

Diss ETH

Prom. Nr. 3379 B

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE  
WIRKUNGSWEISE DER FUSARINSÄURE

VON DER

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG

DER WÜRDE EINES DOKTORS  
DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

HANS BÄR

DIPL. ING. AGR. ETH  
VON RIFFERSWIL (ZÜRICH)

Referent: Herr Prof. Dr. H. KERN

Korreferent: Herr Prof. Dr. E. GÄUMANN

Ser. Kat.

1963

Referent: Prof. Dr. H. KERN

Korreferent: Prof. Dr. E. GÄUMANN

Veröffentlicht in „Phytopathologische Zeitschrift“, Band 48, Heft 2 (1963), Seite 149—177.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Aus dem Institut für spezielle Botanik  
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich

Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

## Untersuchungen über die Wirkungsweise der Fusarinsäure

Von

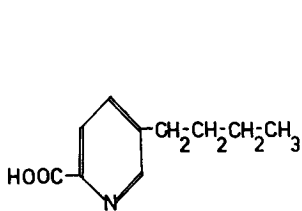
H. BÄR

Mit 15 Abbildungen

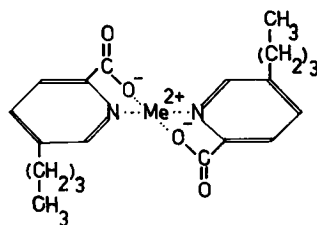
Inhalt: I. Einleitung. — II. Methoden. — III. Einfluß von Ferrioxamin B auf die Wirkung der Fusarinsäure bei verschiedenen Testobjekten. — IV. Einfluß von Fusarinsäure und Ferrioxamin B auf das Wachstum von *Candida vulgaris*. — V. Untersuchungen über eisenunabhängige Wirkungen der Fusarinsäure. — VI. Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

### I. EINLEITUNG

Fusarinsäure ist eines der toxischen Stoffwechselprodukte von *Fusarium lycopersici* Sacc., dem Erreger einer Welkekrankheit der Tomaten (GÄUMANN 1957). Nach TAMARI und KAJI (1952, 1953) hemmt Fusarinsäure die Bildung von Eisenporphyrinenzymen und die Aktivität der Katalase. DEUEL (1954) schreibt der Fusarinsäure aus theoretischen Überlegungen durch ihr Chelierungs-



Fusarinsäure



Metallchelate der Fusarinsäure

vermögen einen Einfluß auf den Spurenelementhaushalt zu. REUSSER und NAEF-ROTH (1956) zeigten, daß die Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. durch Fusarinsäure gehemmt wird. Sie vermuteten, daß diese Wirkung auf einem Antagonismus zwischen Fusarinsäure und metallhaltigen Enzymen beruhe. Die Aktivität der Cytochromoxydase (PAQUIN und WAYGOOD 1957), der Katalase und der Ascorbinsäureoxydase (BOSSI 1959) wird tatsächlich durch Fusarinsäure gehemmt; die erforderlichen Konzentrationen sind jedoch so groß,

daß nicht an einen Zusammenhang mit Schädigungen in vivo gedacht werden kann. Einzig die Hemmung der Polyphenoloxylase, eines kupferhaltigen Enzyms, konnte durch kleinere Dosen von Fusarinsäure erzielt werden (Bossi 1959). BRAUN (1960) zeigte, daß die hemmende Wirkung der Fusarinsäure auf *Candida vulgaris* auct. durch verschiedene Metallionen aufgehoben werden kann. Diese Aufhebung der Fusarinsäurewirkung konnte bei den meisten Metallen durch einen Chelierungseffekt in der Nährlösung erklärt werden, während das Eisen durch seine hohe Wirksamkeit eine besondere Stellung einnahm. Von all den geprüften Eisenverbindungen hatte Ferrioxamin B die beste Wirkung (Tab. 1).

*Tabelle 1*  
Antagonismus  
zwischen Fusarinsäure und verschiedenen metallhaltigen Verbindungen.  
Testorganismus *Candida vulgaris* (nach BRAUN 1960)\*)

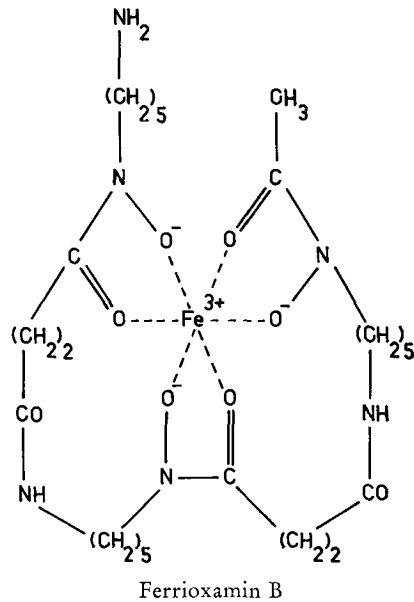
Antagonist	Enthemmungsindex
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	4,0
NiSO <sub>4</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	7,8
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	7,3
MnSO <sub>4</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	1,2
CuCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	2,2
MgSO <sub>4</sub>	0
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	210
FeCl <sub>3</sub>	90
Fusarinsäure-Eisenchelate	130
Ferrioxamin B	970

\*) Der Enthemmungsindex gibt an, von wieviel Mol Fusarinsäure die Hemmwirkung durch ein Grammatom eines Metalls aufgehoben wird.

Ferrioxamin B gehört zu den Sideraminen, einer Guppe von Wuchsstoffen, welche mit Ferriionen sehr spezifische Trihydroxamatkomplexe bilden (ZÄHNER und Mitarb. 1962). Solche Stoffe werden von vielen Organismen gebildet. Bei allen genau untersuchten Vertretern der Familien der *Streptomycetaceae* und *Actinomycetaceae* wurde die Bildung von verschiedenen Ferrioxaminen nachgewiesen (ZÄHNER und Mitarb. 1962). Die Sideramine Ferrichrom (NEILANDS 1952), Coprogen (HESEL TINE und Mitarb. 1952, 1953), Ferrichrysin, Ferricrocin, Ferrirubin und Ferrirhodin (ZÄHNER und Mitarb. 1963) sind Stoffe, die von Pilzen gebildet werden. Sideraminaktivität konnte auch bei Bakterien (BURNHAM und NEILANDS 1961, HESSEL TINE und Mitarb. 1953, LOCHHEAD und Mitarbeiter 1952, ZÄHNER und Mitarb. 1960), bei Algen (ZÄHNER und Mitarb. 1960), bei Phanerogamen (PAGE 1952, LYR 1953, ZÄHNER und Mitarb. 1960) und auch in Leber (LOCHHEAD und BURTON 1956, DEMA IN und HENDLIN 1959, ZÄHNER und Mitarb. 1960) gezeigt werden. Sideraminheterotrophie wurde bei *Pilobolus Kleinii* van Tieghem (HESEL TINE und Mitarb. 1953), *Arthrobacter*

*terregens* Lochhead und Burton (LOCHHEAD und Mitarb. 1952) und bei *Microbacterium lacticum* Orla Jensen (HENDLIN und DEMAÏN 1959) nachgewiesen. Bei *Microbacterium lacticum* genügen Dosen von 100  $\gamma$  Ferrioxamin B je Liter Nährlösung, um das Wachstum zu ermöglichen; größere Dosen geben keine weitere Steigerung (ZÄHNER und Mitarb. 1962). Den Sideraminen wurde zuerst eine Funktion als Eisentransportfaktoren zugeschrieben (HENDLIN und DEMAÏN 1959, DEMAÏN und HENDLIN 1959). Neuere Untersuchungen über die Wirkungsweise der Sideramine lassen vermuten, daß diese als spezifische Eisendonatoren für den Einbau des Eisens in eisenfreie Porphyrine wirken (BURNHAM und NEILANDS 1961, BURNHAM 1962, ZÄHNER und Mitarb. 1962).

BRAUN (1960) zeigte, daß die Hemmung von Hefen durch Fusarinsäure mit Ferrioxamin B aufgehoben werden kann, diejenige von Bakterien aber nicht. Anschließend an die Ergebnisse von BRAUN schien es notwendig, den Einfluß von Ferrioxamin B auf die schädigende Wirkung der Fusarinsäure näher zu untersuchen. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, zu zeigen, bei welchen Testobjekten die Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B aufgehoben wird, welcher Art diese Aufhebung ist und welche Bedeutung dem Eisen bei der Wirkung der Fusarinsäure zukommt.



## II. METHODEN

### Quantitativer Welketest

Im quantitativen Welketest wird geprüft, wie stark Tomatensprosse durch bestimmte Toxinmengen geschädigt werden. Als Maßstab für die Schädigung dient eine Skala von null bis vier. Null bedeutet keine Schädigung, während vier aussagt, daß das bonitierte Gewebe ganz nekrotisch ist. Die Methode ist bei LINSKENS (1955) beschrieben. Um eine allfällige Herabsetzung der Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B festzustellen, wurde bei diesen Versuchen immer eine Dosis Fusarinsäure von 300 mg je Kilogramm Pflanze gegeben. Die Konzentration war  $2,5 \times 10^{-3}$  molar. Von den geprüften Substanzen und ihren Gemischen wurden immer gleiche Lösungsmengen aufgenommen.

### Permeabilitätstest

Die Veränderung der Permeabilität von pflanzlichen Protoplasten wurde nach der von BACHMANN (1956) beschriebenen Methode bestimmt. Schnitte der

roten Epidermis von *Rhoeo discolor* (L'Hér.) Hance wurden vorerst in die Testlösungen gelegt, dann plasmolysiert und die mittleren Deplasmolysezeiten von mindestens 100 Zellen mit denjenigen solcher Schnitte verglichen, die vor der Plasmolyse in Leitungswasser lagen. Der Quotient aus den Deplasmolysezeiten dieser Kontrolle und den Deplasmolysezeiten der geschädigten Zellen wird als Resultat angegeben.

#### Hemmung der Polyphenoloxydase

Der Verlauf der Enzymreaktion wurde im Spektrophotometer verfolgt. Auf Grund der Absorptionskurven von Fusarinsäure (BRAUN 1960), von Ferrioxamin B (BICKEL und Mitarb. 1960), des Enzympräparates, der Substrate para-Kresol und Brenzkatechin und der Reaktionsprodukte wurde die Wellenlänge 320 m $\mu$  für die Messungen ausgewählt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Reaktionsprodukte sehr stark, das Enzympräparat und Ferrioxamin B schwach, Fusarinsäure und die Substrate nicht. In der Kontrolle wurden Puffer und Enzympräparat, je nach Versuchsanordnung auch Ferrioxamin B, zugegeben. Die Testlösungen setzten sich folgendermaßen zusammen: ein Teil Zitronensäurephosphatpuffer pH 7, ein Teil Substrat, ein Teil Enzympräparat, ein Teil Fusarinsäurelösung oder destilliertes Wasser und ein Teil Ferrioxamin B-Lösung oder destilliertes Wasser. Die Endkonzentration des Substrates betrug 1 ‰. Zur Herstellung des Enzympräparates wurden geschälte Kartoffeln im Turmix mit der dreifachen Menge kalten Acetons zerschlagen, abfiltriert und gut mit kaltem Aceton nachgespült. Das zurückgebliebene, vom restlichen Aceton befreite Pulver wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und vor Versuchsbeginn ein Gramm in 10 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt, abfiltriert und das Filtrat in dieser Konzentration verwendet.

#### Sporenceimungstest

Im Sporenceimungstest (z. B. KOBEL 1951) wird bei definierten Versuchsbedingungen die Verdünnung einer Toxinlösung bestimmt, die eine 50 %ige Hemmung der Sporenceimung ergibt. Die Anzahl Einheiten gibt an, wie oft die Toxinlösung dazu verdünnt werden kann. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Sporen von *Alternaria tenuis* Nees Stamm ETH 5878 verwendet. Diese keimen in Wasser sehr gut; eine spezielle Nährlösung für den Test war deshalb überflüssig. Die Sporen wurden von Malzagarkulturen abgeschwemmt, durch Watte abfiltriert und dann die vorgeschriebene Dichte eingestellt.

#### Antagonismustest

Um zu prüfen, ob die hemmende Wirkung der Fusarinsäure auf Bakterien und Hefen durch Ferrioxamin B aufgehoben wird, wurde die Methode der gekreuzten Filterpapierstreifen (BONIFAS 1952, JUILLARD 1957, BICKEL und Mitarbeiter 1960) auf Testplatten mit den entsprechenden Keimen angewandt. Die Fusarinsäurekonzentrationen wurden in Vorversuchen mit 6 mm Filterpapierschleibchen bestimmt, welche wie die Streifen aus Whatman Nr. 1 Chromatographiepapier hergestellt wurden.

### Hemmung der Atmung

Die Gaswechsellmessung erfolgte nach dem manometrischen Prinzip (WARBURG 1926, DIXON 1943, UMBREIT und Mitarb. 1949). Als Versuchsobjekt diente Bäckerpreßhefe. Die Versuchsbedingungen wurden wie bei REUSSER und NAEF-ROTH (1956) gewählt.

### Wachstumsversuche mit *Candida vulgaris*

Durch Bestimmen der optischen Dichte bei  $620\text{ m}\mu$  wurde das relative Wachstum von *Candida vulgaris* bestimmt. Als Vergleich diente unbeimpfte Nährlösung.

Nährlösungen: Nährlösung Richard 5 : Glukose 5 ‰, Ammoniumnitrat 1 ‰, Kaliumdihydrogenphosphat 0,5 ‰, Magnesiumsulfat  $\times 7\text{ H}_2\text{O}$  0,25 ‰, Ferrichlorid 20 mg/l; Malzwasser: Malz 1/4 ‰, Leitungswasser. In den Kulturen bei bestimmten pH-Werten wurde das Leitungswasser durch Ionenaustauschwasser ersetzt.

Einstellen der Wasserstoffionenkonzentration in 1/4 ‰igem Malzwasser: Nährlösung und Phosphatpuffer nach SÖRENSEN in zehnfacher Konzentration wurden einzeln sterilisiert, nachher wurde in jeden Kolben mit 120 ml Nährlösung 1 ml Puffer gegeben. Auf diese Weise konnten pH-Werte von 5,2 bis 6,8 eingestellt werden. Diese konnten während der Kulturdauer nicht konstant gehalten werden.

Impfmateriäl: Das Impfmateriäl wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben 16 Stunden bei  $33^\circ\text{C}$  auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert, abzentrifugiert, zweimal in isotonischer Kochsalzlösung gewaschen, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und so verdünnt, daß bei einer Wellenlänge von  $620\text{ m}\mu$  die Extinktion 0,4 betrug.

Impfmenge: 1 ml Zellsuspension je 120 ml Nährlösung.

Testsubstanzen: Die Testsubstanzen wurden einzeln sterilisiert und die Konzentration so gewählt, daß ein Milliliter je Kolben zugegeben werden konnte.

Kulturbedingungen: 500 ml Erlenmeyerkolben mit 120 ml Nährlösung bei  $33^\circ\text{C}$  rotierend geschüttelt. Je Verfahren fünf Wiederholungen.

Probeentnahme: Aus jedem Kolben wurden etwa 6 ml Kultur entnommen und der Rest weiter inkubiert. Probeentnahme aus 50 Kolben und die Messung dieser Proben dauern je 20 Minuten.

Messung: Bestimmung der Extinktion der Kulturen bei  $620\text{ m}\mu$ .

### Papierchromatographie

Lösungsgemische von Fusarinsäure einerseits und Phenolen und Ascorbinsäure andererseits in Ionenaustauschwasser, Malzwasser und Kulturfiltrat wurden papierchromatographisch untersucht; Phenole und Fusarinsäure wurden aus

Malzwasser und Kulturfiltrat bei pH 3 dreimal mit der halben Menge Essigester extrahiert und der Extrakt zur Papierchromatographie in Aceton gelöst. Fusarinsäure und Ascorbinsäurelösungen in Malzwasser und Kulturfiltrat wurden zum Auftragen bei 40 °C eingengt. Die Konzentrationen in den Lösungen in Ionenaustauschwasser konnten so gewählt werden, daß ein direktes Auftragen möglich war. Zum Chromatographieren wurde Whatmann Chromatographiepapier Nr. 1, als Laufmittel sekundäres Butanol-Ameisensäure-Wasser (75 : 15 : 10) verwendet; die Trennung der Substanzen erfolgte absteigend. Angaben über Papierchromatographie der Fusarinsäure finden sich bei BRAUN (1960), über Phenole und Ascorbinsäure bei LINSKENS (1959). Für den Nachweis der Substanzen wurden neben der direkten Kontrolle im sichtbaren Licht und unter der UV-Lampe die folgenden Reagentien verwendet:

**Bromkresolgrün:** 0,04 % Bromkresolgrün werden in Alkohol 95 % gelöst, in der Lösung mit verdünnter Natronlauge eine blaugrüne Färbung eingestellt.

**Diazotiertes para-Nitroanilin:** Es wird ein Teil gesättigter para-Nitroanilinlösung in 1/3 n Salzsäure, ein Teil Natriumnitrit 1 % und ein Teil Harnstofflösung 5 % gemischt, nach fünf Minuten sieben Teile Wasser zugegeben, die Chromatogramme mit diesem Gemisch und anschließend mit Sodalösung 10 % besprüht.

**Silbernitrat:** Ein Teil Silbernitrat 0,2 n und ein Teil Natronlauge 10 % werden gemischt und tropfenweise konzentriertes Ammoniumhydroxyd zugegeben bis sich das ausgefällte Silberoxyd gerade löst. Die Chromatogramme werden nach dem Besprühen auf 100 °C erhitzt.

### III. EINFLUSS VON FERRIOXAMIN B AUF DIE WIRKUNG DER FUSARINSAURE BEI VERSCHIEDENEN TESTOBJEKTEN

#### A. Schädigung der Sprosse von Tomaten

Sprosse von Tomaten zeigen nach Aufnahme von Fusarinsäurelösung Schädigungen. Die Stengel werden aufgeweicht und eingeschnürt und an den Blättern zeigen sich Nekrosen. Die Ausprägung dieser Symptome ist vom pH-Wert der verabreichten Toxinlösung abhängig. Ist dieser größer als sechs, so werden nur die Blätter angegriffen, ist er kleiner als sechs, werden Stengel und Blätter geschädigt (GÄUMANN und Mitarb. 1952, GÄUMANN 1957).

Als erstes war zu prüfen, ob bei gleichzeitiger Aufnahme von Ferrioxamin B und Fusarinsäure die Wirkung der letzteren aufgehoben werden kann. Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, daß nur bei pH 6 mit einer hohen Konzentration an Ferrioxamin B eine geringe Herabsetzung der Fusarinsäurewirkung nachzuweisen ist. Daraufhin wurde untersucht, ob eine vorzeitige Aufnahme von Ferrioxamin B einen Einfluß auf den Schädigungsgrad hat. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Fusarinsäurewirkung sowohl bei vorangehender Zugabe von Ferrioxamin B als auch bei vorangehender Zugabe von Wasser vermindert wird. Zugleich werden die Aufnahmezeiten für Fusarin-



Tabelle 2

Einfluß von Ferrioxamin B  
auf die Welkewirkung der Fusarinsäure bei gleichzeitiger Gabe der beiden Substanzen

Fusarin- säure molar	Ferri- oxamin B molar	pH 6 Auf- nahmezeit Stunden	Welkeintensität		pH 4,3 Auf- nahmezeit Stunden	Welkeintensität	
			Blätter	Stengel		Blätter	Stengel
0	$5 \times 10^{-4}$	9,2	0	0	3,2	0	0
$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	13,3	0,9	0,2	5,2	2,9	3,4
$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-5}$	9,2	1,8	0,1	2,4	2,7	3,6
$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-6}$	8,3	1,3	0	3,2	2,7	3
$2,5 \times 10^{-3}$	0	7,5	1,5	0	2,8	2,7	3,3

Tabelle 3

Einfluß von Ferrioxamin B  
auf die Welkewirkung der Fusarinsäure bei vorangehender Gabe von Ferrioxamin B

Erste Lösung	Auf- nahmezeit Stunden	Zweite Lösung	Auf- nahmezeit Stunden	Ferri- oxamin B molar	Welkeintensität	
					Blätter	Stengel
pH 6						
Fusarinsäure	7,5	Wasser	—	0	1,5	0
Wasser	1	Fusarinsäure	7,3	0	0,9	0
Wasser	2	Fusarinsäure	9,7	0	0,8	0
Wasser	4	Fusarinsäure	10	0	0,1	0
Wasser	8	Fusarinsäure	10,5	0	0	0
Ferrioxamin B	7,7	Fusarinsäure	12,9	$5 \times 10^{-6}$	0,3	0
Ferrioxamin B	9	Fusarinsäure	10,9	$5 \times 10^{-5}$	0,2	0
Ferrioxamin B	8,4	Fusarinsäure	9,6	$5 \times 10^{-4}$	0,3	0
pH 4,3						
Fusarinsäure	2,8	Wasser	—	0	2,7	2,3
Wasser	1	Fusarinsäure	2,4	0	2,1	3,2
Wasser	2	Fusarinsäure	2,8	0	2,1	3
Wasser	4	Fusarinsäure	5,4	0	1,6	2,6
Wasser	8	Fusarinsäure	4,2	0	1,4	2,4
Ferrioxamin B	4,6	Fusarinsäure	5	$5 \times 10^{-5}$	1,4	2,9
Ferrioxamin B	3	Fusarinsäure	2,7	$5 \times 10^{-4}$	2,2	3,6

säure verlängert. Dieser Effekt ist bei hohen pH-Werten der Toxinlösung besonders ausgeprägt. Betrachtet man die in den Tabellen 2 und 3 dargestellten Ergebnisse, so stellt man fest, daß eine Verminderung der Fusarinsäurewirkung nur in den Fällen eingetreten ist, wo die Aufnahmezeiten verlängert waren; dabei ist es unwichtig, ob Ferrioxamin B anwesend ist oder nicht. Bei tiefem pH-Wert erfolgt die Aufnahme der Fusarinsäure rascher; die Schädigung ist viel stärker und der Einfluß einer verlängerten Aufnahmedauer geringer.

Der nächste Versuch zeigt, wie die Aufnahmedauer und auch die Wirkung der Fusarinsäure verändert werden können, wenn die Sprosse, bevor sie in die Toxinlösung mit pH 6 gebracht werden, längere Zeit abgeschnitten im Wasser belassen werden (Tab. 4). Es wurde besonders darauf geachtet, daß die ersten

*Tabelle 4*  
Aufnahmedauer und Wirkung der Fusarinsäure  
bei Tomatensprossen, die nach dem Schneiden einige Zeit in Wasser gestellt wurden,  
bevor sie in die Toxinlösung gebracht wurden

Zeit in Wasser vor der Aufnahme der Fusarinsäure Stunden	Fusarinsäure Aufnahmezeit Stunden	Welkeintensität	
		Stengel	Blätter
0	8,1	0	2,5
1	9,4	0	2,0
2	8,6	0	1,5
4	10	0	1,0
8	15	0	0

Sprosse sofort nach dem Schneiden in die Fusarinsäurelösung gestellt wurden. Die Ergebnisse bestätigen, daß durch das Belassen der Sprosse in Wasser vor der Aufnahme des Toxins dessen Wirkung stark herabgesetzt und die Aufnahmedauer stark erhöht wird. Diese starke Reduktion der Welkewirkung bei langsamer Toxinaufnahme könnte mit einem erhöhten Abbau der Fusarinsäure in den Tomatensprossen zusammenhängen (SANWAL 1956, KLÜPFEL 1957, BRAUN 1960). Ferrioxamin B hat somit keinen direkten Einfluß auf die Welkewirkung der Fusarinsäure. Trat eine Verminderung auf, ließ sie sich immer durch eine Verlängerung der Aufnahmedauer der Fusarinsäure erklären.

#### B. Schädigung der Permeabilität von pflanzlichen Protoplasten

Fusarinsäure beeinflusst die Permeabilität von pflanzlichen Protoplasten (BACHMANN 1956, HEINRICH 1962). Die Schädigungsweise ist von der Konzentration des Toxins abhängig. Bei Epidermiszellen von *Rhoeo discolor* (L'Hér.) Hance, welche für die folgenden Versuche als Testobjekte verwendet wurden, wies BACHMANN (1956) mit  $10^{-7}$  molarer Fusarinsäure eine Erhöhung der Wasserpermeabilität, mit Konzentrationen größer als  $10^{-4}$  molar eine Erniedrigung nach. Ähnliche Verhältnisse konnte HEINRICH (1962) bei anderen Testobjekten nachweisen. Bei unseren Versuchen zeigte die Fusarinsäure nur eine hemmende Wirkung bei hohen Konzentrationen; die fördernde Wirkung in niedrigen Konzentrationen konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, daß sich die Hemmwirkung der Fusarinsäure durch Ferrioxamin B nicht aufheben läßt.

Tabelle 5

Wirkung von Fusarinsäure und Ferrioxamin B auf die Permeabilität von Epidermiszellen von *Rhodo discolor*.

Die Resultate bilden den Quotienten aus den mittleren Deplasmolysezeiten der Kontrolle und der geschädigten Zellen

Fusarinsäure molar	Ferrioxamin B molar			
	0	$5 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-7}$
0		0,98	0,95	0,88
$5 \times 10^{-8}$	0,51	0,55	0,54	
$10^{-7}$	0,98			0,94

C. Hemmung der Polyphenoloxydase

Bossi (1959) zeigte, daß die Aktivität der Polyphenoloxydase durch Fusarinsäure gehemmt wird. Obschon es sich dabei um ein kupferhaltiges Enzym handelt, sollte versucht werden, ob sich die gehemmte Enzymreaktion durch Ferrioxamin B beeinflussen lasse. Vorerst wurde die Wirkung der Fusarinsäure festgestellt (Abb. 1). Die Ergebnisse von Bossi (1959) waren reproduzierbar. Durch Zugabe von Ferrioxamin B konnte die hemmende Wirkung nicht aufgehoben werden (Abb. 2). Dieselben Ergebnisse wurden auch mit Brenzkatechin erzielt.

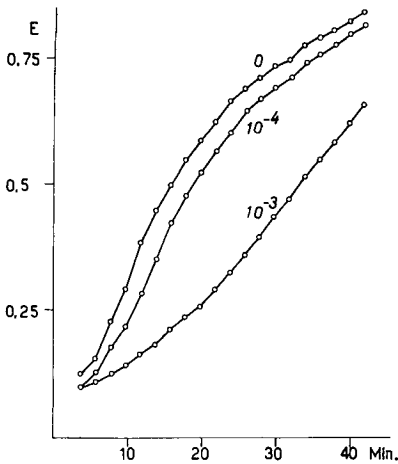


Abb.1 (links). Einfluß verschiedener Fusarinsäurekonzentrationen auf die Wirkung der Polyphenoloxydase. Substrat: para-Kresol. Ordinate: Extinktion des Reaktionsproduktes bei 320 m $\mu$ . Abszisse: Minuten nach Versuchsbeginn

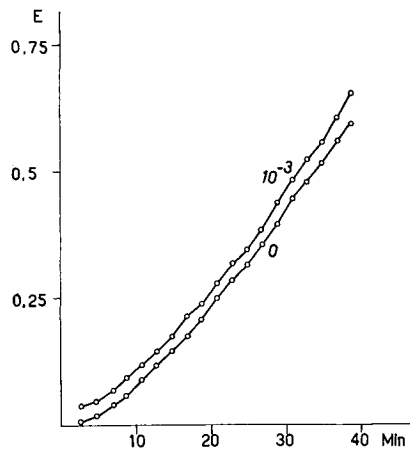


Abb.2 (rechts). Einfluß von Ferrioxamin B auf die Hemmung der Polyphenoloxydase durch  $10^{-3}$  molare Fusarinsäure. Substrat: para-Kresol. Ordinate: Extinktion des Reaktionsproduktes bei 320 m $\mu$ . Abszisse: Minuten nach Versuchsbeginn

### D. Hemmung der Keimung von Pilzsporen

Fusarinsäure hat eine hemmende Wirkung auf die Keimung von Pilzsporen (GÄUMANN und Mitarb. 1952). Bei diesen Untersuchungen mit Sporen von *Alternaria tenuis* Nees zeigte sich eine starke pH-Abhängigkeit der Fusarinsäurewirkung (Tab. 6).

Durch Ferrioxamin B läßt sich die hemmende Wirkung der Fusarinsäure auf die Sporenkeimung nicht vermindern (Tab. 7).

Tabelle 6  
Wirkung des Säuregrades  
auf die Hemmung der Sporenkeimung durch  $10^{-2}$  molare Fusarinsäure

50%ige Hemmung	pH		
	4	5,5	7
Einheiten	19,3	8,1	2

Tabelle 7  
Einfluß von Ferrioxamin B  
auf die Hemmung der Sporenkeimung durch  $10^{-2}$  molare Fusarinsäure

pH	Ferrioxamin B molar	50%ige Hemmung Einheiten
4	$10^{-5}$	23
	$10^{-4}$	25
	$10^{-3}$	22
	0	22
6	$10^{-5}$	5
	$10^{-4}$	5,8
	$10^{-3}$	5,4
	0	5,2

### E. Hemmung des Wachstums von Bakterien und Hefen

Die Wirkung der Fusarinsäure auf Hefen kann im Gegensatz zu derjenigen auf Bakterien durch Eisenverbindungen aufgehoben werden (BRAUN 1960). Im Plattendiffusionstest wurde vorerst die Wirkung der Fusarinsäure auf *Bacillus subtilis* Cohn., *Staphylococcus aureus* Rosenb., *Escherichia coli* (Mig.) Cast., *Saccharomyces cerevisiae* Hans. und *Candida vulgaris* auct. geprüft. Alle fünf Organismen wurden gehemmt, *Bacillus subtilis* am stärksten. Daraufhin wurde im Antagonismustest, mit der Methode der gekreuzten Filterpapierstreifen

*Tabelle 8*  
 Aufhebung der Fusarinsäurewirkung  
 durch Ferrioxamin B im Test mit gekreuzten Filterpapierstreifen

Testorganismus	Fusarinsäure molar	Hemmzone mm	Ferrioxamin B 10 <sup>-2</sup> m Aufhebung
<i>Bacillus subtilis</i>	$\frac{1}{3} \times 10^{-1}$	23	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\frac{1}{3} \times 10^{-1}$	14	—
<i>Escherichia coli</i>	$\frac{1}{3} \times 10^{-1}$	13	—
<i>Candida vulgaris</i>	10 <sup>-1</sup>	18	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 <sup>-1</sup>	21	+

untersucht, ob sich die Wirkung mit Ferrioxamin B aufheben lasse. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse von BRAUN (1960). Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, daß sich nur die Wirkung gegen die beiden Hefen aufheben läßt. Bei *Saccharomyces cerevisiae* sind allerdings die Hemmzonen so unscharf, daß die Ent-hemmung nur schwer zu erkennen ist, während bei *Candida vulgaris* die Einschnürung der Hemmzone sich gut feststellen läßt. Bei der letzteren hob ein Mol Ferrioxamin B die Wirkung von etwa 600 Mol Fusarinsäure auf.

Von all den geprüften Wirkungen der Fusarinsäure sind die Hemmung von *Candida vulgaris* und *Saccharomyces cerevisiae* die einzigen, die sich durch Ferrioxamin B aufheben lassen.

#### F. Hemmung der Atmung von Hefen

Die Atmung intakter Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wird durch Fusarinsäure in Abhängigkeit der Wasserstoffionenkonzentration gehemmt. Bei sinkendem pH-Wert dringt die Fusarinsäure leichter in die Zellen ein; undissoziierte Moleküle permeieren gut. Die eigentliche Atmungshemmung ist wenig von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig (REUSSER und NAEF-ROTH 1956).

*Tabelle 9*  
 Einfluß von Ferrioxamin B  
 auf die Hemmung der Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* durch Fusarinsäure.  
 Prozent O<sub>2</sub>-Verbrauch im Vergleich zur Kontrolle

pH	Fusarinsäure molar	Ferrioxamin B molar	O <sub>2</sub> -Verbrauch %
6,4	$5 \times 10^{-3}$	0	45,8 ± 4,89
	$5 \times 10^{-3}$	10 <sup>-5</sup>	42,2 ± 0,68
	$5 \times 10^{-3}$	10 <sup>-4</sup>	43,0 ± 2,83
	$5 \times 10^{-3}$	10 <sup>-3</sup>	42,8 ± 4,95
4,5	$2,5 \times 10^{-3}$	0	25,9 ± 6,82
	$2,5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	25,0 ± 5,91

Die Versuche, die Wirkung von Fusarinsäure auf die Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* durch Ferrioxamin B aufzuheben, verliefen negativ (Tab. 9). Die Aufhebung der Wachstumshemmung läßt sich nicht durch eine Aufhebung der Atmungshemmung erklären.

#### IV. EINFLUSS VON FUSARINSÄURE UND FERRIOXAMIN B AUF DAS WACHSTUM VON *CANDIDA VULGARIS*

##### A. Allgemeines

Nachdem sich herausgestellt hat, daß die Wachstumshemmung von Hefen die einzige Wirkung der Fusarinsäure ist, die sich durch Ferrioxamin B aufheben läßt, sollen weitere Untersuchungen gemacht werden, um über die Art der Entthemmung mehr zu erfahren. In den folgenden Versuchen wurde durch Bestimmen der optischen Dichte von Kulturen verfolgt, wie das Wachstum von *Candida vulgaris* unter Einfluß von Eisenverbindungen und Fusarinsäure verläuft.

##### B. Ferrioxamin B als Wachstumsfaktor

###### 1. Förderung des Wachstums von *Candida vulgaris* durch Ferrioxamin B

Um später festzustellen, wie die Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B vermindert wird, mußte vorerst geprüft werden, welchen Einfluß Ferri-

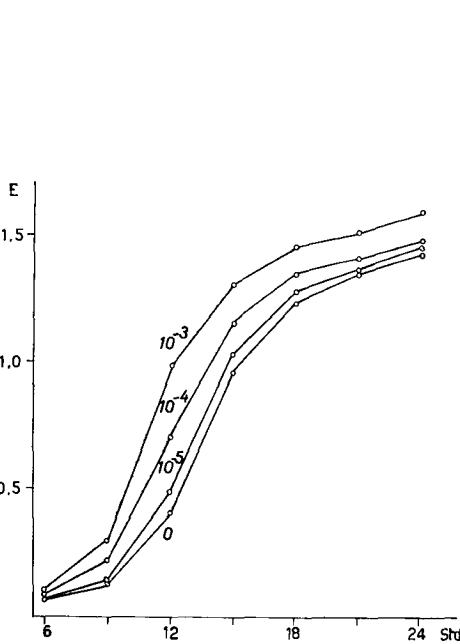


Abb. 3 (links). Förderung des Wachstums von *Candida vulgaris* durch verschiedene Konzentrationen von Ferrioxamin B. Nährlösung: Malzwasser. Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

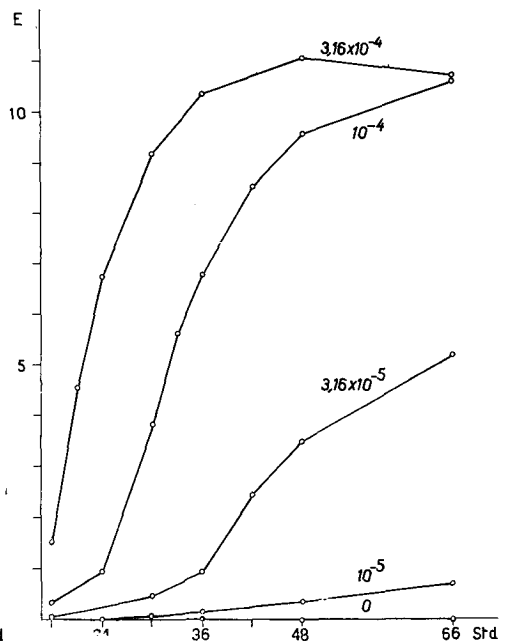


Abb. 4 (rechts). Ferrioxamin B als Wachstumsfaktor für *Candida vulgaris*. Wachstum bei verschiedenen Konzentrationen von Ferrioxamin B. Nährlösung: Richard 5. Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

oxamin B auf das Wachstum von *Candida vulgaris* hat. Der Pilz wurde auf Richard-5-Nährlösung und auf Malzwasser mit verschiedenen Mengen von Ferrioxamin B gezüchtet. Es zeigte sich, daß das Wachstum auf Malzwasser leicht gefördert wird (Abb. 3), während auf der synthetischen Nährlösung Ferrioxamin B unerlässlich ist (Abb. 4). Erst  $10^{-5}$  molares Ferrioxamin B erlaubt ein spärliches Wachstum, größere Dosen bewirken eine sehr starke Wachstumsförderung. Bemerkenswert ist auch die längere lag-Phase auf synthetischem Nährmedium und die darauf folgende sehr steile log-Phase.

## 2. Einfluß von Bausteinen des Ferrioxamin B-Moleküls auf das Wachstum von *Candida vulgaris* auf synthetischer Nährlösung

Die großen Zugaben von Ferrioxamin B, die benötigt werden, um das Wachstum von *Candida vulgaris* zu ermöglichen, lassen eher auf eine Nährstoffwirkung als auf die Wuchsstoffwirkung dieser Substanz schließen, welche bei Sideramin-heterotrophen Organismen untersucht wurde (ZÄHNER und Mitarbeiter 1962). Um ein maximales Wachstum von *Microbacterium lacticum* zu erreichen genügt  $1,5 \times 10^{-7}$  molares Ferrioxamin B. Im folgenden soll durch die Prüfung einiger Bausteine des Ferrioxamin-B-Moleküls als mögliche Wirkstoffe versucht werden, über dessen Wirkungsweise als Wachstumsfaktor für *Candida vulgaris* mehr zu erfahren.

Zuerst soll dem Eisen Beachtung geschenkt werden. Auf Richard-5-Nährlösung mit 20 mg Ferrichlorid je Liter wächst *Candida vulgaris* nicht. Durch verschiedene Zugaben von Ferrichlorid zu Ferrioxamin B wird dessen Wirkung nicht beeinflusst. Versuche, die Wirkung von Ferrioxamin B durch diejenige von Ferrichrom, eines anderen Sideramins zu ersetzen, verliefen auch negativ. Die Wirkung von Ferrioxamin B auf *Candida vulgaris* unterscheidet sich deutlich von der Sideraminwirkung. Bei den bisher bekannten Sideramin-heterotrophen Organismen führten Ferriionen in der Nährlösung zu einer Einsparung an Sideraminen. Diese Organismen sprechen sowohl auf Ferrioxamin B als auch auf Ferrichrom an. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß es sich bei der Wachstumsförderung des Pilzes durch Ferrioxamin B um eine Eisenwirkung handelt.

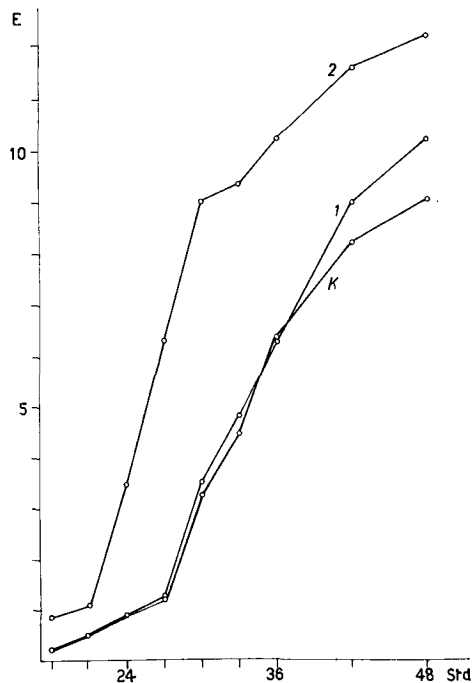


Abb. 5. Einfluß von Desferrioxamin B auf das Wachstum von *Candida vulgaris*. K Ferrioxamin B  $10^{-4}$  m; 1 Ferrioxamin B  $10^{-4}$  m, Desferrioxamin B  $10^{-4}$  m; 2 Ferrioxamin B  $2 \times 10^{-4}$  m. Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn





C. Die Wirkung der Fusarinsäure und ihre Aufhebung durch Ferrioxamin B

1. Hemmung des Pilzes auf synthetischer Nährlösung

Im Antagonismustest mit *Candida vulgaris* hebt ein Mol Ferrioxamin B die Wirkung von etwa 600 Molen Fusarinsäure auf. Auf synthetischer Nährlösung ist Ferrioxamin B für das Wachstum unentbehrlich. Die folgenden Untersuchungen zeigen, welche Wirkung die Fusarinsäure bei verschiedenen Dosen von Ferrioxamin B in der Nährlösung (pH 4,8) hat (Abb. 6). Der Pilz wurde

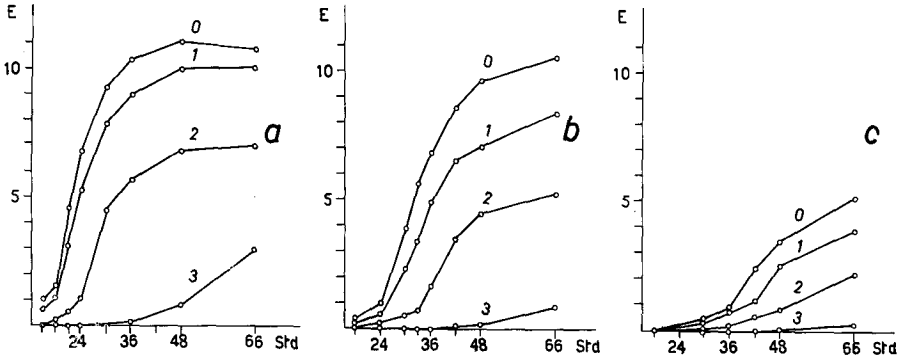


Abb. 6. Einfluß von Fusarinsäure auf das Wachstum von *Candida vulgaris* auf Richard-5-Nährlösung mit verschiedenen Dosen von Ferrioxamin B. a Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-4}$  m; b Ferrioxamin B  $10^{-4}$  m; c Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-5}$  m; 0 Fusarinsäure 0 m; 1 Fusarinsäure  $3,16 \times 10^{-5}$  m; 2 Fusarinsäure  $10^{-4}$  m; 3 Fusarinsäure  $3,16 \times 10^{-4}$  m. Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

mit drei Ferrioxamin-B-Konzentrationen, welche mit je drei Fusarinsäurekonzentrationen kombiniert waren, kultiviert. Der Verlauf der Wachstumskurven zeigt, wie der Pilz bei allen drei Ferrioxamin-B-Konzentrationen durch Fusarinsäure ziemlich stark gehemmt wird.

In Abbildung 7 ist die Beziehung zwischen dem Ferrioxamin-B-Gehalt der Nährlösung und der Wirkung der Fusarinsäure dargestellt. Auf der Ordinate

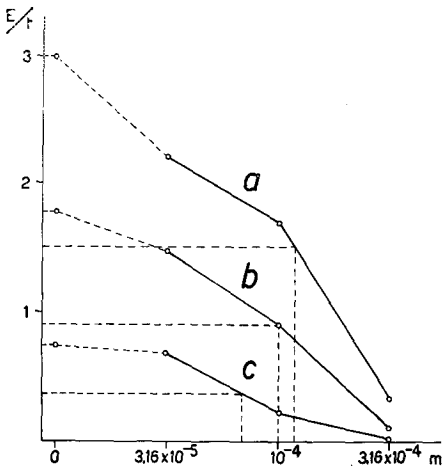


Abb. 7. Bestimmung der Fusarinsäurekonzentrationen, die bei verschiedenem Ferrioxamin-B-Gehalt der Nährlösung eine 50-prozentige Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit in der log-Phase ergeben. Graphische Auswertung der Ergebnisse in Abbildung 6. a Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-4}$  m; b Ferrioxamin B  $10^{-4}$  m; c Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-5}$  m. Ordinate: Zunahme der Extinktion in 3 Stunden in der log-Phase. Abszisse: Fusarinsäurekonzentrationen

wurden die größten Wachstumsgeschwindigkeiten bei den einzelnen Versuchs-anordnungen aus Abbildung 6 aufgetragen, auf der Abszisse die Fusarinsäurekonzentrationen. So konnte bestimmt werden, welche Fusarinsäurekonzentrationen notwendig sind, um bei verschiedenem Gehalt von Ferrioxamin B in der Nährlösung die Wachstumsgeschwindigkeit auf die Hälfte zu reduzieren. Es ist nur ein sehr geringer Einfluß von Ferrioxamin B auf die Fusarinsäurewirkung vorhanden. Nimmt der Wuchsstoffgehalt in der Nährlösung um das zehnfache, bedarf es nur der 1,8fachen Menge Fusarinsäure, um wieder eine 50 %ige Hemmung zu erzielen. Von einem kompetitiven Antagonismus kann nicht gesprochen werden. Die Herabsetzung der Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B ist unter diesen Versuchsbedingungen viel schwächer als auf Malzagarplatten.

## 2. Die Aufhebung der Fusarinsäurewirkung auf Malzwasser

Durch die Verwendung von Malzwasser (pH 6,0) als Nährmedium gelang es, Bedingungen zu schaffen, bei denen die Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B besser aufgehoben wird als auf synthetischer Nährlösung. In Abbildung 8a ist die Wirkung verschiedener Fusarinsäurekonzentrationen, in 8b die Aufhebung der Wirkung von  $10^{-3}$  molarer Fusarinsäure durch verschiedene Konzentrationen von Ferrioxamin B aufgetragen. Wenn die Konzentration der Fusarinsäure über  $10^{-5}$  molar ist, wird das Wachstum von *Candida vulgaris* mit steigenden Mengen zunehmend gehemmt. Es genügen geringe Dosen von Ferrioxamin B, welche keine Wachstumsförderung der Kontrolle ergeben, um die Hemmung zu vermindern. Zu Beginn der

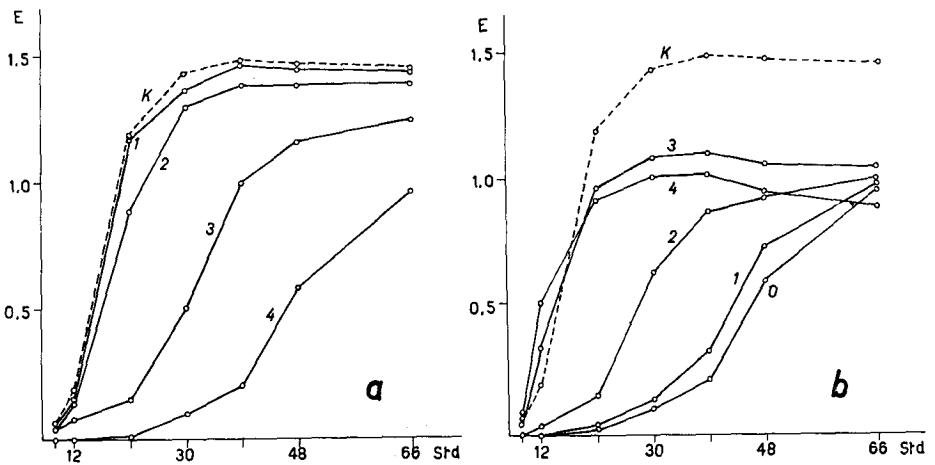


Abb. 8. Aufhebung der Fusarinsäurewirkung auf *Candida vulgaris* durch Ferrioxamin B. Nährlösung: Malzwasser. Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn. a) Wirkung der Fusarinsäure: K Kontrolle; 1 Fusarinsäure  $3,16 \times 10^{-5}$  m; 2 Fusarinsäure  $10^{-4}$  m; 3 Fusarinsäure  $3,16 \times 10^{-4}$  m; 4 Fusarinsäure  $10^{-3}$  m. b) Aufhebung der Wirkung  $10^{-3}$  molarer Fusarinsäure durch Ferrioxamin B: 0 Ferrioxamin B 0 m; 1 Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-8}$  m; 2 Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-7}$  m; 3 Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-6}$  m; 4 Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-5}$  m

Kulturdauer wird die Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolle erreicht, mit großen Dosen von Ferrioxamin B dank deren wachstumsfördernden Wirkung, diese sogar überschritten. Nach der anfänglichen Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit nimmt diese rasch ab, und es wird nur die Dichte der Kulturen erzielt, die auch mit Fusarinsäure, jedoch nach längerer Inkubation erreicht wird.

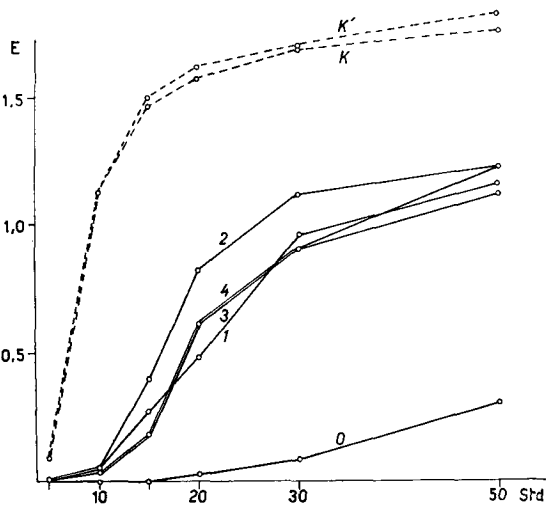
Die nur anfänglich gute Herabsetzung der Wachstumshemmung läßt sich durch das Absinken des pH-Wertes in der Kultur und eine damit verbundene Verschiebung der Wirkungsweise der Fusarinsäure (siehe Seite 167) erklären.

### D. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Beziehungen zwischen Fusarinsäurewirkung und Eisenverbindungen

#### 1. Einfluß einer hohen Wasserstoffionenkonzentration auf die Aufhebung der Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B

Um in Malzagar mit Phosphatpuffer verschiedene pH-Werte einstellen zu können, ohne Niederschläge von Phosphaten zu bekommen, mußte das Leitungswasser, das in den vorangegangenen Versuchen zur Herstellung des Malzwassers verwendet wurde, durch Ionenaustauschwasser ersetzt werden. Nach dieser Änderung war die Aufhebung der Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B schlechter. Es zeigte sich, daß die Aufhebung bei tieferen pH-Werten geringer ist als bei höheren. Der nächste Versuch stellte dar, welche Wirkung steigende Dosen von Ferrioxamin B bei pH 5,5 der Nährlösung auf die Wirkung  $10^{-3}$  molarer Fusarinsäure haben (Abb. 9). Mit  $10^{-6}$  molarem Ferrioxamin B wird eine teilweise Herabsetzung der Fusarinsäurewirkung erreicht, größere Mengen von Ferrioxamin B geben keinen stärkeren Effekt. Die Wachstumsförderung der Kontrolle durch Ferrioxamin B kann im Gegensatz zu den Versuchen auf Malzwasser mit Leitungswasser von pH 6 nicht beobachtet werden.

Abb. 9. Das Wachstum von *Candida vulgaris* unter Einfluß von Fusarinsäure und Ferrioxamin B auf Malzwasser bei pH 5,5. K Kontrolle. K' Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-4}$  molar allein. Die Lösungen 0 bis 4 enthalten Fusarinsäure  $10^{-3}$  molar, und zwar allein (0) oder zusammen mit Ferrioxamin B  $3,16 \times 10^{-7}$  molar (1),  $3,16 \times 10^{-5}$  molar (2),  $3,16 \times 10^{-3}$  molar (3) und  $3,16 \times 10^{-4}$  molar (4). Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn



2. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration  
auf die Aufhebung der Fusarinsäurewirkung durch andere Eisenverbindungen

Nach den Untersuchungen von BRAUN (1960) wird die Fusarinsäurewirkung durch Ferrioxamin B besser aufgehoben als durch Ferrichlorid. Nun soll gezeigt werden, wie sich die Wachstumshemmung von *Candida vulgaris* bei pH 5,5 und 6,8 der Nährlösung durch die beiden Substanzen herabsetzen läßt. Betrachtet man die Ergebnisse in Abbildung 10, sieht man, daß bei tiefem pH Wert die Wirkung von Ferrioxamin B durch diejenige von Ferrichlorid ersetzt werden kann.  $10^{-6}$  molares Ferrichlorid genügt, um die durch Ferrioxamin B mögliche Aufhebung zu erreichen. Die gleiche Dosis von Ferrioxamin B wurde in früheren Versuchen (Abb. 9) gebraucht, um eine solche Herabsetzung der Fusarinsäurewirkung zu erzielen.

Bei hohen pH-Werten der Nährlösung (Abb. 11) hat Ferrioxamin B eine bessere Wirkung als Ferrichlorid. Die Wirkung der Fusarinsäure kann durch  $10^{-6}$  molares Ferrioxamin B fast vollständig aufgehoben werden; um mit Ferrichlorid denselben Effekt zu erzielen, sind viel größere Konzentrationen notwendig. Im Gegensatz zu den Versuchen bei tiefem pH kann eine Wachstumsförderung der Kontrolle durch Eisenverbindungen beobachtet werden; sie unterscheidet sich von der früher beschriebenen Wachstumsförderung auf synthetischer Nährlösung, die nur durch Ferrioxamin B bewirkt wird.

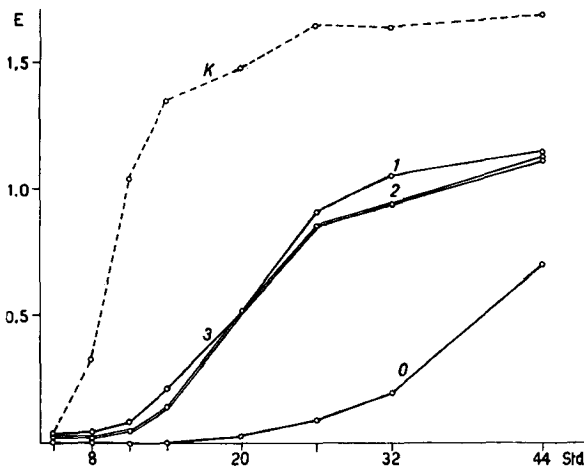


Abb. 10. Das Wachstum von *Candida vulgaris* unter Einfluß von Fusarinsäure und verschiedenen Eisenverbindungen auf Malzwasser bei pH 5,5. K Kontrolle. Die Lösungen 0 bis 3 enthalten Fusarinsäure  $10^{-3}$  molar, und zwar allein (0) oder zusammen mit Ferrioxamin B  $10^{-5}$  molar (2), mit Ferrichlorid  $10^{-6}$  molar (1) und  $10^{-4}$  molar (3). Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

Von einer Sideraminwirkung kann auch in diesem Fall nicht gesprochen werden. Die bessere Wirkung von Ferrioxamin B läßt sich durch die Stabilität des Eisenkomplexes und dessen bessere Wasserlöslichkeit erklären. Die Löslichkeit des anorganischen Eisens nimmt bei steigendem pH-Wert (besonders im Bereich von pH 6) sehr stark ab; in Anwesenheit von Phosphaten und Ca-Ionen wird sie noch stärker herabgesetzt (REDISKE und BIDDULPH 1953), während komplex gebundenes Eisen den Organismen noch zur Verfügung steht (SCHEFFER und Mitarb. 1957, SCHOLZ 1957).

**E. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Wirkungsweise der Fusarinsäure**

Die vorangehenden Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die Wachstumshemmung von *Candida vulgaris* nur teilweise durch Eisenverbindungen aufheben läßt; der Grad dieser Aufhebung ist vom pH-Wert der Nährlösung abhängig. Es soll nun untersucht werden, wie sich das Wachstum des Pilzes und dessen Hemmung durch Fusarinsäure bei verschiedenen pH-Stufen verhält, wenn die durch hohe Eisenkonzentrationen mögliche Aufhebung erreicht ist. Der Pilz wurde einerseits auf Malzwasser ohne zusätzliches Eisen und andererseits auf solchem mit  $10^{-4}$  molarem zusätzlichem Ferrichlorid gezüchtet. Die

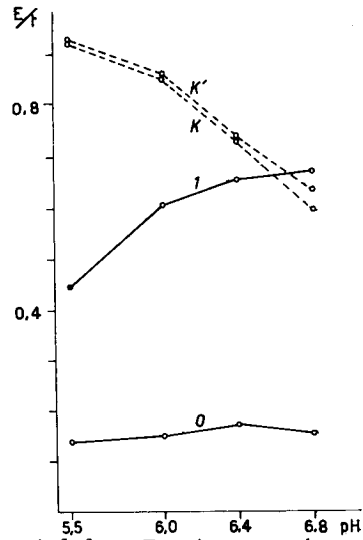
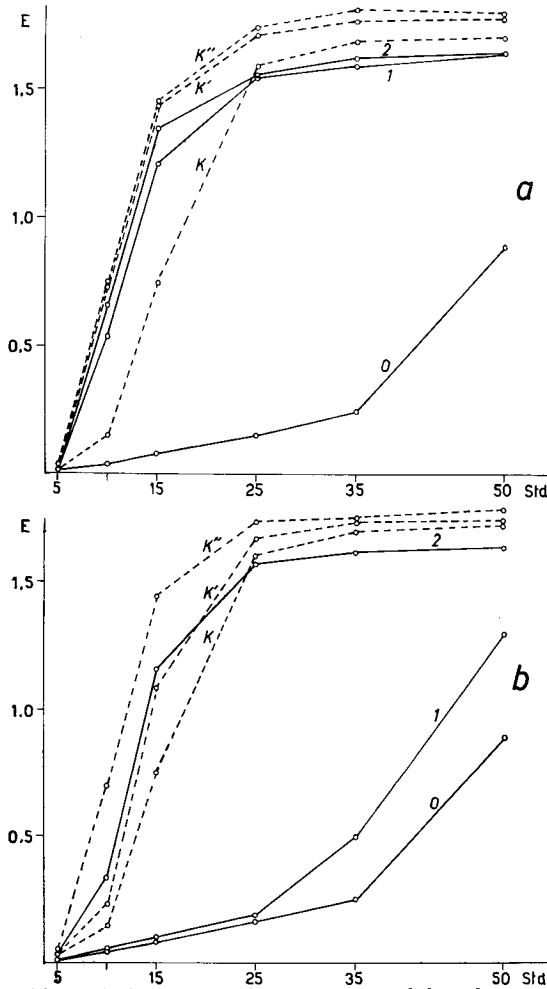


Abb. 11 (links). Das Wachstum von *Candida vulgaris* unter Einfluß von Fusarinsäure und verschiedenen Eisenverbindungen auf Malzwasser bei pH 6,8. a Einfluß von Ferrioxamin B, b Einfluß von Ferrichlorid. K Kontrolle. K' Eisenverbindung  $10^{-4}$  molar allein. Die Lösungen 0 bis 2 enthalten Fusarinsäure  $5 \times 10^{-4}$  molar allein (0) oder zusammen mit Eisenverbindungen  $10^{-6}$  molar (1) und  $10^{-4}$  molar (2). Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

Abb. 12 (rechts). pH-Abhängigkeit der Wirkungsweise der Fusarinsäure auf das Wachstum von *Candida vulgaris*. Verlauf des Wachstums auf Malzwasser bei bestmöglicher Aufhebung der Eisenblockierung durch Fusarinsäure. K Kontrolle. K' Ferrichlorid  $10^{-4}$  molar; 0 Fusarinsäure  $5 \times 10^{-4}$  molar; 1 Fusarinsäure  $5 \times 10^{-4}$  molar; Ferrichlorid  $10^{-4}$  molar. Ordinate: Zunahme der Extinktion in der log-Phase in 5 Stunden. Abszisse: pH-Werte in der Nährlösung

Fusarinsäurekonzentration betrug  $5 \times 10^{-4}$  Mol. Es sei daran erinnert, daß die angegebenen pH-Stufen nach der Zubereitung der Nährlösung eingestellt, während der Wachstumsperiode des Pilzes aber herabgesetzt werden.

In Abbildung 12 werden die erreichten Wachstumsgeschwindigkeiten bei den verschiedenen Versuchsanordnungen verglichen. Diese sind in den Kulturen mit Fusarinsäure ohne zusätzliches Eisen sehr gering. In den Versuchsanordnungen mit Fusarinsäure und Ferrichlorid wird bei hohen pH-Werten der Nährlösung die Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolle erreicht, bei tiefen pH-Werten aber nur eine kleine Beschleunigung des durch Fusarinsäure gehemmten Wachstums erzielt. Die Wachstumshemmung von *Candida vulgare* läßt sich bei pH 6,8 der Nährlösung vollständig durch eine Blockierung des Eisens erklären; bei sinkenden pH-Werten gewinnt ein anderer Wirkungsmechanismus an Bedeutung. Als solcher kommt die Hemmung der Atmung durch Fusarinsäure (NAEF-ROTH und REUSSER 1954, REUSSER und NAEF-ROTH 1956, NAEF-ROTH 1957) in Frage. Die Hemmung der Atmung intakter Hefezellen, welche bei sinkenden pH-Werten zunimmt (REUSSER und NAEF-ROTH 1956), läßt sich durch Ferrioxamin B nicht herabsetzen.

## V. UNTERSUCHUNGEN ÜBER EISENUNABHÄNGIGE WIRKUNGEN DER FUSARINSÄURE

### A. Die Wirkung von Spurenelementen

Die Hemmung des Wachstums von *Candida vulgare* läßt sich teilweise durch eine Blockierung des Eisens erklären. Es stellte sich die Frage, ob durch zusätzliche Gaben von Spurenelementen die Wachstumshemmung besser aufgehoben werden kann. Die Versuche wurden auf Malzwasser, bei einem pH-Wert der Nährlösung von 5,5 durchgeführt. Zu  $10^{-3}$  molarer Fusarinsäure

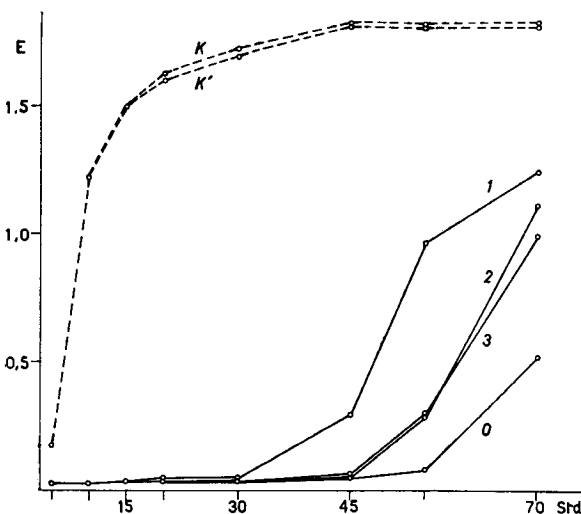


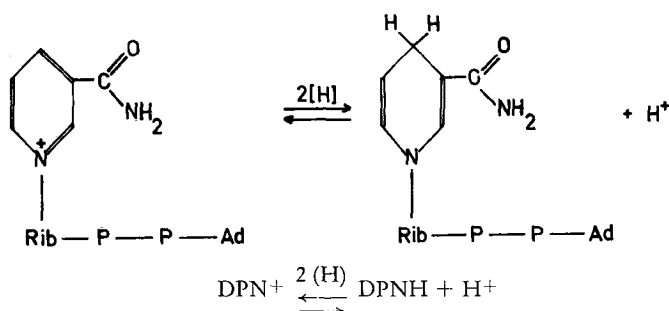
Abb. 13. Das Wachstum von *Candida vulgare* unter dem Einfluß von Fusarinsäure, Ferrichlorid und Hoagland A—Z-Lösung auf Malzwasser bei pH 5,5. K Kontrolle. K' Hoagland A—Z-Lösung in zehnfacher Konzentration allein. Die Lösungen 0 bis 3 enthalten Fusarinsäure  $10^{-3}$  molar allein (0) oder zusammen mit Ferrichlorid  $10^{-5}$  molar (1), mit Ferrichlorid  $10^{-5}$  molar und Hoagland A—Z-Lösung in zehnfacher Konzentration (2) und mit Ferrichlorid  $10^{-5}$  molar und Hoagland A—Z-Lösung in zehnfacher Konzentration (3). Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

wurde  $10^{-5}$  molares Ferrichlorid und Hoagland A-Z-Lösung (HOAGLAND und SNYDER 1933) in normaler und zehnfacher Konzentration zugegeben (Abb. 13).

Mit Hoagland A-Z-Lösung gelingt es nicht, die Wirkung der Fusarinsäure aufzuheben. Die Wirkung des Eisens wird durch die Gabe weiterer Spurenelemente eher abgeschwächt.

### B. Zugabe von Nikotinsäureamid und DPN<sup>+</sup>

Die Pyridinnucleotide sind Coenzyme von zahlreichen Dehydrogenasen. Das Triphosphopyridinnucleotid TPNH dient vorwiegend dazu, bei Biosynthesen den notwendigen Wasserstoff zu liefern, während das Diphosphopyridinnucleotid DPNH seinen Wasserstoff meistens an die Enzyme der Atmungskette abgibt. Mit Nikotinsäureamid verwandte Stoffe, bei denen die Säureamidgruppe durch andere Gruppierungen ersetzt ist, lassen sich ebenfalls zu Pyridinnucleotiden koppeln, welche auch enzymatisch reduziert werden können. Solche Verbindungen werden zur Unterscheidung verschiedener Apoenzyme verwendet (z. B. KARLSON 1962).



Es wurde geprüft, ob zwischen Nikotinsäureamid, der funktionellen Gruppe dieser Coenzyme, und Fusarinsäure ein Antagonismus bestehe. Die Wirkung von  $5 \times 10^{-4}$  molarer Fusarinsäure auf das Wachstum von *Candida vulgaris* wurde weder durch  $5 \times 10^{-6}$  und  $5 \times 10^{-4}$  molares Nikotinsäureamid noch durch  $5 \times 10^{-6}$  und  $5 \times 10^{-5}$  molares DPN<sup>+</sup> aufgehoben. Versuche von KALYANASUNDARAM (1960), die Hemmwirkung der Fusarinsäure auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* durch Nikotinsäureamid und Adenosin aufzuheben, waren ebenfalls negativ verlaufen.

### C. Beziehungen zwischen Phenoloxydase, Phenolderivaten und Fusarinsäure

In den vorangehenden Untersuchungen konnte die Wirkungsweise der Fusarinsäure nicht durch einen Antagonismus zu strukturell ähnlichen Metaboliten und nur teilweise durch den Chelierungseffekt erklärt werden. Einzig die Wachstumshemmung von Hefen konnte durch Eisenverbindungen zum Teil aufgehoben werden, die Atmungshemmung jedoch nicht. BOSSI (1959) zeigte, daß die Aktivität der Polyphenoloxydase durch Fusarinsäure beträchtlich gehemmt wird. Diesem Enzym wird von einigen Autoren (ARNON 1950, BONNER und WILDMANN 1946, LINK und KLEIN 1951, LINK und Mitarb. 1952, JAMES

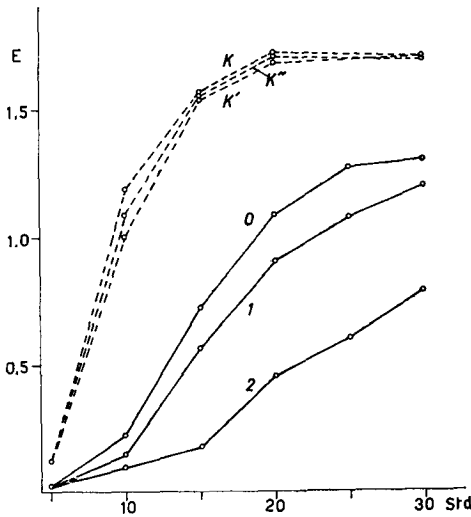


Abb. 14. Einfluß von Fusarinsäure, Brenzkatechin und para-Kresol auf das Wachstum von *Candida vulgaris* auf Malzwasser mit  $10^{-4}$  molarem Ferrichlorid bei pH 5,7. K Kontrolle. K' Brenzkatechin allein, K'' para-Kresol allein. Die Lösungen 0 bis 2 enthalten Fusarinsäure allein (0) oder zusammen mit Brenzkatechin (1) oder para-Kresol (2). Die Konzentrationen aller Zusätze betragen  $5 \times 10^{-4}$  molar. Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

gewährleistet. Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen Einflüsse von Brenzkatechin und para-Kresol. Durch Brenzkatechin wird die Hemmung leicht, durch para-Kresol beträchtlich verstärkt. Größere Dosen der beiden Phenolderivate, als oben verwendet werden, haben für sich allein eine hemmende Wirkung auf das Wachstum des Pilzes.

Wurde in Malzwasser Brenzkatechin und Fusarinsäure zugegeben, trat sowohl in der Nährlösung als auch in den Kulturen eine blaugrüne Färbung auf. Um diese zu erzielen, konnte die Fusarinsäure durch Picolinsäure, jedoch nicht durch Nikotinsäure ersetzt werden. Die Ausprägung der Färbung ist stark pH-empfindlich. Wurde reine Fusarinsäure und Brenzkatechin zusammengegeben, zeigte sich keine Färbung. Papierchromatographische Untersuchungen ergaben, daß in Lösungsgemischen der beiden Substanzen in Ionenaustauschwasser und in Malzwasser, das mit Äthylacetat extrahiert wurde, eine neue Substanz mit einem Rf-Wert von 0,83 nachgewiesen werden kann (Tab. 10). In Lösungsgemischen von Fusarinsäure und para-Kresol werden geringe Mengen einer neuen Substanz mit einem Rf-Wert von 0,94 gebildet.

Beim Entwickeln der Papierchromatogramme mit Bromkresolgrün erscheint die Fusarinsäure teilweise gelb und die Betainform rot an der Spitze des Fleckes. Wurde zu Fusarinsäure ein Überschuß von Brenzkatechin gegeben, konnte diese

1953) im Gegensatz zu anderen (HACKET und SCHNEIDERMAN 1953, HACKET und Mitarb. 1953) eine Rolle bei der Atmung zugeschrieben.

Versuche, die Wachstumshemmung bei pH 5,7 des Malzwassers und bei guter Eisenversorgung mit Phenoloxydase aufzuheben, verliefen negativ. Sowohl ein rohes als ein durch fraktionierte Acetonfällung gereinigtes Präparat aus Kartoffeln ergaben wohl eine Wachstumsförderung; dies konnte aber auch mit durch Hitze inaktivierten Präparaten erzielt werden.

Die weiteren Arbeiten galten der Klärung von Beziehungen zwischen Fusarinsäure und Substraten der Polyphenoloxydase. Für die Wachstumsversuche wurde in Malzwasser ein pH-Wert von 5,7 eingestellt; durch Zugabe von  $10^{-4}$  molarem Ferrichlorid wurde die durch Eisenverbindungen mögliche Aufhebung der Fusarinsäurewirkung



rote Spitze nicht mehr sichtbar gemacht werden. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob die Betainform der Fusarinsäure mit Phenolen reagieren kann und dabei zwischen Phenolen und Fusarinsäure trotz der  $\alpha$ -Stellung der Säuregruppe im Pyridinring eine ähnliche Bindung entsteht wie zwischen Ribose und Nikotinsäureamid bei den Pyridinnucleotiden.

Tabelle 10  
Nachweis von Substanzen  
in Lösungsgemischen von Brenzkatechin und para-Kresol mit Fusarinsäure

Substanz	Rf-Wert	Nachweis	Farbe
Fusarinsäure	0,80	UV	—
Brenzkatechin	0,87	Bromkresolgrün	gelb, Spitze rot
Reaktionsprodukt	0,83	diazotiertes para-Nitroanilin	grünbraun
		sichtbar	grün
		diazotiertes para-Nitroanilin	violett
Fusarinsäure	0,80	UV	—
para-Kresol	0,97	Bromkresolgrün	gelb, Spitze rot
Reaktionsprodukt	0,94	diazotiertes para-Nitroanilin	gelbbraun
		diazotiertes para-Nitroanilin	rot

Kultiviert man *Candida vulgaris* auf Malzwasser mit Brenzkatechin, so verschwindet dieses mit zunehmender Kulturdauer. In Anwesenheit von Fusarinsäure können auch in stark gewachsenen Kulturen neben der neu gebildeten Substanz mit einem Rf-Wert von 0,83 noch große Mengen von Brenzkatechin nachgewiesen werden. Die Umwandlung von Brenzkatechin in Kulturen von *Candida vulgaris* wird also durch Fusarinsäure gehemmt.

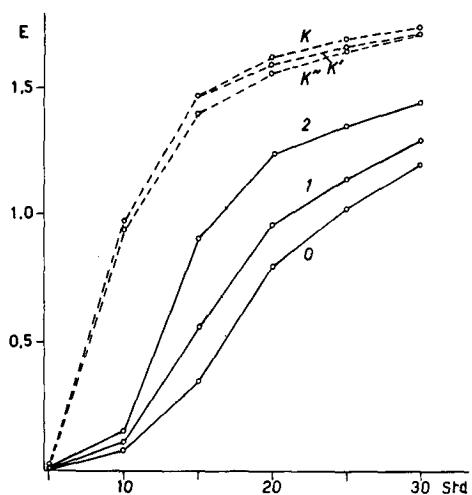


Abb. 15. Einfluß von Fusarinsäure und Ascorbinsäure auf das Wachstum von *Candida vulgaris* auf Malzwasser mit  $10^{-4}$  molarem zusätzlichem Ferrichlorid bei pH 5,7. K Kontrolle. K' Ascorbinsäure  $5 \times 10^{-4}$  molar, K'' Ascorbinsäure  $5 \times 10^{-3}$  molar. Die Lösungen 0 bis 2 enthalten Fusarinsäure  $5 \times 10^{-4}$  molar allein (0) oder zusammen mit Ascorbinsäure  $5 \times 10^{-4}$  molar (1) oder  $5 \times 10^{-3}$  molar (2). Ordinate: Dichte der Kulturen (Extinktion). Abszisse: Stunden nach Versuchsbeginn

#### D. Beziehungen zwischen Ascorbinsäure und Fusarinsäure

*Candida vulgaris* wurde auf Malzwasser von pH 5,7 mit Zugaben von Fusarinsäure und Ascorbinsäure gezüchtet. Die „Eisenwirkung“ der Fusarinsäure wurde durch  $10^{-4}$  molares Ferrichlorid ausgeschaltet. Der pH-Wert der Ascorbinsäurestammmlösung wurde demjenigen der Nährlösung angeglichen. Aus Abbildung 15 ist ersichtlich, daß sich die Wirkung von  $5 \times 10^{-4}$  molarer Fusarinsäure durch  $5 \times 10^{-4}$  und  $5 \times 10^{-3}$  molare Ascorbinsäure teilweise aufheben läßt. Die zu einer geringen Herabsetzung der Fusarinsäurewirkung erforderlichen Ascorbinsäuredosen sind sehr groß. Ähnliche Resultate erhielt KALYANASUNDARAM (1960) mit *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus*.

In papierchromatographischen Untersuchungen des Kulturfiltrats von *Candida vulgaris* konnte durch Entwickeln mit einem Silbernitratreagens neben Ascorbinsäure (Rf-Wert 0,29) eine Substanz vom Rf-Wert 0,59 nachgewiesen werden, deren Bildung bei Vorhandensein von Ascorbinsäure und Fusarinsäure in der Nährlösung unterbleibt. In Malzwasser bildet sich in Anwesenheit von Ascorbinsäure und Fusarinsäure eine gelbe Färbung.

#### VI. DISKUSSION

Von all den geprüften Schädigungen durch Fusarinsäure konnte nur die Wachstumshemmung von Hefen durch Ferrioxamin B herabgesetzt werden. Untersuchungen mit *Candida vulgaris* auf Nährlösung Richard 5 ergaben, daß Ferrioxamin B auf dieser Nährlösung für diesen Pilz unentbehrlich ist. Die Wuchsstoffwirkung von Ferrioxamin B auf Nährlösung Richard 5 steht in keinem Zusammenhang mit der Hemmwirkung der Fusarinsäure; sie läßt sich durch andere Eisenverbindungen nicht ersetzen.

Die Hemmung des Wachstums von *Candida vulgaris* auf Malzwasser durch Fusarinsäure kann mit Eisenverbindungen bei hohen pH-Werten der Nährlösung sehr stark, bei tiefem pH nur wenig vermindert werden. Die Prüfung von Ferrichlorid und Ferrioxamin B als Antagonisten der Fusarinsäure ergab, daß letzteres nur bei hohem pH der Nährlösung, wo Ferrichlorid schwer löslich ist, eine bessere Wirkung hat. Die von BRAUN (1960) beobachtete besonders gute Wirkung von Ferrioxamin B als Antagonist der Fusarinsäure läßt sich durch die Spezifität der Komplexbindung und die gute Wasserlöslichkeit dieser Verbindung erklären.

Der Eingriff der Fusarinsäure in den Eisenstoffwechsel von Hefen beruht nur auf einer Blockierung des Eisens in der Nährlösung. Beim Mischen von Fusarinsäure und Ferrichloridlösungen kann das Ausflocken eines Reaktionsproduktes beobachtet werden. Bei hohen pH-Werten der Nährlösung, bei denen lösliches Eisen nur in geringer Menge vorhanden ist, kann eine besonders starke Verschlechterung der Eisenversorgung durch den Chelierungseffekt der Fusarinsäure nachgewiesen werden. Die Hemmung der Atmung von Hefen durch Fusarinsäure wird mit Ferrioxamin B nicht herabgesetzt. Eine vollständige Aufhebung der Hemmung des Wachstums von *Candida vulgaris* ist nur bei

hohen pH-Werten möglich, bei denen nach den Versuchen von REUSSER und NAEF-ROTH (1956) die Hemmung der Atmung intakter Hefezellen nur gering ist.

Versuche, die Wachstumshemmung von *Candida vulgaris* durch Fusarinsäure bei tiefen pH-Werten der Nährlösung durch Spurenelemente aufzuheben, verliefen negativ. Durch Nikotinsäureamid, einen der Fusarinsäure ähnlichen Metaboliten, wird die Hemmwirkung nicht beeinflusst, durch Brenzkatechin und para-Kresol verstärkt und durch Ascorbinsäure etwas herabgesetzt. KALYANA-SUNDARAM (1960) zeigte, daß die Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* durch Fusarinsäure mit Glucuronsäure, Tyrosin und Ascorbinsäure etwas vermindert wird.

Zwischen Fusarinsäure und den Phenolderivaten Brenzkatechin und para-Kresol konnten Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. Es besteht also die Möglichkeit, daß die von BOSSI (1959) nachgewiesene Hemmung der Polyphenoloxydase nicht kompetitiv, sondern durch eine solche Reaktion bedingt ist. Zudem stellt sich die Frage, ob die Hemmung der Atmung durch Fusarinsäure sich durch eine Reaktion zwischen Fusarinsäure und Hydrochinonen der Atmungskette erklären lasse. Es wird angenommen, daß Chinon-Hydrochinonsysteme an zentraler Stelle zwischen den Flavinenzymen und den Cytochromen in die Atmungskette eingeschaltet sind und sowohl Bernsteinsäure als auch DPNH über solche Systeme oxydiert werden (z. B. GREEN 1961, SLATER und Mitarb. 1961). Die bisherigen Untersuchungen über die Wirkungsweise der Fusarinsäure geben noch keinen Aufschluß, ob die Hemmung der Veratmung von Glukose in der Atmungskette zustande kommt. Einzig die Aufhebung der Wachstumshemmung der Mikroorganismen durch Tyrosin, welches im Stoffwechsel zu Fumarsäure, dem Oxydationsprodukt von Bernsteinsäure abgebaut wird (z. B. KARLSON 1962) und durch Ascorbinsäure, welche eine Umgehung ermöglichen kann (FRANKE 1960), weisen auf diese Möglichkeit hin. Ein gleichzeitiger Nachweis von allfälligen Reaktionsprodukten zwischen Fusarinsäure und Hydrochinonen der Atmungskette und einer Hemmung der Veratmung der Substrate DPNH und Bernsteinsäure wären von großem Interesse, da sie einen ersten Hinweis auf den Wirkungsmechanismus der Atmungshemmung durch Fusarinsäure liefern könnten.

### Zusammenfassung

1. Die Wachstumshemmung von Hefen durch Fusarinsäure (ein Toxin von *Fusarium lycopersici*) wird durch Eisenverbindungen vermindert; unter diesen zeigt Ferrioxamin B die beste Wirkung.

2. Die Hemmwirkung der Fusarinsäure auf die Permeabilität der Epidermiszellen von *Rhodo discolor*, auf die Sporenkeimung von *Alternaria tenuis*, auf das Bakterienwachstum, auf die Atmung von Hefezellen und auf die Polyphenoloxydase sowie die Schadwirkungen auf Tomatensprosse werden von Ferrioxamin B nicht beeinflusst.

3. Auf Richard-Nährlösung wächst *Candida vulgaris* nur unter Zugabe von Ferrioxamin B. In Malzwasser verursacht diese Verbindung nur bei hohen pH-Werten (bei denen Ferrisalze schwer löslich sind) eine geringe Wachstumssteigerung.

4. Die durch Fusarinsäure verursachte Wachstumshemmung von *Candida vulgaris* auf Richard-Nährlösung wird durch steigende Zugabe von Ferrioxamin B nur sehr wenig vermindert.

5. Auf Malzwasser läßt sich die durch Fusarinsäure verursachte Wachstumshemmung von *Candida vulgaris* mit Eisenverbindungen bei hohen pH-Werten sehr stark, bei tiefen pH-Werten nur sehr wenig vermindern. Ferrioxamin B läßt sich bei tiefen pH-Werten durch gleiche, bei hohen pH-Werten nur durch viel größere Dosen von Ferrichlorid ersetzen.

6. Die Versuche führen zu dem Schluß, daß die Fusarinsäure in der Nährlösung das Eisen blockiert. Die Toxizität der Fusarinsäure beruht daneben auf mindestens einem weiteren Mechanismus, dessen Wirkung mit sinkendem pH-Wert zunimmt.

7. Die Wachstumshemmung von *Candida vulgaris* durch Fusarinsäure wird durch Spurenelemente, durch Nikotinsäureamid und durch Polyphenoloxydase nicht beeinflusst, durch Ascorbinsäure herabgesetzt und durch Brenzkatechin und para-Kresol verstärkt.

8. Zwischen Fusarinsäure und den Phenolen para-Kresol und Brenzkatechin wurden papierchromatographisch Reaktionsprodukte nachgewiesen. Der Abbau von Brenzkatechin und Ascorbinsäure in Kulturen von *Candida vulgaris* wird durch Fusarinsäure gehemmt.

9. Eine Reaktion der Fusarinsäure mit Hydrochinonen der Atmungskette erscheint möglich.

#### Summary

1. The inhibition of yeast growth by fusaric acid, a toxin of *Fusarium lycopersici*, is antagonized by iron compounds; among these, ferrioxamin B shows the best action.

2. The toxicity of fusaric acid for tomato shoots and its inhibiting effects on the permeability of epidermal cells of *Rhoeo discolor*, on the spore germination of *Alternaria tenuis*, on bacterial growth, on yeast respiration and on phenoloxidase activity are not influenced by iron compounds.

3. In Richard's solution, increasing amounts of ferrioxamin B reduce the ferrioxamin B. In malt water, ferrioxamin B causes a small increase of growth at high pH values where the solubility of iron salts is low.

4. In Richard's solution, increasing amounts of ferrioxamin B reduce the growth inhibition of *Candida vulgaris* by fusaric acid to a small extent only.

5. In malt water, the reducing action of iron compounds on the inhibition of *Candida vulgaris* growth by fusaric acid is greater at high than at low pH values. At a low pH, ferrioxamin B and ferrichloride are equally effective; at higher pH values bigger doses of ferrichloride are required.

6. The experiments lead to the conclusion that fusaric acid blocks essential iron in the nutrient solution. Besides, fusaric acid acts by at least one other mechanism which is more effective at low pH values.

7. The inhibition of *Candida vulgaris* growth by fusaric acid is not influenced by Hoagland's A-Z solution, by nicotinic acid amide and by phenoloxidase; it is increased by catechol and para-cresol and reduced by ascorbic acid.

8. A chemical reaction between fusaric acid and the phenols catechol and para-cresol was shown with paper chromatographic methods. The destruction of catechol and ascorbic acid in *Candida vulgaris* cultures is inhibited by fusaric acid.

9. A reaction of fusaric acid with quinols of the respiratory chain seems possible.

Für die Unterstützung dieser Arbeit durch die Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz wird bestens gedankt.

### Literaturverzeichnis

- ARNON, D. J., 1950: Functional aspects of copper in plants. In: McELROY, W. D., and B. GLASS, Copper metabolism, 89—114. John Hopkins Press, Baltimore.
- BACHMANN, E., 1956: Der Einfluß der Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. *Phytopath. Z.* 27, 255—288.
- BICKEL, H., E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN und H. ZÄHNER, 1960: Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. *Experientia* 16, 129—133.
- BONIFAS, V., 1952: Détermination de l'association synergique binaire d'antibiotiques et de sulfamides. *Experientia* 8, 234—235.
- BONNER, J., and S. G. WILDMAN, 1946: Enzymic mechanisms in the respiration of spinach leaves. *Arch. Biochem.* 10, 497—518.
- BOSSI, R., 1959: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase. *Phytopath. Z.* 37, 273—316.
- BRAUN, R., 1960: Über Wirkungsweise und Umwandlung der Fusarinsäure. *Phytopath. Z.* 39, 197—241.
- BURNHAM, B. F., 1962: Bacterial iron metabolism. Investigations on the mechanism of ferrichrome function. *Arch. Biophys., Biochem.* 97, 329—335.
- , and J. B. NEILANDS, 1961: Studies on the metabolic function of the ferrichrome compounds. *J. biol. Chem.* 236, 554—559.
- DEMAIN, A. L., and D. HENDLIN, 1959: Iron transport compounds as growth stimulators for *Microbacterium* sp. *J. gen. Microbiol.* 21, 72—79.
- DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. *Phytopath. Z.* 21, 337—348.
- DIXON, M., 1943: Manometric methods. Cambridge Univ. Press, 155 S.
- FRANKE, W., 1960: Ascorbinsäureoxidase. In: RUHLAND, W., *Handb. Pflanzenphysiol.* XII/1, 430—455. Springer, Berlin.
- GÄUMANN, E., 1957: Über Fusarinsäure als Welketoxin. *Phytopath. Z.* 29, 1—44.
- , ST. NAEF-ROTH und H. KOBEL, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. *Phytopath. Z.* 20, 1—38.
- GREEN, D. E., 1961: Coenzyme Q and electron transport. In: A Ciba Foundation Symposium on Quinones in electron transport, 130—159. J. and A. Churchill Ltd., London, 453 S.

- HACKETT, D. P., and H. A. SCHNEIDERMANN, 1953: Terminal oxidases and growth in plant tissues. I. The terminal oxidase mediating growth of *Avena* coleoptile and *Pisum* stem sections. Arch. Biochem. 47, 190—204.
- —, — — and K. V. THIMANN, 1953: Terminal oxidases and growth in plant tissues. II. The terminal oxidase mediating water uptake by potato tissue. Arch. Biochem. 47, 205 bis 214.
- HEINRICH, G., 1962: Fusarinsäure in ihrer Wirkung auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Protoplasma 55, 320—356.
- HENDLIN, D., and A. L. DEMAIN, 1959: An absolute requirement for "Iron transport factors" by *Microbacterium lacticum* 8181. Nature 184, 1849.
- HESSELTINE, C. W., C. PIDACKS, A. R. WHITEHILL, N. BOHONOS, B. L. HUTCHINGS and J. H. WILLIAMS, 1952: Coprogen, a new growth factor for coprophilic fungi. J. Amer. Chem. Soc. 74, 1362.
- —, A. R. WHITEHILL, C. PIDACKS, M. T. HAGEN, N. BOHONOS, B. L. HUTCHINGS and J. H. WILLIAMS, 1953: Coprogen, a new growth factor present in dung, required by *Pilobolus* species. Mycologia 45, 7—19.
- HOAGLAND, D. R., and W. C. SNYDER, 1933: Nutrition of strawberry plant under controlled conditions. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30, 288—294.
- JAMES, W. O., 1953: Plant respiration. Clarendon Press, Oxford, 282 S.
- JUILLARD, M., 1957: Über die Cobalamine einer Mutante von *Bacillus megaterium* De Bary. Zbl. Bakt., Abt. II, 110, 701—727.
- KALYANASUNDARAM, R., 1960: Studies on an antagonist of the phytotoxin fusaric acid. Phytopath. Z. 38, 217—244.
- KARLSON, P., 1962: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 3. Aufl., 358 S. Georg Thieme, Stuttgart.
- KLUEPFEL, D., 1957: Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. 29, 349—379.
- KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Z. 18, 157—195.
- LINK, G. K. K., and R. M. KLEIN, 1951: Studies on the metabolism of plant neoplasm. II. The terminal oxidase patterns of crown galls and auxin tumors of tomato. Bot. Gaz. 113, 190—195.
- —, — —, and E. S. G. BARRON, 1952: Metabolism of slices of tomato stem. J. exp. Bot. 3, 216—236.
- LINSKENS, H. F., 1955: Der Einfluß der toxischen Welke auf die Blattausscheidungen der Tomatenpflanze. Phytopath. Z. 23, 89—106.
- —, 1959: Papierchromatographie in der Botanik. 2. Aufl., 408 S. Springer, Berlin.
- LOCHHEAD, A. G., and M. O. BURTON, 1956: Incidence in soil of bacteria requiring vitamin B<sub>12</sub> and the terregens factor. Soil Sci. 82, 237—245.
- —, — — and R. H. THEXTON, 1952: A bacterial growth factor synthesized by a soil bacterium. Nature 170, 282.
- LYR, H., 1953: Zur Kenntnis der Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*. Arch. Microbiol. 19, 402—434.
- NAEF-ROTH, ST., 1957: Über die parasitogenen und toxischen Veränderungen der Atmungsintensität bei Tomaten. Z. Pfl.krankh. 64, 421—426.
- —, and P. REUSSER, 1954: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von Tomaten-Blattgewebe. Phytopath. Z. 22, 281—287.
- NEILANDS, J. B., 1952: A crystallin organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*). J. Amer. Chem. Soc. 74, 4846—4847.
- PAGE, R. M., 1952: The effect of nutrition on growth and sporulation of *Pilobolus*. Amer. J. Bot. 39, 731—739.
- PAQUIN, R., and E. R. WAYGOOD, 1957: The effect of *Fusarium* toxins on the enzymic activity of tomato hypocotyl mitochondria. Canad. J. Bot. 35, 207—218.
- PRELOG, V., and A. WALSER, 1962: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 36. Mitt. Über die Synthese der Ferrioxamine B und D<sub>1</sub>. Helv. chim. Acta 45, 631—637.

- REDISKE, J. H., and O. BIDDULPH, 1953: The absorption and translocation of iron. *Plant Physiol.* **28**, 576—593.
- REUSSER, P., und ST. NAEF-ROTH, 1956: Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. *Phytopath. Z.* **26**, 273—296.
- SANWAL, B. D., 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. *Phytopath. Z.* **25**, 333—384.
- SCHAEFFER, F., B. ULRICH und P. HIESTERMANN, 1957: Die Bedeutung der Chelatisierung in der Agriculturnchemie und Bodenkunde. *Z. Pflanzenernährg., Düngg., Bodenkde.* **76**, 146—155.
- SCHOLZ, G., 1957: Die Rolle von Chelaten bei der Eisenversorgung und im Stoffwechsel der Pflanzen. *Z. Pflanzenernährg., Düngg., Bodenkde.* **76**, 133—145.
- SLATER, E. C., J. P. COLPA-BOONSTRA and J. LINKS, 1961: The oxidation of quinols by mitochondrial preparations. In: A Ciba Foundation Symposium on Quinones in electron transport, 161—185. J. and A. Churchill Ltd., London, 453 S.
- TAMARI, K., and J. KAJI, 1952, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of fusaric acid on plant growth. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **26**, 223—227, 295—298, 298—303; **27**, 144—147, 147—150, 159—161, 245—249, 249—252.
- UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER, 1949: Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publ. Co., Minneapolis, 227 S.
- WARBURG, O., 1926: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer, Berlin.
- ZÄHNER, H., E. BACHMANN, R. HÜTTER und J. NÜESCH, 1962: Sideramine, eisenhaltige Wachstumsfaktoren aus Mikroorganismen. *Pathol. Mikrobiol.* **25**, 708—736.
- —, R. HÜTTER und E. BACHMANN, 1960: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitt. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. *Arch. Mikrobiol.* **36**, 325—349.
- —, W. KELLER-SCHIERLEIN, R. HÜTTER, K. HESS-LEISINGER und A. DEER, 1963: Sideramine aus Aspergillaceen. *Arch. Mikrobiol.* **45**, 119—135.

## Lebenslauf

1. 4. 1931 Geboren in Rifferswil (Zch). Heimat-  
gemeinde Rifferswil.
- 1938 — 1946 Primarschule und Sekundarschule in Hau-  
sen a/A.
- 1946 — 1952 Landwirtschaftliche Praxis in verschie-  
denen Gebieten der Schweiz. Landwirt-  
schaftliche Winterschule Strickhof, Zürich.
- 1952 — 1954 Landwirtschaftliche Praxis in verschiede-  
nen Gebieten von Dänemark. Vier Monate  
internationale Volkshochschule Helsingör.
- 1954 — 1956 Private Mittelschule Minerva, Zürich. Früh-  
jahr 1956 Aufnahmeprüfung an die Ab-  
teilung Landwirtschaft der Eidgenössischen  
Technischen Hochschule.
- Sommer 1956 Landwirtschaftliche Praxis.
- 1956 — 1960 Studium an der Abteilung für Landwirt-  
schaft der Eidgenössischen Technischen  
Hochschule. Diplomabschluß in allgemeiner  
Richtung.
- Seit 1960 Assistent am Institut für spezielle Botanik  
der Eidgenössischen Technischen Hoch-  
schule.