

Prom. Nr. 2677

**Untersuchungen  
über das Wachstum, die Atmung  
und den intermediären Stoffwechsel  
von *Marasmius putillus* (Fr. ex Fr.) Fr.**

Von der  
Eidgenössischen Technischen  
Hochschule in Zürich

zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte

**PROMOTIONSARBEIT**

vorgelegt von

**PAUL MÜLLER**

dipl. Naturwissenschaftler  
von St. Gallen

Referent: Herr Prof. T. O. Wikén

Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Frey-Wyssling

Juris-Verlag Zürich  
1957

Leer - Vide - Empty

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	6
I. WACHSTUMSVERSUCHE	8
A. Methodik	8
1. Pilzmaterial und Nährlösung	8
2. Impf- und Erntemethoden	9
3. Analysenmethoden	10
a) Glucose	10
b) Weinsäure	10
c) Ketosäuren	10
d) Papierchromatographische Untersuchung organischer Säuren	11
B. Versuche und Resultate	13
1. Die Aneurinheterotrophie von <u>Marasmius putillus</u>	13
2. Das Wachstum in Ruhe- und Schüttelkultur	14
3. Das Wachstum in Ruhekulturen	18
4. Ketosäuren im Kultursubstrat von <u>Marasmius putillus</u>	20
5. Papierchromatographischer Nachweis saurer Stoff- wechselprodukte	22
C. Diskussion der Wachstumsversuche	23
II. ATMUNGSVERSUCHE	26
A. Methodik	26
B. Versuche und Resultate	28
1. Die Atmung von verschieden altem Myzel	28
2. Versuche zur Bestimmung und Erniedrigung der endogenen Atmung	32
3. Der Einfluss der Glucosekonzentration auf das Wachstum und die Atmung	37
4. Der Einfluss des pH auf die Veratmung der Glucose	43
5. Die spezifische O <sub>2</sub> -Aufnahme auf organischen Säuren	44
a) Organische Säuren ausser Fettsäuren	44
b) Fettsäuren	49
c) Der Einfluss des pH auf die Veratmung von Essig- säure und Zitronensäure	52

	Seite
6. Versuche mit Inhibitoren des Glucoseabbaues	52
a) Natriumarsenit	52
b) Natriumfluorid	53
c) 2,4-Dinitrophenol	54
d) Monojodessigsäure	55
e) Malonsäure	56
f) Blausäure	57
7. Prüfung des Atmungssubstrates auf saure Stoffwechselprodukte	58
C. Diskussion der Atmungsversuche	59
ZUSAMMENFASSUNG	64
LITERATURVERZEICHNIS	66

## VORWORT

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt. Herrn Prof. T. O. Wikén, Vorstand dieses Institutes, danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die zahlreichen Ratschläge, sowie für die tatkräftige Unterstützung meiner Versuche.

Diese Untersuchungen gehören in den Rahmen der Studien über die Physiologie der streuezersetzenden Pilze, welche aus dem Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung unterstützt werden. Den zuständigen Behörden bin ich sehr zu Dank verpflichtet.

Auch den Mitarbeitern des Institutes danke ich herzlich für die wertvollen Ratschläge und den Angestellten für die praktische Hilfe.

## EINLEITUNG

Untersuchungen über die Physiologie der Pilze stossen nicht nur deshalb auf Interesse, weil eine grosse Anzahl Pilze eine industrielle Verwendung findet und als Krankheitserreger von Pflanzen und Tieren von Bedeutung ist, sondern auch wegen ihrer Fähigkeit, polymere Stoffe abzubauen. Für die Humus- und Bodenbildung ist die Zersetzung der Zellwandbestandteile von totem Pflanzenmaterial von grosser Wichtigkeit. Speziell das gegen Bakterien und niedere Pilze widerstandsfähige Lignin wird von verschiedenen bodenbewohnenden Basidiomyceten angegriffen (siehe Uebersicht bei Gottlieb und Pelczar 1951). Zu diesen gehören nach Untersuchungen von Lindeberg (1944) auch die Pilze der Gattung *Marasmius*. Aus Arbeiten am hiesigen Institut (Stöckli 1952, Reusser 1956) geht hervor, dass *Marasmius putillus* befähigt ist, in gewissen Streuematerialien Zellulose, Hemizellulose und Lignin abzubauen. Morphologische Untersuchungen im Elektronenmikroskop ergaben eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Abbaues der verschiedenen Zellwandbestandteile von der Art der Holzvermorschungspilze (Meier 1955).

Einer Zusammenstellung von Literatur bei Jennison et al. (1955) betreffend die Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, sowie den Sauerstoff- und Wuchsstoffbedarf streuezeretzender Pilze in vollsynthetischen Medien, ist zu entnehmen, dass im Vergleich zu den niederen Pilzen nur wenige diesbezügliche Untersuchungen vorliegen. Nach Reusser (1956) ist *Marasmius putillus* aneurinheterotroph. Das gleiche fand Sulzer (1955) bei einem Stamm von *Marasmius oreades*. Bezüglich dem Stickstoffbedarf gehört *Marasmius oreades* wie *Marasmius putillus* (Lindeberg 1944) zu den Pilzen, die nur Ammonstickstoff und eine Reihe Aminosäuren verwerten können, während Nitrate als Stickstoffquelle nicht in Frage kommen.

Die Vernachlässigung der Physiologie speziell der höheren Pilze mag einerseits darin begründet sein, dass diesen Organismen bis jetzt noch keine Wichtigkeit in Industrie und Medizin zukommt, andererseits ist diese Tatsache auf experimentelle Schwierigkeiten zurückzuführen (Gray und Bushnell 1955). Als solche sind bei der Untersuchung des Stoffwechsels höherer Pilze in die Wege stellenden Schwierigkeiten in erster Linie die folgenden anzuführen: Die verwertbaren Kohlenstoffquellen werden ausschliesslich in CO<sub>2</sub> und Zellsubstanzen übergeführt, und erfassbare Mengen an Dissimilationsprodukten werden, wenn überhaupt, nur dann ausgeschieden, wenn eine überreichliche Versorgung mit Kohlehydraten besteht. Unter diesen Umständen ist es fraglich, ob die gleichen Dissimilationsmechanismen fungieren wie in natürlichen Verhältnissen, oder ob ein anormaler Stoffwech-

sel vorliegt (Foster 1949). Wegen der hohen endogenen Atmung, die eine Interpretation der  $O_2$ -Aufnahme und  $CO_2$ -Abgabe bei Respirationsversuchen erschwert, sind die Pilze als Objekt für Stoffwechseluntersuchungen weniger gut geeignet als Bakterien und Hefen. Die Pilzmyzelien enthalten grosse Mengen an Reservestoffen, was zur Folge hat, dass nur kleine Bezirke in der Zelle respiratorisch aktiv sind. Dies bewirkt wiederum nicht nur, dass die intakten Zellen eine kleine spezifische Sauerstoffaufnahme besitzen, sondern auch, dass die üblichen Methoden zur Beseitigung der Permeabilitätsschranken der Zellmembran durch Herstellen zellfreier Extrakte zu unbefriedigenden Ergebnissen führen (siehe Zusammenstellung der Methoden bei Hugo 1954).

Es ist daher noch eine offene Frage, welche der bei Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen etc. aufgedeckten Dissimilationsmechanismen bei höheren Pilzen Geltung haben. In den zusammenfassenden Darstellungen der Stoffwechselvorgänge bei Mikroorganismen von Martius und Lynen (1950), Aji (1951), Krebs (1954b), Ochoa (1954), Stumpf (1954), Gunsalus, Horecker und Wood (1955), Wood, W. A. (1955), Kluyver und van Niel (1956) sind keine Ergebnisse betreffend höhere Pilze aufgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung der Impfmethode mit Myzelsuspensionen nach Wikén, Keller, Schelling und Stöckli (1951) das Wachstum von Marasmius putillus in einem vollsynthetischen Substrat untersucht. Vor allem der Einfluss des Schüttelns der Kulturen stand im Vordergrund des Interesses, da das Myzel der Pilze in seiner Entwicklung von guter Sauerstoffzufuhr abhängig ist (Wikén und Som m 1952). Im weitem war die Frage des Ausscheidens saurer Stoffwechselprodukte ins Substrat, sowohl in Ruhe- wie in Schüttelkulturen, Gegenstand dieser Untersuchungen. Aus den Resultaten der Veratmung verschiedener organischer Säuren und der Wirkung spezifischer Inhibitoren auf die Atmung sollten Anhaltspunkte darüber gewonnen werden, ob der Tricarbonsäurezyklus das Hauptschema für die oxydative Dissimilation der Glucose bei Marasmius putillus darstellt.

## I. WACHSTUMSVERSUCHE

---

### A. Methodik

#### 1. Pilzmaterial und Nährlösung

Marasmius putillus (Fr. ex Fr.)Fr., wie auch ein Stamm von Marasmius foetidus (Sow. ex Fr.)Fr., der gelegentlich zu Vergleichszwecken verwendet wurde, stammen vom "Centraalbureau voor Schimmelcultures" in Baarn (Holland).

Die Weiterzüchtung der Stammkulturen erfolgte auf Bierwürzeagar. Die in allen Versuchen verwendete Nährlösung entsprach bis auf geringfügige Abweichungen dem von Lindeberg (1944) angegebenen Substrat "B", das sich für die Züchtung von Marasmien als geeignet erwiesen hat.

Zusammensetzung des Substrates B:

d(+)-Glucose, vitaminfrei	20,0 g
Diammoniumtartrat	5,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	4,8 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4,4 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	9,9 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	109,5 mg
dest. Wasser	ad 1000 ml

Ferner wurde das Substrat B nach Lindeberg durch folgende Wuchsstoffzusätze ergänzt:

Aneurin	40 $\gamma$ /l
Adermin	1 mg/l

Die d(+)-Glucose und die Wuchsstoffe waren Präparate der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel; Diammoniumtartrat war ein Analar-Produkt der British Drug House Ltd., London, und die Mineralsalze, alle von "p.a."-Qualität, stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt.

Als Kulturgefäße dienten 100 ml Erlenmeyerkolben oder 1500 ml Fernbachkolben aus Jenaer Geräteglas 20, die nach Angabe von Wikén und Oebloom (1947) gereinigt wurden. Die mit 25, resp. 350 ml Substrat beschickten Kolben wurden mit Stopfen aus entfetteter Watte verschlossen und während 15 Minuten bei 1 atü auto-

klaviert. Beim Sterilisieren des Substrates als Ganzes trat eine bräunliche Verfärbung auf. Doch wie Reusser (1956) nachwies, war dies ohne Einfluss auf das Pilzwachstum, weshalb auf ein separates Autoklavieren der Glucose, der Wachstoffsäure und der Mineralsalze verzichtet werden konnte. Der pH-Wert nach dem Autoklavieren betrug 5,3 - 5,5.

## 2. Impf- und Erntemethoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Wikén, Keller, Schelling und Stöckli (1951) beschriebene Methodik zur Herstellung einer homogenen Myzelsuspension angewandt. Die Myzeldecken aus 15 - 20 Tage alten Ruhekulturen wurden nach dem Waschen mit sterilem Wasser in die Glasflasche mit Glaskugeln gegeben und von Hand geschüttelt. Für die Dauer des Schüttelns sind 2 Faktoren bestimmend: Einerseits werden bei langem Schütteln die Hyphen stark geschädigt; die Zellfragmente sind zu klein um wieder wachsen zu können. Andererseits muss die Decke in kleine Stücke zerrissen werden, weil grosse Klumpen von Impfmyzel in der Schüttelkultur zu schnell wachsen und grosse Kugeln bilden. Eine Schütteldauer von 2 Minuten genügte, da anschliessend die Myzelsuspension durch einen Seitzfilter filtriert wurde, dessen Asbestschicht durch ein Nylonnetz von 0,5 mm Maschenweite ersetzt war. Die solchermassen von grösseren Myzelklumpen befreite Impfsuspension wurde in 1 ml Portionen auf die Kulturgefässe verteilt. Diese Impfmenge enthielt 0,3 - 0,5 mg Trockensubstanz.

Die Bebrütung der Kolben erfolgte im Dunkeln bei 20° C zum Teil als Schüttel-, zum Teil als Ruhekultur. Die Kolben der Schüttelkultur wurden in Metallbechern auf einer karussellartigen Schüttelmaschine mit 4 übereinanderliegenden Gestellen befestigt. Die Frequenz betrug 55-60 Hin- und Herbewegungen pro Minute bei einer Amplitude von 15 cm.

Zur Bestimmung des Myzeltrockengewichts (MTG) wurde der Inhalt eines Kulturkolbens durch eine Porzellannutsche mit feinmaschigem Kupferdrahtnetz gesaugt. Mit einem Gummistopfen von entsprechender Grösse wurde das Myzel auf dem Kupferdrahtsieb sorgfältig ausgepresst und darauf mit dest. Wasser gewaschen. Das aufgequollene Myzel wurde sodann erneut ausgepresst. Nach dreimaligem Waschen konnte das am Gummistopfen klebende Myzel mit einem Spatel abgelöst werden. Die Trocknung erfolgte in einer Petrischale mit Filtrierpapier bei einer Temperatur von 100-105° C während 40 Stunden. Nach dem Abkühlen in einem Exsikkator wurde das getrocknete Myzel mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,2$  mg gewogen.

### 3. Analysenmethoden

Das von Myzel befreite Substrat wurde, wenn nicht unmittelbar anschliessend analysiert, unverdünnt oder mit dem Waschwasser vereinigt im Kühlraum bei 0° C aufbewahrt. Die pH-Messung erfolgte elektrometrisch mit Hilfe einer Glaselektrode auf eine Genauigkeit von  $\pm 0,02$  Einheiten.

#### a) Glucose

Die Bestimmung der Glucose erfolgte nach der kupferjodometrischen Halbmikromethode von Stiles, Peterson und Fred (1926), wobei die analysierten Proben 0,2 - 2 mg reduzierenden Zucker enthielten.

#### b) Weinsäure

Um festzustellen, ob das als N-Quelle benützte Diammontartrat vom Pilz auch als C-Quelle verwendet werden kann, wurde die Weinsäure im Substrat nach der von Woodman (1941) angegebenen Methode als saures Kaliumtartrat gefällt. Um den Fehler, der infolge der unvollständigen Fällung des Kaliumtartrats entsteht, zu verringern, wurden den 5 ml Substratproben mit maximal 25 mg Diammontartrat 5 ml einer Lösung zugesetzt, die 175 mg Diammontartrat enthielten. Die Probe wurde in einem 50 ml Becherglas mit 0,4 ml Eisessig angesäuert und mit 1,5 g KCl und 5 ml Aethanol versetzt. Nach 24-stündigem Stehenlassen bei 0° C wurde der Niederschlag in heissem Wasser gelöst und mit 0,05 n NaOH auf Phenolphthalein titriert. Anhand von Standardlösungen wurde ein Korrekturfaktor bestimmt für die nicht erfassten Weinsäuremengen. Die Genauigkeit der Bestimmungen betrug  $\pm 2\%$ .

#### c) Ketosäuren

Für die quantitative Bestimmung von Ketosäuren wurde die kolorimetrische Methode von Friedemann und Haugen (1943) benützt. Proben von 3 ml mit 5-30  $\mu$ g Ketosäuren wurden mit 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung versetzt, die gebildeten Hydrazone mit Aethylacetat extrahiert und dann in 10 %ige Sodalösung aufgenommen. Die beim Zugeben der Sodalösung zu 1,5 n NaOH auftretende rotbraune Farbe verblasste mit der Zeit. Die Absorption bei 520 m $\mu$  wurde deshalb nach genau 8 Min. im Beckmann-Spektrophotometer gemessen. Genauigkeit bei 3 Parallelbestimmungen:  $\pm 1\%$ .

Mit Hilfe der Papierchromatographie erfolgte die Trennung der einzelnen Ketosäuren und deren qualitative Bestimmung auf Grund ihres R<sub>f</sub>-Wertes. Da im Substrat verschiedene Verbindungen ausser Ketosäuren mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

reagierten, wurde die Extraktionsmethode von El Hawary und Thompson (1953) angewendet, wie sie bei Moses (1955) beschrieben ist. Die als Flecken von 1 cm Durchmesser auf Whatman-Papier Nr. 3 aufgetragenen Hydrazone waren in 3 %igem Ammoniak gelöst. Als Lösungsmittel diente n-Butanol, gesättigt mit 3 %igem, wässrigem Ammoniak, wie es Cavallini et al. (1949) angeben. Daneben kam noch eine weitere papierchromatographische Methode zur Anwendung, mit welcher Virtanen et al. (1953) Ketosäuren in grünen Pflanzen bestimmten. Die Hydrazone der freien Säuren liefen auf Whatman-Papier Nr. 1 in Glycin-NaCl-Puffer nach Sörensen von pH 8,4. Die Atmosphäre im Chromatographiergefäß war mit Phenol und HCN gesättigt. Die Temperatur konnte nicht konstant gehalten werden, sie schwankte zwischen 18 und 24<sup>o</sup> C. Die Laufzeit betrug 6 Stunden. Anhand der gelben Flecken der 2,4-Dinitrophenylhydrazone konnte die Position der Säuren direkt abgelesen werden und auf ihre Identität mit gleichzeitig mitgelaufenen Testsubstanzen geschlossen werden.

#### d) Papierchromatographische Untersuchung organischer Säuren

Saure Stoffwechselprodukte wurden dem Substrat durch kontinuierliche Aetherextraktion in der Apparatur nach Kutscher-Steudel entzogen. 1 l vom Myzel abgepresste Kulturflüssigkeit wurde mit 30 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert und während 75 Stunden mit 750 ml Aether extrahiert. Einerseits wurde diese Aetherlösung direkt chromatographiert, andererseits wurde der Aether nach Trocknung mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> am Vakuum abgedampft, wobei ein dunkelbrauner, öliges Rückstand erhalten wurde, aus dem sich nach längerem Stehen oft Nadeln auskristallisierten.

Die Entfernung von bei der Papierchromatographie störenden Stoffen, wie anorganische Salze, Glucose, Pigmente etc. wurde auch dadurch erreicht, dass die organischen Säuren aus dem Substrat an Amberlite adsorbiert wurden und nachfolgend mit Ammoncarbonat wieder eluiert. Die Präparierung der Ionenaustauschersäule geschah folgendermassen: Amberlite IRA 400 wurde mit 1,0 n Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Wasser und 0,1 n HCl gewaschen und nach dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur in 0,1 n Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> über Nacht stehen gelassen. Dann wurde viermal mit Wasser gewaschen und das Harz in einer Glasfritte trocken gesaugt. Davon wurden 5 g abgewogen, in Wasser suspendiert und in ein Chromatographierrohr mit einem Durchmesser von 0,8 cm eingefüllt. Es resultierte eine Säule von 16 cm Länge, die nach dem Durchlaufen von 1 l 0,1 n Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit Wasser neutral gewaschen wurde.

50 ml Substrat wurden durch die Kolonne perkoliert gelassen, wobei das pH 4 oder einen tieferen Wert aufwies, damit die Säuren adsorbiert werden konnten. Nach dem Durchspülen mit 50 ml Wasser wurden die Säuren mit 1,0 n Alkalicarbonat wieder eluiert und in 20 ml Portionen aufgefangen bei einer Durchlaufgeschwindigkeit

von 3 ml/min. Nach Bryant und Overell (1953) eignet sich 1,0 n  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  gut als Eluiermittel, da es nachfolgend durch Eindampfen des Eluates im Exsikkator über konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  am Vakuum entfernt werden kann. Gemäss Angaben dieser Autoren adsorbiert eine Kolonne aus 5 g Amberlite IRA 400 je 50 mg von 3 organischen Säuren, z. B. Zitronen-, Aepfel- und Bernsteinsäure. Die Säuren werden quantitativ wieder eluiert, ausser Bernsteinsäure, die nur zu 90 % zurückgewonnen wird.

Die Eluiergeschwindigkeit wurde mit Oxalsäure- und Zitronensäurelösungen bestimmt. Die quantitative Bestimmung der Oxalsäure im Eluat erfolgte durch Titration mit 0,1 n  $\text{KMnO}_4$  bei  $80^\circ\text{C}$  unter Zusatz von 5 ml verd.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:8). Für die Zitronensäure wurde die Methode nach Godet und Charrière (1946) verwendet, die auf der Oxydation der Zitronensäure zu Aceton mit Hilfe von  $\text{KMnO}_4$  beruht. Das entstandene Aceton wurde nach der von Aebi (1951) modifizierten Goodwin'schen Methode jodometrisch bestimmt. Nach dem Auftragen der Säurelösung auf die Ionenaustauschersäule wurde mit 80 ml Wasser nachgespült und dann mit 1,0 n  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  eluiert unter Auffangen von 20 ml Portionen. So konnten 98 % der aufgetragenen Oxalsäure in den 2 ersten Fraktionen bestimmt werden, während 95 % der Zitronensäure in den 3 ersten enthalten waren. Dies zeigt, dass mit 60 ml 1,0 n  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  die ganze eluierbare Säuremenge zurückgewonnen werden kann. Zur Regenerierung der Amberlitesäule wurde mit 250 ml 0,1 n  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  durchgespült. Nachher genügten 500 ml Wasser, um alles Alkali wieder auszuwaschen.

Die  $\text{NH}_4$ -Salze der organischen Säuren wurden in soviel Wasser aufgenommen, dass eine 1 %ige Lösung resultierte, wovon  $4\text{ mm}^3$  mittels der "Agl-Micrometersyringe" auf Whatman-Papier Nr. 1 aufgetragen wurden und über Nacht absteigend chromatographiert. Als Lösungsmittel diente n-Butanol (40 Volumen-%), 98 %ige Ameisensäure (10 Volumen-%) und Wasser (50 Volumen-%) (Lugg und Overell 1947). Nach mehrstündigem Trocknen im Luftstrom bei Zimmertemperatur wurde das Papier mit alkoholischer 0,04 %iger Bromkresolgrünlösung besprüht, gemäss den Angaben von Schweppe (1955). Die erhaltenen  $R_f$ -Werte wurden mit denjenigen von Testsubstanzen verglichen, die in gleicher Weise vorbehandelt worden waren, d. h. auch zuerst am Ionenaustauscher adsorbiert und dann als  $\text{NH}_4$ -Salz eluiert worden waren. Die freien Säuren in der Aetherlösung wurden auch auf Whatman-Papier Nr. 1 chromatographiert mit dem Butanol-Ameisensäure-Wasser-Gemisch und bei unbekannter Konzentration in verschiedenen Mengen nebeneinander auf das Papier aufgetragen bei Verdampfung des Lösungsmittels unter der Infrarot-Lampe.

## B. Versuche und Resultate

### 1. Die Aneurinheterotrophie von *Marasmius putillus*

Viele höhere Pilze benötigen für ihr Wachstum auf einem vollsynthetischen Substrat Aneurin als Wuchsstoff (Fries 1950). Der Wuchsstoffbedarf von *Marasmius putillus* und *Marasmius foetidus* war Gegenstand einer Arbeit von Reusser (1956). Die beiden Pilzstämme erwiesen sich als ausgesprochen aneurinheterotroph, wobei bei *Marasmius putillus* ausserdem Adermin und p-Aminobenzoesäure auf das Wachstum stimulierend wirkten. Sulzer (1955) fand bei *Marasmius oreades*, dass Aneurin als notwendiger Wuchsstoff im synthetischen Substrat durch keine andere Verbindung ersetzt werden kann, obwohl einzelne Purin- und Pyrimidinkörper eine Wachstumsstimulierung bewirkten.

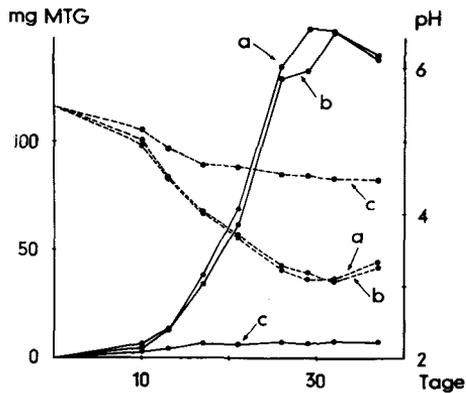


Fig. 1. Die Wirkung von Aneurin und Aneurin + Adermin auf das Wachstum von *Marasmius putillus* in Schüttelkultur

Wachstumskurve: ———, pH-Verlauf: - - - - , a: Substrat B mit Zusatz von 40  $\gamma$  /l Aneurin+ 1 mg/l Adermin, b: Substrat B mit Zusatz von 40  $\gamma$  /l Aneurin, c: Substrat B ohne Wuchsstoffzusatz

Eine Prüfung der Wirkung von Aneurin und des Wuchsstoffgemisches Aneurin+ Adermin auf das Wachstum von *Marasmius putillus* in Schüttelkultur bestätigte die erhaltenen Ergebnisse von Reusser (1956), allerdings verzeichnete Adermin nur

eine kleine Stimulierung der Wachstumsgeschwindigkeit, und die erreichbaren maximalen MTG waren gleich gross. Die Wachstumskurven in Fig. 1 zeigen, dass ohne Wuchsstoffzusatz das Wachstum sehr gering war; die kleine Zunahme an MTG war auf Grund der mit dem Impfmyzel eingeschleppten Wuchsstoffe möglich. Diese geringe Myzelmenge entwickelte eine relativ grosse Atmungstätigkeit, worauf das Sinken des pH hinweist.

## 2. Das Wachstum in Ruhe- und Schüttelkultur

Die Versuchsanlage für Wachstumsversuche mit Pilzen und die Auswertung der Wachstumskurven ist in Arbeiten von Schelling (1952), Keller (1952) und S o m m (1953) ausführlich dargelegt. Die 100 ml Erlenmeyerkolben enthielten gleichzeitig zubereitetes Substrat und waren mit Impfmateriale von der gleichen Myzelsuspension inokuliert. Es wurden soviele Kolben inkubiert, dass zu mindestens 10 verschiedenen Zeiten jeweils 3 Kolben für die Bestimmung des MTG geerntet werden konnten. Das von Myzel befreite Substrat der 3 Kolben wurde zusammen mit dem Waschwasser auf 100 ml ergänzt und diente zur Bestimmung des pH-Wertes, der titrierbaren Säuren, des Glucose-, Weinsäure- und Ketosäuregehaltes.

Wie aus Fig. 2 hervorgeht, ist das Wachstum in Schüttelkulturen durch eine verkürzte Induktionsperiode gekennzeichnet. Der Uebergang von der "lag phase" zur Phase des geradlinigen Wachstums geht nicht allmählich vor sich wie in Ruhekultur. Die Wachstumsgeschwindigkeit in Schüttelkultur zwischen dem 8. und 20. Tage beträgt  $k = 6,8$  mg MTG/T\*. Die entsprechende Ruhekultur weist zwischen dem 16. und 30. Tage ein  $k = 5,9$  auf.

Die in diesem Versuch festgestellte Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit um das 1,15-fache ist sehr gering im Vergleich mit dem beim Mykorrhizabildner Mycelium Radicis atrovirens von S o m m (1953) erhaltenen Wert. Für Schüttelkultur wird  $k = 32,5$ , für Ruhekultur  $k = 14,0$  angegeben, was eine Erhöhung um das 2,32-fache ergibt.

Das in verschiedenen Versuchen mit Marasmius putillus erreichbare maximale MTG lag in Ruhekulturen nie unter den in Schüttelkulturen bestimmten Werten. Ein konstantes Verhältnis der mit den beiden Züchtungsverfahren erzielbaren Höchstausbauten liess sich nicht finden; es war vielmehr beträchtlichen Schwankungen unterworfen, deren Ursache vorwiegend der ungleichen Menge und Beschaffenheit des

---

\* berechnet nach der Formel:  $k = \frac{MTG_{20} - MTG_8}{20 - 8}$

Tabelle 1

Daten zum Wachstumsversuch mit Marasmius putillus in Ruhe- und Schüttelkultur (vgl. Fig. 2 und 3)

Myzelalter in Tagen	MTG in mg	pH	Titrierbare Säure in ml 0,1 n NaOH / Kolben	Weinsäure in mg/ Kolben*	Ketosäuren in mg/ Kolben**	Glucose in mg/ Kolben	Oekonomischer Koeffizient
<b>a. Ruhekultur</b>							
0	-	5,50	2,41	5,00	-	496	-
8	5,2 ± 0,3	5,21	3,33	-	0,07	483	43,4
11	9,8 ± 0,5	4,85	3,61	-	1,73	468	35,3
14	15,3 ± 1,3	4,70	4,08	4,94	0,57	414	18,8
16	22,3 ± 0,6	4,36	4,96	-	1,87	386	20,4
18	37,4 ± 3,5	3,78	7,76	4,96	6,03	318	21,0
20	48,9 ± 0,7	3,36	10,33	-	5,72	244	18,3
22	55,2 ± 1,8	3,36	10,75	-	10,22	169	16,9
25	76,0 ± 2,7	3,30	11,43	4,50	8,98	109	19,6
28	89,3 ± 2,1	3,39	10,67	-	3,62	43	19,7
30	105,5 ± 2,1	3,47	10,63	-	3,52	19	22,1
32	104,8 ± 2,4	3,68	8,51	4,50	0,68	4	21,3
34	92,3 ± 3,0	3,84	7,79	-	0,39	4	18,8
37	80,6 ± 3,4	3,82	-	-	-	-	-
40	71,5 ± 3,7	3,94	6,23	4,36	-	-	-
<b>b. Schüttelkultur</b>							
0	-	5,50	2,41	5,50	-	496	-
8	13,0 ± 0,6	4,78	3,77	-	0,40	449	27,8
11	35,5 ± 3,0	3,98	6,29	-	3,03	361	31,8
14	53,4 ± 2,4	3,33	-	4,96	9,10	219	19,3
16	64,8 ± 6,4	3,19	12,04	-	5,53	167	19,7
18	79,5 ± 6,2	3,08	13,05	4,50	9,44	85	19,4
20	94,7 ± 2,5	3,24	11,65	-	2,74	42	20,8
22	98,0 ± 7,5	3,49	9,65	-	0,98	5	20,0
25	92,2 ± 9,9	3,78	7,55	4,22	0,13	5	23,3
28	62,4 ± 4,5	3,99	6,73	-	0,10	-	-
32	55,8 ± 2,4	4,08	6,21	4,35	-	-	-
<b>c. Zusatz von 250 mg Glucose/Kolben zum alten Substrat mit 20 Tage altem Myzel</b>							
20	94,7 ± 2,5	3,24	11,65	-	2,74	315	-
22	84,6 ± 2,0	3,42	11,28	-	1,90	236	15,4
25	143,4 ± 2,2	3,25	11,55	4,45	2,83	92	21,2
28	161,9 ± 1,1	3,35	10,44	-	0,22	5	21,2
32	111,1 ± 7,0	3,77	7,84	4,35	0,14	5	14,5

Fortsetzung s. S. 16

Tab. 1 (Fortsetzung)

Myzelalter in Tagen	MTG in mg	pH	Titrierbare Säure in ml 0,1 n NaOH / Kolben	Weinsäure in mg/ Kolben*	Ketosäuren in mg/ Kolben**	Glucose in mg/ Kolben	Oekonomischer Koeffizient
d. 20 Tage altes Myzel in Phosphatpuffer mit 250 mg Glucose							
20	94,7 ± 2,5	4,50	9,14	-	-	273	-
22	95,9 ± 6,5	3,69	10,44	-	Spur	176	16,2
25	124,9 ± 7,3	3,28	10,95	-	0,50	64	17,7
28	121,0 ± 9,0	3,24	11,76	-	0,25	5	15,8
32	94,0 ± 5,0	4,25	9,79	-	0,09	22	12,2
e. 20 Tage altes Myzel in Posphatpuffer ohne Glucose							
20	94,7 ± 2,5	4,50	9,14	-	-	-	-
22	72,3 ± 1,4	4,64	10,03	-	Spur	-	-
25	68,4 ± 0,2	4,63	9,93	-	Spur	-	-
28	59,8 ± 0,9	4,66	9,93	-	-	-	-
32	50,9 ± 1,8	5,13	9,45	-	-	-	-

\* Weinsäure ausgedrückt in Diammontartrat

\*\* Ketosäuren berechnet als Brenztraubensäure

Alle Kolben waren mit der gleichen Myzelsuspension geimpft. Das Impfmyzel war 21 Tage alt.

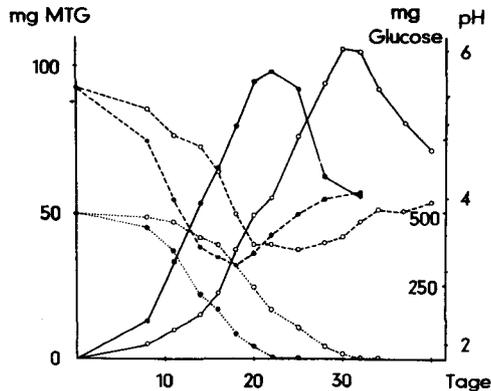
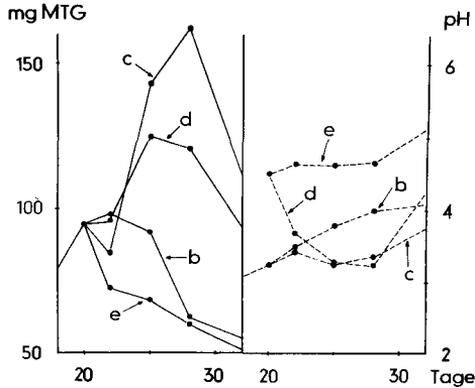


Fig. 2. Vergleich des Wachstums in Schüttel- und Ruhekultur

Schüttelkultur: ● , Ruhekultur: ○ , Wachstumskurve: ———— , pH-Verlauf: - - - - , Glucosegehalt pro Kulturkolben: - - - - -



**Fig. 3.** Wachstum von 20 Tage altem Myzel aus Schüttelkulturen in verschiedenen Substraten

Wachstumskurve: ———, pH-Verlauf: — — —, b: ursprüngliches Substrat (Kurve aus Fig. 2.) c: ursprüngliches Substrat + 250 mg Glucose, d: 0,05 m Phosphatpuffer + 250 mg Glucose, e: 0,05 m Phosphatpuffer

Impfmyzels zuzuschreiben ist. In Tab. 1 sind in der letzten Kolonne die ökonomischen Koeffizienten nach Pfeffer angegeben, die die Menge gebildeten Myzels pro 100 mg verbrauchter Glucose ausdrücken. Man könnte annehmen, dass in submersen Schüttelkulturen der ökonomische Koeffizient positiv beeinflusst würde, indem Gärungen unterbunden werden durch die weitgehende Beseitigung anaerober Verhältnisse, wie sie in der Pilzdecke der Ruhekultur vorkommen. Die stets höhere Ausbeute an Myzel in den Ruhekulturen zeigt aber, dass hier ein grösserer Prozentsatz der C-Quelle in Zellsubstanz verwandelt wurde, was auf die Tendenz hindeutet, dass durch bessere Versorgung des Myzels mit  $O_2$  mehr Glucose veratmet wird.

Die Züchtung in Schüttelkultur verursachte keine vermehrte Ausscheidung von sauren Stoffwechselprodukten in das Substrat, wie es bei verschiedenen Schimmelpilzen der Fall ist. Wie Fig. 2 zeigt, war der Verlauf des pH bei den beiden Züchtungsarten im wesentlichen gleich. In beiden Fällen trat das pH-Minimum einige Tage vor dem Erreichen des maximalen MTG auf. Die gesamte Menge an titrierbarer Säure war in Ruhekultur gleich gross wie in Schüttelkultur; letztere verzeichnete jedoch grössere maximale Werte, gemäss deren grösseren physiologischen Aktivität. Die im Verlauf des Wachstums ausgeschiedenen Säuren, wie Ketosäuren (siehe Tab. 1 ,

Kolonne 6) wurden bei Verarmung des Substrates an Glucose weiter verwertet. Wie aus den Analysendaten hervorgeht, scheint die Weinsäure hingegen nur zu einem geringen Teil als C-Quelle benützt worden zu sein. Offenbar war deshalb der Anstieg des pH in der Autolysephase relativ gering; der ursprüngliche Wert von 5,5 zur Zeit der Inkubation wurde nicht mehr erreicht. In einer 72 Tage alten Kultur betrug der pH-Wert 4,22.

Der Zeitpunkt des Erreichens des maximalen MTG fiel, ausgeprägt in der Schüttelkultur, mit dem Verschwinden der Glucose im Substrat zusammen.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob daneben noch andere Faktoren für die Begrenzung des Wachstums massgebend seien. 12 Kolben einer 20 Tage alten Schüttelkultur erhielten je 1 ml steriler 25 %iger Glucose-Lösung zugefügt. Daneben wurde in 24 weiteren Kolben das alte Substrat, nach dreimaligem Waschen der Myzelkugeln mit sterilem Wasser, durch 20 ml 0,05 n Phosphatpuffer vom pH 4,5 ersetzt. Die Hälfte dieser Kolben wurde mit je 1 ml steriler 25 %iger Glucose-Lösung versetzt. Die Myzelien im Phosphatpuffer dienen der Bestimmung der oxidativen Assimilation, worunter Stout und Koffler (1951) die aerobe Assimilation einer C-Quelle in Abwesenheit von Stickstoffverbindungen verstehen.

Da in dem 20 Tage alten Substrat der Glucosegehalt noch nicht auf 0 gesunken war, wie aus Tab. 1 und Fig. 3 ersichtlich ist, lassen sich die durch die zugefügten 250 mg Glucose bewirkten MTG-Zunahmen in den beiden Substraten nicht quantitativ miteinander vergleichen. Immerhin kann festgestellt werden, dass ein grosser Teil der C-Quelle als Reservestoffe gespeichert wurde, wie sich aus der Differenz der MTG der Kulturen d und e ergibt. Die noch grössere Zunahme an MTG im ursprünglichen Substrat (Differenz der Werte der Kurven c und b) beweist, dass durch Zusatz von Glucose zum alten Substrat neben Speicherung auch Wachstum ermöglicht wurde. Das eigentümliche Sinken der Kurve c bis zum 22. Tage müsste durch weitere Versuche gesichert werden, um auf eine Induktionsperiode zu schliessen. Anhand der pH-Werte und Ketosäuren-Bestimmungen lässt sich zeigen, dass keine sauren Stoffwechselprodukte mehr ausgeschieden wurden.

### 3. Das Wachstum in Ruhekulturen

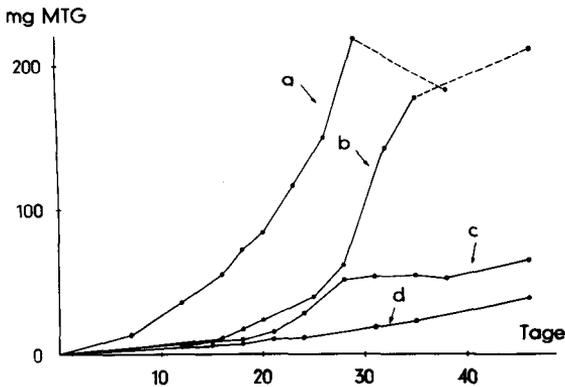
In den Ruhekulturen des vorangegangenen Versuches wurde festgestellt, dass die Bildung grosser Myzelmengen von gutem Oberflächenwachstum abhängt. In der obersten Schicht der Kulturflüssigkeit bildet sich eine dichte, weisse Pilzdecke, während das submerse Myzel schleimig, grau bis bräunlich aussieht. Im Mikroskop erscheint letzteres viel durchsichtiger, die Zellgranula treten deutlicher hervor als

in dem Oberflächenmyzel, dessen Zellwände vermutlich durch vermehrte Chitineinlagerungen verstärkt sind (über Chitin in den Pilzzellwänden siehe Frey 1950). Oft kommt es zur Ausbildung eines Luftmyzels, eines fleischigen, strauchartigen Gebildes von bis zu 8 mm Höhe, in welchem die einzelnen Myzelfäden sehr kompakt miteinander verflochten sind.

Zur Messung des Wachstums von oberflächlichem und submersen Myzel wurden 300 ml Erlenmeyerkolben mit Agarstückmyzel beimpft. Die Vorzüchtung des Impfmyzels geschah in Plattenkultur auf Bierwürzeagar. Von der kreisförmigen Kolonie mit einem Durchmesser von ca. 5 cm wurde nur Myzel der Randzone in Agarstückchen von 1 cm<sup>2</sup> Grösse herausgeschnitten (vergl. Schelling 1952).

Es kamen folgende 4 Versuchsanlagen zur Anwendung:

- a) 50 ml Substrat B, Impfmyzel an der Oberfläche der Flüssigkeit (auf einem 1 cm hohen Glaszylinder)
- b) 50 ml Substrat B, Impfmyzel submers
- c) 50 ml Substrat B, Impfmyzel submers, Kolben mit Gummistopfen verschlossen
- d) 250 ml Substrat B, Impfmyzel submers



**Fig. 4.** Wachstum von Ruhekulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben nach Impfung mit Agarstückmyzel

a: Impfmyzel an der Oberfläche von 50 ml Substrat B, b: Impfmyzel submers in 50 ml Substrat B, c: Impfmyzel submers in 50 ml Substrat B, Kolben mit Gummistopfen verschlossen, d: Impfmyzel submers in 250 ml Substrat B

Aus Fig. 4 geht hervor, dass sich submerses Myzel wesentlich langsamer entwickelte als Oberflächenmyzel. Kurve b (submers geimpfte Kulturen) wird steiler, je mehr das Myzel gegen die Oberfläche der Flüssigkeit hinauf wuchs. Nach ca. 28 Tagen setzte starkes Oberflächenwachstum ein mit gleicher Geschwindigkeit der Zunahme an MTG wie bei oberflächlicher Impfung. Diese Phase des raschen Wachstums blieb in den Kolben aus, die mit Gummistopfen anaerob verschlossen worden waren. Der deutliche Knick, den Kurve c am 27. Tage aufweist, zeigt an, dass der Sauerstoffgehalt im Kolben einen kritischen Wert erreicht hatte, bei welchem weiteres Wachstum nicht mehr möglich war. Es trat dann aber keine Autolyse ein, sondern das MTG blieb über eine lange Zeit konstant. Nach 98 Tagen wurde der letzte Kolben geerntet und ein MTG von 76 mg festgestellt. Die Kulturen, bei welchen sich das Impfmyzel auf dem Kolbenboden unter einer 7,5 cm hohen Flüssigkeitsschicht befand, zeigten langsames, aber stetiges Wachstum. Der im Substrat gelöste und durch Diffusion nachgelieferte Sauerstoff genügte zur Entwicklung einer gallertartigen, nach 98 Tagen das ganze Flüssigkeitsvolumen umfassenden Myzelmasse. Das grünlich-braune Myzel sackte nach Entfernung des Substrates stark zusammen und wog nach der Trocknung während 2 Tagen nur 70,6 mg. Es war deutlich ein Geruch von Aethanol wahrnehmbar.

#### 4. Ketosäuren im Kultursubstrat von *Marasmius putillus*

Wie Tab. 1 zu entnehmen ist und auf S. 17 bereits ausgeführt wurde, schied *Marasmius putillus* im Verlaufe des Wachstums Ketosäuren in die umgebende Flüssigkeit aus, die bei Verknappung des Substrates an Glucose wieder aufgenommen wurden. Zur Bestätigung dieser Befunde wurden Fernbachkolben, die mit 350 ml Substrat B beschickt waren, mit 15 ml Myzelsuspension beimpft und sowohl als Ruhe- wie auch als Schüttelkultur inkubiert. Nachdem ein merkliches Myzelwachstum eingetreten war, wurden alle 2 bis 3 Tage steril 10 ml Substratproben den Kolben entnommen, deren Ketosäuregehalt nach der Methode von Friedemann und Haugen (1943) und pH-Wert bestimmt.

Zu Vergleichszwecken wurde auch *Marasmius foetidus* herangezogen und analog gezüchtet. Sowohl in Ruhe- als auch in Schüttelkultur schied dieser Pilz keine Ketosäuren ins Substrat aus. Der pH-Wert des Substrates sank bis 2,3, also wesentlich tiefer als bei *Marasmius putillus*.

Aus Fig. 5 ist folgendes ersichtlich: Die innerhalb der Wachstumsphase von *Marasmius putillus* ausgeschiedenen Mengen an Ketosäuren waren bei beiden Züchtungsverfahren gleich gross, nur verteilten sie sich in der Schüttelkultur auf eine

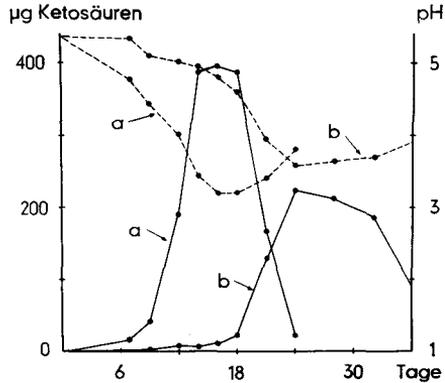


Fig. 5. Gehalt des Kultursubstrates von Marasmius putillus an Ketosäuren

Ketosäuren in  $\gamma$  /ml Substrat: ———, pH-Verlauf: - - - - , a: Schüttelkultur, b: Ruhekultur

kürzere Zeitspanne mit entsprechend grösseren Maximalwerten. Diese Verhältnisse spiegeln sich auch in den pH-Messungen wider, indem in Schüttelkulturen die pH-Kurve einen gedrängteren Verlauf mit tieferen Minimalwerten aufweist als in Ruhekulturen.

Im Substrat von Marasmius putillus wurden die tiefsten pH-Werte beim Auftreten der grössten Mengen von Ketosäuren festgestellt. Das Ansteigen der pH-Werte bevor der Pilz das maximale MTG erreicht hatte, das in Fig. 2 deutlich in Erscheinung trat, kann mit der Verwertung der vorher bei Glucoseüberschuss ausgeschiedenen Ketosäuren in Zusammenhang gebracht werden.

Papierchromatographisch konnte festgestellt werden, dass von 2 Ketosäuren die 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Derivate vorlagen. In 2 Fällen war noch, bei Verwendung von n-Butanol+Ammoniak als Lösungsmittel, ein 3. Flecken von mehr rötlicher Farbe festzustellen, wahrscheinlich von einem Neutralprodukt herrührend, da diese Verbindung im Sørensen-Puffer ungelöst am Startpunkt zurückblieb. Von den verwendeten Testsubstanzen wiesen Brenztraubensäure und Glyoxylsäure gleiche  $R_f$ -Werte wie die beiden aus dem Substrat gewonnenen Ketosäuren auf. Oxal-essigsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarensäure, denen im intermediären Stoffwechsel eine wichtige Rolle beigemessen wird, konnten in der Kulturflüssigkeit nicht nachgewiesen werden. Die papierchromatographische Trennung der Hydrazone von Ketosäuren aus

verschieden alten Kulturen ergab immer die gleichen beiden gelben Flecken von derselben Grösse. Folglich traten in den verschiedenen Wachstumsphasen Brenztrauben- und Glyoxylsäure immer zusammen und in ungefähr gleichen Mengen auf.

5. Papierchromatographischer Nachweis saurer Stoffwechselprodukte

Mit Hilfe der kontinuierlichen Aetherextraktion wurden die freien organischen Säuren aus dem mit  $H_2SO_4$  angesäuerten Substrat gewonnen. Aus 1 l vom Myzel abgepresster Flüssigkeit einer 18 Tage alten Kultur von Marasmius putillus wurde ein brauner, aromatisch riechender Kristallbrei extrahiert, der nach Trocknung über  $P_2O_5$  1,9 g wog.

Tabelle 2

$R_f$ -Werte der freien nichtflüchtigen Säuren

Testsubstanzen	$R_f$	aus Substrat von <u>Marasmius putillus</u>		
		$R_f$	$R_f$	
Weinsäure	0,22	ungeimpftes Substrat	0,22	
Zitronensäure	0,37	16 Tage alte Schüt- telkultur	22 Tage alte Schüt- telkultur	
l-Aepfelsäure	0,43			0,66
$\alpha$ -Ketoglutar Säure	0,56		0,59	32 Tage alte Schüt- telkultur
Glyoxylsäure	0,60		0,43	
Brenztraubensäure	0,66		0,87	32 Tage alte Ruhe- kultur
Milchsäure	0,67		0,71	
Bernsteinsäure	0,72			
Fumarsäure	0,87			

Lösungsmittel: n-Butanol:Ameisensäure:Wasser (40:10:50), absteigend auf Whatman-Papier Nr. 1

Papierchromatographisch konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Säuren vorlagen, jedoch, wie Tab. 2 zeigt, nur im Aetherextrakt aus Kulturen von bestimmtem Alter. So war in einer 32 Tage alten Kultur keine Säure festzustellen ausser Weinsäure, die als Diammontartrat dem Substrat zugefügt worden war. Weinsäure war in allen Fällen anwesend und bildete den Hauptanteil des sauren Extraktes.

Das Substrat einer 16 Tage alten Kultur enthielt mindestens 5 Säuren, die als

Flecken getrennt auf dem Papier erschienen, abgesehen von der Weinsäure, die den weitaus grössten Flecken erzeugte. Ein Vergleich mit den  $R_f$ -Werten einiger Testsubstanzen liess, in der Reihenfolge der Fleckengrösse, auf Brenztraubensäure, Glyoxylsäure, 1-Aepfel- und Fumarsäure schliessen. Ein ganz schwacher Flecken in der Nähe der Brenztraubensäure deutete Bernsteinsäure an, er liess sich besser beobachten, wenn vorher die Ketosäuren durch Fällen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin aus dem Substrat entfernt worden waren. In einem 22 Tage alten Substrat aus Schüttelkulturen konnten nur 2 Flecken festgestellt werden, die der Brenztrauben- und Glyoxylsäure zuzuschreiben waren. Interessanterweise wies der Extrakt aus einer Ruhekultur ein anderes Bild auf. Ein grosser Flecken mit einem  $R_f$  von 0,40 zeichnete sich ab und daneben nur noch ein einziger, schwacher mit einem  $R_f$  von 0,58.

### C. Diskussion der Wachstumsversuche

Jennison et al. (1955) fanden bei 29 verschiedenen Arten von "brown-rot fungi", dass im Durchschnitt 14,1 Tage benötigt wurden, um in Schüttelkultur das maximale MTG zu erreichen, wobei der pH-Wert des Substrates von 4,9 auf 2,7 sank. Andererseits erreichten 13 Arten von "white-rot fungi" das maximale MTG im Mittel schon nach 13,5 Tagen bei einer pH-Aenderung von 4,9 auf 3,6. Verglichen mit diesen Angaben benötigte der untersuchte Stamm von Marasmius putillus eine lange Zeit bis zur Erreichung des maximalen MTG, nämlich durchschnittlich 21 Tage. Doch ist die Zeit bis zur Erreichung des max. MTG keine günstige Vergleichsbasis, da wie z.B. Dorrell und Page (1947) betonen, Menge und Beschaffenheit des Impfmyzels einen entscheidenden Einfluss auf das spätere Wachstum haben.

Der Verlauf der Wachstumskurven in Fig. 1, 2, 6 und 8 ist sehr unterschiedlich. Bei Verwendung von jungen Kulturen als Impfmyzel, die sich in einem Entwicklungsstadium befanden, das dem unteren Teil der linearen Phase der Wachstumskurve entsprach, konnte vor allem eine Verkürzung der Induktionsperiode erreicht werden, da das Impfmateriale nur unbedeutende Mengen an abgestorbenen Zellen enthielt. Ferner genügte eine kurze Schüttelzeit mit den Glaskugeln um die Pilzdecke fein zu zerteilen, wodurch die Zellen nicht stark geschädigt wurden. Der Grad der Zerstörung von Zellen konnte durch eine Prüfung der Myzelsuspension unter dem Mikroskop beurteilt werden, da sich eine Schädigung dadurch bemerkbar macht, dass kleine, stark lichtbrechende Körperchen aus den Myzelfäden in die umgebende Flüssigkeit austreten. Bei diesen Granula handelt es sich vermutlich um Mitochondrien, die bei verschiedenen Mikroorganismen nachgewiesen worden sind (Mudd 1954).

Grössere Impfmengen bewirkten vorwiegend eine Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Das langsame Wachstum bedingt, dass zur Gewinnung von Pilzmyzel als Nahrungsmittel in technischem Masstabe die Nährlösungen mit grossen Myzelmengen zu impfen sind, wie es Humfeld (1948) für die Verwendung von Agaricus campestris vorgeschlagen hat.

In den einzelnen Versuchsserien wurden bei gleicher Substratzusammensetzung und Temperatur im Inkubationsraum ganz verschieden grosse Mengen an maximal erreichbaren MTG festgestellt. Bestimmte Zusammenhänge zwischen dem ökonomischen Koeffizienten im Kulminationspunkt des Wachstums und den oben angeführten, das Wachstum bestimmenden Faktoren, konnten nicht aufgedeckt werden. Es schien aber die Tendenz zu bestehen, dass in Schüttelkultur die Myzelausbeute kleiner war als in der gleichzeitig und mit derselben Myzelsuspension geimpften Ruhekultur. Dies bedeutet, dass bei guter Versorgung des Myzels mit  $O_2$  mehr Glucose zu  $CO_2$  oxidiert wurde als zum Aufbau von Zellsubstanzen und zur Aufrechterhaltung des Lebens notwendig gewesen wäre, und ein Teil der dabei gewonnenen Energie als Wärme verloren ging. Anscheinend fällt die Unterbindung von Gärung durch das Schütteln, was bei der Hefegewinnung von grosser Bedeutung ist, nicht stark ins Gewicht (siehe Literatur bei Smith und Johnson 1954). Schon lange ist bekannt, dass verschiedene Stoffe von Mikroorganismen nur in Schüttelkultur oder bei guter Belüftung verwertet werden können. Rolinson und Lumb (1953) fanden z.B., dass Schweinefett in gut belüfteten Kulturen von Penicillium chrysogenum den Kohlehydraten bevorzugt als C-Quelle benützt wird. Beim gleichen Organismus untersuchte Rolinson (1952) die respiratorische Aktivität, die wegen der Abhängigkeit grosser Penicillinproduktion von der  $O_2$ -Versorgung von Interesse ist. Aus Atmungsversuchen ergab sich, dass die  $O_2$ -Verhältnisse bei der Vorzüchtung des Myzels von bestimmendem Einfluss auf die Atmungstätigkeit und die Penicillinausbeuten sind. Es scheint, dass in Kulturen, die unter reichlicher  $O_2$ -Zufuhr gezüchtet worden waren, ein vermehrter Aufbau von Enzymen stattgefunden hat, da während des Atmungsversuches die  $O_2$ -Verhältnisse bis zu einem gewissen Grenzwert keine Rolle mehr spielten. Die grosse Bedeutung von Belüftung und Bewegung der Kulturen im Laboratorium und in der mikrobiologischen Industrie geht aus verschiedenen Arbeiten auf diesem Gebiet hervor, die aus zusammenfassenden Darstellungen ersehen werden können, z.B. Prescott und Dunn (1949), Foster (1949), Bernhauer (1950), Ledingham (1953), Finn (1954).

Das Sinken des pH, die Ausscheidung von hemmenden Stoffwechselprodukten oder die Verarmung des Substrates an C-, N-, P-Verbindungen, an essentiellen Metallen oder Vitaminen sind die Faktoren, die das Wachstum begrenzen. Durch Zusetzen von Glucose zu Kulturen, die das maximale MTG erreicht hatten, konnte gezeigt werden, dass allein die Erschöpfung des Substrates an Glucose für das Aufhören

des Myzelwachstums und das rasche Ueberhandnehmen von autolytischen Prozessen verantwortlich war.

Als Ergebnis der Untersuchungen auf saure Stoffwechselprodukte ist in erster Linie festzuhalten, dass die im Verlauf des raschen Wachstums ausgeschiedenen Stoffe nicht als Gärprodukt zu betrachten sind, sondern als Ueberschussprodukte, die beim Verarmen der Nährlösung an Glucose weiter verwertet werden. Die Ursache, vor allem in bezug auf das Auftreten von Ketosäuren im Substrat, kann nicht im Schütteln der Kulturen liegen, da das Myzel bei beiden Züchtungsarten organische Säuren ausschied. Es ist eher so, dass die Versorgung des Myzels mit Glucose überreichlich war. Die Enzymsysteme für die Dissimilation der Glucose waren gesättigt, und die intermediären Verbindungen, deren Reaktionsgeschwindigkeiten am langsamsten verliefen, häuften sich im Innern der Zellen an. Wie Foster (1949) ausführt, werden diese Zwischenprodukte oft nicht direkt in die Nährlösung ausgeschieden, sondern gehen Nebenreaktionen mit sekundären Enzymsystemen ein. Auf Grund der im Substrat nachgewiesenen Säuren kann also nicht mit Gewissheit auf den wirksamen Hauptmechanismus der Dissimilation der Glucose geschlossen werden. Die Brenztraubensäure als Endstufe des glykolytischen Abbaus der Glucose tritt häufig im Substrat verschiedener Mikroorganismen auf. Campbell und Smith (1956) demonstrierten, dass Pseudomonas aeruginosa alle notwendigen Enzyme besitzt für die Oxydation von Pyruvat zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  ohne Oxalessigsäure und  $\alpha$ -Ketoglutar Säure zu passieren. Isozitrone Säure wird durch Isozitrata se in Bernsteinsäure und Glyoxylsäure gespalten. Das Fungieren dieser Reaktion äussert sich auch durch das Auftreten grösserer Mengen von Glycin. Mit Hilfe der Ninhydrinreaktion konnte auf dem Chromatographie-Papier die Anwesenheit von Aminosäuren im Substrat von Marasmius putillus sichergestellt werden. Diese wurden jedoch nicht näher identifiziert.

## II. ATMUNGSVERSUCHE

---

### A. Methodik

Für die Messung der Atmung ist morphologisch möglichst homogenes Myzel erforderlich um reproduzierbare Werte zu erhalten, die sich interpretieren lassen. Die Methode der Züchtung auf der Schüttelmaschine, deren Einführung auf Kluyver und Perquin (1933) zurückgeht und seither viel angewendet wurde (Wikén und Somm 1952), liefert gut brauchbares Myzel.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Atmungsversuche in der volumetrischen Apparatur nach von Euler, Myrbäck und Nilsson durchgeführt, die Nilsson (1941) beschrieben hat. Als Versuchsgefässe dienten die von Wikén und Richard (unveröffentlicht) für die Messung der Hefegärung angefertigten Kolben aus Pyrexglas. Sie haben die Form einer Steilbrustflasche von 5 cm Durchmesser und 8 cm Höhe mit seitlich eingeschliffener, drehbarer Ampulle. Unten können bis 20 ml Lauge zur Absorption des  $\text{CO}_2$  eingefüllt werden; diese Kolben wurden von Wikén und Richard (1954) für Atmungsversuche geschaffen, bei welchen die Geschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Bildung gross ist im Vergleich zur  $\text{O}_2$ -Aufnahme. Ein glockenförmiger Einsatz mit einer Oeffnung von 2,5 cm Durchmesser, der 1 cm über dem Boden eingeschmolzen ist, dient der Aufnahme von 5 ml Flüssigkeit und dem Myzel. Der obere Rand des Einsatzes wurde mit Wolf fett bestrichen, um ein Hinüberkriechen der Lauge zu verhindern. Durch Einführen von gefalteten Filtrierpapierstreifen konnte die aktive Oberfläche der Lauge noch vergrössert werden, und damit war eine praktisch augenblickliche Absorption des  $\text{CO}_2$  gewährleistet. Es wurden 15 ml 30%ige KOH verwendet. Zur Bestimmung des während der Atmung des Myzels gebildeten  $\text{CO}_2$  wurde die direkte Methode angewandt, die darin besteht, dass in einem 2. Respirationsgefäss die Lauge weggelassen wurde (Umbreit, Burris und Stauffer 1947). Die Ablesung am Manometer ergab in diesem Fall die Differenz zwischen verbrauchtem  $\text{O}_2$  und gebildetem  $\text{CO}_2$ .

Das auf Substrat B in 100 ml Erlenmeyerkolben oder 1500 ml Fernbachkolben gezüchtete Myzel wurde zur Atmungsmessung durch Abgiessen über ein feinmaschiges Nylonsieb vom alten Substrat befreit und dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Mit einem Spatel aus Chromnickel wurde das Myzel gleichmässig auf die Respirationskolben verteilt. In den meisten Fällen erfolgte die Zugabe von 5 ml Atmungs substrat bevor die Kolben mittels Gummistopfen an die Büretten angeschlossen waren. Bei der üblichen Versuchsdauer von 8 Stunden konnte sich eine Infektion nicht

merklich entwickeln, sodass steriles Arbeiten nicht erforderlich war. Die Versuchsgefäße befanden sich in einem Wasserbad von konstant 25° C und wurden mit einer Frequenz von 90 Hin- und Herbewegungen pro Minute geschüttelt. Nach 15-minütigem Schütteln im Wasserbad zur Ausglei chung von Temperaturdifferenzen wurde der Hahn der Bürette geschlossen und die Stellung des Meniskus der Quecksilbersäule in der 35 cm langen Bürette mit 5 ml Inhalt abgelesen. Durch Senken des Niveaugefäßes entstand im Innern ein geringes Vakuum während der ganzen Versuchsdauer. Aenderungen des Luftdruckes und Schwankungen der Aussentemperatur während dem Versuch konnten durch Verwendung eines Thermobarometers, d. h. eines Respirationskolbens ohne Myzel, nur mit Lauge und Phosphatpuffer, korrigiert werden.

Es ist allgemein bekannt, dass sich die Pilze, Schimmelpilze wie höhere Pilze, durch eine grosse endogene Atmung auszeichnen. Sie beruht auf dem hohen Gehalt des Myzels an Reservestoffen. Durch Schütteln der Kulturen in sterilem dest. Wasser während 48 Stunden verarmten die Zellen an Reservestoffen, und die endogene Atmung reduzierte sich auf ca. die Hälfte des ursprünglichen Wertes. Nach Som m (1953) erfolgt die Verarmung des Myzels in dest. Wasser rascher als in 0,067 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer. Das Kultursubstrat wurde vorsichtig vom Myzel abgegossen, dieses im Kolben dreimal steril mit Wasser gewaschen und, in 25 ml dest. Wasser suspendiert, bei 20° C auf der Schüttelmaschine weiter inkubiert.

Zur Bestimmung des MTG nach beendeter Atmungsmessung wurde in der gleichen Weise verfahren wie bei den Wachstumsversuchen. In einer Versuchsserie wurde der N-Gehalt des Myzels folgendermassen bestimmt: Das während 2 Tagen bei 105° C getrocknete Myzel aus einem Respirationskolben (ca. 50 mg) wurde in einem 100 ml Kjeldahlkölbchen mit verd.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1) unter Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach der Methode von Miller und Miller (1948) aufgeschlossen. Die klare Lösung wurde darauf mit NaOH alkalisch gemacht und der gebildete Ammoniak im Wasserdampfstrom in 4%ige Borsäure abdestilliert. Die Titration erfolgte mit 0,02 n HCl gegen Tashiro-indikator nach Allen (1953).

## B. Versuche und Resultate

### 1. Die Atmung von verschieden altem Myzel

Zur Messung der Atmung von Myzel aus Schüttelkulturen in verschiedenen Wachstumsphasen wurde das Myzel von je einem Kolben eines gleichzeitig geimpften Ansatzes in ein Respirationsgefäß übergeführt und die  $O_2$ -Aufnahme in 5 ml des ursprünglichen Kultursubstrates bestimmt.

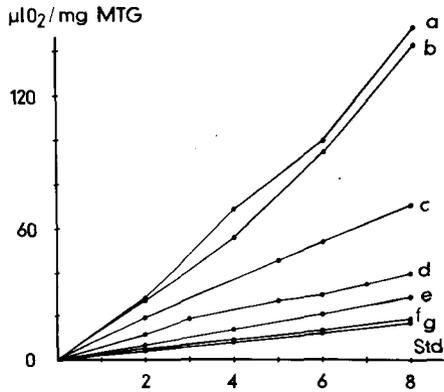


Fig. 6. Atmungskurven von verschieden altem Myzel

In einem Respirationsgefäß befand sich das Myzel von je einem Kulturkolben. Die Messung der  $O_2$ -Aufnahme erfolgte im ursprünglichen Kultursubstrat. Die Kurven entsprechen der Atmung von Myzel folgenden Alters (in Tagen): a: 6, b: 8, c: 11, d: 13, e: 15, f: 18, g: 22

In Fig. 6 sind die in Abständen von 2 bis 3 Tagen aufgenommenen Atmungskurven wiedergegeben, die innerhalb der 8-stündigen Messdauer linear verlaufen (bei den 6- und 8-tägigen Kulturen allerdings nur mit einiger Annäherung). Die Resultate sind Durchschnittswerte von 5 Parallelen.

Die Versuchsdauer betrug, von wenigen Ausnahmen abgesehen, 8 Stunden. Bei Messungen über eine längere Zeitspanne muss das Aufkommen von Infektionen berücksichtigt werden. Da die stündliche  $O_2$ -Aufnahme gewöhnlich zwischen 0,05 und 0,30 ml schwankte, bei einer Ablesegenauigkeit von  $\pm 0,05$  ml, erfolgte nur alle 2 Stunden eine Volumenmessung.

Der Berechnung der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme  $Q_{O_2}$  (der  $O_2$ -Aufnahme in  $\mu l$  pro mg MTG und Stunde) wurde das bei Versuchsabbruch bestimmte MTG zu Grunde gelegt. Selbstverständlich blieb das MTG während der Dauer des Versuches nicht konstant, sondern nahm entweder zu, wenn eine assimilierbare C-Quelle vorhanden war, oder ab, wenn das Myzel in Pufferlösung suspendiert war. In Tab. 3 sind in

Tabelle 3

Spezifische  $O_2$ -Aufnahme durch verschieden altes Myzel (vgl. Fig. 7)

Myzelalter in Tagen	MTG in mg, Myzel von je 1 Kolben	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}$ ber. für mittleres MTG	$Q_{O_2}$ (NB)	MTG in mg, gleiche Myzelmengen	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}$ ber. für mittleres MTG	$Q_{O_2}$ (NB)
6	3,9	18,91 ± 2,60	19,91	16,28	-	-	-	-
8	6,6	17,91 ± 0,96	18,50	15,49	46,0	3,67 ± 0,05	3,75	3,16
10	-	-	-	-	42,2	3,79 ± 0,35	3,96	3,25
11	21,3	9,18 ± 1,02	9,21	7,76	-	-	-	-
13	31,5	4,95 ± 0,59	5,09	4,19	40,9	4,82 ± 0,49	4,95	4,13
15	45,9	3,54 ± 0,50	3,63	3,03	46,5	5,94 ± 0,45	6,15	5,10
17	-	-	-	-	34,6	6,23 ± 0,59	6,27	5,35
18	80,8	2,41 ± 0,06	2,48	2,08	-	-	-	-
20	102,8	2,36 ± 0,21	2,40	2,03	29,4	3,32 ± 0,30	3,33	2,86
22	105,6	2,06 ± 0,17	2,07	1,76	34,2	4,89 ± 0,64	4,97	4,20

Das Myzel war in den Respirationsgefäßen in 5 ml ursprünglichem Kultursubstrat suspendiert.  $CO_2$ -Absorption durch 15 ml 30 %ige KOH. Das Myzel entstammte 2 Versuchsserien, die je mit der gleichen Myzelsuspension geimpft worden waren.

der 4. Kolonne die  $Q_{O_2}$ -Werte für ein mittleres  $MTG = (MTG_A + MTG_E)/2$  aufgeführt, wobei das  $MTG_A$  der gleichzeitig aufgenommenen Wachstumskurve entnommen wurde. Wie ersichtlich ist, liegen die Abweichungen innerhalb der Fehlergrenzen; bei allen späteren Berechnungen von  $Q_{O_2}$  wurde daher nur das  $MTG_E$  verwendet. Die 5. Kolonne der Tab. 3 enthält die auf Normalbedingungen (760 mm Hg und  $0^\circ C$ ) umgerechneten Werte der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme. Der Umrechnungsfaktor  $f$  betrug bei der konstanten Temperatur von  $25^\circ C$  je nach dem herrschenden Luftdruck 0,845 - 0,865. In den folgenden Versuchen wurde auf eine Umrechnung verzichtet, weil die Werte vor allem Vergleichszwecken dienen.

Die graphische Darstellung der  $Q_{O_2}$ -Werte in Funktion vom Myzelalter ergibt die Kurve der spezifischen  $O_2$ -Aufnahmen. Die aus den Atmungskurven von Fig. 6 berechneten  $Q_{O_2}$  bilden die Kurve a in Fig. 7. Die  $O_2$ -Aufnahme durch das Myzel, das einem Kulturkolben entstammte, nahm mit der Zeit ab, und es liesse sich daraus folgern, dass ganz junges Myzel viel kräftiger atme als älteres. Doch es ist zu berücksichtigen,

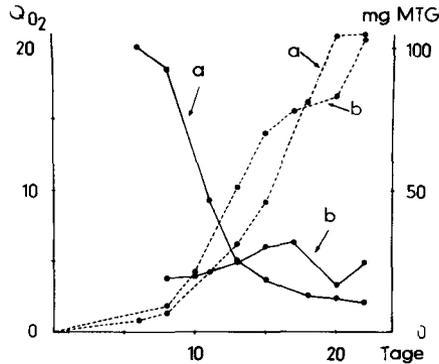
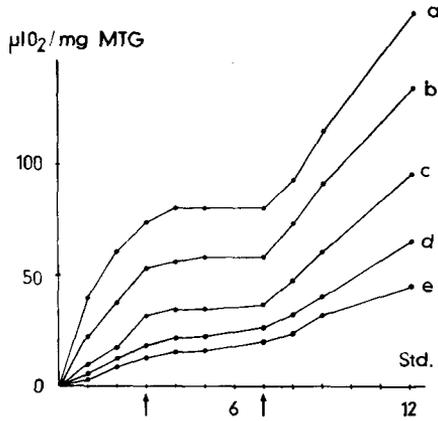


Fig. 7. Die spezifische  $O_2$ -Aufnahme von verschieden altem Myzel (vgl. Fig. 6 und Tab. 3, Kolonne 4 und 8)

Spezifische  $O_2$ -Aufnahme: ———, dazugehörige Wachstumskurve: — · — · —,  
a: Atmungsmessung von Myzel aus einem Kulturkolben, b: Atmungsmessung von  
gleichen Myzelmengen

sichtigen, dass z.B. in 16 Tage alten Kulturkolben sehr viel mehr Myzel vorhanden war als in 8-tägigen. In dichten Suspensionen von Myzelkugeln war unter den Bedingungen, wie sie in den Respirationkolben während der Atmungsmessung herrschten, die  $O_2$ -Versorgung nur für einen Teil der Zellen gut. Es wurde deshalb in einer 2. Versuchsserie die Atmung von stets gleichen Myzelmengen gemessen, was einen ganz andern Verlauf der Kurve der spezifischen  $O_2$ -Aufnahmen ergab (Kurve b in Fig. 7). Es ist ersichtlich, dass die Atmungsintensität von ganz jungen Zellen geringer war als von Myzel, das dem mittleren Abschnitt der Wachstumskurve entspricht. Für das Absinken beim Erreichen des maximalen MTG kann der klein gewordene Glucosegehalt des Substrates verantwortlich gemacht werden.

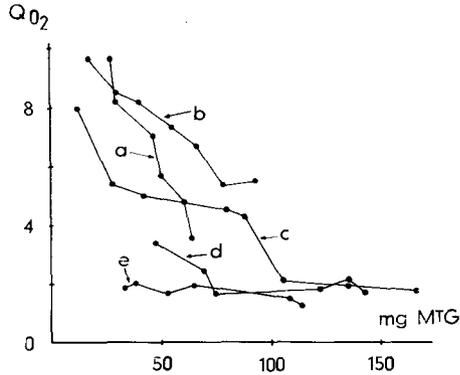
Es drängte sich die Aufgabe auf, den Einfluss der Myzelmenge auf deren spezifische  $O_2$ -Aufnahme zu untersuchen. Fig. 8 zeigt die Atmungskurven von 10 Tage altem Myzel, woraus klar hervorgeht, dass weniger  $O_2$  aufgenommen wurde, bezogen auf 1 mg MTG, je mehr Myzel in das Respirationgefäß eingefüllt worden war. Durch das Unterbrechen des Schüttelns während 4 Stunden liess sich zeigen, dass in den Gefässen mit wenig Myzel die Atmung zum Stillstand kam. Mit zunehmenden Myzelmengen wurde die  $O_2$ -Aufnahme dadurch weniger beeinflusst, was seinen Grund darin haben kann, dass hier ein Teil des Myzels aus der Flüssigkeit herausragte.



**Fig. 8.** Die Atmung in Abhängigkeit von der Myzelmenge im Respirationskolben 10 Tage altes Myzel in 5 ml ursprünglichem Kultursubstrat, zwischen der 3. und 7. Stunde (Pfeile) Kolben nicht geschüttelt, folgende MTG in den Respirationskolben: a: 7,4 mg, b: 12,4 mg, c: 35,7 mg, d: 59,3 mg, e: 80,0 mg

Auf alle Fälle zeigte dieser Versuch, dass das Schütteln der Respirationskolben während der Atmungsmessung notwendig ist, um eine ausreichende Versorgung des Myzels mit  $O_2$  zu gewährleisten.

Fig. 9 fasst die Ergebnisse von weiteren solchen Versuchen zusammen, wobei die  $Q_{O_2}$  - Werte in Funktion vom MTG aufgetragen sind. Verbindet man die Punkte, die Bestimmungen mit Myzel gleichen Alters entsprechen, so ergeben sich für junge Kulturen steil abfallende Kurven, während für alte Kulturen mehr oder weniger horizontale resultieren. Das heißt, dass in jungen Kulturen die Atmung der Zellen stark von der Myzelkonzentration abhängig ist, bei alten Zellen hingegen die  $O_2$ -Versorgung auch in dichten Myzelsuspensionen nicht beeinträchtigt ist. Der  $O_2$ -Bedarf von altem Myzel ist klein, so dass die Diffusion des  $O_2$  durch die Flüssigkeit nicht mehr zum begrenzenden Faktor der Atmung wird.



**Fig. 9.** Abhängigkeit der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme des verschieden alten Myzels von der Myzelmenge im Respirationsgefäß

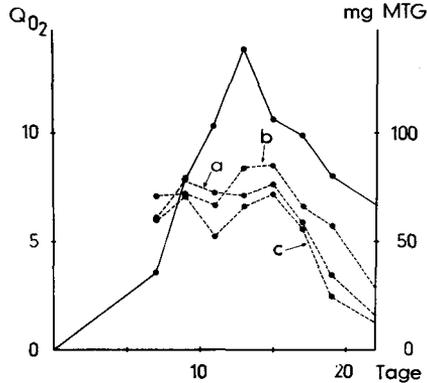
a: 12 Tage altes Myzel, b: 16 Tage altes Myzel, c: 22 Tage altes Myzel,  
d: 29 Tage altes Myzel, e: 36 Tage altes Myzel

## 2. Versuche zur Bestimmung und Erniedrigung der endogenen Atmung

Zum Nachweis einer endogenen Atmung wurde das im Substrat B vorgezüchtete Myzel in der üblichen Weise durch zweimaliges Waschen mit dest. Wasser von anhaftenden Nährstoffen befreit. Die Atmungsmessung erfolgte darauf in 3 verschiedenen Substraten:

- a. ursprüngliches Kultursubstrat
- b. 0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer + 0,05 m Glucose
- c. 0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer

Das Trockengewicht des in einem Respirationsgefäß suspendierten Myzels betrug 25 - 50 mg und die Menge an zugefügtem Substrat 5 ml. Die von verschieden altem Myzel bestimmte spezifische  $O_2$ -Aufnahme ist in Fig. 10 in Abhängigkeit vom Myzelalter aufgezeichnet, woraus hervorgeht, dass im Phosphatpuffer durchwegs die geringste Atmung gemessen wurde. Der Zusatz von Glucose zur Pufferlösung bewirkte, abgesehen von der ersten Messung mit 7 Tage altem Myzel, erst dann eine größere  $O_2$ -Aufnahme, als die ursprüngliche Nährlösung an Glucose erschöpft war.



**Fig. 10.** Die spezifische  $O_2$ -Aufnahme von verschieden altem Myzel in verschiedenen Substraten (vgl. Tab. 4)

Wachstumskurve: ———, spezifische  $O_2$ -Aufnahme: - - - , in jedem Respi-  
rationsgefäß gleiche Myzelmengen, a: ursprüngliches Kultursubstrat, b: 0,05 m  
 $KH_2PO_4$ -Puffer + 0,05 m Glucoselösung, c: 0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer

Die Kulturkolben dieser Versuchsserie waren reichlich mit jungem Myzel be-  
impft worden, was ein rasches Wachstum bewirkte, wie aus dem Verlauf der  
Wachstumskurve abgelesen werden kann. Aber auch andere Versuchsserien mit lang-  
samem Myzelwachstum zeitigten denselben eigentümlichen Verlauf der 3 verschie-  
denen  $Q_{O_2}$ -Kurven mit einem Absinken der Atmungsintensität vor dem Erreichen des  
maximalen MTG. Die grössten  $Q_{O_2}$ -Werte wurden in der Autolysephase festgestellt.  
Mit zunehmendem Myzelalter sank die Atmungstätigkeit rapid.

In dieser Versuchsreihe wurde auch die  $CO_2$ -Abgabe bestimmt, um den respi-  
ratorischen Quotienten (RQ) des Myzels in den 3 verschiedenen Substraten zu be-  
rechnen. Aus Tab. 4 ist ersichtlich, dass RQ im allgemeinen um 1 herum lag; bei  
jungem Myzel etwas darüber, bei altem darunter. Hinsichtlich der verschiedenen  
Substrate ergab sich, dass die RQ-Werte im Phosphatpuffer mit und ohne Glucose mit-  
einander übereinstimmten, während sie im ursprünglichen Medium meistens tiefer  
lagen.

Bezüglich die pH-Änderung während der 8-stündigen Messdauer, auf die im  
Abschnitt 7 noch weiter eingegangen wird, ist festzuhalten, dass in den Gefässen mit  
Phosphatpuffer + Glucose, abgesehen von der ersten Messung, das pH sank. Im Phos-

Tabelle 4

Spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahmen von verschieden altem Myzel in 3 verschiedenen Substraten (vgl. Fig. 10)

Myzelalter in Tagen	Substrat	N-Gehalt in mgN/mg MTG	Mittleres MTG in einem Respirationkolben	pH		Q <sub>O<sub>2</sub></sub> <sup>N</sup>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>CO<sub>2</sub></sub>	RQ
				vor	nach				
7	a	0,057	61,8	4,19	4,32	105	6,02	6,62	1,10
	b	0,061	58,1	4,51	4,72	116	7,07	7,36	1,04
	c	0,060	51,5	4,51	5,55	103	6,08	6,19	1,02
9	a	-	53,2	3,60	3,71	--	7,88	8,54	1,08
	b	-	58,0	4,51	3,93	-	7,20	7,88	1,09
	c	-	55,6	4,51	4,10	-	7,18	7,78	1,08
11	a	-	56,7	3,24	3,42	-	7,24	7,38	1,02
	b	-	58,0	4,51	3,79	-	6,68	6,91	1,03
	c	-	58,4	4,51	4,00	-	5,23	5,17	1,08
13	a	-	61,2	3,04	3,27	-	7,15	6,67	0,93
	b	-	57,0	4,51	3,78	-	8,38	8,38	1,00
	c	-	62,7	4,51	4,14	-	6,69	6,32	0,94
15	a	-	46,5	3,31	3,48	-	7,66	6,75	0,88
	b	-	50,6	4,51	3,92	-	8,53	8,05	0,94
	c	-	49,9	4,51	4,16	-	7,26	6,54	0,90
17	a	-	55,5	3,59	3,72	-	5,89	4,94	0,84
	b	-	52,9	4,51	4,02	-	6,65	6,47	0,97
	c	-	52,4	4,51	4,34	-	5,66	5,18	0,92
19	a	0,041	40,7	3,77	3,82	85	3,50	1,36	0,39
	b	0,035	46,5	4,51	4,01	164	5,75	5,50	0,96
	c	0,035	42,8	4,51	5,51	45	2,47	2,32	0,94
22	a	-	36,8	3,81	3,82	-	1,59	2,19	1,38
	b	-	37,2	4,51	4,03	-	2,72	2,90	1,07
	c	-	38,2	4,51	5,02	-	1,23	1,73	1,41

Für alle Atmungsmessungen gleich grosse Myzelmenngen verwendet; a: 5 ml ursprüngliches Kultursubstrat, b: 5 ml 0,05 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer + 0,05 m Glucose, c: 5 ml 0,05 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer

phatpuffer ohne Glucosezusatz sank der pH-Wert in einigen Fällen, in anderen stieg er, während im alten Kultursubstrat sich immer eine Zunahme ergab. Da die Bezugnahme auf das MTG bei der Bestimmung der Atmungsintensität zu gefälschten Resultaten führt, vor allem wegen dem unterschiedlichen Gehalt des Myzels an Reservestoffen in den verschiedenen Wachstumsphasen, wird oft auf den N-Gehalt abgestellt. Daher wurde nach 2 Atmungsmessungen der N-Gehalt des getrockneten Myzels be-

stimmt, wobei ein Gehalt von 5,7 - 6,0 % bei jungem und 3,5 - 4,1 % bei altem Myzel gefunden wurde. Die auf 1 mg N bezogene spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme (Q<sub>O<sub>2</sub></sub><sup>N</sup>) ist in der 7. Kolonne von Tab. 4 angegeben. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei der N-Bestimmung nicht nur die in respiratorischer Hinsicht aktiven Teile der Zelle, nämlich die Proteine des Protoplasmas, erfasst wurden, sondern auch das aus Glucosamin aufgebaute Chitin, aus dem die Zellwände der Pilze bestehen.

Das wichtigste Ergebnis der Atmungsmessung in den 3 verschiedenen Substraten besteht darin, dass eine grosse endogene Atmung des Myzels nachgewiesen wurde. Die spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme im KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer betrug durchschnittlich 85 % derjenigen in der Pufferlösung + Glucose, ausser beim 19 und 22 Tage alten Myzel, dessen endogene Atmung unter 50 % gesunken war.

Zur Erniedrigung der endogenen Atmung wurde die schon von Quastel und Whetham (1924) angewandte Methode der starken Belüftung von ruhenden Zellen in einer nährstofffreien Lösung benützt. Die Verarmung des Myzels an Reservestoffen geht aus den in Tab. 5 aufgeführten Resultaten von Atmungsmessungen hervor, die

Tabelle 5

Spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme des verschieden alten, verarmten Myzels

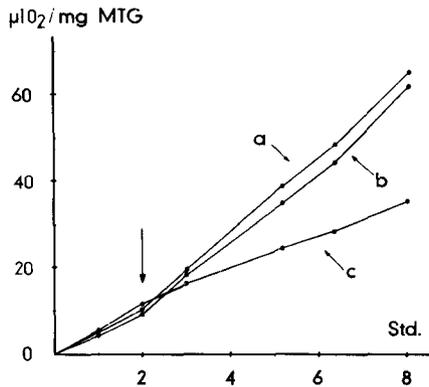
Dauer der Verarmung in Tagen	Substrat	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>						
		Alter des Myzels in Tagen:						
		9	11	14	17	20	23	27
0	Puffer	9,20	9,30	-	8,46	7,35	5,41	-
	Glucose	9,80	10,19	9,53	8,52	7,84	7,02	-
1	Puffer	7,06	5,44	-	5,90	-	3,56	-
	Glucose	9,19	9,09	-	-	-	6,64	-
2	Puffer	4,82	4,46	3,93	4,55	3,94	3,14	-
	Glucose	9,49	10,15	8,02	9,35	7,36	6,68	-
3	Puffer	-	3,59	3,58	-	4,13	-	2,54
	Glucose	-	8,73	6,75	-	-	-	6,36
7	Puffer	-	-	-	-	-	-	1,77
	Glucose	-	-	-	-	-	-	2,03

Verarmung des Myzels in Wasser, Atmungsmessung in 5 ml 0,05 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer resp. in 5 ml 0,05 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer + 0,05 m Glucose

von Myzel erhalten wurden, das in dest. Wasser bei 20° C geschüttelt worden war. Die Messung der spezifischen O<sub>2</sub>-Aufnahme des verschieden lang verarmten Myzels

erfolgte einerseits in 0,05 m Phosphatpuffer, andererseits in 0,05 m Phosphatpuffer + 0,05 m Glucose. Nach einer Verarmungszeit von 48 Stunden war der Betrag der endogenen Atmung auf die Hälfte der im Glucosemedium bestimmten  $O_2$ -Aufnahme gesunken. Die Geschwindigkeit der Verarmung ist bei verschieden altem Myzel gleich, was bedeutet, dass auch schon das ganz junge Myzel über ziemlich viele Reservestoffe verfügt. Die Fähigkeit zur Veratmung von Glucose war durch das Schütteln in dest. Wasser während 2 Tagen nicht beeinträchtigt worden, und es stellte sich daher die Frage, ob durch längere Verarmungszeiten die endogene Atmung noch weiter verringert werden kann. Nach 3 Tagen begann sich aber eine Schädigung des Myzels bemerkbar zu machen, die nach 7 Tagen sehr ausgeprägt in Erscheinung trat.

Die Zugabe der Glucose erfolgte jeweils vor Beginn der Atmungsmessung, um einen Fehler durch eine allfällige Induktionsperiode zu vermeiden. Wie nun aber in dem in Fig. 11 wiedergegebenen Versuch gezeigt werden konnte, setzte die Oxydation der C-Quelle ohne Induktionsperiode ein. Die Zuckerlösung wurde 2 Stunden nach Versuchsbeginn aus der Seitenampulle zugekippt.



**Fig. 11.** Steigerung der Myzelatmung in Phosphatpuffer durch Zusatz von Glucose

15 Tage altes und während 2 Tagen verarmtes Myzel in 3 ml 0,05 m Phosphatpuffer; nach 2 Stunden (Pfeil) folgende Zusätze aus der Seitenampulle: a: 2 ml 0,05 m Puffer + 45 mg Glucose, b: 2 ml 0,05 m Puffer + 30 mg Glucose, c: 2 ml 0,05 m Puffer

### 3. Der Einfluss der Glucosekonzentration auf das Wachstum und die Atmung

Das Substrat B für die Züchtung des Pilzes enthielt üblicherweise 20 g Glucose/l = 0,11 m. In einem orientierenden Wachstumsversuch von Ruhekulturen in Fernbachkolben mit 350 ml Substrat, geimpft mit 15 ml Myzelsuspension, wurde der Einfluss von verschiedenen Glucosemengen auf das Wachstum und auf das allfällige Ausscheiden grösserer Mengen intermediärer Stoffwechselprodukte geprüft. In diesem Versuch wurden die Glucoselösungen separat autoklaviert und dann in den erforderlichen Mengen steril den Mineralsalz- und Wuchsstofflösungen zugefügt.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse einer 20-tägigen Wachstumsperiode angegeben, aus denen hervorgeht, dass hohe Glucosekonzentrationen ein schlechtes Wachstum verursachten. Die Hemmung wurde mit abnehmender Glucosekonzentration geringer. Die grösste Myzelausbeute war auf dem Substrat mit 1 % Glucose zu verzeichnen.

Tabelle 6

Das Wachstum von Marasmius putillus bei verschiedenen Glucosekonzentrationen

Ursprünglicher Gehalt des Substrates an Glucose		MTG in mg	pH	Verbrauch an Glucose in g	Oekonomischer Koeffizient
in g	in %				
52,50	15	254,6	4,80	1,9	13
35,00	10	208,5	4,56	1,3	11
26,25	7,5	249,1	4,80	1,5	17
17,50	5	490,0	4,11	1,40	35,0
13,12	3,75	542,3	4,13	2,60	20,9
7,00	2	813,7	3,82	2,55	32,6
3,50	1	980,8	3,80	2,75	35,6

Ruhekulturen in Fernbachkolben mit 350 ml Substrat B, Ernte nach 20 Tagen, Anfangs-pH: 5,40

Bei Marasmius putillus liegen somit andere Verhältnisse vor als bei dem von Schelling (1952) untersuchten Stamm von Mycelium Radicis atrovirens, welcher auf Substrate mit 1, 4, 6 resp. 8 % Glucose keine namhaften Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit aufwies. Die gemessenen pH-Werte deuten darauf hin, dass keine sauren Stoffwechselprodukte in nennenswerten Mengen auftraten.

Es war nun von Interesse, den Einfluss grösserer Glucosemengen auf die Atmung des in Substrat B mit 2 % Glucose vorgezüchteten Myzels zu untersuchen.

Die Atmung von 13 Tage altem, unverarmtem Myzel (siehe Tab. 7) wurde mit

Tabelle 7

Spezifische  $O_2$ -Aufnahme bei verschiedenen Glucosekonzentrationen

Glucosekonzentration	Myzel nicht verarmt		2 Tage verarmt		3 Tage verarmt	
	$Q_{O_2}$	pH-Aenderung	$Q_{O_2}$	pH-Aenderung	$Q_{O_2}$	pH-Aenderung
0,9 % (0,05 m)	5,32 ± 0,02	- 0,66	6,26 ± 0,40	- 0,30	3,84 ± 0,04	+ 0,20
2,0 % (0,111 m)	4,97 ± 0,29	- 0,60	5,99 ± 0,50	- 0,26	3,92 ± 0,24	+ 0,25
5,0 % (0,278 m)	4,78 ± 0,02	- 0,59	4,96 ± 0,66	- 0,18	3,45 ± 0,70	+ 0,19
10,0 % (0,556 m)	4,56 ± 0,18	- 0,51	4,54 ± 0,44	+ 0,03	3,08 ± 0,16	+ 0,39

Myzelalter: 13 Tage + Verarmungszeit; 25-45 mg MTG, 5 ml Substrat, Anfangs-pH: 4,5, im Mittelraum 15 ml 30 %ige KOH

steigender Glucosekonzentration nur leicht und bei weitem nicht in dem Umfange wie das Wachstum gehemmt. Stärker machte sich ein hemmender Einfluss auf die Atmung durch grössere Glucosemengen nach 48-stündiger Verarmungszeit geltend. Der Hemmeffekt trat bei dem 3-tägig verarmten Myzel nicht mehr so gut in Erscheinung, weil ein Teil der Zellen durch das Schütteln in dest. Wasser geschädigt worden war. Die verringerte physiologische Aktivität des Myzels bei zu reichlicher Versorgung mit Glucose spiegelt sich auch in den in Tab. 7 aufgeführten pH-Aenderungen während der 8-stündigen Messdauer wider. Wie auf S. 58 noch weiter ausgeführt wird, bewirkte das auf dem Glucosesubstrat relativ kräftig atmende Myzel ein Sinken des pH. Das Ausmass der Säuerung hängt daneben auch noch vom Myzelalter ab, oder genauer gesagt, vom Anteil an autolyisierenden Zellen, welcher bei verarmtem Myzel grösser ist als bei unverarmtem.

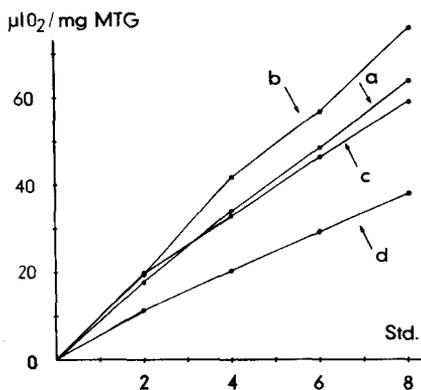
Es stellte sich die Frage, ob im Glucose reichen Substrat vermehrt Glucosemoleküle von der Zelle aufgenommen werden ohne eine Erhöhung der  $O_2$ -Aufnahme zu bewirken. Daher wurde auf folgende Weise versucht, eine Zunahme an MTG während der Zeit der Atmungsmessung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zu finden: Vor dem Versuch wurde das gewaschene Myzel in sterilem dest. Wasser aufgeschwemmt und je 6 ml der Suspension in einen Messzylinder gegossen. Das Myzel einer solchen Portion wurde filtriert, leicht ausgepresst und mit dem Spatel in den Re-

spirationskolben übergeführt. Zur Bestimmung des Anfangs-MTG wurden sogleich 4 Teile bei 105° C getrocknet. Eine MTG-Zunahme, deren Wert ausserhalb der mit dieser Methode erhaltenen Streuung von bis zu ± 8 % lag, wies jedoch einzig das während 2 Tagen verarmte Myzel im Substrat mit 10 % Glucose auf. In diesem Fall betrug das mittlere MTG<sub>A</sub> 32,7 mg, das mittlere MTG<sub>E</sub> 44,7 mg.

Zur Bestimmung der O<sub>2</sub>-Aufnahme des Myzels auf einer C-Quelle wurde von dieser im allgemeinen eine 0,05 m Lösung angesetzt. Einige Versuche wurden nun unternommen, um Aufschluss darüber zu erhalten, wie die Atmung auf kleineren Glucosemengen verläuft.

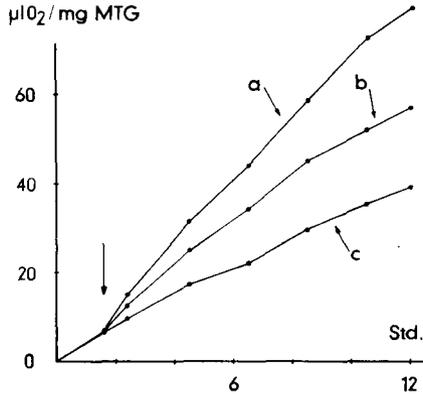
Im Hinblick auf die späteren Atmungsversuche mit dem Gemisch einer organischen Säure und Glucose von je 0,025 m Konzentration (siehe S. 47) wurden vorerst die O<sub>2</sub>-Aufnahmen auf 0,05 und 0,025 m Glucoselösung miteinander verglichen. Wie aus Fig. 12 ersichtlich ist, bewirkte die kleinere Konzentration eine grössere Atmungsintensität. Gleichzeitig wurde auch eine 0,005 m Glucoselösung verwendet und die endogene Atmung mitbestimmt. Bei dieser zehnmal kleineren Konzentration als der üblichen machte sich die Verdünnung schwach bemerkbar; die Werte lagen allerdings innerhalb der Fehlergrenze der Kurve a. Die in bezug auf die Atmung optimale Glucosekonzentration liegt zwischen 0,05 und 0,005 m; dies entspricht einem Gehalt von 250 resp. 25 µ M Glucose pro 5 ml Substrat.

Als Mass der Atmungssteigerung bei Vorlage von Glucose wurde hier die Differenz (Q<sub>O<sub>2</sub></sub> Glucose - Q<sub>O<sub>2</sub></sub> endogen) genommen und dabei vorausgesetzt, dass die endogene Atmung im gleichen Ausmass weiter dauert wie in Phosphatpuffer ohne C-Quelle.



**Fig. 12.** Die Abhängigkeit der Myzelatmung von der Glucosekonzentration

19 Tage altes Myzel, verarmt während 2 Tagen; zu 5 ml 0,05 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer folgende Zusätze: a: 45 mg Glucose (0,05 m), b: 22,5 mg Glucose (0,025 m), c: 4,5 mg Glucose (0,005 m), d: keine



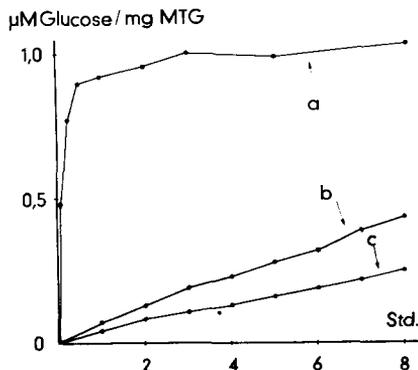
**Fig. 13.** Die Abhängigkeit der Myzelatmung von der Glucosekonzentration

16 Tage altes Myzel, verarmt während 2 Tagen; nach 1 Stunde 35 Minuten folgende Zusätze zu 5 ml 0,05 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer: a: 45 mg Glucose (0,05 m), b: 1,8 mg Glucose (0,002 m), c: keine

Die in Fig. 13 abgebildeten Atmungskurven zeigen, dass 250  $\mu\text{M}$  Glucose/5 ml Substrat nur zu einer doppelt so grossen Erhöhung der  $\text{O}_2$ -Aufnahme führten als die 25 mal kleinere Menge von 10  $\mu\text{M}$  Glucose/5 ml Substrat. Dies bedeutet, dass bei der allgemein angewandten 0,05 m Konzentration die Versorgung des Myzels mit Glucose überreichlich war. Die Mehraufnahme an  $\text{O}_2$  in 0,05 m Glucoselösung gegenüber der endogenen Atmung betrug während der 10-stündigen Messdauer 2,70 ml, was zu einer vollständigen Oxydation von 20  $\mu\text{M}$  Glucose zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  genügte.

Um abzuklären, ob nur 20  $\mu\text{M}$  von total vorhandenen 250  $\mu\text{M}$  Glucose durch die Zellen aufgenommen worden waren, wurden den Respirationsgefässen, die wie für einen Atmungsversuch mit Substrat und Myzel beschickt waren, zu verschiedenen Zeiten Proben von 0,3 ml entnommen. Diese wurden mit dest. Wasser auf 5 ml ergänzt und zur quantitativen Bestimmung des Glucosegehaltes verwendet. Der Wert zur Zeit 0 wurde so bestimmt, dass sofort nach Zugabe des Substrates zum Myzel und kurzem Umschwenken des Gefässes die Probe genommen wurde, da die Verdünnung durch das dem Myzel anhaftende Wasser berücksichtigt werden musste.

Die Aufnahme der Glucose durch Myzel, das während 2 Tagen verarmt worden war, wies den in Fig. 14 wiedergegebenen Verlauf auf (Kurve a). Die Anzahl aufgenommener  $\mu\text{M}$  Glucose sind auf 1 mg MTG bezogen, da 2 Kolben mit etwas verschiedenen Myzelmengen verwendet wurden. Die ersten 4 Werte stammen aus dem



**Fig. 14.** Die Aufnahme von Glucose durch 16 Tage altes, verarmtes Myzel  
Verarmungszeit 2 Tage; a: aufgenommene  $\mu\text{M}$  Glucose/mg MTG, b: oxydierte  
 $\mu\text{M}$  Glucose/mg MTG, berechnet aus der Atmungskurve von Fig. 13, c: Subtraktion  
der durch die endogene  $\text{O}_2$ -Aufnahme oxydierten Glucose

1. Kolben, die nachfolgenden aus dem 2. Bei Zugabe zu verarmtem Myzel wurde sogleich viel Glucose aufgenommen; nach 30 Minuten waren von den anfänglichen 45 mg bereits 7,84 mg aus dem Substrat verschwunden. Während den folgenden 7,5 Stunden bis zur letzten Messung nach 8 Stunden nahm der Gehalt nur noch um 0,38 mg ab. Ob alle aus dem Substrat verschwundene Glucose von den Zellen aufgenommen worden war oder teilweise nur an der Myzeloberfläche adsorbiert wurde, konnte mit der vorliegenden Untersuchungsmethode nicht abgeklärt werden.

Unter Verwendung der Werte des Atmungsversuches mit 0,05 m Glucoselösung (siehe Fig. 13) wurde berechnet, wieviel Glucose mit dem vom Myzel aufgenommenen  $\text{O}_2$  zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxydiert werden konnte. Die Umrechnung auf  $\mu\text{M}$  Glucose oxydiert/mg MTG lieferte die Kurve b in Fig. 14. Die Kurve c wurde nach Subtraktion der endogenen Atmung erhalten.

Da  $134,4 \mu\text{l O}_2$  1  $\mu\text{M}$  Glucose oxydieren, reichten die in 8 Stunden aufgenommenen  $59,5 \mu\text{l O}_2$ /mg MTG zur Veratmung von  $0,44 \mu\text{M}$  Glucose; das sind 42 % der aus dem Substrat verschwundenen Glucosemenge. Nimmt man an, dass die endogene Atmung während der Oxydation der zugesetzten Glucose unvermindert weitergehe (Kurve c), so findet man, dass 24,5 % der aus der Lösung verschwundenen Glucose direkt veratmet wurden. Es wird angenommen, dass die restliche Glucose als Re-

servestoff gespeichert wurde, was einen Zuwachs an MTG von 3,5 mg pro 50 mg MTG bewirken würde. Diese Zunahme kann nicht genau gewogen werden, da sie innerhalb der Fehlergrenze liegt.

Während der Veratmung von zugefügter Glucose bestehen in bezug auf die endogene Atmung die 3 Möglichkeiten: 1. Sie wird nicht beeinflusst und geht konstant weiter. 2. Die Eigenatmung wird erhöht oder 3. sie wird erniedrigt. Das Problem ist speziell bei den Organismen aktuell, die eine hohe endogene Atmung aufweisen, da sich hier die Frage aufdrängt, wie die Eigenatmung bei der Berechnung der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme auf einer C-Quelle berücksichtigt werden muss (van Niel 1943). Auf Grund der Angabe von Barker (1936) ist es möglich einen Anhaltspunkt zu gewinnen, wenn man annimmt, dass konstant gleiche Teile eines Substrates oxidiert werden unabhängig von deren Konzentration. Drückt man die gemessenen  $O_2$ -Aufnahmen bei verschiedenen Substratkonzentrationen in % der theoretischen  $O_2$ -Aufnahmen aus (unter Annahme einer vollständigen Aufnahme der Glucose) und vergleicht dann die Daten ohne Abzug der endogenen Atmung mit denjenigen mit Abzug der endogenen Atmung, so lässt sich entscheiden, ob die Eigenatmung zu berücksichtigen ist, je nachdem welche Werte besser übereinstimmen.

In Anlehnung an die Arbeit von Barker (1936) wurden in einem Versuch mit 2-tägig verarmtem Myzel so kleine Glucosemengen zugefügt, dass deren vollständige Veratmung innerhalb 8 Stunden zu erwarten war. In je 3 Respiationsgefäße wurden nach 2 Stunden 0,9 mg ( $5 \mu M$ ), 0,45 mg ( $2,5 \mu M$ ) resp. 0,225 mg ( $1,25 \mu M$ ) Glucose zugekippt und daneben in 2 Gefäßen die Atmung in Abwesenheit einer C-Quelle verfolgt. Die Resultate zeigt Fig. 15, woraus ersichtlich ist, dass die Atmung der Zellen nur langsam auf die Glucosezugabe reagierte; eine merkliche Erhöhung war erst nach 3 Stunden zu beobachten. Wie Stout und Koffler (1951) ausführen, ist es allgemein schwierig zu entscheiden, wann alles zugesetzte Substrat verbraucht ist, da kein scharfer Knick in der Atmungskurve auftritt. Auch ist zu beobachten, dass die endogene Atmung nicht mehr auf den ursprünglichen Wert zurücksinkt, sondern im Verhältnis zur zugegebenen Glucose ansteigt. Im vorliegenden Fall ist es nicht möglich einen steileren Anstieg der Atmungskurve gefolgt von einer Verflachung festzustellen (bei Kurve b andeutungsweise zu beobachten), sondern nur ein allmähliches Ansteigen. Bei Versuchsabbruch wurde der Glucosegehalt bestimmt, wobei Ansatz c den gleichen Reduktionswert wie die Pufferlösung ohne Glucosezusatz aufwies; in b fanden sich von den anfänglichen 0,45 mg Glucose noch 0,03 mg, und in a liess sich noch fast die Hälfte der vorgelegten 0,9 mg, nämlich 0,42 mg nachweisen.

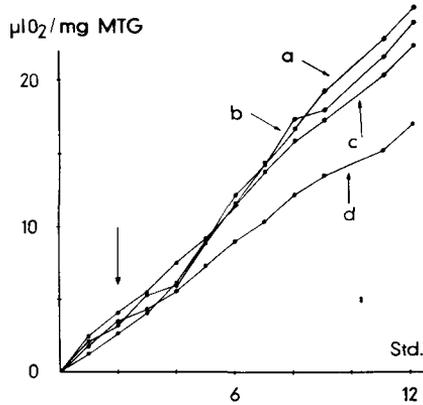


Fig. 15. Die Veratmung von kleinen Glucosemengen

12 Tage altes Myzel, verarmt während 2 Tagen; nach 2 Stunden (Pfeil) folgende Zusätze zu 5 ml 0,05 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer: a: 0,9 mg ( $5 \mu\text{M}$ ) Glucose, b: 0,45 mg ( $2,5 \mu\text{M}$ ) Glucose, c: 0,225 mg ( $1,25 \mu\text{M}$ ) Glucose, d: keine

#### 4. Der Einfluss des pH auf die Veratmung der Glucose

Die Wasserstoffionenkonzentration im Substrat beeinflusst die physiologische Aktivität der Organismen in verschiedener Hinsicht. Einerseits sind die Permeabilitätsverhältnisse der Zellmembran durch den pH-Wert des umgebenden Mediums bestimmt, andererseits hängen die Enzymaktivität und -stabilität vom pH ab. Sowohl bei tiefem wie bei hohem pH findet eine Inaktivierung der Enzyme statt, dazwischen liegt ein Optimum der Wirksamkeit, das je nach Art des Enzyms mehr im alkalischen oder sauren Gebiet liegt (siehe z. B. Johnson 1949).

Sowohl Schimmelpilze wie höhere Pilze bevorzugen im allgemeinen saures Milieu. Die Abhängigkeit der Glucoseoxydation durch 14 Tage altes, verarmtes Myzel von Marasmius putillus vom pH-Wert des Substrates wurde im folgenden Versuch untersucht. Die 0,067 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung vom pH 4,5, wie gewöhnlich für die Atmungsversuche angewandt, wurde mit 30 %iger KOH auf pH 6,8 eingestellt und mit konz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf 2,8 und 1,8. Dann wurde soviel 0,2 m Glucoselösung zugegeben, dass eine in bezug auf Phosphatpuffer wie C-Quelle 0,05 m Lösung resultierte.

Wie Tab. 8 zeigt, war im neutralen Bereich die kleinste respiratorische Akti-

Tabelle 8

Die Veratmung der Glucose bei verschiedenen pH-Werten

Anzahl Parallelen	pH	Mittleres MTG in mg	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>
3	6,80	57,9	3,25 ± 0,20
3	4,25	60,1	5,27 ± 0,01
3	2,86	55,0	6,20 ± 0,12
2	1,80	49,3	5,44 ± 0,32

14 Tage altes Myzel, verarmt während 2 Tagen, in 5 ml Phosphatpuffer + 45 mg Glucose

vität zu beobachten, während sie mit sinkendem pH zunahm. Aus den vorliegenden 4 Messungen bei verschiedenem pH ergab sich ein Optimum um pH 3 herum. Dies entspricht dem tiefsten im Laufe des Wachstums erreichten Wert. Bei pH 1,8 wurde noch eine ungefähr gleich grosse O<sub>2</sub>-Aufnahme gemessen wie bei pH 4,5, d. h. dass Marasmius putillus eine ziemlich starke Ansäuerung des Substrates, mindestens was die Atmung anbelangt, verträgt, während gegen das neutrale und alkalische Gebiet hin eine zunehmende Hemmung zu verzeichnen ist.

#### 5. Die spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme auf organischen Säuren

##### a) Organische Säuren ausser Fettsäuren

Die Fähigkeit von Marasmius putillus zur oxydativen Dissimilation organischer Säuren wurde durch Messen der O<sub>2</sub>-Aufnahme geprüft, wobei es, wie aus dem Vorangegangenen hervorgeht, notwendig war, die Eigenatmung des Myzels zu reduzieren. In allen Versuchen wurde das Myzel durch Schütteln in dest. Wasser während 48 Stunden an Reservestoffen verarmt und vor der Atmungsmessung zweimal mit frischem dest. Wasser gewaschen. In die einzelnen Respirationsgefässe wurden Myzelmengen von ca. 40 mg Trockengewicht gegeben und in 5 ml Substrat suspendiert. Dieses setzte sich aus 0,067 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und 0,2 m Säurelösung im Verhältnis 3:1 zusammen. Die Lösungen der organischen Säuren waren mit KOH auf das pH des Puffers (4,5) eingestellt (für die Weinsäure wurde NaOH verwendet). Die Veratmung der verschiedenen Säuren wurde einerseits mit derjenigen von Glucose, andererseits mit der Eigenatmung verglichen. In Anbetracht der grossen Schwankungen der Sauerstoff-

Tabelle 9

Spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme auf organischen Säuren, ausgenommen Fettsäuren

Myzel- alter in Tagen	C - Quelle	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>		Q <sub>O<sub>2</sub></sub> Säure	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> Säure	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> Glucose
			δ	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> Glucose	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> endogen	Q <sub>O<sub>2</sub></sub> endogen
17	Bernsteinsäure	10,93	0,47	1,18	1,70	1,40
	Bernsteinsäure + Glucose	10,36	0,71			
	Glucose	9,22	0,05			
	Eigenatmung	6,42	0,16			
12	α-Ketoglutarinsäure	7,40	0,36	0,89	1,60	1,79
	α-Ketoglutarinsäure+Glucose	7,23	0,39			
	Glucose	8,28	0,02			
	Eigenatmung	4,62	0,14			
12	Milchsäure	5,95	0,57	0,83	1,21	1,46
	Milchsäure + Glucose	7,30	0,20			
	Glucose	7,15	0,84			
	Eigenatmung	4,90	0,02			
20	Brenztraubensäure	6,90	0,95	0,82	1,32	1,62
	Brenztraubensäure + Glucose	9,31	0,16			
	Glucose	8,46	0,41			
	Eigenatmung	5,21	0,04			
13	Fumarsäure	9,16	0,33	0,81	1,78	2,19
	Fumarsäure + Glucose	11,12	0,15			
	Glucose	11,26	0,72			
	Eigenatmung	5,14	0,02			
12	Glutarsäure	5,02	0,29	0,79	1,18	1,49
	Glutarsäure + Glucose	7,44	0,63			
	Glucose	6,35	0,26			
	Eigenatmung	4,27	0,44			
15	l-Aepfelsäure	6,01	0,71	0,77	1,18	1,54
	l-Aepfelsäure + Glucose	7,61	0,49			
	Glucose	7,82	0,55			
	Eigenatmung	5,09	0,24			
15	Gluconsäure	5,44	0,23	0,71	1,45	2,05
	Glucose	7,68	0,65			
	Eigenatmung	3,75	0,41			
14	Oxalsäure	3,95	0,25	0,66	1,04	1,59
	Oxalsäure + Glucose	5,90	0,10			
	Glucose	6,03	0,72			
	Eigenatmung	3,80	0,04			
19	trans-Aconitsäure	4,79	0,23	0,62	0,92	1,50
	Glucose	7,78	0,05			
	Eigenatmung	5,19	0,35			

Fortsetzung s. S. 46

Tab. 9 (Fortsetzung)

Myzel- alter in Tagen	C - Quelle	$Q_{O_2}$		$Q_{O_2}$ Säure	$Q_{O_2}$ Säure	$Q_{O_2}$ Glucose
			$\delta$	$Q_{O_2}$ Glucose	$Q_{O_2}$ endogen	$Q_{O_2}$ endogen
14	Zitronensäure	5,31	0,06			
	Zitronensäure + Glucose	9,37	0,79			
	Glucose	10,47	0,40	0,60	1,06	1,75
	Eigenatmung	5,98	0,48			
19	Weinsäure	4,83	0,27			
	Weinsäure + Glucose	7,14	0,16			
	Glucose	8,51	0,18	0,57	1,15	2,02
	Eigenatmung	4,21	0,06			
18	cis-Aconitsäure	4,30	0,28			
	cis-Aconitsäure + Glucose	7,88	0,32			
	Glucose	7,86	0,26	0,55	1,16	2,12
	Eigenatmung	3,71	0,09			
17	Malonsäure	5,09	0,50			
	Malonsäure + Glucose	9,28	0,52			
	Glucose	9,35	0,70	0,54	1,43	2,63
	Eigenatmung	3,55	0,06			
15	Maleinsäure	3,72	0,45			
	Maleinsäure + Glucose	7,61	0,69			
	Glucose	6,93	0,35	0,54	0,88	1,63
	Eigenatmung	4,25	0,31			
15	Adipinsäure	1,93	0,43			
	Glucose	5,67	0,68	0,34	0,62	1,83
	Eigenatmung	3,10	0,04			

Die Respirationsgefäße enthielten während 2 Tagen verarmtes Myzel von 30 - 60 mg Trockengewicht, 5 ml Substrat und im mittleren Raum 15 ml 30 %ige KOH zur Absorption des  $CO_2$ . Die 4 resp. 3 verschiedenen Arten von Substrat hatten folgende Zusammensetzung:

0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer + 0,05 m organ. Säure (in 3 resp. 4 Parallel-Gefäßen)

0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer + 0,025 m organ. Säure + 0,025 m Glucose (in 3 resp. 0 Parallel-Gefäßen)

0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer + 0,05 m Glucose (in 3 resp. 4 Parallel-Gefäßen)

0,05 m  $KH_2PO_4$ -Puffer (in 2 resp. 3 Parallel-Gefäßen)

Die Versuchsdauer betrug in allen Fällen 8 Stunden.

aufnahme, die zum Teil durch verschiedenes physiologisches Alter des Myzels bedingt waren, wurde pro Versuch nur eine Säure geprüft, daneben jedesmal auch die Atmung auf Glucose und in Phosphatpuffer ohne C-Quelle bestimmt. Zur Feststellung von katalytischen Effekten auf die oxydative Dissimilation der Glucose durch organische Säuren wurde ein Gemisch von Glucose und Säure in einer Konzentration von je 0,025 m als Atmungssubstrat verwendet. Jedem Versuch zur Atmungsmessung lag also folgende Versuchsanordnung zu Grunde:

- 3 Kolben mit 0,05 m Säurelösung
- 3 Kolben mit 0,025 m Säurelösung + 0,025 m Glucoselösung
- 3 Kolben mit 0,05 m Glucoselösung
- 2 Kolben ohne C-Quelle
- 1 Kolben als Thermobarometer

In Tab. 9 sind die Resultate mit 16 verschiedenen Dicarbon-, Tricarbon- und Ketosäuren zusammengestellt. Die Veratmung der Glucose durch das Myzel wurde nur durch Zusatz von Glutarsäure und von Brenztraubensäure um einen Betrag erhöht, der grösser als die mittlere lineare Abweichung ist. Wie aber Versuche mit verschiedenen Glucosekonzentrationen gezeigt haben (siehe S. 39), kann eine Erhöhung der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme durch Herabsetzung der Glucosekonzentration von 0,05 m auf 0,025 m bewirkt werden. Bei der angewandten Konzentration liess sich keine Aktivierung der oxydativen Dissimilation der Glucose durch Säuren des Tricarbonsäure-Zyklus (abgek. TCA-Zyklus) feststellen im Sinne der klassischen Arbeiten von Szent-Györgyi (1935) mit Taubenbrustmuskeln.

Die Reihenfolge der Säuren in Tab. 9 ist durch deren Veratembbarkeit im Vergleich zu Glucose bestimmt. Das Verhältnis  $Q_{O_2}$  Säure/ $Q_{O_2}$  Glucose fiel immer kleiner als 1 aus, ausser bei Bernsteinsäure, wo eine um 20 % erhöhte  $O_2$ -Aufnahme gegenüber Glucose gemessen wurde (die  $Q_{O_2}$ -Werte auf Glucose und Säure sind bezüglich der endogenen Atmung unkorrigiert).

Weitere Atmungsversuche mit den gleichen Säuren und gleichen Konzentrationen, deren Ergebnisse Tab. 10 zu entnehmen sind, ergaben meistens eine relativ gute Reproduzierbarkeit, und die Reihenfolge der Säuren blieb im grossen und ganzen die gleiche. Die Versuchsstreuungen haben ihre Ursache einerseits darin, dass nicht für jeden Versuch gleichaltriges Pilzmaterial zur Verfügung stand; andererseits wurde trotz bestmöglicher Konstanthaltung der Züchtungs- und Verarmungsbedingungen verschieden physiologisch aktives Myzel erhalten, was durch Vergleich der  $Q_{O_2}$ -Werte und durch Bildung des Verhältnisses  $Q_{O_2}$  Glucose/ $Q_{O_2}$  endogen zum Ausdruck kommt.

Zieht man den Quotienten  $Q_{O_2}$  Säure/ $Q_{O_2}$  endogen zur Charakterisierung der Säuren hinsichtlich ihrer Eignung als Atmungssubstrat heran, so ergeben sich fol-

Tabelle 10

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Atmungsversuche mit organischen Säuren als C-Quellen

C - Quelle	$\frac{Q_{O_2} \text{ Säure}}{Q_{O_2} \text{ Glucose}}$	$\frac{Q_{O_2} \text{ Säure}}{Q_{O_2} \text{ endogen}}$	$\frac{Q_{O_2} \text{ Glucose}}{Q_{O_2} \text{ endogen}}$
	Bernsteinsäure	(1,18) 0,91	(1,70) 1,84
$\alpha$ -Ketoglutarinsäure	(0,89) 0,76	(1,60) 1,46	(1,79) 1,91
Brenztraubensäure	(0,82) 0,64	(1,32) 1,46	(1,62) 2,29
Fumarsäure	(0,81) 0,74 0,83	(1,78) 1,50 1,06	(2,19) 2,01 1,28
Glutarsäure	(0,79) 0,80	(1,18) 1,38	(1,49) 1,73
l-Aepfelsäure	(0,77) 0,69 0,67	(1,18) 1,63 1,33	(1,54) 2,37 2,00
Oxalsäure	(0,66) 0,62 0,40	(1,04) 0,97 0,87	(1,59) 1,57 2,18
Zitronensäure	(0,60) 0,57 0,65	(1,06) 1,13 1,34	(1,75) 1,99 2,04
Weinsäure	(0,57) 0,48	(1,15) 1,01	(2,02) 2,09
cis-Aconitsäure	(0,55) 0,86	(1,16) 1,17	(2,12) 1,01
Malonsäure	(0,54) 0,59	(1,43) 1,23	(2,63) 2,08

In Klammer die Werte aus Tab. 9.

gende Umstellungen: Die Fumarsäure kommt an 1. Stelle, Gluconsäure und Malonsäure, die eine 50 %ige Erhöhung der  $O_2$ -Aufnahme verglichen mit der endogenen Atmung bewirkten, rücken auf die 4. und 5. Stelle.

Die untersuchten organischen Säuren lassen sich in 3 Gruppen einteilen: 1. Säuren, die eine Erhöhung der  $O_2$ -Aufnahme in bezug auf die endogene Atmung hervorriefen; 2. Säuren, auf denen die gleiche spezifische  $O_2$ -Aufnahme ermittelt wurde wie in der Pufferlösung; 3. Säuren, die die endogene Atmung hemmten. In die 1. Kategorie fallen Fumarsäure, Bernsteinsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, Gluconsäure, Malonsäure, Brenztraubensäure, Milchsäure, sowie Glutarsäure und l-Aepfelsäure. Zur Kategorie der indifferenten Säuren sind Zitronensäure, cis- und trans-Aconitsäure, Weinsäure und Oxalsäure zu zählen. In die 3. Kategorie gehören Maleinsäure und Adipinsäure, sowie ausgeprägter die Fettsäuren, die in Tab. 11 aufgeführt sind.

Wie bereits bei den Wachstumsversuchen konstatiert wurde, veratmet das Myzel keine Weinsäure; bei Zugabe von Weinsäure zu Glucose trat eine kleine Atmungs-  
hemmung ein.

Reusser (1956) untersuchte die Wirkung von Di- und Tricarbonensäuren in verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstum von Marasmius foetidus und Marasmius putillus und fand durchwegs eine Hemmung, was im Gegensatz steht zu analogen Versuchen von Oebloom (1951), die eine starke Stimulierung des Wachstums bei Marasmius urens durch Di- und Tricarbonensäuren feststellte.

b) Fettsäuren

Die Atmung der ruhenden Zellen von Marasmius putillus wurde durch Fettsäuren stark gehemmt, wenn sie in gleichen Konzentrationen vorlagen wie bei den vorangegangenen Versuchen mit Dicarbon-, Tricarbon- und Ketosäuren. Wie Tab. 11 zeigt, fand auf Caprylsäure keine O<sub>2</sub>-Aufnahme statt; von den niedern Fettsäuren be-

Tabelle 11

Die Hemmung der spezifischen O<sub>2</sub>-Aufnahme durch Fettsäuren

Myzelalter in Tagen	C - Quelle	Q <sub>O2</sub>		Q <sub>O2</sub> Säure	Q <sub>O2</sub> Säure	Q <sub>O2</sub> Glucose
				Q <sub>O2</sub> Glucose	Q <sub>O2</sub> endogen	Q <sub>O2</sub> endogen
16	Ameisensäure	1,98	0,66	0,20	0,43	2,20
	Ameisensäure + Glucose	3,40	0,58			
	Glucose	10,03	0,30			
	Eigenatmung	4,56	0,01			
20	Essigsäure	0,47	0,18	0,08	0,14	1,69
	Essigsäure + Glucose	3,42	0,45			
	Glucose	5,64	0,74			
	Eigenatmung	3,34	0,22			
14	Propionsäure	0,11	0,11	0,01	0,03	2,64
	Propionsäure + Glucose	0,53	0,08			
	Glucose	10,98	0,92			
	Eigenatmung	4,16	0,46			
15	Buttersäure	0,50	0,20	0,05	0,11	2,04
	Buttersäure + Glucose	2,07	0,25			
	Glucose	9,59	0,40			
	Eigenatmung	4,71	0,07			
14	Capronsäure	1,23	0,08	0,15	0,31	2,04
	Caprylsäure	0,0	0	0	0	
	Glucose	8,04	0,46			
	Eigenatmung	3,93	0,95			

Versuchsordnung siehe Tab. 9, pH 4,5

bewirkte die Propionsäure die stärkste Hemmung, während durch Ameisensäure die endogene Atmung am wenigsten erniedrigt wurde. In den Respirationskolben, die Glucose und eine Fettsäure zusammen in einer Konzentration von je 0,025 m enthielten, betrug die O<sub>2</sub>-Aufnahme in Anwesenheit von Ameisensäure 1/3, von Essigsäure 2/3 und von Buttersäure 1/5 der Atmung auf 0,05 m Glucose; Propionsäure bewirkte eine auffallend starke Hemmung, die Veratmung der Glucose erreichte kaum 5 % derjenigen ohne Säurezusatz.

Aus Versuchen mit kleineren Essigsäurekonzentrationen, deren Ergebnisse Tab. 12 zu entnehmen sind, liessen sich Anhaltspunkte über die Ursachen der Atmungshemmung durch Fettsäuren gewinnen. Es zeigte sich, dass mit sinkender Konzentration der Hemmeffekt kleiner wurde, wobei 0,001 m Essigsäure bereits eine Erhöhung gegenüber der endogenen Atmung bewirkte. In Tab. 12 sind auch die mittleren MTG aufgeführt, weil die Schwankungen von  $Q_{O_2}$  Säure/ $Q_{O_2}$  endogen innerhalb der

Tabelle 12

Die Abhängigkeit der spezifischen O<sub>2</sub>-Aufnahme von der Essigsäurekonzentration und dem Myzelalter

Myzelalter in Tagen	Konzentration der Essigsäure	Säure		Eigenatmung		$\frac{Q_{O_2} \text{ Säure}}{Q_{O_2} \text{ endogen}}$
		$Q_{O_2}$	mittleres MTG in mg	$Q_{O_2}$	mittleres MTG in mg	
11	0,01 m	1,52 ± 0,75	21,0	4,83 ± 0,25	22,0	0,32
20	0,01 m	1,29 ± 0,06	43,6	2,56 ± 0,12	46,9	0,50
12	0,005 m	2,16 ± 0,54	20,9	4,53 ± 0,36	22,4	0,48
18	0,005 m	0,72 ± 0,32	23,9	1,66 ± 0,28	27,4	0,43
13	0,001 m	6,57 ± 0,52	24,7	5,68 ± 0,15	29,6	1,16
19	0,001 m	1,90 ± 0,45	50,1	1,40 ± 0,06	63,5	1,36

5 Parallelen; Myzel während 2 Tagen verarmt; pH 4,5

gleichen Konzentration eher auf verschiedene Myzelmengen als auf verschiedenes Myzelalter zurückgeführt werden können. Die beiden Versuche mit 0,005 m Essigsäure stimmten, trotzdem das Myzel einer 12 resp. 18 Tage alten Kultur entstammte, gut überein, da beidemale ungefähr gleiche Myzelmengen vorlagen. Bei 0,01 m und 0,001 m Essigsäure hingegen ergaben die Versuche mit höherem MTG einen grösseren Wert des Quotienten  $Q_{O_2}$  Säure/ $Q_{O_2}$  endogen, was so zu erklären ist, dass in dichteren Myzelsuspensionen auf die einzelne Zelle weniger Essigsäure einwirkte.

Tabelle 13

Spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme auf Essigsäure und Zitronensäure bei verschiedenen pH-Werten

Myzel- alter in Tagen	Substrat	pH	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>		$\frac{Q_{O_2} \text{ Säure}}{Q_{O_2} \text{ Glucose}}$	$\frac{Q_{O_2} \text{ Säure}}{Q_{O_2} \text{ endogen}}$	$\frac{Q_{O_2} \text{ Glucose}}{Q_{O_2} \text{ endogen}}$
				$\delta$			
20	Essigsäure	4,5	0,47	0,18	0,08	0,14	1,69
	Essigsäure + Glucose		3,42	0,45			
	Glucose		5,64	0,74			
	Eigenatmung		3,34	0,22			
13	Essigsäure	6,8	2,88	0,43	0,53	1,14	2,14
	Essigsäure + Glucose		6,43	0,74			
	Glucose		5,40	0,01			
	Eigenatmung		2,52	0,22			
22	Essigsäure	6,8	2,01	0,60	0,67	1,36	2,01
	Essigsäure + Glucose		3,54	0,28			
	Glucose		2,98	0,24			
	Eigenatmung		1,48	0,30			
12	Zitronensäure	2,8	4,80	0,25	0,51	0,95	1,87
	Zitronensäure + Glucose		8,70	0,03			
	Glucose		9,42	0,69			
	Eigenatmung		5,03	0,50			
18	Zitronensäure	2,8	3,10	0,06	0,49	1,00	2,03
	Zitronensäure + Glucose		5,96	0,19			
	Glucose		6,29	0,09			
	Eigenatmung		3,10	0,10			
15	Zitronensäure	4,5	6,49	0,11	0,89	1,53	1,72
	Zitronensäure + Glucose		7,42	0,71			
	Glucose		7,31	0,87			
	Eigenatmung		4,24	0,01			
19	Zitronensäure	4,5	3,09	0,11	0,65	1,24	1,90
	Zitronensäure + Glucose		4,82	0,42			
	Glucose		4,74	0,31			
	Eigenatmung		2,50	0,26			
13	Zitronensäure	6,8	2,16	0,22	0,53	1,48	2,77
	Zitronensäure + Glucose		2,64	0,41			
	Glucose		4,05	0,46			
	Eigenatmung		1,46	0,06			
15	Zitronensäure	6,8	3,72	0,56	0,65	1,12	1,71
	Zitronensäure + Glucose		5,02	0,56			
	Glucose		5,69	0,25			
	Eigenatmung		3,32	0,14			

Gleiche Versuchsanordnung wie bei den in Tab. 9 aufgeführten Atmungsmessungen

c) Der Einfluss des pH auf die Veratmung von Essigsäure und Zitronensäure

Bei Versuchen mit intakten Zellen stellt sich immer die Frage, ob die Substratmoleküle durch die Zellmembran in die Zelle gelangen können. Durch Veränderung des pH besteht eine Möglichkeit, die Permeabilitätsschranken zu überwinden. Wie Tabelle 13 zeigt, nahm die Atmungshemmung durch Essigsäure bei Erhöhung des pH von 4,5 auf 6,8 stark ab, weil durch die vermehrte Dissoziation im neutralen Bereich weniger Essigsäure in die Zelle eindrang, was in Uebereinstimmung steht mit den Resultaten von Moses (1955) mit dem Pilz Zygorrhynchus moelleri. Bei pH 6,8 fand Moses eine grössere O<sub>2</sub>-Aufnahme auf Essigsäure als selbst auf Glucose, während bei pH 3,4 eine starke Hemmung verzeichnet wurde.

Zitronensäure wurde von Marasmius putillus in stark saurem Milieu nicht veratmet, während sie bei pH 4,5 die O<sub>2</sub>-Aufnahme stimulierte, was nicht im Einklang steht mit den Ergebnissen in Tabelle 9. Dies zeigt die schlechte Reproduzierbarkeit der Atmungsversuche speziell mit Zitronensäure.

#### 6. Versuche mit Inhibitoren des Glucoseabbaues

Die Verwendung von Fluorid, Monojodessigsäure, Arsenit, Natriumazid etc., die ganz bestimmte Teilreaktionen des Kohlehydratabbaues hemmen, hat sich in der Hand vieler Forscher als wertvolles Hilfsmittel zur Aufklärung der Dissimulationsmechanismen erwiesen.

Es wurde deshalb die Wirkung einiger Inhibitoren auf die Veratmung der Glucose und auf die Eigenatmung untersucht. In Kenntnis der Tatsache, dass der Hemmeffekt in einem bestimmten Bereich von der Konzentration abhängt, wurde jeweils nur eine einzige Konzentration geprüft, die auf Literaturangaben basierte.

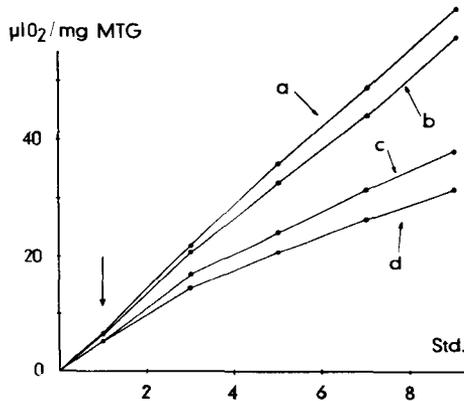
a) Natriumarsenit

Ein Zusatz von Arsenit führt bei verschiedenen Organismen zur Anreicherung von Ketosäuren im Substrat, da die Oxydation dieser Säuren gehemmt wird, wahrscheinlich durch Reaktion des Arsenits mit der Sulfhydrylgruppe des Coenzym A, das für deren Abbau notwendig ist (Krebs 1954 a).

Im folgenden Versuch wurde in Anlehnung an Angaben von Rolinson (1954) eine 0,01 m Natriumarsenitkonzentration verwendet, um deren Einfluss auf die Atmung von 18 Tage altem, unverarmtem Myzel in Pufferlösung mit und ohne Glucosezusatz zu bestimmen. Zuerst wurde die O<sub>2</sub>-Aufnahme von gewaschenem Myzel, das in 3 ml 0,067 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer suspendiert war, während einer Stunde gemessen. Dann wurden aus der Seitenampulle folgende Zusätze zugegeben:

- a) In je 3 Gefäße 0,75 ml 0,067 m Phosphatpuffer + 0,25 ml 1 m Glucoselösung + 1 ml H<sub>2</sub>O
- b) In je 2 Gefäße 0,75 ml 0,067 m Phosphatpuffer + 1,25 ml H<sub>2</sub>O
- c) In je 3 Gefäße 0,75 ml 0,067 m Phosphatpuffer + 0,25 ml 1 m Glucose- + 1 ml 0,05 m Arsenitlösung
- d) In je 3 Gefäße 0,75 ml 0,067 m Phosphatpuffer + 0,25 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml 0,05 m Arsenitlösung

Während den folgenden 8 Stunden betrug die spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme durch die gehemmten Kulturen in Gegenwart von Glucose 60 % gegenüber derjenigen durch ungehemmte. Die 0,01 m Arsenitkonzentration bewirkte eine Erniedrigung der endogenen Atmung um 45 % (siehe Fig. 16). Eine augenfällige Hemmung begann sich nicht sofort nach der Zugabe des Arsenits auszuwirken, sondern erst nach 2 Stunden.



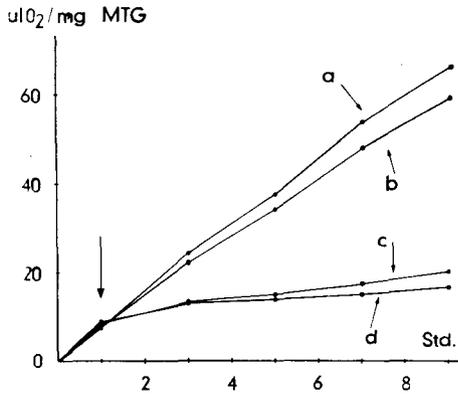
**Fig. 16.** Die Hemmung der Glucoseveratmung und der Eigenatmung durch Natriumarsenit

18 Tage altes, unverarmtes Myzel; Zusatz von 0,05 mM Natriumarsenit nach 1 Stunde (Pfeil) zu 5 ml Substrat, a: Glucoselösung ohne Hemmstoff, b: Pufferlösung ohne Hemmstoff, c: Glucoselösung mit Hemmstoff, d: Pufferlösung mit Hemmstoff

#### b) Natriumfluorid

Verschiedene enzymatische Reaktionen werden durch NaF gehemmt, indem die Spaltung der organischen Phosphatbindung verhindert wird. Am meisten studiert wurde die Wirkung auf Phosphoglyceromutase und Enolase.

Die Versuchsanordnung war analog der bei der Prüfung von Arsenit verwendeten.



**Fig. 17.** Die Hemmung der Glucoseveratmung und der Eigenatmung durch Natriumfluorid

12 Tage altes, unverarmtes Myzel; Zusatz von 0,05 mM Natriumfluorid nach 1 Stunde (Pfeil) zu 5 ml Substrat, a: Glucoselösung ohne Hemmstoff, b: Pufferlösung ohne Hemmstoff, c: Glucoselösung mit Hemmstoff, d: Pufferlösung mit Hemmstoff

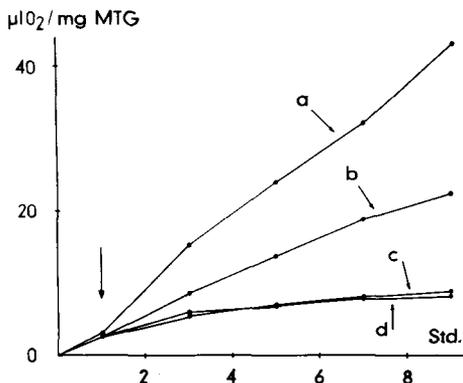
Die Hemmstoffkonzentration war auch wieder gemäss den Angaben von Rolinson (1954) 0,01 m. Die Resultate zeigt Fig. 17, woraus hervorgeht, dass die endogene Atmung stark gehemmt wurde in der 0,01 m Natriumfluoridlösung. Ob auch die Veratmung der zugesetzten Glucose gehemmt wurde, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, da sich unverarmtes Myzel in den Respirationsgefässen befand. Aus dem Verlauf der Kurven a und b ist ersichtlich, dass die Myzelatmung im Glucosesubstrat diejenige in der reinen Pufferlösung nur wenig überstieg.

### c) 2,4-Dinitrophenol

2,4-Dinitrophenol ist die am meisten gebrauchte Verbindung zur Hemmung der oxydativen Phosphorylierung ohne die Oxydation zu beeinträchtigen. In Anwesenheit von Nitrophenolen, Halogenphenolen, Azid, Gramacidin etc. wird kein anorganisches Phosphat in organische Bindung übergeführt unter Ausnützung der Energie der Oxydationsvorgänge. Diese Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung tritt nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich ein; grössere Mengen an Hemmstoffen hemmen auch die Atmung (Krebs 1954 b).

Hockenhuil et al. (1954) verwendeten eine 0,001 m Konzentration, die für den folgenden Versuch übernommen wurde. 16 Tage altes, verarmtes Myzel wurde in den

Respirationsgefäßen in 3 ml 0,067 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer suspendiert. Nach 1 Stunde wurde aus der Seitenampulle ein Gemisch von 1 ml 0,005 m DNP-Lösung, 0,25 ml 1 m Glucoselösung und 0,75 ml 0,067 m Phosphatpuffer zugegeben, so dass in bezug auf Glucose und Phosphat die übliche 0,05 m Lösung resultierte. Während den darauffolgenden 8 Stunden wurde sowohl die Glucoseveratmung wie die endogene Atmung unter dem Einfluss von 2,4-Dinitrophenol stark gehemmt (Fig. 18).



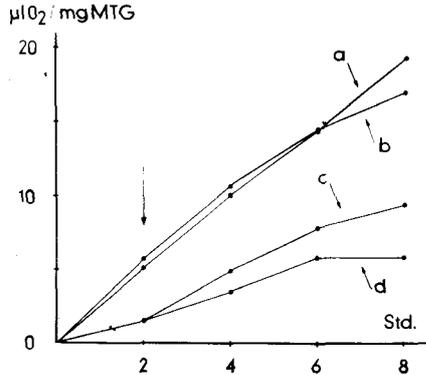
**Fig. 18.** Die Hemmung der Glucoseveratmung und der Eigenatmung durch 2,4-Dinitrophenol

16 Tage altes Myzel, verarmt während 2 Tagen; Zusatz von 0,005 mM DPN nach 1 Stunde (Pfeil) zu 5 ml Substrat, a: Glucoselösung ohne Hemmstoff, b: Pufferlösung ohne Hemmstoff, c: Glucoselösung mit Hemmstoff, d: Pufferlösung mit Hemmstoff

#### d) Monojodessigsäure

Die Oxydation von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 1,3-Diphosphoglycerinsäure wird durch Monojodessigsäure gehemmt. Im reduzierten Zustand hat die Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase freie SH-Gruppen, mit denen wahrscheinlich die Monojodessigsäure reagiert (Stumpf 1954).

Der Versuch wurde mit 22 Tage altem, unverarmtem Myzel ausgeführt und die Wirkung von Monojodessigsäure in einer 0,001 m Konzentration (Hockenull et al. 1954) auf die Respiration mit und ohne Glucosezusatz geprüft. In Anwesenheit des Hemmstoffes wurde die Glucoseveratmung auf ca. die Hälfte reduziert. Bei der Eigenatmung machte die gehemmte Atmung 35 % der ungehemmten aus (Fig. 19).



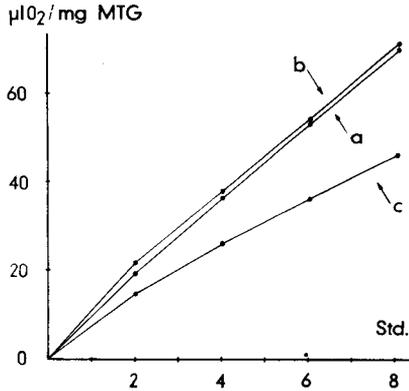
**Fig. 19.** Die Hemmung der Glucoseveratmung und der Eigenatmung durch Monojodessigsäure

22 Tage altes, unverarntes Myzel; Zusatz von 0,005 mM Monojodessigsäure nach 2 Stunden (Pfeil) zu 5 ml Substrat, a: Glucoselösung ohne Hemmstoff, b: Pufferlösung ohne Hemmstoff, c: Glucoselösung mit Hemmstoff, d: Pufferlösung mit Hemmstoff

#### e) Malonsäure

Malonsäure hemmt kompetitiv Bernsteinsäure an der Reaktion mit der Bernsteinsäure-Dehydrogenase, ein Effekt, der auf der Ähnlichkeit der Strukturen dieser beiden Verbindungen beruht und zum erstenmal von Quastel (1930) beschrieben wurde. Diese Hemmung dient als wichtige Reaktion zum Nachweis, ob im untersuchten Organismus der TCA-Zyklus als Hauptweg der oxydativen Glucosedissimilation fungiert.

Bei der Prüfung der Veratembbarkeit verschiedener organischer Säuren (siehe S. 46) wurde auch Malonsäure berücksichtigt. Dabei wurde festgestellt, dass im Säure-Glucosegemisch die Veratmung der Glucose durch 0,025 m Malonsäure nicht beeinflusst wurde, obwohl die Malonsäure offensichtlich von den Zellen aufgenommen worden war, da sie in einer 0,05 m Konzentration eine gegenüber der endogenen Atmung grössere  $\text{O}_2$ -Aufnahme bewirkte. Im folgenden Versuch wurde speziell die Veratmung von Bernsteinsäure allein in 0,05 m Konzentration und zusammen mit Malonsäure in je 0,025 m Konzentration geprüft. Das Ergebnis liegt in Fig. 20 vor. Es bestätigt eindeutig, dass Malonsäure in der angewandten, relativ hohen Konzentration die Oxydation der Bernsteinsäure nicht hemmt.



**Fig. 20.** Die Veratmung von Bernsteinsäure und Bernsteinsäure + Malonsäure

13 Tage altes Myzel, verarmt während 2 Tagen; Myzel in 5 ml Substrat, pH 4,5,

a: 0,05 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer + 0,05 m Bernsteinsäurelösung, b: 0,05 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer + 0,025 m Bernsteinsäure- + 0,025 m Malonsäurelösung, d: 0,05 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer

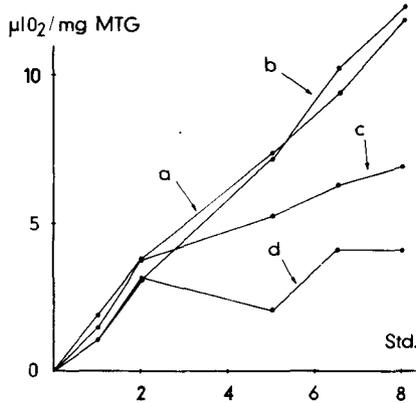
#### f) Blausäure

HCN bindet das dreiwertige Eisen der Cytochromoxydase reversibel zu einem katalytisch unwirksamen Komplex (Warburg 1946) und bedingt eine Atmungshemmung, da die übrigen Glieder des Elektronen übertragenden Systems nicht autoxydabel sind.

Für die Untersuchung der Hemmung der Atmung von 13 Tage altem, unverarmtem Myzel von Marasmius putillus durch Cyanid wurde eine 0,0001 m Konzentration gewählt. Die der  $\text{CO}_2$ -Absorption dienende 30 %ige KOH musste durch eine verdünnere Lauge ersetzt werden mit soviel KCN darin gelöst, dass sich ein gleich grosser HCN-Partialdruck einstellte wie über der 0,0001 m KCN-Lösung vom pH 4,5. In den Hauptraum der Respirationsgefässe wurden 10 ml 0,2 m KOH- und 10 ml 2 m KCN-Lösung gegeben und damit gemäss Angaben von Umbreit, Burris und Stauffer (1947) eine genügend grosse Konzentration an freier HCN erhalten, so dass keine Blausäure aus dem Substrat überdestillieren konnte. In 6 Gefässen befanden sich 5 ml Phosphatpuffer mit Glucose, und in 5 Gefässen wurde die Eigenatmung gemessen. Je 3 Gefässe wurden kurz vor Versuchsbeginn mit 0,0005 mM KCN versetzt.

Da die  $\text{CO}_2$ -Absorption durch verdünnte Lauge nicht mehr so schnell erfolgte wie mit 30 %iger, wurden auch die Gefässe ohne Hemmstoff mit 0,1 m KOH beschickt. So

konnte eine verringerte Atmung in Anwesenheit von KCN nicht einer unvollständigen Beseitigung des gebildeten  $\text{CO}_2$  zugeschrieben werden.



**Fig. 21.** Die Hemmung der Glucoseveratmung und der Eigenatmung durch Blausäure 13 Tage altes, unverarntes Myzel;  $\text{CO}_2$ -Absorption mit 0,1 m KOH, a: Veratmung der Glucose, b: Eigenatmung, c: Veratmung der Glucose in Gegenwart von KCN in 0,0001 m Konzentration, d: Eigenatmung in Gegenwart von KCN in 0,0001 m Konzentration

Wie aus Fig. 21 ersichtlich ist, wurde in diesem Versuch eine kleine  $\text{O}_2$ -Aufnahme gemessen (auch ohne Cyanid), da das  $\text{CO}_2$  nur zum Teil von der Lauge absorbiert wurde. Eine Hemmung der  $\text{O}_2$ -Aufnahme durch Blausäure tritt aber trotzdem deutlich in Erscheinung, bei der endogenen Atmung stärker als bei der Glucoseveratmung. Die Hemmung setzte nicht gleich zu Versuchsbeginn ein, sondern es wurden während den ersten 2 Stunden in allen Kolben ungefähr gleich grosse  $\text{O}_2$ -Aufnahmen gemessen. Die ungehemmte endogene Atmung war etwa gleich gross wie die Atmung im Glucosesubstrat, da das Myzel vor dem Versuch nicht verarnt worden war.

#### 7. Prüfung des Atmungssubstrates auf saure Stoffwechselprodukte

Nach Beendigung der Atmungsmessung wurde der pH-Wert des vom Myzel befreiten Substrates bestimmt. Die Säurelösungen wiesen stets eine abnehmende Acidität auf, doch liess sich kein Zusammenhang finden zwischen dem Betrag der pH-Än-

derung und der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme auf dem betreffenden Substrat. In den Gemischen von organischer Säure und Glucose traten praktisch keine Verschiebungen des pH-Wertes auf, während in den reinen Pufferlösungen der pH um ca. eine Einheit anstieg, was auf eine Ausscheidung von basischen Autolyseprodukten schliessen lässt. Die Beobachtung, dass die Wasserstoffionenkonzentration im Substrat mit Glucose nach der 8-stündigen Atmungsmessung oft beträchtlich zugenommen hatte, veranlasste eine papierchromatographische Untersuchung auf saure Stoffwechselprodukte. Zur Abtrennung von störenden Stoffen wie anorganischen Salzen und Glucose wurden 3 ml Atmungssubstrat auf eine Ionenaustauschersäule gegeben und die adsorbierten Carbonsäuren mit  $(NH_4)_2CO_3$  wieder eluiert. Zur Trennung der  $NH_4$ -Salze der Carbonsäuren auf Whatman-Papier Nr. 1 wurde ein Gemisch von n-Butanol, Ameisensäure und Wasser als Lösungsmittel verwendet. Mit dieser Methode liessen sich in keinem Fall im Glucosesubstrat irgendwelche sauren Produkte nachweisen, und von den Substratproben der 0,05 m Lösungen organischer Säuren resultierten nur Flecken, die von den zugegebenen Säuren stammten.

### C. Diskussion der Atmungsversuche

Ueber die Atmungsintensität der höheren Pilze und zum Teil auch der Schimmelpilze liegen wenig quantitative Untersuchungen vor. Daher wurden Atmungsversuche mit intaktem Schüttelmyzel von Marasmius putillus unternommen unter besonderer Berücksichtigung des Myzelalters und der Dichte der Myzelsuspensionen. Der maximale Wert der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme auf Substrat B ist in Tab. 14 aufgeführt. Er ist verglichen mit denjenigen von anderen Pilzen und speziell von Hefen ziemlich klein. Im Durchschnitt wurden nur  $8 \mu l O_2/mg$  MTG (maximaler Wert: 16) gemessen. Die geringe Atmungsintensität beruht hauptsächlich auf dem grossen Gehalt des Myzels an Reservestoffen, sodass pro Gewichtseinheit relativ wenig aktives Material vorhanden ist. Dass die Myzelfäden auch schon im ganz jungen Wachstumsstadium zu einem grossen Teil aus gespeicherten Produkten bestehen, beweist die hohe endogene Atmung. Es wird deshalb oft homogenisiertes Pilzmaterial zur Atmungsmessung verwendet, in welchem durch Zentrifugieren die Ballaststoffe abgetrennt werden können. Doch besitzen die Ergebnisse von solchen Versuchen keine Vergleichsbasis mit denjenigen von intakten Zellen, da durch den Aufschluss der Zellen die Aktivität der Enzyme verschieden beeinflusst wird. Die zellfreien Extrakte eignen sich vor allem gut, um bestimmte Reaktionen nachzuweisen, doch das Zusammenspiel der für die Stoffwechselvorgänge notwendigen Enzymsysteme ist gestört. Manche Enzyme sind

Tabelle 14

Maximale spezifische  $O_2$ -Aufnahme verschiedener Mikroorganismen

Organismus	$Q_{O_2}$	$Q_{O_2}^N$	Literatur
Azotobacter chroococcum	2000		Meyerhof und Burk *
Wilde Hefe	180		Stephenson (1949)
Bäckereihefe	87		"
Lactobacillus delbrückii	190		"
Zygorrhynchus moelleri	92	1008	Moses (1955)
Penicillium chrysogenum	72		Rolinson (1952)
Streptomyces griseus	50		Hockenhull et al. (1954)
Mycelium Radicis atrovirens	27		Somm (1953)
Marasmius putillus	16	260	diese Arbeit

\* zitiert nach Somm (1953)

leicht löslich, andere sind fest an die Zellstrukturen gebunden oder in Mitochondrien lokalisiert (zusammenfassende Darstellung bei Alexander 1956, Green 1954).

Wood, H. G. (1955) fordert, dass wieder vermehrt Experimente mit intakten Zellen ausgeführt werden, da zu dem Embden-Meyerhof-Schema und dem TCA-Zyklus noch andere Abbauewege hinzugekommen sind und noch kommen werden, und sich die Frage stellt, welche Mechanismen in den betreffenden Organismen die Hauptrolle spielen, welche in quantitativer Hinsicht die wichtigsten sind. So wird angenommen, dass in den Hefen der TCA-Zyklus spielt, da alle Teilreaktionen nachgewiesen worden sind. Doch verläuft die Oxydation der Zitronensäure nur sehr langsam, so dass der TCA-Zyklus nicht als Hauptschema für die terminalen Abbauprozesse in Betracht kommen kann (Krebs 1954 b).

Was den Stoffwechsel des untersuchten Stammes von Marasmius putillus anbelangt, so können auf Grund der gemessenen  $Q_{O_2}$ -Werte auf organischen Säuren und der Wirkung von Inhibitoren Anhaltspunkte darüber gewonnen werden, ob gewisse Mechanismen auszuschliessen sind oder nicht. Eine grosse spezifische  $O_2$ -Aufnahme, die die endogene Atmung beträchtlich übertraf, bewirkten die Säuren des Dicarbonsäure-Zyklus: Bernstein-, Fumar- und l-Aepfelsäure. Jedoch auch Glutarsäure und Malonsäure wurden gut veratmet, während sich Oxalsäure indifferent verhielt, und Maleinsäure und Adipinsäure hemmten. Bemerkenswert ist das Verhalten der Malonsäure, die in 0,05 m Konzentration weder die Eigenatmung noch die Veratmung von

Glucose und Bernsteinsäure hemmte, während bekanntlich in tierischen Geweben die Malonsäure die Bernsteinsäuredehydrogenase inaktiviert. Weil dieses Enzym ein wichtiger Bestandteil des Di- und Tricarbonsäure-Zyklus ist, können diese beiden Schemen nicht den Hauptweg der oxydativen Abbauprozesse bei Marasmius putillus darstellen. Die Erhöhung der spezifischen  $O_2$ -Aufnahme bei Zugabe von Malonsäure beweist, dass das Ausbleiben eines Hemmeffektes nicht auf Permeabilitätsschwierigkeiten zurückgeführt werden kann. Es kann auch nicht darauf beruhen, dass die zugesetzte C-Quelle zuerst assimiliert wird und nachfolgend nur zelleigene Stoffe veratmet werden, da die Stimulierung der Atmung durch Malonsäure ohne Induktionsperiode einsetzte. Das Ausbleiben eines Anpassungsintervalls schliesst auch die Möglichkeit der Bildung adaptiver Enzyme aus, die die Bernsteinsäuredehydrogenase vor der Einwirkung durch Malonsäure schützen.

Eine wichtige Stellung im TCA-Zyklus nimmt die Zitronensäure ein. Nach Ly nen und Kalb (1955) ist die Unfähigkeit lebender Hefezellen, zugesetzte Zitronensäure zu verwerten, durch die geringe Durchlässigkeit der intakten Zellwand für mehrbasische Säuren bedingt. Zitrat wird kräftig abgebaut, wenn man die Hefezellen vor dem Versuch durch Einfrieren in flüssiger Luft öffnet. Ueber dieses Ausfrieren sind in der Literatur viele Arbeiten veröffentlicht worden (vergl. z.B. Foulkes 1951). Wie Moses (1955) ausführt, können die Permeabilitätsschranken bei höheren Pilzen, im Unterschied zu Hefen, durch Schaffung eines stark sauren Milieus beseitigt werden. Bei Marasmius putillus trat aber durch Erniedrigung des pH keine Erhöhung der  $O_2$ -Aufnahme im Zitronensäuresubstrat ein, sondern im Gegenteil eine Erniedrigung. Andererseits wirkte auf die Glucosedissimilation das Senken des pH von 4,5 auf 2,8 stimulierend, so dass die Annahme naheliegt, die Zitronensäure dringe, speziell bei tiefem pH, gut in die Zelle ein, reichere sich dort an und beeinflusse die intrazellulären pH-Verhältnisse ungünstig. Die gemessenen  $Q_{O_2}$  auf Zitronensäure beim pH 4,5 schwankten sehr stark, so dass wegen der schlechten Reproduzierbarkeit aus diesen Resultaten keine weiteren Schlüsse gezogen werden können. Dasselbe gilt für die cis-Aconitsäure.

In der Literatur finden sich Angaben über Wachstums- und Atmungshemmungen durch Fettsäuren bei verschiedenen Mikroorganismen. Es sei nur auf die am hiesigen Institut ausgeführten Arbeiten über den Einfluss niederer Fettsäuren auf die Sulfatreduktion eines Stammes von Desulphovibrio desulphuricans durch Ghose (1955) hingewiesen, sowie über die hemmende Wirkung auf Assimilation und Atmung von Mycelium Radicis atrovirens (Som m 1953). Die Hemmung der Atmung von Marasmius putillus durch Essigsäure ist sehr von der vorliegenden Säurekonzentration abhängig, wie die vorliegenden Untersuchungen ergaben. In kleinen Konzentrationen (0,001 m) war eine deutliche Steigerung der Atmung durch Essigsäure gegenüber der Eigenatmung festzustellen, d. h. dass der untersuchte Stamm die notwendigen Enzymsysteme

zur Acetatoxydation besitzt und die Hemmung nur auf einem Konzentrationseffekt beruht. Dies wird auch durch die Atmungsversuche mit Essigsäure bei verschiedenem pH bekräftigt. Das Verschwinden der Hemmung bei pH 6,8 ist so zu erklären, dass beim höheren pH-Wert ein grösserer Teil der Säure als Salz vorliegt, das vollständig dissoziiert ist; dabei ist die Lipoidlöslichkeit verringert, und weniger Moleküle können durch die Lipoidschicht der cytoplasmatischen Membran in die Zellen gelangen (vergl. Höber 1947). Eine aktive Aufnahme von Essigsäureanionen aus dem neutralen Medium findet wahrscheinlich nicht statt.

Es sind verschiedene Erklärungen der Hemmung durch Fettsäuren möglich. So wies Maesen (1953) bei Bäckerhefe nach, dass die Hemmung auf einem zu tiefen intrazellulären pH beruht, wenn im sauren Substrat ziemlich viel Essigsäure vorhanden ist. Eine Erhöhung der Salzkonzentration in der umgebenden Flüssigkeit wirkt antagonistisch, da die Möglichkeit eines vermehrten Austausches von H-Ionen aus der Zelle mit andern Kationen besteht. S o m m (1953) schrieb die Atmungshemmung in grösseren Fettsäurekonzentrationen einer Blockierung von Schlüsselreaktionen zu, die bei der Dissimilation dieser Verbindungen selbst eine Rolle spielen. Eine solche Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichtes durch die Anwesenheit grosser Mengen des einen Reaktionspartners ist bei Oxalessigsäure bekannt.

Bei der Propionsäure kommt noch eine weitere, spezielle Hemmwirkung dazu. Diese Säure wies die stärkste Hemmung sowohl der Eigenatmung wie der Glucoseveratmung auf. Wie Hill (1952) bei Streptococcus faecalis nachwies, verbindet sich Propionsäure mit Coenzym A zu Propionyl-CoA und beeinflusst dadurch den Brenztraubensäureabbau.

Die Aufnahme der Glucose in die Zelle hinein ist mit phosphorylierenden Reaktionen verknüpft. Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol mag zum Teil darauf beruhen, dass die zugesetzte Glucose nicht aufgenommen werden konnte wegen der Verhinderung von oxydativen Phosphorylierungen. Jedoch auch die Eigenatmung wurde in der 2,4-Dinitrophenollösung unterbunden, was beweist, dass der Kohlehydratabbau über phosphorylierte Zwischenprodukte verläuft. Auf das Fungieren des Embden-Meyerhof-Schemas deuten auch die Ergebnisse mit Monojodessigsäure und Fluorid hin.

Das Elektronen übertragende System erwies sich als Cyanid empfindlich, was im Einklang steht mit den Ergebnissen von Untersuchungen mit andern höheren Pilzen (Rolinson 1954, S o m m 1953).

In bezug auf die Frage, wie die endogene Atmung beeinflusst wird, wenn sich die Zellen in einer Nährlösung mit verwertbarer C-Quelle befinden, sind in der Literatur ganz verschiedene, sich widersprechende Angaben zu finden. So stellten Norris et al. (1949) bei Pseudomonas aeruginosa fest, dass die Eigenatmung nicht beeinflusst wird von der Anwesenheit oxydierbarer Substanzen. Das gleiche fanden Stout und Koffler (1951) bei Penicillium chrysogenum, während bei der farblosen Alge

Prototheca zopfii die endogene Atmung weitgehend unterdrückt schien bei Zugabe von leicht veratembarem Material (Barker 1936). Diese Resultate fussten auf indirekten Untersuchungen und sind nicht ganz zufriedenstellend. Eine direkte Methode besteht darin, dass man die Organismen  $C^{14}$  markierte Verbindungen speichern lässt und nachher die Menge an  $C^{14}O_2$  bestimmt, die in einer gewöhnlichen Glucoselösung gebildet wurde. Reiner, Gest und Kamen (1949) bestimmten mit Hefen auf Glucose eine vermehrte Bildung von markiertem  $CO_2$ , was für eine Erhöhung der endogenen Atmung spricht, während Moses und Syrett (1955) bei Zygorrhynchus moelleri keine nennenswerte Erhöhung der Aktivität des gebildeten  $CO_2$  fanden. Nickerson (1953) äusserte die Vermutung, dass Streptomyces-Arten das zugefügte Substrat aufnehmen und assimilieren. Zur Energiegewinnung dienen in diesem Fall nur zelleigene Stoffe, die endogen veratmet werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Wachstum von Marasmius putillus in Ruhekultur wurde mit demjenigen in Schüttelkultur unter Verwendung eines synthetischen Substrates verglichen. Es interessierte vor allem der Verlauf der Wachstumskurven, der pH-Verlauf, die Geschwindigkeit der Glucoseaufnahme und das Auftreten von sauren Produkten im Kultursubstrat. Dabei ergab sich, dass in Ruhekulturen das Myzelwachstum wohl langsamer verläuft, meistens aber ein grösseres maximales MTG erreicht wird. Für das Aufhören des Wachstums und das Ueberhandnehmen der Autolyse war in der betreffenden Nährlösung das Verschwinden der Glucose verantwortlich. Verschiedene Säuren konnten während der Wachstumsphase im Substrat nachgewiesen werden, die aber wieder verwertet wurden, sobald alle Glucose aufgezehrt worden war. Die als Ammoniartrat zugegebene Weinsäure wurde nicht als C-Quelle ausgenützt. Papierchromatographisch konnten die folgenden Säuren nachgewiesen werden: Brenztraubensäure, Glyoxylsäure, 1-Aepfelsäure, Fumarsäure sowie Bernsteinsäure. Das Auftreten und Verschwinden von Ketosäuren wurde quantitativ verfolgt.

Mit Hilfe der Apparatur nach von Euler, Myrbäck und Nilsson wurde die Atmung von intaktem Schüttelmyzel in Abhängigkeit von Myzelalter und Myzelmenge gemessen. Durch Schütteln des Myzels in Wasser konnte erreicht werden, dass Reservestoffe veratmet wurden. Dabei sank nach 48 Stunden die Eigenatmung auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes. Mit dermassen verarmtem Myzel wurde die Veratmung der Glucose bei verschiedenen Konzentrationen geprüft und bestimmt, dass in einer 0,05 m Lösung rund 1/4 der vom Myzel aufgenommenen Glucose direkt veratmet wurde. Hohe Glucosekonzentrationen hemmten das Myzelwachstum stark und wirkten schwach hemmend auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme. Der optimale pH-Wert für die Veratmung der Glucose lag um 3 herum.

Die O<sub>2</sub>-Aufnahme durch verarmtes Myzel bei Zugabe von organischen Säuren wurde mit der Veratmung von Glucose und der Eigenatmung verglichen. Verschiedene Dicarbonsäuren, sowie Milchsäure und Brenztraubensäure erwiesen sich als gutes Atmungssubstrat. Fettsäuren, wenn in der gleichen Konzentration zugegeben, verursachten durchwegs eine Atmungshemmung. Sehr kleine Mengen von Essigsäure bewirkten eine Erhöhung der O<sub>2</sub>-Aufnahme gegenüber der endogenen Atmung. Am Beispiel der Essigsäure und der Zitronensäure wurde gezeigt, dass die Wirkung dieser Säuren auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme stark pH-abhängig ist.

Natriumarsenit, Natriumfluorid, 2,4-Dinitrophenol und Monojodessigsäure hemmten in der angewandten Konzentration die Atmung des intakten Myzels. Dies spricht dafür, dass der Kohlehydratabbau über die phosphorylierten Zwischenprodukte des Embden-Meyerohof-Schemas verläuft. Die festgestellte Empfindlichkeit von Ma-

rasmius putillus gegenüber Blausäure deutet auf das Vorhandensein von Cytochromoxydase hin. Trotz der Tatsache, dass verschiedene Glieder des Tricarbonsäure-Zyklus gut veratmet werden konnten, scheint dieser Zyklus beim untersuchten Organismus nicht als Hauptweg der oxydativen Dissimilierung der Glucose zu fungieren, da Malonsäure überhaupt keine Hemmwirkung zeigte.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aebi, H. (1951). Diss. ETH. Zürich.
- Ajl, S. J. (1951). Bact. Rev. 15, 211.
- Alexander, M. (1956). Bact. Rev. 20, 67.
- Allen, O. N. (1953). Experiments in soil bacteriology. Minneapolis.
- Barker, H. A. (1936). J. cell. comp. Physiol. 8, 231.
- Bernhauer, K. (1950). Ergebnisse der Enzymforschung 11, 151.
- Bryant, F. and Overell, B. T. (1953). Biochim. Biophys. Acta 10, 471.
- Campbell, J. J. R. and Smith, R. A. (1956). Can. J. Microbiol. 2, 433.
- Cavallini, D., Frontali, N. and Toschi, G. (1949). Nature (London) 163, 568.
- Dorrell, W. W. and Page, R. M. (1947). J. Bact. 53, 360.
- El Hawary, M. F. S. and Thompson, R. H. S. (1953). Biochem. J. 53, 340.
- Finn, R. K. (1954). Bact. Rev. 18, 254.
- Foster, J. W. (1949). Chemical activities of fungi. New York.
- Foulkes, E. C. (1951). Biochem. J. 48, 378.
- Frey, R. (1950). Ber. schweiz. bot. Ges. 60, 199.
- Friedemann, T. E. and Haugen, G. E. (1943). J. biol. Chem. 147, 415.
- Fries, N. (1950). Svensk Bot. Tid. 44, 379.
- Ghose, T. K. (1955). Diss. ETH. Zürich.
- Godet, Ch. und Charrière, R. (1946). Mitt. Lebensmitteluntersuchung und Hyg. 37, 317.
- Gottlieb, S. and Pelczar, M. J. (1951). Bact. Rev. 15, 55.
- Gray, W. D. and Bushnell, W. R. (1955). Mycologia 47, 646.
- Green, D. E. (1954). in: Chemical pathway of metabolism, edited by Greenberg, D. M. New York.
- Gunsalus, J. C., Horecker, B. L. and Wood, W. A. (1955). Bact. Rev. 19, 79.
- Hill, C. H. (1952). J. biol. Chem. 199, 329.
- Höber, R. (1947). Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Bern.
- Hockenull, D. J. D., Fantes, K. H., Herbert, M. and Whitehead, B. (1954). J. gen. Microbiol. 10, 353.
- Hugo, W. B. (1954). Bact. Rev. 18, 87.
- Humfeld, H. (1948). Science 107, 373.
- Jennison, M. W., Newcomb, M. D. and Henderson, R. (1955). Mycologia 47, 275.
- Johnson, M. J. (1949). in: Respiratory enzymes, edited by Lardy, H. A. Minneapolis.
- Keller, H. G. (1952). Diss. ETH. Zürich.

- Kluyver, A. J. and van Niel, C. B. (1956). The microb's contribution to biology. Cambridge, Mass.
- Kluyver, A. J. und Perquin, L. H. C. (1933). *Biochem. Z.* 266, 68.
- Krebs, H. A. (1954a). in: *Chemical pathway of metabolism*, edited by Greenberg, D. M. New York.
- Krebs, H. A. (1954b). *Angew. Chem.* 66, 313.
- Ledingham, G. A. (1953). *Ann. Rev. Microbiol.* 7, 433.
- Lindeberg, G. (1944). *Symb. Bot. Upsal.* VIII:2, 41.
- Lugg, J. W. H. and Overell, B. T. (1947). *Nature* 160, 87.
- Lynen, F. und Kalb, H. W. (1955). *Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A. II Chemica* 60, 471.
- Maesen, T. J. M. (1953). *Biochim. Biophys. Acta* 12, 445.
- Martius, C. and Lynen, F. (1950). *Advances Enzymol.* 10, 167.
- Meier, H. (1955). *Diss. ETH. Zürich.*
- Miller, G. L. and Miller, E. E. (1948). *Anal. Chem.* 20, 481.
- Moses, V. (1955). *J. gen. Microbiol.* 13, 235.
- Moses, V. and Syrett, P. J. (1955). *J. Bact.* 70, 201.
- Mudd, S. (1954). *Ann. Rev. Microbiol.* 8, 1.
- Nickerson, W. J. and Mohan, R. R. (1953). *VIIth Internat. Congress of Microbiology, Rome.*
- van Niel, C. B. (1943). *Ann. Rev. Biochem.* 12, 551.
- Nilsson, R. (1941). in: *Die Methoden der Fermentforschung*, hg. von Bamann, E. und Myrbäck, K. Leipzig.
- Norris, F. C., Campbell, J. J. R. and Ney, P. W. (1949). *Can. J. Res.* C 27, 157.
- Oeblom, K. (1951). *Physiol. Plant.* 4, 563.
- Ochoa, S. (1954). *Advances Enzymol.* 15, 183.
- Prescott, S. C. and Dunn, C. G. (1949). *Industrial microbiology*. New York.
- Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M. (1930). *Biochem. J.* 25, 117.
- Quastel, J. H. and Whetham, M. D. (1924). *Biochem. J.* 18, 519.
- Reiner, J. M., Gest, N. and Kamen, M. D. (1949). *Arch. Biochem.* 20, 175.
- Reusser, F. (1956). *Diss. ETH. Zürich.*
- Rolinson, G. N. (1952). *J. gen. Microbiol.* 6, 336.
- Rolinson, G. N. (1954). *J. gen. Microbiol.* 11, 412.
- Rolinson, G. N. and Lumb, M. (1953). *J. gen. Microbiol.* 8, 265.
- Schelling, C. L. (1952). *Diss. ETH. Zürich.*
- Schweppe, H. (1955). in: *Papierchromatographie in der Botanik*, hg. von Linskens, H. F. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Smith, C. G. and Johnson, M. J. (1954). *J. Bact.* 68, 346.
- Somm, H. (1953). *Diss. ETH. Zürich.*
- Stephenson, M. (1949). *Bacterial metabolism*. London.

- Stiles, H. R., Peterson, W. H. and Fred, E. B. (1926). *J. Bact.* 12, 427.
- Stöckli, A. (1952). Diss. ETH. Zürich.
- Stout, H. A. and Koffler, H. (1951). *J. Bact.* 62, 253.
- Stumpf, P. K. (1954). in: *Chemical pathway of metabolism*, edited by Greenberg, D. M. New York.
- Sulzer, F. (1955). Diss. ETH. Zürich.
- Szent-Györgyi, A. (1935). *Z. physiol. Chem.* 236, 1.
- Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F. (1947). *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism*. Minneapolis.
- Virtanen, A. I., Miettinen, J. K. and Kunttu, H. (1953). *Acta chem. scand.* 7, 38.
- Warburg, O. (1946). *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*. Berlin.
- Wikén, T., Keller, H. G., Schelling, C. L. und Stöckli, A. (1951). *Experientia* 7, 237.
- Wikén, T. and Oeblom, K. (1947). *Arkiv för Botanik (A)* 33, 1.
- Wikén, T. und Richard, O. (1954). *Antonie van Leeuwenhoek* 20, 385.
- Wikén, T. und Somm, H. (1952). *Experientia* 8, 140.
- Wood, H. G. (1955). *Physiol. Rev.* 35, 841.
- Wood, W. A. (1955). *Bact. Rev.* 19, 222.
- Woodman, A. G. (1941). *Food analysis*. New York.

## Curriculum vitae

von Paul Müller

von St. Gallen, geboren 30. März 1929

In St. Gallen besuchte ich 6 Jahre die Primarschule, 3 Jahre die Gymnasialabteilung und 4/2 Jahre die technische Abteilung der st. gallischen Kantonsschule. Im Herbst 1949 bestand ich die Maturitätsprüfung Typus C und immatrikulierte mich anschliessend an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule. Im Frühjahr 1954 erhielt ich das Diplom als Naturwissenschaftler (chemisch-physikalische Richtung). Seither bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistent am Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule tätig, wo ich Gelegenheit hatte, die vorliegende Arbeit auszuführen.