 Tage lang. C, fünfmalig, 5 Tage lang. G, zweimalig, 7 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidien-suspension.

## Kulturlösung:

Grundlösung . . . . .	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25

Summe (ccm) 100

pH 4,3

Tabelle 9.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH	Kojisäure	Reduzierende Zucker
a-1	5	0,098	2,8	-	+
a-2	5	0,073 0,086	2,8	fast -	+
a-3	10	0,252	2,5	++++	+
a-4	10	0,326 0,289	2,5	++++	+
a-5	15	0,201	2,5	+	+
a-6	15	0,406 0,304	2,4	++++	+
b-1	6	0,095	2,7	+	+
b-2	6	0,122 0,109	2,7	+	+
b-3	10	0,258	2,6	++	+
b-4	10	0,329 0,294	2,8	++	+
b-5	17	0,384	2,4	+	+
b-6	17	0,377 0,381	2,4	+	+

In diesem Versuch (Tabelle 10) mit mehrmals durchgeführter Vorkultur S tritt starke Ammoniophilie nicht mehr hervor, obwohl die letzte Vorkultur so kurze Dauer wie im vorhergehenden Versuch hatte.

Dieselben Verhältnisse ergeben sich auch nach C- und G-Vorkulturen, wobei Art und Konzentration des Zuckers des Vorkulturbodens verschieden von denjenigen der stark ammoniophilen S-Vorkultur war, obwohl die Generationszahl und die Dauer der letzten Vorkultur ungefähr gleich waren.

Die ammoniophile bzw. nitratophile Eigenschaft von *Aspergillus oryzae* ist also sehr veränderlich und die wiederholte Vorkultur durch

Tabelle 10.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>
S-1	5	—	3,5
S-2	7	0,232	4,1
S-3	10	0,237	4,1
C-1	3	0,122	3,3
C-2	4	0,326	3,0
C-3	5	0,344	3,5
C-4	6	0,440	3,6
C-5	8	0,639	3,7
C-6	9	9,643	3,8
C-7	10	0,913	4,2
C-8	11	0,877	4,1
G-1	5	—	3,7
G-2	7	0,158	4,1
G-3	10	0,212	4,2

mehrere Generationen veranlaßt die Entstehung einer ganz anderen Eigenschaft. Wie gezeigt, steht damit auch die Dauer einzelner Vorkulturen in inniger Beziehung. Deshalb wäre es nicht unwahrscheinlich, daß durch Summierung der Eigenschaften in den einzelnen Generationen die Ammoniophilie sich entweder verstärkt oder zurückgeht.

Die Resorptionsweise von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> hängt auch von den Methoden der Impfung der Konidien ab. Wie im Versuch 6 erwähnt, erhöhte sich die Acidität der Kulturlösung während des Pilzwachstums durch starke Ammoniophilie bis auf p<sub>H</sub> 2,3, wenn Konidien aus verhältnismäßig alter Koji-Agarvorkultur mit einer Platinöse direkt in die Glukosegrundlösung eingimpft wurden. Es ist aber erstaunlich und unerwartet, daß wenn die B-Konidien suspension aus ein und derselben Vorkultur, welche die Konidien 7 Tage vorher auch für Versuch 6 geliefert hatte, mit einer sterilisierten Pipette in die Kulturlösung übertragen wurden, die Aciditätssteigerung nicht mehr so stark auftrat (Versuch 9).

## Versuch 9.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: K. Impfung mit 1 ccm von B-Konidien-suspension.

Kulturlösung:

Grundlösung . . . . .	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25
Summe (ccm)	100
	p <sub>H</sub> 4,2

Diese Tatsache läßt sicher erkennen, daß bei der Herstellung der B-Suspension irgendeine Substanz, welche auf das Pilzwachstum und be-

sonders auf die Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  einwirkt, aus dem Agarboden oder der Myceldecke in destilliertes Wasser ausdiffundiert. Diese Vermutung sollen die folgenden Versuche prüfen.

## Versuch 10.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur:  $\text{K}_1$ , 36malig, 11 Tage lang.  $\text{K}_2$ , 36malig, 11 Tage lang. Impfung: a) Konidien mit einer Platinöse aus der Agarkultur entnommen und einmal direkt in jede Kulturlösung geimpft. Ein Stück Kojiagar, auf welchem der Pilz noch nicht gewachsen war, wurde hinzugefügt. b) Impfung mit denselben Konidien und in gleicher Weise wie bei a. Ein Stück von Kojiagar, worauf der Pilz schon gewachsen war, wurde hinzugefügt (Tabelle 12).

Tabelle 11.

Kulturdauer in Tagen	$\text{p}_H$
4	2,9
5	2,8
6	3,0
7	3,5

Tabelle 12.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	$\text{p}_H$
$\text{K}_1\text{a}-1$	5	3,2
$\text{K}_1\text{a}-2$	7	3,4
$\text{K}_1\text{b}-1$	5	3,2
$\text{K}_1\text{b}-2$	7	3,3
$\text{K}_2\text{a}-1$	5	2,4
$\text{K}_2\text{a}-2$	7	2,5
$\text{K}_2\text{b}-1$	5	3,0
$\text{K}_2\text{b}-2$	7	3,0

## Versuch 11.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, einmalig, 19 Tage lang. Impfung: a) Konidien mit einer Platinöse der Agarkultur entnommen und einmal direkt in jede Kulturlösung geimpft. b) B-Konidiensuspension aus derselben Vorkultur wie bei a (Tabelle 13).

Es zeigt sich also (Tabelle 13) ein deutlicher Unterschied der Aciditätsveränderung zwischen den beiden Impfungsmethoden, wenn der Pilz schon in der Vorkultur mit stark ammoniophiler Eigenschaft ausgestattet war. Bei Impfung der B-Konidiensuspension erhöhte sich  $\text{C}_H$  nicht so stark wie bei der Kultur, in welche die Konidien mit einer Platinöse direkt eingepflegt wurden. Es läßt sich also vermuten, daß die aus dem Pilze ausgeschiedene Substanz auf die Resorptionsverhältnisse von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  einwirkt. Ein Pilz, der in der Vorkultur keine stark ammoniophile Eigenschaft erworben hat, zeigt auch keinen solchen Unterschied auf Grund der beiden verschiedenen Impfungsmethoden.

Die Ergebnisse dieses Kapitels können wir folgendermaßen zusammenfassen:

Die Ammoniphilie bzw. Nitratophilie von *Aspergillus oryzae* in der Kultur wird nicht wenig durch die Stammeigenschaft und die Vorkultur-

bedingung determiniert. Obwohl es mir noch nicht gelungen ist, die Faktoren, welche die Ammoniophilie hervorrufen, genau zu analysieren, kann man als wirksam das Alter der Vorkultur, die Art und Konzentration des Zuckers in derselben u. a. in Betracht ziehen. Welche Vorkultur verwendet werden muß, hängt vom Zwecke der Kultur ab. Für diese sind die alten sogenannten „reifen“ Konidien nicht immer das geeignetste Material und nicht alle Kulturen führen zu gleichmäßigen Ergebnissen.

In welchem Verhältnis  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  von *Aspergillus oryzae* eines bestimmten Stammes und einer bestimmten Vorkultur resorbiert werden, hängt auch von der Zusammensetzung der Lösung der Kultur selbst ab. Sogar der Einfluß der Vorkultur auf die Ammoniophilie kann erst analysiert werden, wenn die oben erwähnten Beziehungen ausführlich untersucht sind.

Ich ging zunächst von der Vermutung aus, daß eine innige Beziehung zwischen den Zuckerarten und der Ammoniophilie bestehen könne, weil der Unterschied in der Ammoniophilie zwischen unseren Kulturen und denjenigen von TAMURA (1927) mit einiger Wahrscheinlichkeit auf die Verschiedenheit der benutzten Zuckerarten zurückgeführt werden durfte.

Darüber, daß bei Schimmelpilzen oder Bakterien der Nährwert der C- sowie N-Quellen je nach der Art ihrer Kombination verschieden sein kann, haben mehrere Forscher Mitteilungen veröffentlicht.

Im folgenden werden einige Beispiele aus Versuchen mitgeteilt, welche erst weiter unten vollständig mitgeteilt werden.

Zunächst wurden Versuche mit Pilzen von verhältnismäßig schwacher Ammoniophilie angestellt, wobei als C-Quelle Glukose und Saccharose verwendet wurden.

Versuch 12.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: E, viermalig, 7 Tage lang. Impfung mit 1 ccm B-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)
Grundlösung . . . . .	25	25
Glukoselösung (m/2). . . . .	50	—
Saccharoselösung (m/4) <sup>1</sup> . . . . .	—	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	25
Summe (ccm)	100	100
$\text{pH}$ . . . . .	4,2	4,2
$\text{NH}_3$ <sup>2</sup> . . . . .	0,129	0,129
$\text{NO}_3$ <sup>2</sup> . . . . .	0,129	0,129

Versuch 13.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: E, fünfmalig, 7 Tage lang. Impfung mit 1 ccm B-Konidiensuspension. Kulturlösung gleich derjenigen des Versuchs 12.

<sup>1</sup> Mit Rücksicht auf die totale Inversion wurde nur die halbe Menge der Glukose genommen.

<sup>2</sup> Ausgedrückt in der Normalität.

Tabelle 14.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>
1—1	4	0,074	3,4	—	0,126	0,123	1,02
1—2	4	0,056 0,065	3,4	—	0,127	0,123	1,03
2—1	4	0,117	3,5	—	0,123	0,124	0,99
2—2	4	0,092 0,105	3,5	—	0,125	0,124	1,00
1—3	7	0,142	3,5	—	0,125	0,123	1,01
1—4	7	0,214 0,178	3,5	—	0,126	0,123	1,02
2—3	7	0,283	3,7	—	0,124	0,121	1,02
2—4	7	0,295 0,289	3,8	—	0,123	0,121	1,01
1—5	10	0,399	3,9	+	0,122	0,120	1,01
1—6	10	0,352 0,376	3,9	Spur	0,120	0,120	1,00
2—5	10	0,406	4,1	„	0,118	0,118	1,00
2—6	10	0,381 0,394	4,1	„	0,119	0,116	1,02
1—7	13	0,630	4,0	+	0,114	0,113	1,00
1—8	13	0,669 0,650	3,9	+++	0,109	0,111	0,99
2—7	13	0,670	4,0	+	0,107	0,108	0,99
2—8	13	0,659 0,665	4,2	Spur	0,107	0,107	1,00

## Versuch 14.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: K<sub>2</sub>, zweimal, 6 Tage lang. Impfung mit 1 ccm B-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)
Grundlösung . . . . .	25	25
Glukoselösung (m/2). . . . .	50	50
Saccharoselösung (m/4) . . . . .	—	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	25
Summe (ccm)	100	100
p <sub>H</sub> . . . . .	4,2	4,2
NH <sub>3</sub> . . . . .	0,124	0,125
NO <sub>3</sub> . . . . .	0,123	0,123

Aus diesen Versuchen (Tabelle 14, 15, 16) ist ersichtlich, daß das Resorptionsverhältnis von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub><sup>1</sup>, die p<sub>H</sub>-Veränderung und das

<sup>1</sup> Nach den Analysenergebnissen beurteilt, scheint die C<sub>H</sub>-Veränderung bisweilen nicht nur dem Resorptionsverhältnis NH<sub>3</sub>/NO<sub>3</sub> zuzuschreiben zu sein. Auf der früheren Stufe des Wachstums wurde C<sub>H</sub> gesteigert, obwohl die Ana-

Tabelle 15.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	p <sub>H</sub>	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>
1-1	4	0,080	3,3	-	0,127	0,124	1,02
1-2	4	0,069 0,075	3,3	-	0,125	0,123	1,01
2-1	4	0,077	3,5	-	0,125	0,123	1,01
2-2	4	0,087 0,082	3,5	-	0,127	0,123	1,02
1-3	7	0,221	3,5	-	0,118	0,121	0,97
1-4	7	0,214 0,218	3,6	-	0,118	0,120	0,98
2-3	7	0,295	3,8	-	0,121	1,120	1,01
2-4	7	0,276 0,286	3,9	-	0,120	0,118	1,02
1-5	10	0,314	4,0	-	0,116	0,116	1,00
1-6	10	0,334 0,324	3,9	-	0,117	0,116	1,01
2-5	10	0,367	4,3	-	0,114	0,117	0,97
2-6	10	0,417 0,392	4,3	-	0,115	0,116	0,99
1-7	13	0,731	3,9	+	0,109	0,109	1,00
1-8	13	0,423 0,577	4,1	-	0,116	0,113	1,02
2-7	13	0,618	4,3	+	0,112	0,112	1,00

Pilzwachstum je nach den Zuckerarten deutlich verschieden waren, auch wenn der Pilz schon zu schwacher Ammoniophilie oder Nitratophilie neigte. In den ersten Stadien verliefen die C<sub>H</sub>-Veränderungen sowie das Pilzwachstum in beiden Kulturformen gleichmäßig, alsdann aber begann bei Darbietung von Saccharose eine schnellere Erniedrigung der C<sub>H</sub>, und das Wachstum war besser als mit Glukose.

Je stärker ammoniophil der Pilz ist, desto auffälliger treten solche Unterschiede zwischen beiden Zuckerarten ein, wie der folgende Versuch 15 zeigt, bei welchem ein ziemlich stark ammoniophiler Pilz verwendet wurde. Nach 13tägiger Kultur stieg C<sub>H</sub> bis auf 2,4 in der Glukosegrundlösung an, und es ist dabei tatsächlich eine ziemlich große Differenz der zurückgebliebenen Mengen von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> wahrzunehmen, wäh-

lysenresultate stärkere Resorption von NO<sub>3</sub> als von NH<sub>3</sub> zeigten. Außer NH<sub>3</sub> dürften daher noch andere Kationen überwiegend vom Pilz aufgenommen werden. Es wäre auch möglich, daß dieses scheinbar paradoxe Resultat bis zum gewissen Grade dem Unterschied zwischen den Analysenfehlern von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> zuzuschreiben ist, weil das Pufferungsvermögen dieser Kulturlösung zwischen p<sub>H</sub> 3,0 und 4,3 sehr klein ist, und selbst schwache unbalancierte Resorption von Kation und Anion eine merkliche Verschiebung der C<sub>H</sub> hervorruft.

Tabelle 16.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	p <sub>H</sub>	Koji- säure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Riesenzelle
1—1	4	0,053	3,2	—	0,125	0,122	1,02	—
1—2	4	0,076 0,065	3,0	Spur	0,122	0,120	1,01	—
2—1	4	0,133	3,3	—	0,125	0,118	1,06	Anschwellung
2—2	4	0,199 0,166	3,5	—	0,125	0,118	1,06	„
1—3	7	0,248	2,6	—	0,118	0,115	1,02	„
1—4	7	0,268 0,258	2,8	—	0,121	0,115	1,05	„
2—3	7	0,484	4,3	Spur	0,125	0,110	1,15	—
2—4	7	0,517 0,501	4,0	„	0,124	0,110	1,13	Anschwellung
1—5	9	0,311	2,8	++++	0,115	0,109	1,05	„
1—6	9	0,343 0,327	2,8	++	0,115	0,110	1,04	„
2—5	9	0,681	4,2	+	0,110	0,096	1,14	—
2—6	9	0,627 0,654	4,1	Spur	0,112	0,096	1,14	—
1—7	13	0,521	2,8	++++	0,110	0,108	1,02	Anschwellung
1—8	13	0,556 0,539	2,9	++++	0,110	0,108	1,02	„
2—7	13	0,721	3,9	++	0,110	0,098	1,12	—

rend in der Saccharosegrundlösung die maximale Acidität p<sub>H</sub> 3,6 erreicht wurde und üppigeres Wachstum eintrat.

## Versuch 15.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: D, zweimalig, 7 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)
Grundlösung . . . . .	25	25
Glukoselösung (m/2). . . . .	50	—
Saccharoselösung (m/4) . . . . .	—	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	25
Summe (ccm)	100	100
p <sub>H</sub> . . . . .	4,2	4,2
NH <sub>3</sub> . . . . .	0,127	0,127
NO <sub>3</sub> . . . . .	0,127	0,127

## Versuch 16.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: K<sub>12</sub>, viermalig; a) 8 Tage lang, b) 5 Tage lang, c) 3 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension. Kulturlösung gleich derjenigen des Versuchs 15 (Tabelle 18).

Tabelle 17.

Kultur	Kultur- dauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	p <sub>H</sub>	Kojl- säure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Riesenzelle
1—1	4	0,078	2,9	+	0,126	0,124	1,01	A <sup>1</sup> , R <sup>2</sup>
1—2	4	0,108 <i>0,093</i>	2,9	Spur	0,123	0,123	1,01	„
2—1	4	0,118	3,6	—	0,126	0,123	1,02	normal
2—2	4	0,097 <i>0,108</i>	3,6	—	0,125	0,122	1,02	„
1—3	5	0,147	2,9	Spur	0,125	0,122	1,02	A, R
2—3	5	0,181	3,7	—	0,126	0,122	1,03	A
1—4	7	0,219	2,6	Spur	0,116	0,116	1,00	A, R
1—5	7	0,187 <i>0,203</i>	2,6	+	0,119	0,117	1,02	„
2—4	7	0,336	3,9	—	0,121	0,114	1,06	A
2—5	7	0,323 <i>0,323</i>	4,0	—	0,123	0,115	1,07	„
1—6	9	0,323	2,5	++	0,111	0,115	0,96	A, R
1—7	9	0,321 <i>0,322</i>	2,6	+	0,111	0,115	0,96	„
2—6	9	0,371	4,3	—	0,121	0,111	1,09	
2—7	9	0,534 <i>0,453</i>	4,5	—	0,119	0,112	1,06	R
1—8	13	0,480	2,4	++++	0,105	0,112	0,94	A
2—8	13	0,660	4,3	—	0,113	0,109	1,04	

Der Pilz, der im Versuch 16<sup>3</sup> verwendet wurde, war stark ammoniophil und zeigte keinen so deutlichen Unterschied in der Resorption von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> zwischen der Glukose- und Saccharosekultur, wie in anderen Fällen. Er wuchs etwas besser in der ersteren Kultur als in der letzteren. Die Ammoniophilie übertraf die Nitratophilie auffällig, nicht nur in der Glukose-, sondern auch in der Saccharosekultur, besonders bei b und c. Die Acidität stieg in beiden Kulturen bis zu p<sub>H</sub> 2,5—2,7 an und begann in der Saccharosekultur freilich nicht schnell, sondern erst nach 14 Tagen wieder zu sinken. Wie später ausführlich diskutiert werden soll, scheint die Inversion in gewissem Grade notwendig für eine Nitratophilie, wenn Saccharose als C-Quelle dargeboten wird. In der Saccharosekultur dieses Versuches wurde die Inversion durch die gesteigerte Acidität gehemmt und die Menge des reduzierenden Zuckers, ausgenommen a 2—3 und b 2—4, war verhältnismäßig klein.

<sup>1</sup> Anschwellung.

<sup>2</sup> Riesenzelle.

<sup>3</sup> Dieser Versuch illustriert andererseits auch die Beziehung zwischen der Vorkultur und Ammoniophilie.

Tabelle 18.

Kultur	Kultur- dauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	p <sub>H</sub>	Koji- säure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Reduzie- rende Zucker	Riesen- zelle
a1—1	5	0,061	2,9	—					R
a2—1	5	0,092	3,0	—					„
b1—1	5	0,051	2,8	—					„
b2—1	5	0,081	2,9	—					„
c1—1	5	0,029	2,9	—					„
c2—1	5	0,083	3,0	—					„
a1—2	9	0,205	2,5	Spur					„
a2—2	9	0,223	3,7	—					„
b1—2	9	0,151	2,6	—					„
b2—2	9	0,271	2,5	+					„
c1—2	9	0,225	2,5	—					„
c2—2	9	0,219	2,6	+					„
a1—3	11	0,148	2,8	—	0,123	0,119	1,03	5,7	„
a2—3	11	0,300	4,3	—	0,126	0,111	1,13	3,1	„
b1—3	11	0,202	2,6	—	0,119	0,119	1,00	5,8	„
b2—3	11	0,237	2,7	—	0,118	0,119	0,99	1,7	„
c1—3	11	0,172	2,6	—	0,115	0,118	0,97	5,7	„
c2—3	11	0,273	2,7	—	0,115	0,118	0,97	1,5	„
a1—4	14	0,270	3,9	—	0,121	0,108	1,12	2,9	„
a2—4	14	0,372	3,9	—	0,122	0,106	1,15	1,7	„
b1—4	14	0,195	2,6	—	0,114	0,113	1,01	2,5	„
b2—4	14	0,314	4,2	—	0,121	0,109	1,11	4,9	„
c1—4	14	0,176	3,0	—	0,113	0,113	1,00	4,1	„
c2—4	14	0,333	4,1	—	0,119	0,110	1,08	2,2	„

Versuch 17 (Tab. 19) wurde unter Verwendung eines ammoniophilen Pilzes und unter Darbietung der beiden Zuckerarten in zweifacher Konzentration ausgeführt. In der Saccharosekultur war die Ammoniophilie nicht so stark wie in Versuch 16, und C<sub>H</sub> stieg nur bis zu p<sub>H</sub> 2,9, um dann zu sinken, was gegenüber der Glukosekultur mit ihrer C<sub>H</sub>-Steigerung auf das Pilzwachstum günstiger eingewirkt hat. Dies beruht hauptsächlich darauf, daß in der Saccharosekultur die Nitratophilie von Anfang an infolge genügender Inversion ziemlich stark auftritt, obwohl die Resorption von NH<sub>3</sub> sich bei beiden Zuckerarten nicht merklich unterschied. Es ist höchst interessant, daß die Saccharosekultur a 2, in welcher Zucker-

<sup>1</sup> 5 ccm des auf 500 ccm verdünnten Filtrats wurden nochmals auf 20 ccm verdünnt und diese Lösung als Probe verwendet. Der reduzierende Zucker wurde nach der BERTRANDSchen Methode volumetrisch bestimmt und seine Mengen in den Proben in Kubikzentimetern der für die Titration verbrauchten 0,5%igen Kaliumpermanganatlösung vergleichsweise angegeben.

Versuch 17.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, viermalig, 9 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:

	(a)		(b)	
	1	2	1	2
Grundlösung . . . . .	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2). . . . .	50	—	—	—
Glukoselösung (m) . . . . .	—	—	50	—
Saccharoselösung (m/4) . . . . .	—	50	—	—
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	—	—	—	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	25	25	25
Summe (ccm)	100	100	100	100
pH . . . . .	4,2	4,2	4,2	4,2
NH <sub>3</sub> . . . . .	0,129	0,129	0,129	0,129
NO <sub>3</sub> . . . . .	0,129	0,129	0,129	0,129

Versuch 18.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, fünfmalig, 6 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:

Spezifische Grundlösung:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	2 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	1 g
FeCl <sub>3</sub> (2%) . . . . .	1 Tropfen
Umdestilliertes Wasser . . . . .	100 ccm

	(1)	(2)	(3)	(4)
Grundlösung . . . . .	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
Spezifische Grundlösung . . . . .	25	25	—	25
N-Quelle (2 normale NH <sub>4</sub> -Salzlösung) . . . . .	25	25	—	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50	50	—	—
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	—	—	50	50
Umdestilliertes Wasser . . . . .	—	—	25	—
Summe (ccm) . . . . .	100	100	100	100
pH . . . . .	4,2	4,2	4,2	4,2

In der Kulturlösung 4 wurden Zucker und Salze vereint sterilisiert (Tabelle 20).

Versuch 19.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, fünfmalig, 10 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:

	(1)	(2)	(3)	(4)
Spezifische Grundlösung . . . . .	25	25	25	25
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (normal) . . . . .	25	—	25	—
NH <sub>4</sub> Cl (normal) . . . . .	—	25	—	25
Glukoselösung (m) . . . . .	50	50	—	—
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	—	—	50	50
Summe (ccm) . . . . .	100	100	100	100
pH . . . . .	4,2	4,2	4,2	4,2

Die spezifische Grundlösung war gleich derjenigen in Versuch 18. Ein Gemisch derselben und der normalen NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Lösung in gleichen Mengen entspricht fast der gewöhnlichen Grundlösung (Tabelle 21).

Tabelle 19.

Kultur	Kultur dauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	pH	Koji- säure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Reduzie- rende Zucker	Riesen- zelle
a1-1	5	0,122	2,8	-					
a1-2	5	0,069 0,096	2,9	-					
a2-1	5	0,125	3,2	-					
a2-2	5	0,138 0,134	3,3	-					
b1-1	5	0,132	2,8	-					
b1-2	5	0,183 0,158	2,8	-					
b2-1	5	0,171	3,2	-					
b2-2	5	0,192 0,182	2,9	-					
a1-3	7	0,125	2,8	-	0,125	0,120	1,04	7,2	A, R
a2-3	7	0,185	3,5	-	0,125	0,118	1,06	2,1	"
b1-3	7	0,150	2,8	-	0,121	0,118	1,02	7,5	"
b2-3	7	0,251	3,4	-	0,123	0,117	1,05	3,5	"
a1-4	10	0,187	2,8	-	0,122	0,119	1,02	5,9	"
a1-5	10	0,152 0,170	2,8	-	0,123	0,118	1,04	6,4	"
a2-4	10	0,326	4,4	-	0,122	0,114	1,07	2,9	"
a2-5	10	0,304 0,315	4,0	-	0,122	0,115	1,06	2,7	"
b1-4	10	0,204	2,8	-	0,122	0,118	1,03	15,2	"
b1-5	10	0,192 0,198	2,6	-	0,120	0,118	1,01	13,8	"
b2-4	10	0,413	3,9	-	0,119	0,114	1,04	6,2	"
b2-5	10	0,414 0,414	4,1	-	0,123	0,115	1,07	6,2	"
a1-6	14	0,244	2,5	-	0,110	0,108	1,02	4,0	"
a2-6	14	0,350	5,1	-	0,112	0,104	1,17	2,0	"
b1-6	14	0,354	2,6	-	0,116	0,111	1,04	12,2	"
b2-6	14	0,531	4,7	-	0,123	0,103	1,19	7,0	"
a1-7	16	0,293	3,5	-	0,122	0,110	1,10	2,5	"
a2-7	16	0,367	5,2	+	0,122	0,103	1,18	1,4	"
b1-7	16	0,407	2,8	-	0,113	0,112	1,01	9,8	"
b2-7	16	0,516	4,8	Spur	0,122	0,102	1,19	6,1	"

menge, als Invertzucker berechnet, nur die Hälfte der Glukosemenge in Kultur b 1 betrug, die letztere Kultur an Pilzwachstum übertraf.

Wenn man Versuch 19, bei welchem ziemlich stark ammoniophiler Pilz verwendet wurde, betrachtet und die Kulturen 1 und 3 vergleicht,

Tabelle 20.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH	Kojisäure	Reduzierende Zucker
1-1	4	0,061	3,3	-	
1-2	4	0,089 <i>0,075</i>	3,3	-	
2-1	4	0,065	3,3	-	
2-2	4	0,080 <i>0,070</i>	3,3	-	
3-1	4	0,104	3,5	-	
3-2	4	0,168 <i>0,136</i>	3,5	-	
4-1	4	0,152	3,5	-	
4-2	4	0,131 <i>0,142</i>	3,6	-	
1-3	7	0,108	2,8	+++	
1-4	7	0,140 <i>0,124</i>	2,8	+++	
2-3	7	0,094	2,8	++	
2-4	7	0,121 <i>0,108</i>	2,8	++	
3-3	7	0,262	3,4	Spur	
3-4	7	0,286 <i>0,274</i>	3,3	„	
4-3	7	0,379	3,5	+	
4-4	7	0,217 <i>0,298</i>	3,5	-	
1-5	12	0,271	2,6	++	+
1-6	12	0,301 <i>0,286</i>	2,6	+++	+
2-5	12	0,194	2,8	++	+
2-6	12	0,247 <i>0,171</i>	2,8	++	+
3-5	12	0,754	3,4	Spur	+
3-6	12	0,693 <i>0,724</i>	3,4	++	+
4-5	12	0,742	4,1	-	+
4-6	12	0,731 <i>0,737</i>	4,1	-	+
1-7	18	?	?	?	?
1-8	18	?	?	?	?
2-7	18	0,350	2,6		+
2-8	18	0,276 <i>0,313</i>	2,8		+
3-7	18	0,860	3,4		+
3-8	18	0,940 <i>0,900</i>	3,6		+
4-7	18	0,843	3,0		+
4-8	18	0,941 <i>0,842</i>	4,2		+

Tabelle 21.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH	Kojisäure	Riesenzelle
1—1	5	0,212	2,9		
1—2	5	0,182 <i>0,197</i>	2,9	-	
2—1	5	0,264	2,6		
2—2	5	0,251 <i>0,258</i>	2,6	+	
3—1	5	0,239	3,3	fast -	
3—2	5	0,271 <i>0,255</i>	3,3		
4—1	10	0,218	2,6		
4—2	10	0,257 <i>0,238</i>	2,6	„ -	
1—3	10	0,438	2,6		R
1—4	10	0,346 <i>0,392</i>	2,8	++	„
2—3	10	0,466	2,4		„
2—4	10	0,401 <i>0,434</i>	2,4	+++	„
3—3	10	0,522	3,7		A
3—4	10	0,517 <i>0,520</i>	3,5	Spur	„
4—3	10	0,384	2,3		R
4—4	10	0,386 <i>0,385</i>	2,3	+	„
1—5	13	0,445	2,7		„
1—6	13	0,425 <i>0,435</i>	2,9	+++	„
2—5	13	0,506	2,3		„
2—6	13	0,487 <i>0,497</i>	2,3	++++	„
3—5	13	0,726	4,1		meistens normal
3—6	13	0,813 <i>0,770</i>	4,1	+	„
4—5	13	0,475	2,3	++	R
4—6	13	0,493 <i>0,484</i>	2,3		„
1—7	17	0,624	2,9		„
1—8	17	0,618 <i>0,621</i>	2,8	++++	„
2—7	17	0,499	2,3		„
2—8	17	0,511 <i>0,505</i>	2,3	++++	„
3—7	17	0,785	4,2		meistens normal
3—8	17	0,797 <i>0,791</i>	4,3	+	„
4—7	17	0,482	2,3		R
4—8	17	0,427 <i>0,455</i>	2,3	++	„

von denen der ersteren Glukose, der letzteren Saccharose als C-Quelle zugegeben war, während die N-Quelle in beiden  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  darstellte, so sieht man, daß  $C_H$  in der Glukosekultur stets höher stieg und der Pilz weniger intensiv als in der Saccharosekultur wuchs. Mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als N-Quelle (Kultur 2 und 4) zeigten hingegen die beiden Zuckerarten keinen solchen Unterschied, weil  $\text{NH}_3$  als alleinige N-Quelle vom Pilze aufgenommen wird und deshalb  $C_H$  in beiden Fällen gleichmäßig auf  $p_H$  2,3 anstieg. Gemäß der Steigerung von  $C_H$  ( $p_H$  2,3) wurden die Wirkung der Invertase des Pilzes und infolgedessen auch die Zuckerresorption und Assimilation wahrscheinlich gehemmt. In diesem Falle stand das Wachstum in der Saccharosekultur demjenigen in der Glukosekultur etwas nach.

Im folgenden werden die Nährwerte von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nach dem Wachstumsgrade im Verlauf der Kultur vergleichend wiedergegeben, mit Rücksicht auf die gleichzeitig gegebenen Zuckerarten (Tabelle 22).

Tabelle 22.

Kulturdauer in Tagen	Glukosekultur		Saccharosekultur	
	(1) $\text{NH}_4\text{NO}_3$	(2) $\text{NH}_4\text{Cl}$	(3) $\text{NH}_4\text{NO}_3$	(4) $\text{NH}_4\text{Cl}$
5	0,197	0,258	0,255	0,238
7	0,392	0,434	0,520	0,385
13	0,435	0,497	0,770	0,484
17	0,621	0,505	0,791	0,455

Da der ziemlich stark ammoniophile Pilz das  $\text{NO}_3$  in der Glukosekultur 1 nicht ausreichend ausnutzen konnte, zeigt dieser Fall, daß  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nicht immer eine günstigere N-Quelle als  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sein muß. Überdies ergab die Gegenwart der Cl-Ionen die Tendenz, die  $\text{NH}_3$ -Resorption zu erleichtern, woraus sich das bessere Wachstum in der  $\text{NH}_4\text{Cl}$  haltigen Kulturlösung 2 erklärt<sup>1</sup>. Nach einer gewissen Dauer der Kultur, d. h. nach etwa 17 Tagen, erwarb der Pilz aufs neue die nitratophile Eigenschaft und die  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Kultur begann diejenige mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  an Pilzernte zu übertreffen. Da die Saccharosekultur aber von Anfang an beim Pilz die  $\text{NO}_3$ -Resorption begünstigt, findet man die ganze Kulturdauer hindurch in der  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Kultur immer das bessere Wachstum.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß die Inversion des Zuckers in der Saccharosekultur für die Assimilation der C-Quelle durch den Pilz eine große Rolle spielt. Tatsächlich vermehrt sich in den meisten Fällen die Menge des reduzierenden Zuckers im Verlaufe der Kultur.

Um den Unterschied zwischen der Glukose- und Saccharosekultur genauer zu untersuchen, ist es unbedingt notwendig, noch Kulturversuche

<sup>1</sup> Daß  $\text{NH}_4\text{Cl}$  manchmal als N-Quelle dem  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  überlegen sein kann, wurde auch bei der Kultur von *Aspergillus niger* gefunden (SAKAMURA 1927).

mit Fruktose anzustellen, welche letztere Zuckerart mit Glukose zusammen den Invertzucker darstellt. Im Versuch 20 wurden Kulturen mit Glukose, Fruktose und Saccharose unter Verwendung eines ziemlich stark ammoniophilen Pilzes zum Vergleich der Wirkung dieser drei Zuckerarten auf die Resorptionsverhältnisse  $\text{NH}_3/\text{NO}_3$  angesetzt.

## Versuch 20.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, sechsmalig, 25 Tage lang. Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)	(3)	(4)
Grundlösung . . . . .	25	25	25	25
Glukoselösung (m) . . . . .	50	0	0	25
Fruktoselösung (m) . . . . .	0	50	0	25
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	0	0	50	0
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	25	25	25
Summe (ccm) . . . . .	100	100	100	100
$\text{pH}$ . . . . .	4,2	4,2	4,2	4,2
$\text{NH}_3$ . . . . .	0,125	0,125	0,125	0,125
$\text{NO}_3$ . . . . .	0,123	0,123	0,248	0,123

In der Kulturlösung 3 wurden Zucker und Nährsalze gemischt und der Sterilisation unterworfen, doch hat die höhere Konzentration der Salze keine besondere Bedeutung (Tabelle 23).

Das Pilzwachstum war am besten in der Fruktosekultur, worauf das Gemisch der Hexosen, dann die Saccharose- und zuletzt die Glukosekultur folgten. Die  $\text{C}_\text{H}$ -Steigerung und Ammoniophilie gingen beide mit schwächerem Wachstum symbat. Es ist nun sehr wahrscheinlich, daß die merkliche Neigung zur schwachen Nitratophilie bei der Saccharosekultur hauptsächlich der Wirkung der durch Inversion daraus erzeugten Fruktose zu verdanken ist. Wie notwendig die Inversion für die Nitratophilie bei der Saccharosekultur ist, kann man deutlich aus den Resultaten des Versuchs 16 ersehen.

Bezüglich der Zuckerarten ergibt sich also:

Falls  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  als N-Quelle dem Pilz dargeboten wird und er  $\text{NO}_3$  ebensogut wie  $\text{NH}_3$  resorbiert, erhöht sich die Acidität nicht in extremem Grade, mithin wird das Pilzwachstum üppig. Bei der Verwendung von Saccharose als C-Quelle erfolgt Inversion in der Kulturlösung und zweifellos beeinflußt die dadurch gebildete Fruktose die  $\text{NO}_3$ -Resorption und das Pilzwachstum im obigen Sinne günstig. Daher muß man in der Saccharosekultur auch den Zusammenhang zwischen der Bildung oder Wirkung von Invertase und der Acidität genau berücksichtigen.

Daß in den meisten Kulturen TAMİYAS  $\text{C}_\text{H}$  nicht stark anstieg, beruht wahrscheinlich zum nicht geringen Teil auf der durch die Darbietung von Saccharose hervorgerufenen nachträglichen Nitratophilie, wenn auch der Pilz an sich schon nitratophile Eigenschaften besaß. Wie BRENNER (1914, S. 12—13) mit Recht betont hat, sind wir erst berechtigt, die Nähr-

Tabelle 23.

Kultur	Kultur- dauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	D <sub>H</sub>	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Reduz. Zucker
1—1	6	0,192	2,6	+	0,120	0,120	1,00	+
2—1	6	0,651	4,1	—	0,115	0,100	1,15	+
3—1	6	0,366	3,3	—	0,239	0,256	0,93	+
4—1	6	0,543	4,1	—	0,114	0,117	0,97	+
1—2	11	0,494	2,3		0,103	0,113	0,91	+
1—3	11	0,587 0,541	2,2	++++				+
2—2	11	0,808	4,6		0,106	0,088	1,20	+
2—3	11	0,956 0,882	4,6	+++				+
3—2	11	0,595	3,9		0,221	0,227	0,97	+
3—3	11	0,742 0,669	4,1 4,0	—				+
4—2	11	0,760	4,4		0,105	0,090	1,17	+
4—3	11	0,782 0,771	4,4	Spur				+
1—4	15	0,581	2,2		0,101	0,117	0,86	+
1—5	15	0,747 0,664	2,3	++++				+
2—4	15	0,867	4,7		0,109	0,077	1,41	+
2—5	15	0,854 0,861	5,0	+++				+
3—4	15	0,822	4,6		0,225	0,213	1,06	+
3—5	15	0,798 0,810	4,7	—				+
4—4	15	0,801	4,8		0,106	0,092	1,15	+
4—5	15	0,877 0,839	4,7	Spur				+

werte verschiedener Stoffe zu vergleichen, wenn ihre Beziehung mit Nährstoffen anderer Art berücksichtigt<sup>1</sup> wird. Besonders ist der Zusammenhang der Zuckerart mit der Resorption von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> ein wichtiges Moment bei der Pilzkultur, weil einerseits die Synthese der komplizierten organischen Verbindungen ihren Ausgangspunkt darin findet, und andererseits die damit zusammenhängende C<sub>H</sub>-Veränderung als Begleiterscheinung das Gedeihen des Pilzes beeinflußt. Es läßt sich vermuten, daß die Nitratophilie bei der Fruktose- bzw. Saccharosekultur<sup>2</sup> mit der Reduktion von NO<sub>3</sub> verknüpft sei.

<sup>1</sup> Z. B. Beziehung zwischen den Zuckerarten und den anorganischen N-Quellen.

<sup>2</sup> Die Saccharose geht in Wirklichkeit durch die Enzymwirkung während der Kultur in Invertzucker über.

Schon früher hat NÄGELI (1881) sich dahin geäußert, daß Nitrate vor der Resorption und Assimilation von Mikroorganismen durch Reduktion in  $\text{NH}_3$  übergehen könnten. LAURENT (1890), RITTER (1911), KLAESER (1914) u. a. betonten die Notwendigkeit der Reduktion der Nitrate zu Ammoniak, bevor eine Synthese von N-haltigen organischen Verbindungen stattfindet. RACIBORSKI (1906) bestätigte, daß in Gegenwart eines Oxydationsmittels, wie z. B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Kaliumchlorat, das Wachstum von *Aspergillus niger* in der  $\text{NO}_3$ -Kultur gehemmt wird, während in der  $\text{NH}_3$ -Kultur keine solche Hemmung nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu beeinflusst der Zusatz von Aluminiumpulver das Wachstum in einer  $\text{NO}_3$ -Kultur sehr günstig. Dies kann man wahrscheinlich dadurch erklären, daß in Gegenwart von Oxydationsmitteln die Reduktion von  $\text{NO}_3$  verhindert wird, welche als einer von den notwendigen Prozessen für die Assimilation der N-Quelle betrachtet werden muß, und daß in Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Aluminiumpulver die Reduktion von  $\text{NO}_3$  beschleunigt und dadurch das Pilzwachstum begünstigt wird. Auch BRENNER (1914) nahm einen Reduktionsprozeß  $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{Hydroxylamin} \rightarrow \text{NH}_3$  an und faßte diesen als intrazelluläre Reaktion auf, die erst nach der Resorption eintritt. KOSTYTSCHEW u. TSWETKOVA (1920) bestätigten, daß wenn die Deckenkultur von *Aspergillus niger* und *Mucor ramosus* auf eine  $\text{NO}_3$ - bzw.  $\text{NO}_2$ -haltige Zuckerlösung übergeführt wird, die Reduktion  $\text{NO}_3 \leftarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_3$  und daran anschließend weiterhin Eiweißsynthese erfolgt. KLEIN, EIGNER u. MÜLLER (1926) haben ähnliche Ansichten geäußert, wonach aber die  $\text{NO}_3$ -Reduktion schon in der Kulturlösung stattfindet.

Fast alle Autoren, welche oben genannt wurden, sind sich darin einig, daß die Reduktion von  $\text{NO}_3$  für dessen Assimilation eine wichtige, und zwar notwendige früheste Stufe darstellt.

Als mögliche Reduktionsmittel in der Pilzkultur kann man die als C-Quelle dargebotenen reduzierenden Zucker nennen. Besonders Fruktose ist in verschiedenen Eigenschaften viel reaktiver als Glukose<sup>1</sup>. Wir sind daher nicht abgeneigt anzunehmen, daß Fruktose verglichen mit Glukose eine spezielle Aktivität für die Nitratreduktion aufweise, wovon wahrscheinlich die oben erwähnte günstige Wirkung des Fruktosezusatzes auf das Pilzwachstum direkt und indirekt abhängig ist<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> IRVINE (1923).

<sup>2</sup> Daß die Gegenwart des Nitrats bei verschiedenen Stoffwechsellerscheinungen eine wichtige Rolle spielt, ist bisher bisweilen mitgeteilt worden. Vor kurzem haben RUHLAND und ULLRICH (1929) festgestellt, daß der Atmungsquotient der grünen Blätter durch Zusatz von Nitrat erhöht wird.

**Pilzwachstum und Resorption von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> in gepufferten Kulturlösungen.**

Wie schon erwähnt, ist der Pufferzusatz in der Kultur eines stark ammoniophilen Pilzes auffällig wirksam, während er auf das Wachstum schwach ammoniophiler oder nitratophiler Pilze weniger oder gar nicht günstig im Sinne der Pufferung wirkt. In den folgenden Versuchen werden nun das Pilzwachstum und die Resorption von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub> in gepufferten Kulturlösungen von verschiedenem p<sub>H</sub> genauer, mit Rücksicht auf die ammoniophilen sowie nitratophilen Eigenschaften des Pilzes, untersucht.

Bei seinen Kulturversuchen mit *Aspergillus oryzae* in Lösungen, welche mit ziemlich großen Mengen des Phosphatgemisches stark gepuffert waren und verschiedene p<sub>H</sub>-Werte zeigten, hat TAMIIYA (1927) ein maximales Wachstum bei etwa p<sub>H</sub> 3,5 und bei 7,0 und dazwischen ein vermindertes bei etwa p<sub>H</sub> 5,5, also eine zweigipfelige Wachstumskurve beobachtet. Er ist geneigt, bei etwa p<sub>H</sub> 5,5 einen isoelektrischen Punkt des Plasmaeiweißes anzunehmen, obschon er sich nicht bestimmter über das Vorhandensein eines solchen Punktes ausgesprochen hat.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Kulturlösungen mit Phosphatgemisch gepuffert. Eine C<sub>H</sub>-Veränderung im Verlaufe der Kultur fand natürlich mehr oder weniger in allen Lösungen statt. Trotz der stärkeren Pufferung der Kulturlösungen TAMIIYAS ging die C<sub>H</sub>-Veränderung auch in seinem Falle doch ebenso weit wie in den meinigen.

Versuch 21.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, achtmalig, 7 Tage lang. Impfung mit 1 cem von B-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Grundlösung . . . . .	25	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50	50	50	50	50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	0	25	23	1,25	2,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	0	0	2	1,25	22,5
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	0	0	0	0
Summe (ccm) . . . . .	100	100	100	100	100
p <sub>H</sub> . . . . .	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
NH <sub>3</sub> . . . . .	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127
NO <sub>3</sub> . . . . .	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126

Trotz der schwachen Ammoniophilie des Pilzes kann man eine deutlich günstige Wirkung des Pufferzusatzes auf das Pilzwachstum wahrnehmen. Obwohl die Tendenz, daß der Pilz um so besser wächst, je größer der p<sub>H</sub>-Wert der Kulturlösung ist, festgestellt werden kann, so läßt sich auch schwächeres Wachstum bisweilen in der mittleren Region von p<sub>H</sub> finden.

Tabelle 24.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	pH	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Reduzierende Zucker
1-1	7	0,132	3,3	-				
2-1	7	0,187	3,7	-				
3-1	7	0,382	4,3	++				
4-1	7	0,414	5,6	++++				
5-1	7	0,461	5,7	++++				
1-2	8	0,193	3,7	-	0,121	0,121	1,00	+
1-3	8	0,210	3,9	-				
		0,202						
2-2	8	0,239	4,0	-				
2-3	8	0,245	4,1	-	0,122	0,121	1,01	+
		0,242						
3-2	8	0,430	4,7	++	0,118	0,115	1,02	+
3-3	8	0,552	4,9	++				
		0,491						
4-2	8	0,482	5,5	+++	0,108	0,107	1,01	wenig
4-3	8	0,567	5,5	+++				
		0,525						
5-2	8	0,528	5,7	++++				
5-3	8	0,465	5,8	++++	0,108	0,103	1,05	„
		0,497						
1-4	11	0,202	4,5	-	0,123	0,108	1,13	+
2-4	11	0,294	4,7	Spur	0,120	0,102	1,23	+
3-4	11	0,232	5,2	++	0,119	0,097	1,22	wenig
4-4	11	0,381	5,5	++++	0,100	0,097	1,08	„
5-4	11	0,443	5,9	++++	0,097	0,096	1,01	„
1-5	14	0,288	5,1	-	0,124	0,108	1,14	+
1-6	14	0,310	5,1	+				+
		0,299						
2-5	14	0,350	5,2	+	0,123	0,101	1,21	+
2-6	14	0,466	5,2	+				+
		0,408						
3-5	14	0,456	5,5	+++	0,109	0,099	1,10	+
3-6	14	0,257	5,5	++++				+
		0,357						
4-5	14	0,589	5,7	+++++	0,101	0,099	1,02	wenig
4-6	14	0,495	6,2	+++++				„
		0,542						
5-5	14	0,592	6,3	+++++	0,082	0,096	0,85	„
5-6	14	0,547	6,3	+++++				„
		0,570						

Was die  $C_H$ -Veränderung betrifft, so hat TAMIYA bestätigt, daß auf der schwächer sauren Seite etwa um  $p_H$  5,5  $C_H$  sich immer erhöht, ohne wieder zu fallen. Im vorliegenden Falle ist der Verlauf ein etwas anderer. In der Kulturlösung mit so niedrigem Anfangs- $C_H$ , wie oben erwähnt ( $p_H$  6,0 und 6,4), stieg die Acidität einmal bis auf etwa 5,5, dann aber fiel sie wieder, bisweilen über die Anfangsacidität hinaus. Im folgenden ist der Verlauf der  $C_H$ -Veränderung wiedergegeben:

Anfangs- $p_H$	Kulturdauer in Tagen			
	7	8	11	14
5,2	4,3	4,8	5,2	5,5
6,0	5,6	5,5	5,5	6,2
6,4	5,7	5,8	5,9	6,3

Die Ammoniophilie erwies sich als stärker in der gepufferten Lösung als in der nicht gepufferten von demselben anfänglichen  $p_H$ -Wert und um so stärker, je niedriger  $C_H$  war. Im Gegensatz dazu überwog die Nitratophilie in den höheren Aciditäten über die Ammoniophilie. Die resorbierte Gesamtmenge von  $NH_3$  sowie  $NO_3$  war aber in den niederen Aciditäten stets größer und war proportional zum Wachstumsgrade. Nach BACH (1925) resorbiert *Aspergillus repens* mehr  $NH_3$  bei niedrigerem und mehr  $NO_3$  in höheren  $C_H$ . TAMIYA (1927, S. 90, 131) äußerte sich darin, daß die Nitrataufnahme durch *Aspergillus oryzae* wahrscheinlich erst dann beginne, wenn die mit Pilzmycel unmittelbar in Berührung stehende Lösung eine Acidität von etwa  $p_H$  2,5<sup>1</sup> erreicht habe. Da aber *Aspergillus oryzae* in einer  $KNO_3$ -Kultur von niedrigeren Aciditäten als  $p_H$  2,5 gut wachsen kann und diese immer erniedrigt<sup>2</sup>, wäre es nicht unberechtigt daraus zu schließen, daß die Resorption von  $NO_3$  durch *Aspergillus oryzae* auch in einer  $NH_4NO_3$ -Kultur schon stattfinden kann, bevor  $C_H$  bis auf  $p_H$  2,4 gesteigert ist.

Versuch 22.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: K, 10 Tage lang. Impfung mit 1 cem A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Grundlösung . . . . .	25	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50	50	50	50	50
$NaH_2PO_4$ (m/5) . . . . .	0	25	23	1,25	2,5
$Na_2HPO_4$ (m/5) . . . . .	0	0	2	1,25	22,5
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	0	0	0	0
Summe (cem) . . . . .	100	100	100	100	100
$p_H$ . . . . .	4,2	4,2	5,2	6,0	6,4
$NH_3$ . . . . .	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127
$NO_3$ . . . . .	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127

<sup>1</sup> Die als Ganzes gemessene Acidität der Kulturlösung müßte dabei niedriger sein. <sup>2</sup> Seine Versuche 14 und 15.

Tabelle 25.

Kultur	Kultur- dauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	p <sub>H</sub>	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Riesen- zelle
1—1	5	0,132	2,9	—	0,120	0,122	0,95	A, R
2—1	5	0,205	3,5	—	0,121	0,120	1,01	A
3—1	5	0,291	4,3	—	0,113	0,116	0,97	normal
4—1	5	0,283	5,2	Spur	0,113	0,115	0,98	„
5—1	5	0,344	5,8	„	0,104	0,110	0,95	„
1—2	7	0,291	2,7	+++	0,118	0,121	0,97	A, R
2—2	7	0,334	3,2	++++	0,117	0,119	0,98	A
3—2	7	0,511	3,9	++++	0,117	0,115	0,96	normal
4—2	7	0,523	4,6	+	0,110	0,116	0,95	„
5—2	7	0,664	4,9	+	0,092	0,108	0,85	„
1—3	10	0,379	3,4	—	0,121	0,118	1,02	A, R
2—3	10	0,474	3,4	+++	0,118	0,114	1,03	A
3—3	10	0,531	3,9	++++	0,116	0,113	1,02	normal
4—3	10	0,741	4,1	+++	0,099	0,109	0,91	„
5—3	10	0,934	4,2	+++	0,087	0,104	0,84	„

Wir würden zu weit gehen, wenn wir z. B. aus meinem Versuch 21 schließen wollten, daß der direkt mit Pilzmycel in Berührung kommende Teil der Lösung, deren Anfangs-p<sub>H</sub> 6,6 war und deren als Ganzes gemessene C<sub>H</sub> nach Stägiger Kultur p<sub>H</sub> 5,8 betrug, eine so hohe Acidität wie p<sub>H</sub> 2,5 besaß, wenn auch örtliche Verschiedenheit der Acidität innerhalb einer Kulturlösung möglich sein mag. Überdies illustrieren die Analysenresultate eine ziemlich starke Resorption von NO<sub>3</sub> im allgemeinen schon in niedrigeren Aciditäten.

Der verwendete Pilz war mittelstark ammoniophil. Die C<sub>H</sub> stieg in der Glukosegrundlösung bis auf p<sub>H</sub> 2,7, um wieder zu fallen. Die Pilzernte war desto größer, je niedriger die Acidität war, und der Pufferzusatz zeigte eine deutlich günstige Wirkung auf das Pilzwachstum<sup>1</sup>. Am 10. Tage begann die Acidität in den Kulturen 1 und 2 wieder zurückzugehen, während in den Kulturen 4 und 5 noch eine Aciditätsvermehrung anhält. Dazwischen stand die Kultur 3, wo die C<sub>H</sub> von p<sub>H</sub> 3,9 vom 7. bis zum 10. Tage unverändert erhalten blieb. Eine solche abweichende Tendenz der C<sub>H</sub>-Veränderung kann man leicht daraus erklären, daß das Verhältnis NH<sub>3</sub>/NO<sub>3</sub> > 1 in allen Kulturen bis zum 7. Tage bestand und am 10. Tage in den Kulturen 1, 2 und 3 größer als 1 wurde, während es in 4 und 5 immer noch kleiner als 1 blieb. Es ist nicht selten schwierig, die Wirkung von verschiedenen Aciditäten auf das Pilzwachstum zu ver-

<sup>1</sup> Vergleiche die Kulturen 1 und 2.

gleichen, wenn einerseits  $C_H$ -Steigerung, d. h. Ammoniophilie, in einigen Kulturen einer gewissen  $p_H$ -Reihe, in anderen Kulturen derselben  $C_H$ -Erniedrigung, d. h. Nitratophilie, herrschen. Da aber in Versuch 22 die Resorption von  $NH_3$  in den früheren Stufen aller Kulturen ziemlich lange andauerte, waren die Unterschiede der daraus entstandenen Pilzernten bei der letzten derselben noch immer ungestört geblieben.

Wir haben schon mehrfach erfahren, daß die Vorkultur je nach deren Bedingungen verschiedenartig auf die Kultur einwirkt. Im folgenden wurde ein Versuch angestellt, um festzustellen, inwieweit verschiedene  $C_H$  und die Pufferung in der Vorkultur das Pilzwachstum der gepufferten Kultur beeinflussen können. Je drei Arten von Kulturlösungen wurden für die Vorkultur sowie die Kultur hergestellt. Die Zusammensetzung aller entsprechenden Kulturlösungen war fast gleich, ausgenommen nur die Konzentration der C-Quelle (Saccharose).

Versuch 23.

*Aspergillus oryzae* 65.

Vorkulturboden:	(a)	(b)	(c) <sup>1</sup>
Grundlösung . . . . .	25	25	25
Saccharoselösung (10%) . . . . .	50	50	50
$NaH_2PO_4$ (m/5) . . . . .	25	20	10
$Na_2HPO_4$ (m/5) . . . . .	0	5	15
Agar (g) . . . . .	2	2	2
$p_H$ . . . . .	4,2	4,2	4,2

Vorkultur: siebenmal, 7 Tage lang. Impfung mit 1 ccm B-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(A)	(B)	(C)
Grundlösung . . . . .	25	25	25
Saccharoselösung (m/2) . . . . .	50	50	50
$NaH_2PO_4$ (m/5) . . . . .	25	20	10
$Na_2HPO_4$ (m/5) . . . . .	0	5	15
Summe (ccm) . . . . .	100	100	100
$p_H$ . . . . .	4,2	5,4	6,4

Die Kombination zwischen der Vorkultur und der Kultur war folgende: a—A. die Konidien aus der Vorkultur a wurden in die Kulturlösung A; a—B aus a in B; a—C aus a in C geimpft, usw. (Tabelle 26).

Die Ergebnisse sprechen im allgemeinen dafür, daß je größer der  $p_H$ -Wert des Vorkulturbodens und der Kulturlösung war, desto üppiger fiel mit wenigen Ausnahmen das Pilzwachstum aus. Man kann also den günstigen Einfluß der niedrigeren  $C_H$  in der gepufferten Vorkultur auf das Pilzwachstum in der nachfolgenden Kultur konstatieren, weil nun das Wachstum in den schwächeren Aciditäten, wie oben gezeigt, günstig war, auch wenn Saccharose als C-Quelle dargeboten wurde, mithin der

<sup>1</sup> Dieser ist gleich dem Vorkulturboden S-Agar.

Tabelle 26.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	$D_{41}$	Kojisäure	Reduzierende Zucker
a-A-1	4	0,203	3,6	-	+
a-B-1	4	0,311	5,0	+	+
a-C-1	4	0,534	5,6	++	+
b-A-1	4	0,278	3,6	-	+
b-B-1	4	0,590	5,0	++	+
b-C-1	4	0,621	5,5	++	+
c-A-1	4	0,200	3,6	-	+
c-B-1	4	0,558	5,0	++	+
c-C-1	4	0,664	5,4	++	+
a-A-2	7	0,323	3,7	-	+
a-B-2	7	0,500	4,4	+	+
a-C-2	7	0,777	5,1	++	+
b-A-2	7	0,436	3,7	-	+
b-B-2	7	0,863	4,7	++	+
b-C-2	7	0,915	5,4	+++	+
c-A-2	7	0,487	3,7	-	+
c-B-2	7	0,945	4,4	++	+
c-C-2	7	1,234	5,0	+++	+
a-A-3	9	0,530	3,8	-	+
a-B-3	9	0,752	4,5	+	+
a-C-3	9	0,886	5,0	++++	+
b-A-3	9	0,551	3,8	-	+
b-B-3	9	0,819	4,7	++	+
b-C-3	9	0,833	5,2	++++	+
c-A-3	9	0,945	4,1	+	+
c-B-3	9	1,105	4,1	++	+
c-C-3	9	1,340	5,1	++++	+
a-A-4	12	0,982	4,1	+	+
a-B-4	12	1,052	4,3	Spur	+
a-C-4	12	1,444	5,2	+++	+
b-A-4	12	1,017	4,0	+++	+
b-B-4	12	1,089	5,3	++++	+
b-C-4	12	1,200	5,5	++++	+
c-A-4	12	0,940	4,0	++	+
c-B-4	12	1,536	4,3	+	+
c-C-4	12	1,565	4,5	++++	+

Pilz sich nur schwach nitratophil verhält, wäre zu erwarten, daß eine solche Reihenfolge des Wachstumsgrades noch deutlicher bei der Verwendung von Glukose vorkommen sollte. Daß das Pilzwachstum in den gepufferten Lösungen von verschiedenen  $C_H$  von den dargebotenen Zuckerarten abhängig ist, ist auch aus dem folgenden Versuch ersichtlich:

Versuch 24.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, zweimalig, 10 Tage lang. Impfung mit 1 cem B-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(a)					(b)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Grundlösung	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Glukose-										
lösung(m/2)	50	50	50	50	50	0	0	0	0	0
Saccharose-										
lösung(m/4)	0	0	0	0	0	50	50	50	50	50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>										
(m/5) . .	0	25	23	1,25	2,5	0	25	23	1,25	2,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>										
(m/5) . .	0	0	2	1,25	22,5	0	0	2	1,25	22,5
Umdestill.										
Wasser. .	25	0	0	0	0	25	0	0	0	0
Summe(cem)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
p <sub>H</sub> . . . .	4,2	4,2	5,2	6,0	6,4	4,2	4,2	5,2	6,0	6,4
NH <sub>3</sub> . . .	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126	1,126	0,126
NO <sub>3</sub> . . .	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127

(Tabelle 27.)

Da der Pilz im Verlauf der Kultur bald in den nitratophilen Zustand überging, war das Wachstum nicht wenig von denjenigen Bedingungen abhängig, welche die Resorption von NO<sub>3</sub> beherrschten. Dies war besonders in den Aciditäten etwa zwischen p<sub>H</sub> 3,3 und 4,5 der Fall, bei denen NO<sub>3</sub> leicht vom Pilz aufgenommen werden kann. Der Pilz wächst in dieser Aciditätsbreite immer besser in der Saccharosekultur als in der Glukosekultur, welche erstere die Nitratophilie günstig beeinflussen soll. In niedrigeren Aciditäten dagegen, nämlich in den Kulturen 4 und 5, wo die Resorption von NO<sub>3</sub> gewöhnlich verhältnismäßig schwach stattfindet, fiel das Wachstum in beiden Zuckerarten umgekehrt aus. Vom 7. Tage ab wurde maximales Wachstum in Kultur 4 festgestellt, deren Anfangsacidität p<sub>H</sub> 6,0 war.

Die in den bisher erwähnten Versuchen dieses Abschnittes verwendeten Pilze waren eigentlich schwach ammoniophil oder nitratophil. Keine auffällige Steigerung der C<sub>H</sub> wurde in der Glukosegrundlösung bemerkt. Selbst in diesen Kulturen mit schwach ammoniophilen Pilzen trat die günstige Wirkung des Puffers und im großen und ganzen auch diejenige der niedrigeren Anfangsaciditäten einigermaßen hervor. Daß dies bei

Tabelle 27.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	pH	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Redu- zierende Zucker
a 1-1	5	0,108	3,3					
a 2-1	5	0,081	3,4					
a 3-1	5	0,185	4,5					
a 4-1	5	0,197	5,2					
a 5-1	5	0,212	5,8					
b 1-1	5	0,111	3,4					
b 2-1	5	0,142	3,6					
b 3-1	5	0,200	4,5					
b 4-1	5	0,196	5,1					
b 5-1	5	0,194	5,8					
a 1-2	7	0,107	3,7					
a 2-2	7	0,184	3,7					
a 3-2	7	0,263	4,3					
a 4-2	7	0,336	5,1					
a 5-2	7	0,314	5,5					
b 1-2	7	0,172	3,9					
b 2-2	7	0,189	3,9					
b 3-2	7	0,323	4,5					
b 4-2	7	0,372	5,3					
b 5-2	7	0,216	5,6					
a 1-3	8	0,157	3,9	-	0,124	0,118	1,05	
a 2-3	8	0,202	3,8	-	0,124	0,114	1,08	
a 3-3	8	0,266	4,6	+	0,123	0,113	1,08	
a 4-3	8	0,428	5,2	++	0,113	0,110	1,03	
a 5-3	8	0,339	5,8	+++	0,110	0,108	1,02	
b 1-3	8	0,190	4,0	-	0,122	0,115	1,06	
b 2-3	8	0,223	4,0	Spur	0,123	0,114	1,08	
b 3-3	8	0,378	4,7	+	0,119	0,113	1,05	
b 4-3	8	0,478	5,4	+++	0,110	0,108	1,02	
b 5-3	8	0,344	5,8	++	0,109	0,106	1,02	
a 1-4	10	0,198	4,3	-	0,116	0,109	1,06	+
a 2-4	10	0,309	4,5	-	0,114	0,105	1,08	+
a 3-4	10	0,396	4,8	+	0,111	0,105	1,05	+
a 4-4	10	0,498	5,2	++	0,101	0,101	1,00	+
a 5-4	10	0,591	5,8	+++	0,095	0,099	0,96	+
b 1-4	10	0,201	4,2	-	0,117	0,111	1,05	+
b 2-4	10	0,316	4,7	Spur	0,114	0,109	1,05	+
b 3-4	10	0,426	4,7	+	0,112	0,107	1,05	+
b 4-4	10	0,426	5,4	++	0,101	0,102	0,99	+
b 5-4	10	0,415	5,8	+++	0,100	0,101	0,99	+

stark ammoniophilen Pilzen noch deutlicher der Fall ist, war schon aus dem Versuch 4 ersichtlich. Um dies noch weiterhin festzulegen, wurde der folgende Versuch mit einer noch etwas größeren Zahl von Kulturlösungsarten von verschiedener  $C_H$  angestellt.

Versuch 25.

*Aspergillus oryzae* 65. Vorkultur: S, einmalig, 7 Tage lang. a) Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension, welche besonders in einer  $1/2$ -molaren Grundlösung hergestellt war. b) Impfung mit 1 ccm A-Konidiensuspension.

Kulturlösung:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Grundlösung . . . . .	25	25	25	25	25
Glukoselösung (m/2) . . . . .	50	50	50	50	50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	0	25	23	12,5	2,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (m/5) . . . . .	0	0	2	12,5	22,5
Umdestilliertes Wasser . . . . .	25	0	0	0	0
Summe (ccm) . . . . .	100	100	100	100	100
$p_H$ . . . . .	4,2	4,2	5,3	6,0	6,4
NH <sub>3</sub> . . . . .	0,127	0,127	0,127	1,127	0,127
NO <sub>3</sub> . . . . .	0,126	0,126	0,126	0,126	0,126

Aus diesen Versuchen (Tabellen 28 und 29) geht hervor, daß die Pilze, ausgenommen eine Unregelmäßigkeit am 6. Tage bei der Kultur a, um so besser wachsen, je niedriger die Acidität ist, und daß bei Pufferzufuhr eine dementsprechende Wirkung zur Geltung kommt. Die starke Ammoniophilie kann man einerseits an der  $C_H$ -Steigerung in Kultur I und andererseits darin erkennen, daß das Verhältnis NH<sub>3</sub>/NO<sub>3</sub> im allgemeinen kleiner war als eins.

Tabelle 23.

Kultur	Kulturdauer in Tagen	Pilzgewicht in g	$p_H$	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Reduzierende Zucker	Riesenzelle
1-1	6	0,305	3,0						
2-1	6	0,488	3,0						
3-1	6	0,339	3,9						
4-1	6	0,392	5,1						
5-1	6	0,395	5,7						
1-2	10	0,372	2,5	++++	0,108	0,111	0,97	+	R
2-2	10	0,443	3,5	++++	0,104	0,108	0,96	+	„
3-2	10	0,487	4,1	+++	0,108	0,103	1,05	+	„
4-2	10	0,809	3,8	+++	0,090	0,099	0,91	+	„
5-2	10	0,984	4,4	+	0,082	0,094	0,87	+	normal
1-3	13	0,479	2,5	+++	0,109	0,113	0,97	+	R
2-3	13	0,515	3,2	+++	0,109	0,108	1,01	+	„
3-3	13	0,546	4,0	+++++	0,109	0,100	1,09	+	R wenig
4-3	13	0,861	4,0	++	0,093	0,104	0,99	+	„ „
5-3	13	1,002	4,3	+++	0,075	0,100	0,75	+	normal

Tabelle 29.

Kultur	Kultur- dauer in Tagen	Pilz- gewicht in g	pH	Kojisäure	NH <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> /NO <sub>3</sub>	Redu- zierende Zucker	Riesen- zelle
1-1	8	0,183	2,5	+	0,117	0,122	0,96	+	R
2-1	8	0,291	3,1	+++	0,115	0,119	0,97	+	„
3-1	8	0,410	3,9	+++	0,113	0,112	1,01	+	„
4-1	8	0,620	4,3	+++	0,101	0,110	0,92	+	„
5-1	8	0,738	5,1	+++	0,085	0,108	0,79	+	normal
1-2	13	0,449	2,4	+++	0,118	0,123	0,96	+	R
2-2	13	0,700	2,7	+++	0,085	0,098	0,87	+	„
3-2	13	0,777	4,1	++	0,106	0,096	1,10	+	„
4-2	13	0,887	3,8	+++	0,091	0,106	0,86	+	„
5-2	13	1,133	4,4	+++	0,075	0,106	0,71	+	R wenig

### Der Mechanismus der Resorption<sup>1</sup> von NH<sub>3</sub> und NO<sub>3</sub>.

Bei vielen Pflanzen, selbst heterotrophen, wie z. B. Schimmelpilzen, werden die N-haltigen organischen Stoffe unter Benutzung einfacher anorganischer Salze synthetisch gebildet, unter denen Ammoniumsalze und Nitrate am häufigsten als N-Quellen geboten werden<sup>2</sup>. Da sie zu den Elektrolyten gehören, muß der Mechanismus der Resorption dieser N-Quellen als eine gemeinsame Erscheinung samt der anderer Elektrolyten behandelt werden, wenn es auch natürlich möglich wäre, daß die fortwährende Benutzung dieser N-Quelle zur Synthese ihr Eindringen in die Zelle erleichtere<sup>3</sup>.

Nach der klassischen Theorie der elektrolytischen Dissoziation<sup>4</sup> dissoziiert ein Elektrolyt in einer Lösung zum Teil in Ionen, zum Teil bleibt er in Molekülform. Daher ist es eine wichtige Frage, ob aus einer Salzlösung ihr basischer sowie Säureanteil in der Molekül- oder der Ionenform von der Pflanze aufgenommen wird.

Bei der Ernährung der höheren wie niederen Pflanzen wird NH<sub>3</sub>- und NO<sub>3</sub>-N nicht im Zustande von NH<sub>3</sub>OH bzw. HNO<sub>3</sub>, sondern in ihren Salzformen dargeboten. Die bisherigen Untersuchungen verschiedener

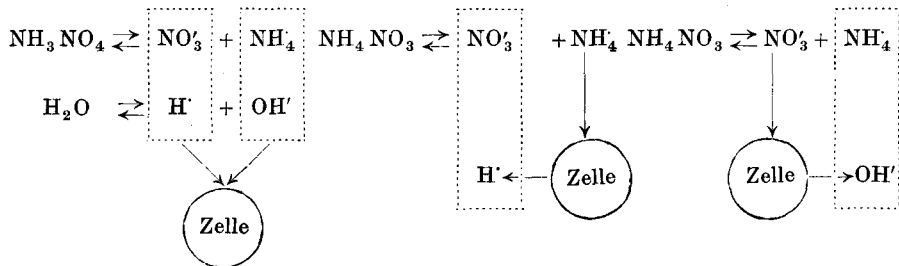
<sup>1</sup> Vergleiche meine frühere Arbeit (1929), wo der Mechanismus der Resorption der Elektrolyte ausführlich erörtert worden ist.

<sup>2</sup> Es dürfte auch möglich sein, wie einige Forscher betonen, daß NO<sub>3</sub> zunächst in NH<sub>3</sub> reduziert wird, bevor der Pilz ihn resorbiert. In Kulturlösung, die NaNO<sub>3</sub> als N-Quelle und Glukose oder Fruktose als C-Quelle enthielt, konnte NH<sub>3</sub> nach der Ernte nicht nachgewiesen werden. Daher liegt die Annahme nahe, daß NO<sub>3</sub> unreduziert als solches vom Pilz resorbiert und erst innerhalb der Zelle in reduzierte Formen übergeht.

<sup>3</sup> Für höhere Pflanzen vergleiche LUNDEGÄRDH u. MORAVEK (1924), MEVIUS u. ENGEL (1929).

<sup>4</sup> Es scheint mir nicht notwendig, im Rahmen dieser Erörterung besonders auf die Aktivitätstheorie der starken Elektrolyte einzugehen.

Forscher an verschiedenen Pflanzen lehren, daß der basische Anteil eines Salzes kaum in äquivalenter Menge resorbiert wird. Dies ist der Fall besonders bei der Darbietung des Ammoniumsalzes und Nitrats als N-Quelle und wird an einer Aciditätsveränderung leicht kenntlich, die nicht durch Säureausscheidung der Pflanzen verursacht wird<sup>1</sup>. Wir können aber eine solche Aciditätsverschiebung nicht nur durch die ungleiche Aufnahme von Kation und Anion eines Salzes erklären, sondern müssen auch eine ungleichmäßige Resorption des durch die Hydrolyse entstandenen Basenmoleküls (bzw. Kation und OH' in äquivalenter Menge) und des Säuremoleküls (bzw. Anion und H' in äquivalenter Menge<sup>2</sup>) oder unbalancierte Ionenresorption mit gleichzeitiger Exsmose von H' bzw. OH' von entsprechender Konzentration ins Auge fassen, wie die folgenden Schemata zeigen:



Z. B. werden bei der Kultur von *Aspergillus oryzae* 1. das  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Molekül (bzw.  $\text{NH}_4'$  und  $\text{OH}'$  in äquivalenter Menge) und das  $\text{NHO}_3$ -Molekül (bzw.  $\text{NO}'_3$  und  $\text{H}'$  in äquivalenter Menge) unbalanciert aus einer  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Lösung vom Pilze aufgenommen, oder 2.  $\text{NH}_4$  und  $\text{NO}'_3$  ungleichmäßig resorbiert, während  $\text{OH}'$  bzw.  $\text{H}'$  aus den Zellen austreten. Wir können die Ergebnisse der Resorption nach diesen beiden Schemata als fast gleich auffassen. Wenn man nun von der Abhängigkeit der  $\text{NH}_3$ - bzw.  $\text{NO}_3$ -Resorption vom  $\text{NH}_3$ - bzw.  $\text{NO}_3$ -Verbrauch innerhalb der Zelle absieht, so würden zwei Erklärungen für die ungleichmäßige Resorption des basischen und Säureanteils dieses Salzes möglich sein; erstens Annahme des Vorhandenseins von Plasmaampholyten und zweitens auf Grund des Dissoziationszustandes des eindringenden Salzes.

ROBBINS und ROBBINS u. SCOTT (1925) haben an den Geweben von Kartoffelknollen, *Rhizopus nigricans* und *Giberella saubinetti*, und SCOTT (1926) an *Fusarium lycopersici* bestätigt gefunden, daß pflanzliche Zellen die  $C_H$  von verdünnten Pufferlösungen je nach den Anfangsaciditäten bald erniedrigen, bald erhöhen. Diese Aciditätsverschiebungen von entgegengesetzten Richtungen treffen sich beinahe in einem  $p_H$ . Gestützt

<sup>1</sup> PRIANICHNIKOV (1924), LOO (1927), MEVIUS (1928), SAKAMURA (1924), TAMIYA (1927), BACH (1924, 1925) u. a.

<sup>2</sup> Vergleiche TAYLOR (1928, S. 218).

auf die Untersuchungen von MICHAELIS an amphoteren Kolloiden haben diese Autoren die Erscheinung derart erklärt, daß es sich um einen isoelektrischen Punkt des Plasmaampholyten handelt, welcher der genannten Grenzacidität entspreche. Auch in der Kultur von anderen Pilzen wurde eine derartige zentripetale Aciditätsverschiebung und das geringste Wachstum bei einem angenommenen isoelektrischen Punkt oder isometabolischen Punkt nach SIDERIS (1925) nachgewiesen<sup>1</sup>.

Andererseits muß beachtet werden, daß die Resorption des Elektrolyten von ihrem Dissoziationszustande abhängig ist. Da ein Salz kurz gesagt im Zustande der durch die Hydrolyse entstandenen Säure und Base von der Pflanze aufgenommen wird, wie erklärt wurde, so ist es wichtig zu wissen, ob und inwieweit der Dissoziationszustand dieser Säure und Base auf ihre Resorption einwirkt.

Wenn man die Lösung einer schwachen Säure oder Base mit einer stärkeren Säure bzw. Base vermischt, so wird die Dissoziation der ersteren mehr oder weniger stark herabgedrückt und bleiben viele Moleküle in undissoziiertem Zustande. Für die Menge der undissoziierten Moleküle ist die Reaktion der Lösung bestimmend, und nimmt bei einer Base mit steigender Acidität ab. Das umgekehrte Verhältnis gilt für die Säure. Aus zahlreichen Versuchen verschiedener Forscher<sup>2</sup> geht hervor, daß die pflanzlichen sowie tierischen Zellen für die Säure und Base um so leichter permeabel sind, je schwächer dissoziierbar sie sind, indem nämlich ihre undissoziierten Moleküle leicht in die Zelle eindringen können. Unter derartigen anorganischen Säuren und Basen kann man  $H_2CO_3$  bzw.  $NH_4OH$  als auffällige Beispiele anführen.

An höheren Pflanzen wurde von vielen Autoren konstatiert, daß bei niedriger Acidität die Aufnahme von  $NH_3$  gefördert und diejenige von  $NO_3$  gehemmt wird und in höherer Acidität ein umgekehrtes Verhältnis herrscht<sup>3</sup>.

Auch in der Kultur von *Aspergillus* wurden dieselben Resorptionsverhältnisse von TAMIYA nachgewiesen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde eine solche Tendenz in gewissem Grade bemerkt, obwohl die resorbierten Mengen von  $NO_3$  in verschiedenen  $C_H$  nicht so einfach in eine solche Reihe gestellt werden können, weil in den niederen Aciditäten die resorbierende Myceloberfläche sich immer stärker vergrößert als in den höheren und die bessere  $NO_3$ -Aufnahme in den höheren Aciditäten dadurch verdeckt werden dürfte.

<sup>1</sup> BACH (1925), TOCHINAI (1926), TAMIYA (1927).

<sup>2</sup> WARBURG, OVERTON, NEWTON HARVEY, LILLIE, JACOBS, OSTERHOUT, IRWINN u. a.

<sup>3</sup> PRIANISCHNIKOW (1929), THERON (1923), HOAGLAND und DAVIS (1923 a, b), NIKLEWSKI, KRAUS u. LEMANCZYK (1928), MEVIUS (1929) und LOO (noch nicht publiziert).

Es ist schwierig zu entscheiden, ob die geförderte Aufnahme von  $\text{NH}_3$  in den niedrigeren Aciditäten bei der Kultur von *Aspergillus oryzae* tatsächlich mit der vermehrten  $\text{NH}_3$ -Menge in der undissoziierten Molekülform oder mit der Säureeigenschaft des Plasmaampholyten verknüpft ist. Mir scheint aber die erstgenannte Möglichkeit viel wahrscheinlicher und ich möchte, wie MEVIUS (1929, S. 78) bei höheren Pflanzen annehmen, daß der  $\text{NH}_4$ -Stickstoff hauptsächlich in Form von  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Molekülen vom Pilze aufgenommen wird. BRENNER (1914, S. 59—60) ist der Meinung, daß Ammoniak in Ionen- sowie Molekülform in die Zelle von *Aspergillus niger* eindringe.

Ich möchte die Annahme einer amphoteren Eigenschaft des Protoplasmas und dementsprechend eines isoelektrischen Punktes nicht von der Hand weisen. Ich habe schon früher (1925) mit Loo das Vorhandensein einiger isoelektrischer Punkte der Plasmaampholyte bei *Spirogyra* angenommen<sup>1</sup>. Loo hat in jüngster Zeit in unserem Laboratorium mit großer Vorsicht umfangreiche Untersuchungen über die Beziehung zwischen der Acidität und der Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  bei höheren Pflanzen ausgeführt und festgestellt, daß die Resorption in mehreren Punkten einer  $\text{p}_\text{H}$ -Reihe und nicht nur einmal in einem bestimmten Punkte sinkt<sup>2</sup>. Dies macht auch das Vorhandensein von mehreren isoelektrischen Punkten der Plasmaampholyte noch wahrscheinlicher. Auch für *Aspergillus niger* habe ich in einer früheren Arbeit (1924, S. 98) festgestellt, daß im Verlaufe der Kultur eine plötzliche Depression der Wachstumskurve bei etwa  $\text{p}_\text{H}$  5,0 stattfindet. Ich habe damals angenommen, daß vielleicht etwa  $\text{p}_\text{H}$  5,0, wo das Wachstum gehemmt wurde, mit einem isoelektrischen Punkte eines Plasmaampholyten in irgendeiner Beziehung stehen dürfte.

Daß die Resorption von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  auf der amphoteren Eigenschaft des Protoplasmas beruht, kann man nicht rundweg zurückweisen. Da aber die Reaktion der Kulturlösung, auch wenn sie ziemlich stark gepuffert wird, sich während der Kultur beträchtlich verändert, so ist es schwer, auf Grund einer solchen das Pilzwachstum bei konstanter Acidität zu bestimmen. Die mittlere Depression der Wachstumskurve in einer  $\text{p}_\text{H}$ -Reihe kommt nicht immer zum Ausdruck. Aus diesem Grunde wäre es noch verfrüht, die etwa stattfindende zentripetale Aciditätsverschiebung, nämlich das Resorptionsverhältnis von  $\text{NH}_3$  und  $\text{NO}_3$  ganz der chemischen Affinität des amphoteren Protoplasmas zuzuschreiben. Weiter wäre es nicht berechtigt, die Wachstumshemmung in extrem

<sup>1</sup> Trotz dem Einwand von HEILBRUNN (1929) gegen unsere Annahme habe ich aufs neue durch eine modifizierte Versuchsmethode gefunden, daß unsere frühere Annahme immer noch möglich ist. Diese Untersuchungen werden a. a. O. veröffentlicht werden.

<sup>2</sup> Noch nicht veröffentlicht.

hohen Aciditäten kurzweg so zu erklären, daß  $\text{NH}_3$  minimal resorbiert und dadurch N-Mangel herbeigeführt werde. Man muß beim Pilzwachstum auch die direkte Wirkung der  $\text{C}_H$  und die von  $\text{C}_H$  abhängige indirekte Einwirkung anderer Ionen und Moleküle auf die morphologischen und kolloidchemischen Eigenschaften des Protoplasmas im Auge behalten, von denen die Resorption, d. h. die Permeabilität, wohl selbst möglicherweise abhängt.

### Zusammenfassung.

1. In einer  $\text{NH}_3/\text{NO}_3$ -haltigen Kulturlösung resorbiert *Aspergillus oryzae* entweder vorzugsweise  $\text{NH}_3$  (Ammoniophilie) oder  $\text{NO}_3$  (Nitratophilie). Der Grad der Ammoniophilie bzw. Nitratophilie kann durch das Aufnahmeverhältnis  $\text{NH}_3/\text{NO}_3$  bestimmt ausgedrückt werden. Der ammoniophile Pilz nimmt mehr oder weniger auch Nitrat, der nitratophile auch Ammoniak auf. Zwischen den beiden Extremen kommen Ammoniophilie und Nitratophilie kombiniert in verschiedenen Verhältnissen vor.

2. Bei starker Ammoniophilie wächst  $\text{C}_H$  der Kulturlösung sehr stark an, mithin wurde das Pilzwachstum gehemmt. Bei schwacher Ammoniophilie oder Nitratophilie ist es sehr üppig, weil die Acidität nur schwach oder gar nicht gesteigert und überdies die resorbierte N-Menge als Ganzes vermehrt wird.

3. Die Ammonio- bzw. Nitratophilie ist abhängig von der Stammeigenschaft des Pilzes und den Bedingungen der Vorkultur, ja bisweilen auch von der Methode der Impfung. Es ist aber noch nicht gelungen, solche Faktoren der Vorkultur in aller Strenge zu erfassen, welche diesbezügliche Eigenschaften des Pilzes immer zur Folge haben.

4. Das Auftreten von Ammonio- bzw. Nitratophilie ist auch nicht wenig durch die als C-Quelle benutzte Zuckersorte bedingt. Fruktose ruft Nitratophilie am leichtesten hervor, weniger Saccharose (d. h. infolge der Inversionswirkung des Pilzes praktisch Invertzucker) und am schwächsten Glukose. Auch der Wachstumsgrad ordnet sich nach dieser Reihe.

5. In einer stark ammoniophilen Kultur kann man durch Zusatz von Phosphatgemischen die Vermehrung der Acidität hemmen und dadurch das Pilzwachstum begünstigen, so daß also ein Pufferungseffekt hervortritt. Im Gegensatz dazu ist der Pufferzusatz überflüssig und befördert das Wachstum nicht merklich, wenn die Kultur nur schwach ammoniophil oder nitratophil ist.

6. Wenn auch ein Zusammenhang zwischen der Resorption von  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NO}_3$  und der amphoteren Eigenschaft des Pilzplasmas nicht unwahrscheinlich ist, so läßt sich doch mit den heutigen Methoden dieser Zusammenhang kaum einwandfrei dartun.

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

### Literaturverzeichnis.

- Bach, D.:** Variations de la concentration des ions H au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux d'acids forts par l'*Aspergillus repens* DE BARY. C. r. Acad. Sci. Paris **179** (1924). — Contribution à l'étude de la nutrition azoté de l'*Aspergillus repens* DE BARY **1925**. — **Brenner, W.:** Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. Zbl. Bakter., Abt. II, **40** (1914). — **Heilbrunn, L. V.:** The colloid chemistry of protoplasm. Berlin 1929. — **Hoagland, D. R. a. Davis, A. R.:** The composition of the cell sap of the plant in relation to the absorption of ions. J. gen. Physiol. **5** (1923 a). — Further experiments on the absorption of ions by plants including absorptions on the effect of light. Ebenda **6** (1923 b). — **Irvine, J. C.:** Some constiutional problems of carbohydrate chemistry. J. chem. Soc. Lond. **123** (1923). — **Klaeser, M.:** Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten und Ammoniak durch Bakterien. Zbl. Bakter., Abt. II, **41** (1914). — **Klein, G., Eigner, A. u. Müller, H.:** Nitratassimilation bei Schimmelpilzen. Hoppe-Seylers Z. **159** (1926). — **Kostytschew, S. u. Tswetkowa, E.:** Über die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. Ebenda **111** (1920). — **Laurent, E.:** Recherches sur la valeur comparée des nitrates et sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelques autres plantes. Ann. Inst. Pasteur **3** (1889). — Expériences sur la réduction des nitrates par les végétaux. Ebenda **4** (1890). — **Loo, T. L.:** On the mutual effects between the plant growth and the change of reaction of the nutrient solution with ammonia salts as the source of nitrogen. Jap. J. of Bot. **3** (1927). — **Lundegårdh, H. u. Moravek, Vl.:** Untersuchungen über die Nährsalzaufnahme der Pflanzen I. Die gegenseitige Beeinflussung der Ionen. Biochem. Z. **151** (1924). — **Mevius, W.:** Die Wirkung der Ammoniumsalze in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Planta (Berl.) **6** (1928). — **Mevius, W. u. Engel, H.:** Die Wirkung der Ammoniumsalze in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. II. Ebenda **9** (1929). — **Nägeli, C.:** Untersuchungen über niedere Pilze 1881. — **Nikitinsky, J.:** Über die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. Jb. Bot. **40** (1904). — **Niklewski, B., Krause, A. u. Lemanczyk, K.:** Zur Kenntnis der Aufnahmetechnik der Mineralbestandteile durch die Wurzeln der Pflanze. Ebenda **69** (1928). — **Prianichnikov, D. N.:** Sur l'assimilation de l'ammoniaque par les plantes supérieures. Rev. gén. Bot. **36** (1924). — Zur Frage nach der Ammoniakernährung von höheren Pflanzen. Biochem. Z. **207** (1929). — **Raciborski, M.:** Über die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze. Anz. Akad. Wiss. Krakau, Math.-naturwiss. Kl. **1906**. — **Ritter, G. E.:** Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. Ber. dtsh. bot. Ges. **27** (1909). — Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. Ebenda **29** (1911). — Die giftige und formative Wirkung der Säuren auf die Mucoraceen und ihre Beziehung zur Mucorhefebildung. Jb. wiss. Bot. **52** (1912). — Ammonnitrat und freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. Biochem. Z. **60** (1914). — **Ruhland, W. u. Ullrich, H.:** Einfluß von Nitraten und von Salpetersäure auf die Atmung grüner Blätter (v. M.). Planta (Berl.) **7** (1929). — **Sakamura, T.:** Über die Kultur von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermögen der Nährlösung. J. Coll. Agricult. Hokkaido Imp. Univ. **14** (1924). — Weitere Studien über die

moderierende Rolle der organischen Salze und des Phosphats bei der Kultur von *Aspergillus niger*. Jap. J. of Bot. **3** (1927). — Über die Resorption der Salze durch die pflanzlichen Zellen. Ber. Jap. Assoc. Advancem. Sci. **4** (1929). — **Sakamura, T. u. Loo, T. L.:** Über die Beeinflussung des Pflanzenplasmas durch die H-Ionen in verschiedenen Konzentrationen. Beiträge zur Annahme des isoelektrischen Punktes des Protoplasmas. Bot. Mag. Tokyo **39** (1925). — **Scott, I. T.:** Some protein analogies of the mycelium of *Fusarium lycopersici*. Res. Bull. Agricult. Exper. Stat. Univ. Missouri **1926**, Nr 92. — **Sideris, C. P.:** Studies on the behavior of *Fusarium cromocephoron* in carbohydrates, glucosides, proteins and various decoctions, with a discussion on the „isometabolic point“ of substances. Phytopathology **15** (1926). — **Takahashi, T. a. Yamamoto, T.:** On the physiologic alldifference of the varieties of *Aspergillus oryzae* employed in the three main industries in Japan, namely Saké-, Shoyu-, and Tamari-manufacture. J. Coll. Agricult. Tokyo Imp. Univ. **5** (1913). — **Tamiya, H.:** Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. I. Acta phytochim. (Tokyo) **3** (1927). — Studien über die Stoffwechselphysiologie von *Aspergillus oryzae*. II. Ebenda **4** (1928). — **Taylor, N. W.:** Acid penetration into living tissues. J. gen. Physiol. **11** (1928). — **Theron, J. J.:** The influence of reaction on the inter-relations between the plant and its culture solution. Univ. California Publ. Agricult. Sci. **4** (1923). — **Tochinai, Y.:** Comparative studies on the physiology of *Fusarium Lini* and *Colletotrichum Lini*. J. Coll. Agricult. Hokkaido Imp. Univ. **14** (1926).

---