

# BEGRENZENDE BEDINGUNGEN BEI DER ATMUNG VON PHYCOMYCES

von

E. C. WASSINK.

## INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
Einführung .....	584
Abschnitt I. Die Kultur von Phycomyces auf flüssigen Nährböden mit Kohlenstoffquellen von bestimmter Zusammensetzung.	
§ 1. Zuchtversuche auf synthetischen Nährösungen.....	588
§ 2. Einfluss von Hefe auf die Entwicklung von Phycomyces	589
§ 3. Literatur über wachstumsfördernde Wirkungen .....	596
§ 4. Extraktion von Hefe; Reinigung der Extrakte und Konzentrierung der wachstumsfördernden Faktoren; Versuche mit Extrakten .....	601
Abschnitt II. Atmungsversuche mit Kulturen optimaler Entwicklung auf 4 % Glukose.	
§ 1. Einführung .....	624
§ 2. Literaturbesprechung .....	625
§ 3. Methode.	
a. Kultur des Pilzes .....	635
b. Atmungsapparat und Versuchsanordnung .....	636
§ 4. Besprechung der Versuche .....	643
Abschnitt III. Versuche mit Kulturen verschiedenen Alters.	
§ 1. Einführung .....	648
§ 2. Versuche mit Kulturen verschiedenen Alters.....	651
Abschnitt IV. Versuche zur Analyse der begrenzenden Bedingungen.	
§ 1. Einführung. Glukose als limitierender Faktor.....	663
§ 2. Die Atmung pro Einheit von Trockengewicht.....	667
§ 3. Versuche zur weiteren Analyse des Verhaltens von 5-tägigen Kulturen .....	673
§ 4. Versuche mit narkotisierten Myzelien .....	675

	Seite
Abschnitt V. Allgemeine Betrachtungen.	
§ 1. Die Temperaturabhängigkeit der Protoplasmaströmung	678
§ 2. Reversible Beschädigungen durch hohe Temperaturen	678
§ 3. Allgemeine Schlüsse .....	679
§ 4. Übersicht der Ergebnisse .....	681
Literaturverzeichnis .....	683

### EINFÜHRUNG.

De Boer (7)<sup>1)</sup> studierte die Atmung von Kulturen des Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus* Burgeff (= *Ph. nitens* Kunze) auf natürlichen Nährböden. Er benutzte zwei Bodentypen, nämlich einen Boden aus Brot und einen Boden, der aus zerkleinerten Leinsamen bestand. Auf dem ersten wird die Energie für den Aufbau- und den Erhaltungsstoffwechsel des Pilzes hauptsächlich durch Kohlehydrate geliefert, auf dem zweiten durch Fette.

Es wurden die O<sub>2</sub>-Aufnahme und die CO<sub>2</sub>-Abgabe gemessen. De Boer untersuchte u.A. die Beziehung der Atmung zu der Temperatur bei Kulturen optimaler Entwicklung. Soweit die Temperaturen nicht schädlich wirkten, wurde für diese Beziehung eine Gerade gefunden: die Atmung stieg also proportional mit der Temperatur an.

Es ist von vorne herein wahrscheinlich, dass eine Gerade als Temperaturkurve eines physiologischen Prozesses der Ausdruck einer komplizierten Relation ist. Denn wenn eine chemische Reaktion den begrenzenden Teilprozess darstellt, wird man erwarten, dass die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses bei jeder 10° Temperaturerhöhung 2 bis 3 fach vergrössert wird (nach der Van 't Hoffschen Regel). Wenn der Prozess von einer physikalischen Reaktion, speziell von einem Diffusionsprozesse, limitiert wird, dann wird im Allgemeinen die Vergrösserung der Geschwindig-

<sup>1)</sup> Die Zahlen zwischen Klammern beziehen sich auf das Literaturverzeichnis.

keit bei  $10^{\circ}$  Temperaturerhöhung geringer sein ( $\pm 1.2$ — $1.5$ -fach). In beiden Fällen wird die Beziehung der Geschwindigkeit zur Temperatur durch eine Exponentialfunktion zum Ausdruck gebracht. Im letzten Falle ist es durch den geringen Anstieg vielleicht oft schwer zu bestimmen, ob experimentelle Daten zu einer Exponentialkurve oder zu einer Geraden gehören. Jedenfalls wird diese Kurve eine geringe Neigung zur Temperaturachse aufweisen. Dies aber ist mit den von de Boer erhaltenen Geraden keineswegs der Fall.

Es zeigte sich, dass die Temperaturkurven der  $O_2$ -Aufnahme und der  $CO_2$ -Abgabe ungefähr dieselbe Neigung zur Temperaturachse aufweisen: der respiratorische Quotient  $\frac{CO_2}{O_2}$  ist also nicht von der Temperatur abhängig. Vergleicht man die Erhöhung der  $O_2$ -Aufnahme und der  $CO_2$ -Abgabe von  $10^{\circ}$  bis  $15^{\circ}$ , von  $15^{\circ}$  bis  $20^{\circ}$ , von  $20^{\circ}$  bis  $25^{\circ}$ , so sinkt diese prozentual stark, also: „ $Q_5$ “ wird mit ansteigender Temperatur immer kleiner.

Cohen Stuart (14) hat darauf hingewiesen, dass man aus den von Van 't Hoff und Arrhenius für physikalische und chemische Prozesse aufgestellten Formeln erwarten kann, dass die Grösse des Temperaturkoeffizienten mit ansteigender Temperatur sinkt. In der speziellen Literaturbesprechung werde ich noch näher zeigen, dass die Abnahme des Temperaturkoeffizienten innerhalb der studierten Temperaturgrenzen aus diesem Grunde aber weit geringer ist als die Abnahme, die man den Daten de Boers entnehmen kann. Übrigens ist auch kaum zu erwarten, dass die gesamte Atmung einen in physiko-chemischer Hinsicht einfachen Prozess darstellen werde. Viel wahrscheinlicher ist es, dass die Änderung des Temperaturkoeffizienten darauf beruht, dass nicht bei allen Temperaturen derselbe Teilprozess die Geschwindigkeit der Atmung beschränkt. (s.a. Crozier c.a.).

Den Gesamtprozess der Atmung auf einem natürlichen Nährboden, z.B. auf Brot, kann man sich aus folgenden Teilprozessen zusammengesetzt denken:

1. Die enzymatische Spaltung des Substrats: die Bildung plastischer Nährstoffe.
2. Die Diffusion der plastischen Nährstoffe von ausserhalb des Myzels nach innen, der interne Transport und eventuelle weitere hydrolytische Spaltungen.
3. Die Atmungsreaktionen im eingeren Sinne (die oxydativen Prozesse)<sup>1)</sup>. Falls letztere die Geschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Abgabe begrenzen, wird ein hoher Temperaturkoeffizient zu erwarten sein. Wenn die Geschwindigkeit von der Diffusion der plastischen Nährstoffe begrenzt wird, so ist ein niedriger  $Q_{10}$  zu erwarten.

Bekanntlich hat Blackman in seiner klassischen Abhandlung (6) 2 Theorien ausgesprochen, nämlich:

1. die Theorie über das Temperaturoptimum der Lebensprozesse, welche zur Voraussetzung hat, dass die Temperaturkurve bei unschädlichen Temperaturen der Van 't Hoffschen Regel gemäss verläuft.
2. die Theorie der begrenzenden Faktoren, welche aussagt, dass die Geschwindigkeit eines Lebensprozesses proportional mit der Zunahme des begrenzenden Faktors zunimmt und gar nicht mit der Zunahme eines anderen Faktors. Wird der begrenzende Faktor dermassen vermehrt, dass ein anderer Faktor in das Minimum gelangt, so kann die Geschwindigkeit des Prozesses fernerhin nur durch Vermehrung dieses neuen Faktors vergrössert werden. Die Beschränkung ist also *absolut*. Ausdrücklich muss darauf hingewiesen werden, dass diese Betrachtungsweise nur für Reaktionsketten gültig sein kann; die Geschwindigkeit einfacher Prozesse ist

<sup>1)</sup> Genauer gesagt: diejenige Umlagerungen, die stattfinden sobald die Nährstoffmoleküle am Ende ihrer Wanderung durch das Plasma angelangt sind.

von Änderungen in der Menge von jedem der reagierenden Bestandteile abhängig. In Zusammenhang hiermit hat Romell (40) hervorgehoben, dass es richtiger ist, nicht von begrenzenden „Faktoren“ zu reden, wie es Blackman getan hat, sondern von begrenzenden „Prozessen“ (d.h. Teilprozessen der Reaktionskette).

Dem Wesen nach sind beide Theorien Blackmans vollkommen getrennt. Besonders Van den Honert (25) hat die Tatsache benutzt, dass der Verlauf der Temperaturkurve einen Indikator für die Art des begrenzenden Prozesssteiles darstellt.

Es wurde versucht, ob von diesen Anschauungen aus, eine Einsicht in die Zusammensetzung der geradlinigen Temperaturkurve de Boers für die Atmung von *Phycomyces* zu gewinnen sei. Wie oben bereits auseinander gesetzt wurde, kann man den Atmungsprozess ohne Schwierigkeit in Teilreaktionen zerlegen, die jede für sich als begrenzender Prozess auftreten können. In erster Linie hat man es mit der enzymatischen Spaltung des Substrates zu tun.

Bei meinen Versuchen habe ich mich auf Kohlehydratkulturen beschränkt. Um zu untersuchen, ob die Spaltung der Stärke im Brot bei den höheren Temperaturen als „limiting factor“ fungiere, war es also notwendig, Kulturen auf einfachen Zuckerböden anzulegen. Aus der von de Boer gegebenen Übersicht geht hervor, dass es bisher nicht möglich war, brauchbare Kulturen von *Phycomyces* auf Zuckerlösungen (in Verbindung mit einer anorganischen Nährlösung) zu erhalten. Das Verfahren, nach dem dies gelang, ist in Abschnitt I beschrieben; die Atmungsversuche mit Glukosekulturen sind in den Abschnitten II bis V angeführt.

Alle Versuche wurden mit einem — -Stamm von *Phycomyces Blakesleeanus*, aus dem „Centraal Bureau voor Schimmelcultures“ zu Baarn, ausgeführt.

## ABSCHNITT I.

## DIE KULTUR VON PHYCOMYCES AUF FLÜSSIGEN NÄHRBÖDEN MIT KOHLENSTOFFQUELLEN VON BESTIMMTER ZUSAMMENSETZUNG.

## § 1. Zuchtversuche auf synthetischen Nährösungen.

Man kann nicht sagen, dass Phycomyces auf synthetischen Nährböden mit Zucker als Kohlenstoffquelle, gar nicht wächst. Einige Beobachtungen aus der Literatur über ziemlich gutes Wachstum, findet man bei de Boer zitiert. Welche Zuckerarten die besten sind, darüber gehen die Meinungen auseinander. Man führte dies darauf zurück, dass verschiedene Pilzstämme verschieden wählerisch sein sollten. Immer aber blieb die Entwicklung weit hinter derjenigen auf einem natürlichen Substrat, z.B. auf Brot, zurück. De Boer versuchte dies so zu erklären, dass bei geringen Zuckerkonzentrationen der Nährwert der Lösung zu klein sein würde, während bei hohen Konzentrationen das Wachstum durch osmotische Schädigungen gehemmt werden sollte.

Seitdem erschien die Arbeit Nielsens (79) über die Bildung von „Rhizopin“ durch Mucorineae. Hierin wird u.a. eine neue Nährlösung vorgeschlagen und weiter angegeben, dass die Anwesenheit eines festen Substrates in der Nährösung, Bedingung für die Bildung des Wuchsstoffes ist. Es war möglich, dass die Resultate Nielsens auch für die Kultur von Phycomyces von Bedeutung wären. Bei meinen ersten Versuchen, Phycomyces synthetisch zu züchten, benutzte ich deshalb die von Nielsen vorgeschlagene Nährösung, in die ein festes Substrat hineingebracht wurde.

In der Tabelle 1 ist die Salzlösung nach Nielsen angegeben (N 1) und zugleich sind aus einer Anzahl Abänderungen dieser Lösung, die ich später versuchte, einige angeführt, von denen auf den nächsten Seiten noch öfter die Rede sein wird (N 3 und N 7).

TABELLE 1.  
Mehrfach verwendete Modifikationen der Nielsenschen  
Nährösung.

N 1.	N 3.
Salzlösung nach den Angaben Nielsens (79)	Wie N 1, aber: $\text{NH}_4$ -Tartrat 5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 0.5 g	
$\text{Mg SO}_4$ ..... 0.5 g	
$\text{NH}_4$ -Tartrat ..... 10 g	
$\text{Fe Cl}_3$ .....	N 7.
10 Tropfen einer 1% Lösung	Wie N 1, aber anstatt
$\text{H}_2\text{O}$ ..... 1000 ccm	$\text{NH}_4$ -Tartrat: $\text{NH}_4\text{Cl}$ ..... 5 g

Als festes Substrat wurden bei den ersten Versuchen Stückchen ausgekochten Gazetuchs, welche auf ein Glasviereck gespannt waren, benutzt. Auch Säckchen aus Gaze, mit ausgekochtem Sand gefüllt, kamen zur Verwendung. Sie wurden in Kulturohren gestellt und steckten mit ihrem unteren Ende in der Nährösung, die dann in den Sand und in das Tuch emporstieg. Weitere Details der Versuchsanordnung übergehe ich hier.

In der Tabelle 2 findet man die Resultate einiger Kulturversuche mit verschiedenen Zuckerarten in verschiedenen Konzentrationen. In den meisten Fällen war die Entwicklung äussert gering. Ich mache noch auf die Rohre e und q mit Gummi arabicum bzw. löslicher Stärke als Kohlehydratquelle aufmerksam, worauf die Entwicklung ebenfalls sehr dürftig war und auf die Vergleichskulturen auf Brot (Rohre d und i), die ein sehr starkes Wachstum zeigten.

*Die Nährösung Nielsens, auch wenn festes Substrat hineingebracht wird, ermöglicht Phycomyces das Wachstum auf synthetischen Böden also nicht.*

## § 2. Einfluss von Hefe auf die Entwicklung von Phycomyces.

In der Maltosekultur f (Tabelle 2), die zufälligerweise

TABELLE 2.  
Kulturversuche mit *Phycomyces* (—-Myzel).  
Synthetische Nährlösungen mit festem Substrat (s. Text).

Rohr	Nährlösung	Impf-datum	Entwicklung d.d.		
a.	N 1 Glukose 1 %	16.1.32	20.1	kein Wachstum	26.1 kein Wachstum
b.	N 1 " 1 %	16.1	" "	" "	" "
c.	N 1 " 5 %	16.1	" "	" "	" "
d.	Brot (Kontrolle)	16.1	stark	"	sehr stark 25.1 28.1
f.	N 1 Maltose 5 %	22.1	geringes Myzelwachstum	(zieml. gutes Wachstum auf der Kulturflüssigkeit, nicht auf der Gaze, dünne Spor.träger.	
g.	N 1 Saccharose 1 %	22.1	geringes Myzelwachstum	Myzelwachstum etwas mehr auf der Gaze, im übrigen wie f.	
h.	N 1 Sacch. 1 % + 2 Tropf. Zitronensäure 1 %	22.1	kein Wachstum	kein Wachstum	
i.	Brot (Kontrolle)	22.1	bereits Spor.träger 1.2	starke Entwicklung von dicken Spor.trägern 8.2	
a.	N 1 Maltose 1 %	30.1	{geringes Myzelwachstum auf der Gaze	wie am 1.2	
c.	N 1 Saccharose 1 %	30.1	{geringes Myzelwachstum in der Lösung	wie am 1.2	
n.	N 1 " 1/2 %	30.1	kein Wachstum	kein Wachstum	
e.	N 1 Gummi arabic. 1 %	30.1	" "	einige Myzelfäden	
q.	N 1 Amylum solub. 1 %	30.1	" "	geringes Myzelwachstum	
1.	N 1 Saccharose 1/2 %	30.1	" "	in der Flüssigkeit	
2.	N 1 " 1 %	30.1	" "	kein Wachstum	
3.	N 1 " 2 %	30.1	" "	" "	
4.	N 1 " 5 %	30.1	" "	geringes Wachstum	
5.	N 1 " 10 %	30.1	" "	kein Wachstum	
6.	N 1 Maltose 1/2 %	30.1	" "	sehr geringe Entw.	
7.	N 1 " 1 %	30.1	" "	kein Wachstum	
8.	N 1 " 2 %	30.1	" "	geringes Wachstum	
9.	N 1 " 5 %	30.1	" "	etwas stärkeres Wachstum	
10.	N 1 " 10 %	30.1	" "	kein Wachstum	
11.	N 1 Fruktose 1/2 %	30.1	" "	" "	
12.	N 1 " 1 %	30.1	" "	" "	
13.	N 1 " 2 %	30.1	" "	" "	
19.	N 1 " 5 %	30.1	" "	" "	
20.	N 1 " 10 %	30.1	" "	sehr geringes Wachstum	
14.	N 1 Glukose 1/2 %	30.1	" "	" " "	
15.	N 1 " 1 %	30.1	" "	" "	
16.	N 1 " 2 %	30.1	" "	einzelne dünnen Fäden	
17.	N 1 " 5 %	30.1	" "	" " "	
18.	N 1 " 10 %	30.1	" "	" " "	

stehen geblieben war, entwickelte sich am 12.2.'32 plötzlich eine stark wachsende Generation von dicken Sporangienträgern, die den auf Brot gebildeten wenig nachstanden. Es zeigte sich, dass diese Kultur mit einer roten Hefe verunreinigt war. Gleichzeitig war eine kleine *Penicillium*-kolonie anwesend. Es lag auf der Hand, das plötzliche Wachstum von *Phycomyces* auf die Anwesenheit der anderen Organismen zurückzuführen. Beide Infektionen wurden isoliert und rein weitergezüchtet. In einer Anzahl dieser Kulturen wurde *Phycomyces* geimpft. Es zeigte sich, dass nur die rote Hefe das Wachstum von *Phycomyces* sehr stark zu stimulieren vermochte. Eine Kultur von *Phycomyces* auf der Nielsenschen Nährösung mit 5 % Maltose bei Anwesenheit der roten Hefe bleibt wenig hinter einer Brotkultur zurück. In *Penicillium*-kulturen konnte *Phycomyces* nicht zu einer günstigen Entwicklung gebracht werden.

Man konnte sich die wachstumsförderende Wirkung der Hefe auf verschiedenen Weisen vorstellen, und zwar

1. indem die vorhandene Kohlenstoffquelle in für *Phycomyces* besser zu verarbeitenden Verbindungen umgebildet würde,
2. indem von der Hefe ein Stoff an die Kulturflüssigkeit abgegeben würde, der für die Entwicklung von *Phycomyces* notwendig ist,
3. durch Veränderung des PH,
4. durch stimulierende Wirkung der lebenden Hefezellen auf das Wachstum von *Phycomyces* (indem sie z.B. eine Strahlung aussenden würden).

Weil die unter 2 und 3 angegebenen Möglichkeiten einer experimentellen Prüfung am leichtesten zugänglich waren, wurde mit ihrer Untersuchung zuerst angefangen.

Einige PH-Bestimmungen gaben folgendes Resultat:

Nährösung Nielsen (N 1) — Maltose 5 % ...	PH 5.60
idem 5-fach verdünnt .....	5.70

Kulturflüssigkeit Kultur f. (s. oben).....	PH 4.00
"      "      i. (nasses Brot) .....	6.63

Die Kulturflüssigkeit der infizierten Kultur f ist also beträchtlich särker geworden, wahrscheinlich hauptsächlich durch die Anwesenheit von *Penicillium*. Worauf es hier ankommt ist die Tatsache, dass das Wachstum von *Phycomyces*, also bei einem PH von 4.00 und bei einem PH von 6.63, sehr üppig sein kann. Dadurch wird es unwahrscheinlich, dass das PH der Nielsenschen Nährlösung ( $\pm$  5.60) für *Phycomyces* ungeeignet sein würde. In späteren Versuchen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als Stickstoffquelle hat sich ebenfalls gezeigt, dass *Phycomyces* in sehr saueren Lösungen noch gut wachsen kann (s. Tabelle 12).

Herr Professor Went hat mich darauf aufmerksam gemacht, dass die oben unter 2 angeführte Möglichkeit vielleicht zu der von Wildiers (102) aufgeworfenen Biosfrage führte. Um dies näher zu studieren, habe ich mit Bäckerhefe gearbeitet, weil hiervon leicht grössere Mengen zu erhalten waren.

TABELLE 3.  
Kulturversuche mit Zusatz von Hefe.

Agarböden mit Raulinscher Nährlösung (ohne Weinsäure) + 5 % Maltose. Geimpft 6.4.32.

8.4 Myzelien durch die Mitte geteilt, Hälfte durch 2 Glasstreifen, zwischen die Wachs gegossen wurde, getrennt.

Suspension von 1 gr. frischer Bäckerhefe in 200 ccm sterilem aq. dest.

Von dieser 5 ccm in 50 ccm N 1 (Lösung A).

0.5 ccm in 50 ccm N 1 (Lösung B).

A u. B  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 70° erwärmt.

Kombination in verschiedenen Schalen (2 Stunden Einwirkungszeit).

In Schale 1: B neben N 1.

In Schalen 2,3: A „ N 1.

Weiterentwicklung der verschiedenen Hälften.

9.4 Schale 1: Kein Unterschied.

Schalen 2,3: Durchmesser vom Myzel in beiden Hälften gleich, das Myzel ist aber auf der Seite von Lösung A bedeutend dichter.

11.4 In den Hälften mit Lösung A eine Anzahl Sporangienträger.

” ” ” ” B und mit Lösung N 1 nicht.

12.4 Wie 11.4; in den Hälften mit der Lösung A schon dicke Sporangienträger.

16.4 Myzelhälfte (mit dem Nährboden) den Hefesuspensionen in gesonderten Schalen ausgesetzt. Nachher wieder zusammengebracht.

Hefesuspension: 1 gr. frischer Bäckerhefe in 200 ccm aq. dest.

Von dieser: 1 ccm in 9 ccm N 3 — Erwärm:  $\frac{1}{2}$  St. auf 70°.

1 ” ” 9 ” N 3 — ”  $\frac{1}{2}$  ” ” 120°.

Kombinationen: N 3 gegenüber Suspension 70°.

N 3 ” ” 120°.

Einwirkungszeit 2 St.

17.4 In den Hälften, worauf die Suspensionen gestanden hatten, war das Myzel etwas grösser und viel dichter als in den N 3-Hälften.

18.4 Ganze Schalen. Der aufzugessenden Flüssigkeit war Maltose (in gleicher Konzentration wie im Nährboden) zugesetzt.

Hefesuspension: s. Vers. 16.4. Einwirkungszeit 2 St.

Schale 1: N 3 — 4 % Maltose.

” 2: N 3 — 4 % Maltose—Hefesusp. 70°.

” 3: N 3 — 4 % Maltose—Hefesusp. 120°.

20.4 Resultat. Myzelien bedecken in allen Fällen den ganzen Nährboden.

Schale 1: sehr dünn.

” 2: viel dichter.

” 3: wie 2.

19.4 Versuch ganz wie 18.4.

20.4 Resultat: Myzelien ungefähr gleich gross (No. 1 etwas kleiner).

Schale 1: sehr dünn.

” 2: am dichtesten.

” 3: zwischen 1 u. 2 aber mehr wie 2.

26.5 3 Reihen, jede aus 6 Schalen bestehend. Boden: Glukose 3 %, Maltose 1 %, N 3, agar 2 %. Geimpft mit Blöckchen aus einer Malzagarkultur. Folgende Lösungen gelangten 2 Stunden zur Einwirkung:

Reihe A:	N 3 — Glukose 3 % Maltose 1 % .....	150	ccm
	H <sub>2</sub> O .....	7.5	"
	N 3 — Glukose 3 % Maltose 1 % .....	150	"
Reihe B:	Hefesuspension (s. Vers. 8.4), 4 Tage auf 70° .....	7.5	"
	N 3 — Glukose 3 % Maltose 1 % .....	150	"
Reihe C:	Hefesuspension (s. Vers. 8.4), 1/2 Stunde auf 120° erwärmt .....	7.5	"

**Resultat:**

- 28.5 Durchmesser aller Myzelien ungefähr gleichgross.  
Besonders die der Reihe A dünner.
- 30.5 B und C gleich, der ganze Boden mit ziemlich dünnem Myzel  
überwachsen; A seit 28.5 wenig gewachsen und sehr dünn.
- 31.5 A sehr schwach entwickelt.  
B und C gleich, s. 30.5.
- 3.6 B und C ± gleich, vielleicht B etwas (sehr wenig) kräftiger  
als C.
- 9.6 Entwicklung seit dem 3.6 nicht weiter gegangen.

Eine Anzahl Petrischalen mit Nielsen<sup>1)</sup>-Maltoseagar wurde im Zentrum mit einem Stückchen Phycomyces-Myzel beschickt, das sich zu einem dünnen kreisrunden Myzel entwickelte. Sodann wurde eine Suspension von Bäckerhefe in Nielsenscher Nährösung hergestellt und während einer halben Stunde auf 70° C. erhitzt. Diese Temperatur wurde deshalb gewählt, weil über die Thermostabilität eventuell anwesender stimulierender Stoffe vorläufig nichts zu sagen war, während Okunuki (86) angibt, dass Hefe, die 1/2 Stunde auf 65° erwärmt wird, nicht weiter wächst. Zum Vergleich wurden aber auch Versuche mit einer Hefesuspension, die 1/2 Stunde auf 120° erhitzt war, angestellt.

Ungefähr am Tage nach dem Impfen wurden die Böden mit den daraufgewachsenen Myzelien mittendurch geteilt und die beiden Hälften durch ein Paraffinband getrennt oder in verschiedene (sterile) Schalen gebracht. Eine Hälfte wurde mit Nielsenscher Nährösung begossen, die andere

<sup>1)</sup> In einigen Fällen wurde Raulinsche Nährösung verwendet.

mit derselben Lösung, in der aber Hefe suspendiert war. Nach einigen Stunden wurden die Lösungen wieder abgegossen. In der Tabelle 3 findet man die Resultate einiger Versuchsreihen angegeben. Einige Détails bezüglich der Methode sind gleichfalls in die Tabelle aufgenommen worden. In allen Fällen wurde beobachtet, dass das Myzel in den Hälften, worauf während 2 Stunden die Hefesuspension gestanden hatte, deutlich dichter war, als in den Hälften, worauf während 2 Stunden die Nielsensche Lösung ohne Hefe gestanden hatte. Eine grössere Versuchsreihe bei der die Nielsensche Lösung und die Suspension auf ganze Myzelien in gesonderten Schalen zur Einwirkung gelangten und wo ausserdem die aufzugieissenden Flüssigkeiten die gleiche Zuckerkonzentration hatten wie die Nährböden, gab dasselbe Resultat (Tabelle 3). In der Regel waren nur geringe Unterschiede zwischen den Wirkungsgraden von einer auf 70° oder 120° erwärmteten Suspension zu beobachten.

Die erhaltenen Resultate deuten darauf hin, dass *in der Hefe ein thermostabiler Stoff vorhanden ist, der auf das Wachstum von Phycomyces stark fördernd wirkt.*

Es lag jetzt auf der Hand, das etwas bessere Wachstum in den in § 1 beschriebenen Versuchen mit Maltose als Zuckerquelle, so zu deuten, dass die Maltose im Gegensatz zu den anderen Zuckerarten noch Spuren eines wachstumsförderenden Stoffes enthalten müsse. Dafür spricht auch, dass Phycomyces sich auf Agarböden mit 1 % Maltose + 3 % Glukose kaum schlechter entwickelte als auf Böden mit 4 % Maltose, während auf Glukose allein kein Wachstum stattfand. Durch die später zu besprechenden Arbeiten von Schopfer ist diese Ansicht wohl als erwiesen anzusehen.

Die mit Hefesuspension behandelten Myzelien erreichten niemals eine üppige Entwicklung. Dafür war die zugeführte Menge wachstumsfördernder Stoffe offenbar zu gering. Würde man aber mehr Hefe zusetzen, dann würden damit

auch wieder mehr Nährstoffe zugesetzt werden und man würde so von der Verabreichung einer Energiequelle bekannter Zusammensetzung weit entfernt sein. Es musste also versucht werden, die wachstumsförderende Wirkung der Hefe von seinen energiereichen Bestandteilen möglichst weitgehend zu trennen. Dies gelang in befriedigender Weise durch Verwendung der von chemischer Seite ausgearbeiteten Reinigungsverfahren für Bios und andere Wachstumsfaktoren.

Bevor ich meine diesbezüglichen Versuche anführe, möchte ich erst einen kurzen Überblick über die in der Literatur zerstreuten Angaben über wachstumsförderende Wirkungen geben.

### § 3. Literatur über wachstumsförderende Wirkungen.

Wie bereits erwähnt, hat Wildiers (103) als erster die Frage nach einem bisher unbekannten, in kleinen Dosen für das Wachstum (i.c. von Hefe) erforderlichen Stoff diskutiert<sup>1)</sup>. Er versuchte, für eine Kontroverse zwischen Liebig und Pasteur eine Lösung zu bringen. Nach Pasteur könnte Hefe in einer Flüssigkeit wachsen und gären, in der nur Hefea sche, ein  $\text{NH}_4$ -Salz und Zucker enthalten ist. Nach Liebig wäre dies unmöglich, wenn keine weiteren organischen Stoffe anwesend sein würden. Wildiers fand nun, dass Wachstum und Gärung in einem Milieu nach Pasteur auftreten, wenn nur mit einer nicht zu kleinen Hefemenge geimpft wird. Dasselbe Resultat konnte Wildiers bekommen wenn er der Nährösung eine gewisse Menge gekochter Hefesuspension zusetzte. Wenn er die gekochte Suspension filtrierte, dann hatte das Filtrat die wachstumsförderende Wirkung, die festen Zellreste nicht. Hefea sche war in dieser Hinsicht unwirksam. Wildiers schliesst hieraus, dass ausser den bekannten

<sup>1)</sup> Die zoologische Vitaminliteratur bleibt hier ausser Betracht.

Nährsalzen und der Kohlenstoffquelle eine kleine Menge einer unbekannten organischen Substanz für das Wachstum der Hefe notwendig sein muss. Diese Substanz nannte er „Bios“. Die von ihm verwendete Hefe bildete nach Wildiers kein Bios. Wildiers bestimmte auch eine Anzahl Eigenschaften des Bios. Es zeigte sich z.B. löslich in Wasser und hochprozentigem Alkohol, unlöslich in absolutem Alkohol und in Aether, widerstandsfähig gegen Kochen mit Säure und dialysierbar.

Die späteren Angaben, woraus man auf eine spezifische Wachstumsförderung von kleinen Hefemengen schliessen kann, beziehen sich fast alle auf mehr oder weniger bei-läufige Beobachtungen. Robbins (91, 92) fand, dass das Wachstum von isolierten Wurzeln in sterilen Nährösungen länger anhielt, wenn Hefeextrakt zugesetzt wurde. Brink (59) stellte fest, dass das Wachstum von Pollenschläuchen auf einem synthetischen Substrat durch Zusetzen von steriles Hefeextrakt stark gefördert wurde. Der wachstumsförderende Stoff, der hier eine Rolle spielte, war thermostabil. Hefea sche hatte eine geringere, aber doch noch deutliche Wirkung. Brink stellte auch Versuche an, zum Vergleich der Keimung einzelner und in Gruppen liegender Pollenkörner. Er schloss hieraus, dass während der Keimung wachstumsförderende Stoffe abgegeben werden, die nicht artspezifisch sind. Auffällig war, dass die Differenz zwischen dem Wachstum einzelner und in Gruppen gekeimter Pollenkörner auf einem hefehaltigen Substrat geringer war als sonst. Die Wirkung der Hefe scheint also in derselben Richtung zu liegen, wie die der von den Körnern selbst abgegebenen Stoffe.

Ich möchte aber darauf hinweisen, dass man nicht alle wachstumsförderenden Wirkungen der Hefe auf Wildiers' Bios zurückführen kann, da die Hefe mehrere Wachstumsfaktoren enthält, z.B. auch Auxin (s. Kögl & Haagen Smit [71]).

Okunuki (86) untersuchte den Einfluss von den durch rote Hefen abgegebenen Substanzen auf das Wachstum von Schimmelpilzen. Es waren ein wachstumshemmender und ein wachstumsfördernder Stoff vorhanden. Der Giftstoff war u.a. extrahierbar mit Aether; der Rest hatte dann nur noch eine wachstumsfördernde Wirkung. Beide Stoffe waren thermostabil und fanden sich nicht in der Asche. Okunuki macht auch auf die verschiedenen Übereinstimmungspunkte des wachstumsfördernden Stoffes mit Wildiers' Bios aufmerksam.

Lepeschkin (72) fand, dass aus Hefe hergestelltes Vitamin B in kleinen Mengen eine fördernde Wirkung auf das Hefewachstum in synthetischem Milieu und auf das Wachstum von *Penicillium glaucum* hat.

Williams & Honn (107) untersuchten den Einfluss von Hefeextrakt auf Kulturen verschiedener Schimmelpilze auf einem vielseitigen synthetischen Nährboden. In vielen Fällen trat eine Wachstumsverbesserung in Erscheinung. An Vergleichskulturen setzten sie ein Gemisch aus einigen Aminosäuren zu. Dieses verbesserte das Wachstum in einigen Fällen, aber meistens weniger als der Hefeextrakt. Sie führen weiter unveröffentlichte Ergebnisse Winchells an, woraus hervorgeht, dass die Kulturflüssigkeit von *Aspergillus niger* Bios enthält.

Nielsen (80, 81) fand, dass „Rhizopin“, von *Rhizopus suinus*, das auf der bereits erwähnten Nährösung gebildet wird, eine wachstumsfördernde Wirkung auf Kulturen von *Aspergillus niger* und der Hefe (in synthetischer Nährösung) hat. Von Nielsen & Hartelius wurde dies weiter untersucht (82). Wurde die Kulturflüssigkeit von *Rhizopus* mit Aether extrahiert, dann ging der Stoff, der das Wachstum der *Avena*-koleoptilen fördert (Wuchsstoff A) in den Aether über, während der Wuchsstoff (B), der auf die Schimmelpilze günstig wirkt, in der wässrigen Lösung zurückblieb. Beide Stoffe waren thermostabil.

Es zeigte sich weiter (84, 85) dass der Wirkungsgrad des Wuchsstoffes B auf die Hefe von der Anwesenheit gewisser anorganischer Substanzen abhängig ist, die zum Teil in Filtrierpapierasche vorgefunden werden, und die die Autoren mit dem Namen Co-Wuchsstoffe belegen. Weiter hat Hartelius (67, 68) nachgewiesen, dass auch Harn eine bedeutende Menge des Wuchsstoffes B enthält, der wahrscheinlich wenigstens zum Teil direkt aus der Nahrung hineingelangt (69). Vor einiger Zeit machten Nielsen & Hartelius (83) die aufsehenerregende Beobachtung, dass ein Stoff der in einigen chemischen Eigenschaften und in seiner physiologischen Wirkung mit dem Wuchsstoff B übereinstimmt, entsteht, wenn man Glukose mit organischen Säuren oder deren  $\text{NH}_4$ -Salzen eine Stunde lang auf 135° erhitzt. Besonders interessant ist es, dass für diese Reaktion kein Stickstoff notwendig ist, dass also der chemisch gebildete Wuchsstoff B stickstofffrei ist.

Ältere Beobachtungen über wachstumsförderende Wirkungen, von Schimmelpilzen ausgehend, liegen ebenfalls vor. Zeller & Schmitz (109) liessen verschiedene Schimmelpilze in Schalen zusammenwachsen oder impften sie nacheinander in die wieder sterilisierte Kulturflüssigkeit. *Pleurotus sapidus* z.B. wurde in seinem Wachstum durch Kontakt mit Kolonien von *Aspergillus glaucus*, gefördert. Auch schädliche Stoffwechselprodukte schienen gebildet zu werden. Die Sukzessionsversuche sind übrigens wenig aussagend, weil am Ende der Kohlehydratvorrat erschöpft war, in den Kontrollen dagegen nicht. Ob auch in den Versuchen Harders (66) eine spezifische wachstumsfördernde Wirkung vorliegt, ist schwer zu entscheiden.

Porter (90) beobachtete Hemmungen im Wachstum von Schimmelkulturen in der Nähe von Bakterienkolonien. Erwiesen wurde, dass die Wirkung stofflicher Natur sein muss.

In neuester Zeit hat Den Dooren de Jong (60) Ver-

suche mit einem Bakterium mitgeteilt, das für Wuchsstoffe empfindlich ist. Dabei wurde erwiesen, dass das wachstumsförderende Agens mit dem Haferwuchsstoff (Went [102], Kögl & Haagen Smit [71]) nicht identisch ist. Die angegebenen Eigenschaften stimmen nicht alle mit denjenigen von Wildiers' Bios überein. Auch auf diesem Gebiete bestanden einige ältere Beobachtungen (s. bei Den Dooren de Jong).

Von Euler & Philipson (62) beobachteten die Bildung eines wachstumsfördernden Faktors für Hefe in Kulturen von *Rhizopus*-arten, *Aspergillus Wentii* und *Penicillium*. Auch Spalten von Haferkoleoptilen sollten ausser Haferwuchsstoff einen Stoff bilden, der das Wachstum der Hefe beschleunigt. Aber diese Versuche erscheinen mir nicht recht beweisend, denn es ist zum mindesten zu erwägen, ob in den langen Extraktionszeiten keine Bakterienentwicklung stattgefunden habe.

Jedoch steht die Fähigkeit höherer Pflanzen, einen Wachstumsfaktor vom diskutierten Typus zu bilden, ausser Zweifel. Eastcott fand ihn in Tee (was Von Euler & Philipson [62] als Vergleichsmaterial benutzt haben). Weiter weise ich auf die z. T. bereits besprochenen Arbeiten von Den Dooren de Jong (60), von Hartelius (69), von Philipson (89) und von Boas (55a) hin, worin der Wuchsstoff (B)-Gehalt verschiedener Teile höherer Pflanzen nachgewiesen wurde.

Weiter ist noch zu erwähnen, dass die Keimung und das Wachstum mehrerer Schimmelpilze, darunter von *Phycomyces* und von *Rhizopus*, nach Branscheidt (58) durch die Anwesenheit lebender Pollenkörner stark gefördert wird.

Dass Hefe ihrerseits in bestimmten Fällen einen Einfluss auf höhere Pflanzen haben kann, wurde bereits besprochen.

Zum Schluss möge noch darauf hingewiesen werden, dass die Beobachtungen von Bottomley und Mockeridge

(56, 57, 75, 76) über die Wirkung bestimmter Substanzen (sog. Auximonen) auf das Wachstum von Lemnakkulturen von Olsen (87) überholt wurden, der gezeigt hat, dass es sich hier nur um die Verabreichung von Eisen in löslicher Form handelte. Es scheint mir aber möglich, dass hier in bestimmten Fällen doch auch noch eine richtige „Auximon“-Wirkung vorliegt ([76], s. auch Saeger [93]).

Die Reinigungsverfahren von Hefeextrakten sowie die Arbeiten Schopfers werde ich in § 4 in Anschluss an meine eigenen Versuche behandeln.

#### § 4. Extraktion von Hefe; Reinigung der Extrakte und Konzentrierung der wachstumsfördernden Faktoren; Versuche mit Extrakten.

Einen Überblick über die Behandlung der Biosfrage von chemischer Seite hat Philipson (87) gegeben. Vergleicht man die verschiedenen hierher gehörenden Arbeiten, dann zeigt es sich, dass mehrere Autoren den wirksamen Faktor in eine Anzahl Komponenten zerlegen konnten, die jede für sich einen geringeren Wirkungsgrad aufwiesen als das Gesamtprodukt (vgl. u.a. Lucas [73]; Williams, Wilson & Von der Ahe [105]; Eddy & Kerr [61]; Miller, Eastcott & Maconachie [74]). Andere Untersucher, wie Narayanan (77), sahen keine Spaltungen bei ihrer Behandlungsweise auftreten. In einer der neuesten Arbeiten (Miller, Eastcott & Maconachie [74]) wird auseinandergesetzt, dass bei der Methode Narayanan eben die fraktionnierenden Bearbeitungen umgangen worden sind. So würde sich der scheinbare Widerspruch zwischen Narayanan und den oben erwähnten Autoren erklären. Als ich mit der Reinigung von Hefeextrakten anfing, war die Arbeit von Miller, Eastcott & Maconachie noch nicht erschienen. Beim Vergleich der verschiedenen beschriebenen Verfahren erschien das Verfahren Narayanan am meisten empfehlenswert, eben weil es den

wirksamen Faktor bis zum Ende homogen weiterführte. Die Frage ob das Bios eine einheitliche Substanz sei oder nicht, erachtete ich für meine Versuche nicht von primärer Bedeutung.

In der Tabelle 4 sind die verschiedenen Etappen des Narayananschen Verfahrens soweit es von mir befolgt wurde, kurz zusammengestellt. Die letzten Bearbeitungen wurden hier fortgelassen, weil damit nach den Angaben Narayanans keine nennenswerte weitere Reinigung erzielt wurde. Die Ziffern bei den Angaben von Extrakten in den Versuchstabellen beziehen sich auf diese Übersicht.

So ist z. B. Anfangs wurde die Methode Narayanans genau befolgt. Der Extrakt 2a wurde 2 Stunden auf 2 Atmosphären mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  hydrolysiert. Später wurde diese Hydrolyse fortgelassen weil hierdurch die Stärke des Extraktes abnahm und weiter die durch Zusatz des Baryts gebildete Fällung sich beim Autoklavieren zum Teil wieder zu lösen schien. Der Rückgang in der Wirkung des Extraktes beim Autoklavieren wird auch von Miller, Eastcott & Maconachie (74) erwähnt. Es wurde also nur überschüssiges Baryt zugesetzt und die gebildete Fällung abfiltriert. Die Extrakte, die für die im I. Abschnitt beschriebenen Versuche benutzt wurden, waren alle 2 St. auf 2 Atm. hydrolysiert. Für fast alle Atmungsversuche benutzte ich das „Filtrat 3c“ weil mit der Phosphorwolframsäurebearbeitung nur eine geringe weitere Reinigung erzielt wurde und das Filtrat 3c den gestellten Anforderungen durchaus genügte. Auch die Bearbeitung Nr 4 zeigte wenig Erfolg, da der erhaltene Sirup sich in dem zugesetzten Alkohol wieder vollständig löste.

TABELLE 4.

Auszug aus dem Extraktionsverfahren für Bios von Narayanan (1930) (etwas abgeändert).

1. a. 1 kg Bäckerhefe extrahieren mit 0.8 l. 70 % Alkohol bei 70° während 4 St.
- b. Filtrieren, Rest noch 2 × extrahieren mit ungefähr der gleichen Menge 50 % Alkohol.
- c. Extrakte a u. b zusammenbringen, Alkohol auf einer kleinen Flamme ausdunsten, wässriger Extrakt etwas konzentrieren.
2. a. Dem Endextrakt 1c  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (warmer konzentr. Lösung) zusetzen bis keine weitere Fällung entsteht. Eventuell 2 St. auf 2 Atm. autoklavieren.
- b. Präzipitat abfiltrieren, Ba entfernen mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , wieder filtrieren.  $\text{P}_\text{H}$  6.8.
3. a. Dem Filtrat 2b Überschuss neutralen Bleiazetats zusetzen, nachts stehen lassen.
- b. Filtrieren. Filtrat mit  $\text{H}_2\text{S}$  bleifrei machen ( $\rightarrow$  „Filtrat 3c“).  
b<sub>2</sub>. Fällung in heissem Wasser suspendieren, Pb. entfernen durch Zusatz von  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Filtrieren. Filtrat neutralisieren mit  $\text{NaOH}$  ( $\rightarrow$  „Fällung 3c“).
- c. Die bleifreien Flüssigkeiten auf  $\text{P}_\text{H}$  6.8 bringen und konzentrieren. Das Filtrat enthält den Bios, die Fällung das Vitamin B<sub>2</sub>.
4. a. Filtrat 3c konzentrieren zu Sirup.
- b. Den Sirup 3 × extrahieren mit 5 Vol. heißen Alkohols 80 %.
5. a. Alkohol ausdunsten, den Sirup lösen in 500 ccm 5 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- b. Überschuss Phosphorwolframsäure (konz. Lösung) zusetzen. Bios wird ausgefällt. Abfiltrieren  $\rightarrow$  Filtrat 5b + Fällung 5b. (s. weiter unten).
- c. Bios aus der Fällung wieder lösen durch Zusatz von  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  bis zu alkalischer Reaktion. Filtrieren. Das Filtrat mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisieren bis zu  $\text{P}_\text{H} \pm 6.8$ .  $\text{BaSO}_4$  abfiltrieren. Eindampfen (Fertiger Extrakt „Fällung 5b“).
- d. Filtrat 5b ebenfalls mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  alkalisch machen. Filtrieren. Neutralisieren mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bis zu  $\text{P}_\text{H} \pm 6.8$ .  $\text{BaSO}_4$  abfiltrieren. Eindampfen.

Für die Herstellung der Extrakte ging ich immer von frischer Bäckerhefe aus. Die ersten Versuchsreihen ausgenommen, wurde das Volumen der Extrakte meistens auf 100 ccm aus 1 kg frischer Hefe gebracht.

Mit den Endextrakten von jeder Bearbeitung wurde erst eine qualitative Versuchsreihe angesetzt. Als Testmyzelien benutzte ich *Phycomycesmyzelien*, die in Petrischalen von einer zentralen Impfung mit Myzel aus, auf einem N3 - Glukose 3 % - Maltose 1 % - Agar 2 % - Boden gewachsen waren.

Die Impfung wurde in allen Fällen so vorgenommen, dass aus einem Myzel in einer Malzgärschale mit einem sterilen Messer quadratische Blöckchen geschnitten wurden von nahezu  $\frac{1}{2}$  cm Länge und Breite. Man erhielt also in dieser Weise kleine Agarplättchen, die an der Oberseite mit Myzel bewachsen waren, und die, als Impfmaterial verwendet, sehr gleichmässige Kulturen ergaben. Ein besonderer Vorteil bestand noch darin, dass aus den Blöckchen eine geringe Menge wachstumsförderender Stoffe in den synthetischen Nährboden hinaus diffundierte, wodurch das Myzel leicht auf dem Nährboden zu wachsen anfing. Aus den in § 2 angeführten Versuchen hat sich übrigens gezeigt, dass in dieser Weise nur eine geringe Weiterentwicklung erzielt wird. Die beschriebene Art der Impfung wurde auch bereits von Zeller & Schmitz (109) erwähnt.

Auf den in dieser Weise erhaltenen dünnen Myzelien wurden jetzt die gewonnenen Extrakte untersucht. Von jedem Extrakt wurde  $\frac{1}{2}$  ccm mit  $4\frac{1}{2}$  ccm Wasser zusammen auf  $120^{\circ}$  sterilisiert und über einem Myzel ausgegossen. Die Kontrolle erhielt 5 ccm sterilisiertes Aq. dest. In diesen Versuchen blieb die Flüssigkeit auf den Schalen stehen.

Aus der Tabelle 5 ist ersichtlich, dass alle Extrakte, welche nach Narayanan eine „Bios“-Wirkung auf Hefe haben, auch das Wachstum von *Phycomyces* auf den angegebenen synthetischen Nährboden stark fördern. Besonders möchte ich noch darauf hinweisen, dass nach dem Zusatz von Bleiazetat die wachstumsfördernde Wirkung ganz im Filtrat enthalten war und die Fällung keine wachstumsförderende Wirkung mehr zeigte. (Das Totalvolumen

der durch Extraktion der Fällung erhaltenen Flüssigkeit war kleiner als das Volumen des Filtrats). Weiter ist hervorzuheben, dass die Differenz zwischen Filtrat 5b und Fällung 5b analog der von Narayanan beobachteten erschien. Nach Narayanan bewirkt die Bleiazetatbehandlung die Trennung von Bios (im Filtrat) und Vitamin B<sub>2</sub> (in der Fällung). In Übereinstimmung hiermit war die Fällung unwirksam bei Hefe, wirkte aber wachstumsfördernd auf junge Ratten (Narayanan & Drummond [78]). Sämtliche Tatsachen machen es sehr wahrscheinlich, dass *der nämliche Stoffkomplex (Wildiers' „Bios“), der das Wachstum von Hefe auf synthetischen Nährböden fördert, auch das Wachstum von Phycomyces auf diesen Böden ermöglicht.*

TABELLE 5.  
Versuche mit gereinigten Hefeextrakten.

---

Nährboden für alle Testkulturen: N 3, Glukose 3 %, Maltose 1 %, Agar 2 %. Jeder Schale zugesetzt:  $\frac{1}{2}$  ccm Extrakt +  $4\frac{1}{2}$  ccm aq. dest.,  $\frac{1}{2}$  St. zusammen auf 120° sterilisiert. Extrakte nachher nicht abgegossen.

---

a. Extrakt 1b.

250 ccm frische Bäckerhefe mit 200 ccm 70 % Alkohol extrahiert. Alkohol verdampfen lassen (Extr. 1a).

2. Extraktion mit 50 % Alkohol. (Extr. 1b).

4 Schalen. Geimpft 6.6.32.

7.6 12 Uhr. Zugesetzt:

Schale 1: Extrakt 1a.

„ 2: „ 1a (weiter eingedampft).

„ 3: „ 1b.

„ 4: „ 1b (weiter eingedampft).

Ergebnis:

9.6 Alle Schalen mit sehr kräftiger Entwicklung von gelbem Myzel. Untereinander wenig verschieden.

13.6 Wie 9.6.

16.6 Alle Schalen sehr dicht ausgefüllt mit dünnen Sporangienträgern. Schale 4 mit etwas weniger und etwas dickeren Sporangienträgern.

---

b. Extrakt 2b (bariumfrei, Weiterverarbeitung des Extraktes unter a).

2 Schalen. Geimpft 7.6.

8.6 22 Uhr 30. Extrakt zugesetzt. Kontrolle 1 Schale worauf 5 ccm  
aq. dest.

Ergebnis:

10.6 Starke Myzelentwicklung. Kontrolle  $\pm$  nichts.

13.6, 16.6 Wie 10.6.

19!

c. Extrakt 3c (bleifrei, pH  $\pm$  6.8).

2 Schalen, Geimpft 8.6.

9.6 16 Uhr. Extrakt zugesetzt. Kontrolle 1 Schale worauf 5 ccm  
aq. dest.

Ergebnis:

10.6 Gute Entwicklung, Kontrolle  $\pm$  nichts.

16.6 Mässige Entwicklung von ziemlich dünnen Sporangienträgern.

d. Fällung 3c.

2 Schalen. Geimpft 10.6.

11.6 10 Uhr. Extrakt zugesetzt.

Ergebnis:

13.6 Entwickl. etwas stärker als die Kontrolle, aber doch sehr gering.

16.6 Wie 13.6.

e. Extrakt 4b (Gewicht des Sirups  $\pm$  1.5 gr., gelöst in 15 ccm  
aq. dest.).

2 Schalen. Geimpft 10.6.

11.6 10 Uhr. Extrakt zugesetzt. Kontrolle. 1 Schale mit 5 ccm  
aq. dest.

Ergebnis:

13.6 Kräftige Entwicklung. Kontrolle  $\pm$  nichts.

16.6 Mässige Entwicklung von dünnen Sporangienträgern. Kontrolle  $\pm$  nichts.

#### TABELLE 6.

Versuche mit gereinigten Hefeextrakten (Quantitative Versuche).

Nährboden: N 3 - Glukose 3 % - Maltose 1 % - Agar 2 %.

Alle Extrakte  $\pm$  150 ccm von 400 gr. frischer Hefe. Jedesmal zugesetzt 5 ccm verschiedener Verdünnungen, und zwar:

a = 1 ccm Extrakt mit 4 ccm aq. dest.	(1	ccm Extrakt)
b = 1 "	a	" 4 "
c = 1 "	b	" 4 "
d = 1 "	c	" 4 "

(1/5 " )

(1/25 " )

(1/125 " )

**Extrakt 1b.**

13.6.32 Schalen geimpft (eine für jede Verdünnung) 14.6 Extrakte zugesetzt.

**Ergebnis:**

- 16.6 a und b ungefähr gleich. Sehr starke Entw., c. weniger, d noch weniger, kaum kräftiger als ohne Zusatz.
- 22.6 a. sehr kräftig, üppiger als auf Malzagar.  
 b. weniger, ungefähr wie auf Malzagar.  
 c. deutlich schwächer.  
 d. wenig kräftiger als ohne Zusatz.

**Extrakt 2b (bariumfrei).**

14.6 Schalen geimpft. 15.6. Extrakte zugesetzt.

**Ergebnis:** 16.6. a > b > c > d. d nicht merkbar, c kaum kräftiger als ohne Zusatz.

- 22.6. a  $\pm$  wie auf Malzagar.  
 b etwas schwächer.

**Extrakt 3c (bleifrei).**

15.6. Schalen geimpft. 16.6. Extrakte zugesetzt.

**Ergebnis:** 17.6. a > b > c > d. d  $\pm$  nichts, c merklich besser.

- 22.6. a ziemlich kräftig, etwas schwächer als auf Malzagar.

In den Tabellen 6 und 7 ist eine Versuchsreihe angeführt worden, mit Extrakten welche zuvor alle auf dasselbe Volumen gebracht waren. Hier ist also ein quantitativer Vergleich möglich. Es zeigt sich, dass im Verlauf der Bearbeitung die Wirkung einigermassen abnahm, was, wie bereits gesagt, hauptsächlich während des Autoklavierens stattfand.

In dieser Versuchsreihe sind außerdem 4 Verdünnungen der Extrakte verglichen worden. Dabei ist eine regelmässige Abnahme des Wirkungsgrades zu beobachten.

In einer Anzahl von Fällen hatte auch das Filtrat 5b eine erhebliche wachstumsfördernde Wirkung. Später hat es sich herausgestellt, dass dabei zu wenig Phosphorwolframsäure zugesetzt worden war, und demzufolge nicht alles Bios gefällt war. Eine prinzipielle Differenz in der Wirkungs-

TABELLE 7.  
Versuche zum Vergleich von Filtrat 3b und Fällung 3b.

Versuche in Schalen. Totale Menge der Extrakte ungefähr dieselbe.					
Fällung 3b. Versuchsbeginn 29.7.32		Filtrat 3b. Versuchsbeginn 29.7.32			
Verdünnung <sup>1)</sup>	Nährboden	Entwicklung am 5.8	Verdünnung <sup>1)</sup>	Nährboden	Entwicklung am 5.8
a	Agar 2%	keine	a	Agar 2%	sehr wenig
a	„ 2%, N3, Gluk. 4%	sehr wenig	a	„ 2%, N3, Gluk. 4%	stark
b	„ 2%, N3, „	„ „	b	„ 2%, N3, „	abnehmend
c	„ 2%, N3, „	„ „	c	„ 2%, N3, „	↓
d	„ 2%, N3, „	„ „	d	„ 2%, N3, „	kein Wachstum

<sup>1)</sup> s. Tabelle 6.

Resultate der Phosphorwolframsäurebehandlung.

Fällung 5b. Versuchsbeginn 30.6.32			Filtrat 5b. Versuchsbeginn 30.6.32		
Verdünnung <sup>1)</sup>	Nährboden	Resultat d.d. 4.7	Verdünnung <sup>1)</sup>	Nährboden	Resultat d.d. 4.7
a	Agar 2%	nichts	a	Agar 2%	kein Wachstum
a	„ 2%, N3, Gluk. 4%	sehr kräftige Entw.v. dünnen u. dicken Spor.trägern	a	„ 2%, N3, Gluk. 4%	Geringe Entw. (etwas mehr als c der Fällung)
b	„ 2%, N3, „	idem, etwas weniger	b	„ 2%, N3, „	sehr wenig
c	„ 2%, N3, „	wenig	c	„ 2%, N3, „	„ „
d	„ 2%, N3, „	sehr wenig	d	„ 2%, N3, „	„ „

<sup>1)</sup> s. Tabelle 6.

art gab es zwischen Filtrat 5b und Fällung 5b nicht (s.z.B. Tabelle 11).

In der Tabelle 8 findet man die Resultate von Kombinationen verschiedener Nährböden mit Extrakt 4b und

mit Wasser. Es zeigt sich, dass *Phycomyces* sich nur ausgiebig entwickelt, wenn der Extrakt mit dem vollständigen Nährboden kombiniert wird. Dass der Nährboden ohne Extrakt keine Entwicklung ermöglicht, ist in § 2 bereits besprochen; die in obigen Versuchen angewendete Menge Extrakt auf einem Agarboden ohne Nährstoffe bildet ebenfalls kein geeignetes Substrat. Außerdem wurde die gleiche Extraktgabe kombiniert mit nur den Zuckern oder nur den Salzen (Lösung N3). In beiden Fällen war die Entwicklung sehr gering. Das besagt, dass der Nährwert der zugesetzten Extraktmenge (4b) sehr klein ist, dass sie nicht als „natürliches Substrat“ fungiert, aber den Schimmelpilz in die Lage setzt, die Nährstoffe aus dem synthetischen Boden zu verarbeiten.

TABELLE 8.  
Wirkungsweise der Extrakte.

Extrakt 4b (15 ccm von 250 g. Hefe). Versuche in Schalen.  
11.6.32 Extrakt unmittelbar nach dem Impfen zugesetzt. ( $\frac{1}{2}$  ccm Extrakt +  $4\frac{1}{2}$  ccm aq. dest. zusammen sterilisiert).

Reihe	Boden	Zugesetzt		Entwicklungs d.d. 13.6
1	N 3, Glukose 3 %, Maltose 1 %, Agar 2 %	5 ccm H <sub>2</sub> O	(Kontrolle)	± keine
2	N 3, Glukose 3 %, Maltose 1 %, „ 2 %	Extrakt	(2 Schalen)	stark
3	— — — „ 2 %	„	(2 „ )	± keine
4	— Glukose 3 %, Maltose 1 %, „ 2 %	„	(2 „ )	± keine
5	N 3 — — „ 2 %	„	(2 „ )	± keine

#### 16.6 Wie 13.6

Arbeitet man mit dem Extrakt 3c, dann liegen die Verhältnisse im Grossen und Ganzen ähnlich, nur bekommt man meistens auf dem Extrakt + der Zuckerlösung eine ziemlich gute Entwicklung; auf dem Extrakt + der Salzlösung aber nicht.

Besonders möchte ich also hervorheben, dass *der Extrakt*

TABELLE 9.  
Kohlehydratkonzentration und Vorrat.

Kolben	Kohlehydrat	Salzlösung	Bios	Impfdatum 6.9.32		Resultat d.d. 15.9
6	4 g. lös. Stärke + 8 ccm Wasser	12 ccm N3	1ccm Fällung 5b (100 ccm v. 1 kg. Hefe)			Zieml. viele dicke Sp. tr., ± keine dünne.
9	2 " " " + 10 " "	"				Wenigere dicke Sp. tr. dazwischen dünne.
13	1 " " " + 11 " "	"	"			Dünnere Sp. tr., mehr als in 9.
14	$\frac{1}{2}$ " " " + 11 $\frac{1}{2}$ " "	"	"			± wie 13.
16	4 % Glukose <sup>1)</sup>	N3 <sup>2)</sup>	"			Viele, dünne bis sehr dünne Sp. tr.
24	1 % "	"	"			Wenigere Sp. tr. als 16, zieml. viele sehr dünne.
26	0.5 % "	"	"			Etwas wenigere Sp. tr. als 16, nahezu keine sehr dünne.
30	0.25 % "	"	"			Ungefähr wie 26, keine sehr dünne Sp. tr.
35	0.133 % "	"	"			Weniger als 30, keine sehr dünne Sp. tr.
36	0.07 % "	"	"			Ungefähr wie 35, keine sehr dünne Sp. tr.
38	—	"	"			Einige Entw. v. zieml. dicken Sp. trn.
39	4 % "	keine	"			Einige Entw. v. zieml. dicken Sp. trn.

<sup>1)</sup> <sup>2)</sup> Zusammen 24 ccm.

*keinen Ersatz bildet für die Kohlenstoffquelle im synthetischen Nährboden, sondern dass sie erst durch die Hilfe des Extraktes für den Pilz zugänglich gemacht wird.* Hinsichtlich der Kohlenstoffquelle sind die synthetischen Nährböden, denen eine kleine Dosis Extrakt zugesetzt ist, also vollkommen synthetischen Böden gleichzusetzen. Für die nacher zu beschreibenden Atmungsversuche ist diese Folgerung von grosser Wichtigkeit.

Ein weiterer Beleg für diesen Schluss bildet z.B. die geringe Entwicklung, die auf sehr niedrigen Zuckerkonzentrationen erzielt wird (s. Tabelle 9, Kolben 16 bis 38). Es zeigt zugleich, dass das in der Lösung N3 vorhandene Tartrat nicht als Kohlenstoffquelle verarbeitet werden kann.

Es war zu erwarten, dass die wachstumsfördernde Wirkung vom Hefeextrakt sich nicht nur auf dem Glukose-Maltose-Substrat äussern würde, sondern auch auf andern Energiequellen. Aus den in der Tabelle 10 angeführten Versuchen (s. auch Abb. 1) geht hervor, dass auch das Wachstum auf Glukose, Saccharose und auf löslicher Stärke in 4 %-iger Lösung in Verbindung mit N3 durch Hefeextrakt-Filtrat 3c sehr stark gefördert wird. Man sieht in allen Versuchsreihen noch eine deutliche Entwicklungsförderung durch Zugabe von nur 1/25 ccm Extrakt, und einen durchaus parallelen Verlauf in allen Reihen mit abnehmender Extraktmenge. Daraus geht deutlich hervor, dass *nur das Fehlen von Bios der Faktor ist, welcher der Assimilation der verschiedenen Kohlenstoffquellen in synthetischem Milieu im Wege steht.*

Die Kulturfüssigkeit einer Stärkekultur von *Phycomyces* enthält ein diastatisches Enzym. Bringt man einen Tropfen dieser Lösung auf eine Stärke-Gelatin-Platte (s. Wijsman [108], Klinkenberg [70]), und färbt man mit Jodjodkalium nachdem die Schale einige Tage im Eisschrank gestanden hat, so zeigt sich ein helles Feld mit einem Diffusionsring. Ob ein oder mehrere Enzyme vorhanden

sind, konnte ich bisher nicht ermitteln. Die Kulturflüssigkeit einer Glukosekultur zeigt diese Reaktion nicht.

Auch Kulturen auf N3 + Kokosfett in einer mit 4 % übereinstimmenden Gewichtsmenge reagierten in ähnlicher Weise auf eine Zugabe von Hefeextrakt (s. Tabelle 10,

TABELLE 10.

Wirkung des Bios auf die Assimilation verschiedener Kohlenstoffquellen.

Totalvolumen der Nährlösung 24 ccm. Salzlösung N3. Kohlehydratkonzentr. 4 %. Bios: Filtrat 3c. 100 ccm von 1 kg Hefe. Mit Baryt nicht autoklaviert. Geimpft 23.1.33.

Kolben No.	Kohlehydrat	Verdünnung Bios	Erfolg d.d. 30.1
3	kein	a (1 ccm)	Geringe Anzahl zieml. dünner Sp. tr.
43	Glukose	a (1 ccm)	Viele dünne Sp. tr.
44	"	b (a : 5)	Viele zieml. dicke Sp. tr. Wenigere dünne.
45	"	c (b : 5)	Etwas geringere Entw. als in 44.
46	"	-	Nahezu keine Entw.
76	Saccharose	a	{ Sehr viele sehr dünne, zieml. viele { etwas dickere Sp. tr.
80	"	b	Viele dicke Sp. tr. Nahezu keine dünne.
90	"	c	Wenigere Sp. tr. Sp. tr. ziemlich dünn.
92	"	-	Sehr geringe Entw.
95	Lösliche Stärke	a	Viele dicke Spor. tr.
96	" "	b	Zieml. viele dicke Sp. tr.
97	" "	c	Zieml. viele dicke Sp. tr., weniger als 96.
98	" "	-	Nahezu keine Entw.
104	Kokosfettsuspension	a	Zieml. viele dicke Spor. tr.
105	"	b	Zieml. viele dicke Spor. tr., eine Anzahl dünne.
107	"	c	Ungewöhnlich wie 105.
110	"	-	Geringe Entwickl., mehr als in den Kohlehydratkontrollen.

TABELLE 11.

Versuche über die Glukosekonzentration, die N-Quelle und den Einfluss von Fe-zitrat.

Impfdatum 30.8.32				Resultat am 4.9
Kolben	Salz- lösung <sup>1)</sup>	Glukose- konz. <sup>2)</sup>	Zusätzlicher Wachstumsfaktor	
65	N7	1 %	1 ccm Filtrat 5b (50 ccm aus 1 kg Hefe)	Zieml. viele, zieml. dicke Sp. tr.
66	N7	4 %	Idem	sehr viele, sehr dünne Sp. tr.
67	N7	10 %	Idem	Viele, dünne Sp. tr.
68	N7	15 %	Idem	Wie 67.
69	N7	20 %	Idem	Wie 67
70	N3	1 %	Idem	Zieml. viele, zieml. dicke Sp. tr.
71	N3	4 %	Idem	Viele zieml. dicke Sp. tr.
72	N3	10 %	Idem	Wie 71
73	N3	15 %	Idem	± wie 71
74	N3	20 %	Idem	± wie 71
75	N3	4 %	1 ccm Fällung 5b (50 ccm aus 1 kg Hefe)	Wie 66
76	N3	4 %	$\frac{1}{2}$ ccm Filtr. 5b + $\frac{1}{2}$ ccm Fäll. 5b	Wie 71
77	N3	4 %	$\frac{1}{2}$ ccm Filtr. 5b + $\frac{1}{2}$ ccm Fäll. 5b + $\frac{1}{2}$ ccm Fe-zitrat 1 %	Wie 71
78	N3	4 %	$\frac{1}{2}$ ccm Filtr. 5b + $\frac{1}{2}$ ccm Fe-zitrat 1 %	Wie 71
79	N3	4 %	$\frac{1}{2}$ ccm Fäll. 5b + $\frac{1}{2}$ ccm Fe-zitrat 1 %	Wie 75
80	N3	4 %	$\frac{1}{2}$ ccm Fe-zitrat 1 %	Entwicklung sehr gering.

<sup>1)</sup> <sup>2)</sup> Zusammen 24 ccm.

Abb. 1). Ohne Bios ist hier die Entwicklung von *Phycomyces* etwas besser als in den Kohlehydratkontrollen. Wahrscheinlich röhrt das daher, dass das Kokosfett an sich eine kleine Biosmenge enthält. Auch hier wird die Entwicklung durch

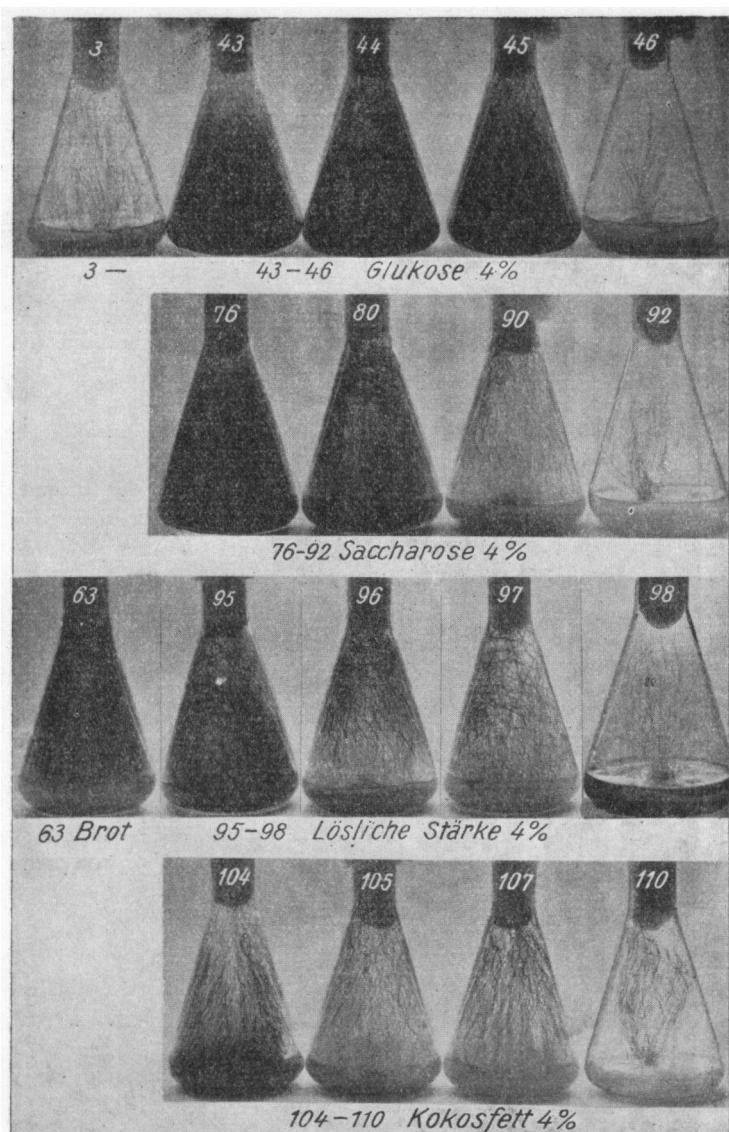


Abb. 1. Wirkung des Bios auf die Assimilation verschiedener Kohlenstoffquellen. Hierzu Tabelle 10.

Kolben-Nr:	Nahrlösung:				
	Salzlösung	N3 + 1	ccm Bios	ohne	Kohlenstoffquelle
3	N3 + 1	"	"	+ 4 %	"
43, 76, 95, 104	"	N3 + 1	"	"	"
44, 80, 96, 105	"	N3 + 1/5	"	+ 4 %	"
45, 90, 97, 107	"	N3 + 1/25	"	+ 4 %	"
46, 92, 98, 110	"	N3 ohne	"	+ 4 %	"
63	Vergleichskultur auf nassem Brot.				

1/25 ccm Extrakt 3c bedeutend verbessert. Die günstige Entwicklung welche de Boer auf Leinsamen erhielt, ist also in einem Milieu, das ein gereinigtes Fett und Bios enthält, im Prinzip zu reproduzieren. Methodische Verbesserungen (z.B. bessere Verteilung des Fettes) sind allerdings noch möglich. Bis jetzt habe ich mich mit den Fettkulturen nicht weiter beschäftigt.

Aus der Tabelle 11 ist ersichtlich, dass innerhalb weiter Grenzen die Glukosekonzentration eine starke Entwicklung von *Phycomyces* ermöglicht. Unterhalb 1 % wird die Entwicklung schlechter (s. Tabelle 9). Bei Konzentrationen von 15—20 % Glukose macht sich noch keine Schädigung bemerkbar. In der Regel bekommt man den Eindruck, dass sich auf hohen Glukosekonzentrationen eine grosse Menge sehr dünner, auf niedrigen Glukosekonzentrationen wenige, aber dicke Sporangienträger entwickeln. Vielleicht hängt damit auch zusammen, dass in den Stärkekulturen hauptsächlich dicke Sporangienträger gebildet werden (indem näml. die Konzentration direkt aufnehmbaren Zuckers niedrig ist). Das Problem, wovon die Bildung bestimmter Sporangientypen abhängig ist, bedarf aber noch einer näheren Untersuchung.

Aus der Tabelle 11 geht ebenfalls noch hervor, dass auch mit der Salzlösung N7, worin  $\text{NH}_4$ -tartrat durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ersetzt wurde, eine starke Entwicklung von *Phycomyces* erhalten werden kann. Nur waren die Sporangienträger meistens etwas dünner als auf N3. Die Lösung N7 hat aber den Nachteil, dass sie durch Verbrauch vom  $\text{NH}_4$ -ion immer saurer wird. Deshalb wurde meistens mit der Lösung N3 gearbeitet.

In der Tabelle 12 ist noch das Ergebnis zweier Versuchsreihen ganz kurz zusammengestellt. Es wurden hier verschiedene Konzentrationen Glukose und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  kombiniert. Auf Details der Entwicklungsweise der verschiedenen Kulturen gehe ich hier weiter nicht ein; nur der Gesamt-

TABELLE 12.

Übersicht über die Entwicklungsstärke und den Endwert des PH von Kulturen auf Nährböden mit verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentrationen.

Die Gesamtentwicklung ist in einer Skala von 1—5 abgeschätzt worden. Versuche von 9.9.32 und 22.9.32 kombiniert. Resultate nach 5 Tagen. Kolben von 100 ccm, mit 24 ccm Nährlösung.

0.1 %	2 PH8.3	2	2 PH8	2	2 PH7	2	2 PH6.3	2	2 PH6.3	2	2 PH6.3
0.4 %	3 PH7	3 PH7	3	3 PH6.3	3	4 PH4.1	5 PH2.5	4 PH4.6	4 PH5.5	4	4
1 %	3 PH4.1	3 PH4.1	3	3 PH3.6	4 PH3.6	5 PH3	5 PH2.5	4 PH2.5	3 PH2.5	3	3 PH3
4 %	3 PH4.6	3	3 PH4.1	3	4 PH4.1	4 PH3	3 PH3	2 PH2.5	2 PH2.5	2	2 PH3
15 %	3 PH4.6	3 PH4.6	3 PH4.6	3 PH3.5	4 PH3	3 PH2.5	2 PH3.6	2 PH3.6	2 PH3.6	2	2 PH3.6
Glukose NH <sub>4</sub> Cl	0	0.0005 %	0.002 %	0.005 %	0.02 %	0.05 %	0.1 %	0.2 %	0.5 %	1 %	2 %

eindruck ist in der Tabelle schätzenderweise wiedergegeben. Die beste Entwicklung auf diesem Substrat liegt in der Nähe von 1—4 % Glukose und 0.05—0.1 % NH<sub>4</sub>Cl. Am Ende des Versuchs wurde das PH der Kulturflüssigkeit bestimmt. Die starke Ansäuerung nach kurzer Entwicklung geht deutlich daraus hervor, sowie die Tatsache, dass Phycomyces nicht sehr säure-empfindlich ist.

Herr Dr. Dijkman hatte die Freundlichkeit den Extrakt „Fällung 5b“ auf seinen Gehalt an „Avena-Wuchsstoff“ zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass der Extrakt beträchtliche Mengen davon enthielt. Es war interessant festzustellen, ob die wachstumsfördernde Wirkung auf Phycomyces hiermit in Zusammenhang stünde. Zu diesem Zwecke wurde ein Teil des Extraktes mit peroxydfreiem Aether ausgeschüttelt (s. 71) und nach dem Ausschütteln wieder auf das ursprüngliche Volumen zurückgebracht. Auf Avena war der ausgeschüttelte Extrakt unwirksam. Vom ausgeschüttelten sowie vom unbehandelten Extrakt wurden 3 Verdünnungen mit synthetischer Nährlösung kombiniert. Die Entwicklung von Phycomyces war ungefähr dieselbe, mit dem ausgeschüttelten Extrakt noch etwas besser als mit dem unbehandelten. Hieraus ist zu schliessen, dass Avena-Wuchsstoff jedenfalls keine wachstumsfördernde Wirkung auf Phycomyces hat.

Durch die Freundlichkeit der Herren Prof. Dr. F. Kögl und Dr. A. J. Haagen Smit war ich imstande auch einen direkten Versuch mit gereinigtem Auxin vorzunehmen. Demselben synthetischen Boden wurden verschiedene Auxinmengen von 50—1000 AE (s. 71) zugesetzt. Auch hier zeigte sich keinerlei Entwicklung. Einige Versuche wobei immer einer Schale mit dem üblichen Nährboden  $\frac{1}{2}$  ccm einer Auxinlösung von 1 mgr/l (also 25000 AE) zugesetzt wurde, hatten ebenfalls keinen Erfolg. (Tabelle 13).

Obwohl es nach oben beschriebener Darstellungsweise nicht sehr wahrscheinlich war, dass die Wirkung der Hefextrakte bestimmten Elementen zuzuschreiben wäre, welche in kleinen Mengen für das Wachstum von Phycomyces notwendig wären, wurden doch einige Vergleichsversuche angestellt mit gekohltem Extrakt. Wie zu erwarten war, hatte er keine wachstumsfördernde Wirkung.

Es war noch zu untersuchen, ob sich nicht die Ent-

TABELLE 13.

Versuche mit Extrakten mit und ohne Wuchsstoff (Auxin).

Verwendeter Extrakt: Fällung 5b, 100 ccm von 1 kg Hefe.

Nährösung: N9<sup>1)</sup> - Glukose 4 % (Zusammen 24 ccm)

Geimpft am 15.11.32.

Kolben	Zusatz	Erfolg am 28.11
54	mit Aether ausgesch. Extrakt. 1 ccm Verd. a	Ziemlich viele dünne Sp. tr. Die beste Reihe
55	" " " 1 " " b	
56	" " " 1 " " c	
32	Unbehandelter Extrakt 1 ccm Verd. a	Ähnlich obenstehender Reihe. Etwas weniger gut entwickelt besonders Verd. a
33	" " 1 " " b	
34	" " 1 " " c	
13	1 ccm Auxin = 1000 AE	
18	1 " " = 500 AE	Kein Wachstum
20	1 " " = 200 AE	
26	1 " " = 100 AE	
31	1 " " = 50 AE	

2 Schalen N3 — Glukose 4 % — Agar 2 %. Geimpft 15.6.32.

Am 16.6 zugesetzt  $\frac{1}{2}$  ccm einer Auxinlösung von 1 mgr/liter ( $\frac{1}{2}$  ccm enthält 25000 AE).

Erfolg: 17.6 Kein Unterschied mit einer Kontrolle, der Wasser zugesetzt worden war.

Von neuem die gleiche Wuchsstoffmenge zugesetzt.

22.6 Keine Änderung.

1) N9. Stickstoff als 1 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; p. 1 zugesetzt 0.1 g KOH,  $\text{pH} \pm 5.1$ .

wicklung auf vollkommen synthetischen Böden verbessern liesse, durch Zufuhr des Stickstoffes in organischer Bindung. Durch Zusatz einer kleinen Menge Pepton tritt tatsächlich eine geringe Besserung ein. Es ist aber fraglich, ob diese Wirkung dem Pepton selbst zuzuschreiben ist, und nicht auf seinem Biosgehalt beruht. Auf einem Boden, worin der ganze Stickstoffgehalt als Asparagin gegeben wurde,

entwickelte sich Phycomyces nicht besser als mit einem Ammoniumsalz (Tabelle 14).

TABELLE 14.  
Kulturen auf Substraten mit organischem Stickstoff.

30.5.32 Verglichen wurden:

A : 5 Schalen mit N3 - Glukose 3 %. Maltose 1 % - Agar 2 %.

B : 5 Schalen mit N3 - Glukose 3 %. Maltose 1 % - Agar 2 %, Pepton  $1/20$  %.

31.5 Kein Unterschied.

3.6 Ähnlicher Unterschied wie nach Zusatz einer Hefesuspension (zugunsten von B).

9.6 Entwicklung seit 3.6 nicht weiter gegangen.

8.6.32 Kulturen auf: Glukose 3 % - Maltose 1 % - Agar 2 % in Verbindung mit einer Nielsen-Lösung, worin der Stickstoff gegeben wurde als 5 g Asparagin/l (statt  $\text{NH}_4$ -Tartrat).

16.6 Entwicklung nicht besser als auf N3 - Glukose 3 % - Maltose 1 % - Agar 2 %.

Auch die Frage Bottomley-Olsen wurde in dieser Hinsicht geprüft. Einigen Kulturen wurde statt Hefeextrakt eine kleine Menge Eisenzitratlösung zugesetzt. An sich gestattete dies keine Entwicklung von Phycomyces auf synthetischem Nährboden, auch in Verbindung mit Hefeextrakt hatte es auf dessen Wirkungsgrad keinen merklichen Einfluss (Tabelle 11).

Auch ein Torfextrakt, nach den Angaben Olsens (87) hergestellt, war ohne Wirkung. Eine Abkochung von Teeblättern hatte eine geringe wachstumsfördernde Wirkung.

Ein Boden, aus 49 % Malzextrakt, 49 % Wasser und 2 % Agar-agar zusammengesetzt, bildet ein gutes natürliches Substrat für Phycomyces. Impft man Phycomyces auf einem 2 %-igen Agarboden worauf 1 ccm sterilen Malzextrakts gegossen worden ist, dann bekommt man eine geringe Entwicklung. Setzt man aber einem synthetischen

Boden dieselbe Menge Malzextrakt zu, dann entwickelt sich *Phycomyces* kräftig. Der Malzextrakt enthält also eine erhebliche Menge „Bios“. Ein Versuch, den Malzextrakt der Narayananschen Bearbeitung zu unterziehen, gelang nicht. Durch seinen Reichtum an gelösten Substanzen, speziell Zucker, ist Malz kein bequemer Ausgangsstoff für die Herstellung eines Biospräparates.

Die Versuche, die in diesem § beschrieben sind, wurden zum Teil auf Nährösungen in Erlenmeyerkolben ausgeführt. Es wurde dann eine Schicht Watte auf dem Boden eines jeden Kolbens als „festes Substrat“ zugegeben. Die Salzlösung wurde in doppelter Stärke zugesetzt, während die Zuckerlösung gleichfalls in doppelter Konzentration zusammen mit dem wachstumsfördernden Extrakt in einen anderen Kolben gebracht wurde. Beide „Hälften“ des Nährbodens wurden gesondert  $\frac{1}{2}$  Stunde auf  $120^\circ$  sterilisiert; nachher wurde die Zuckerlösung mit dem Extrakt, unter Beachtung steriler Arbeitsweise, im Kolben mit der Watteschicht übergossen.

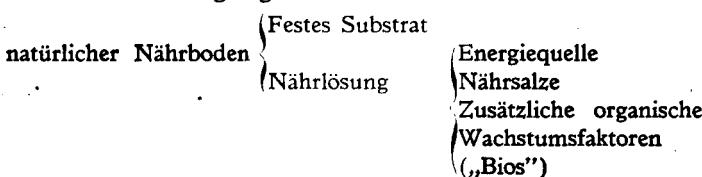
Jetzt werde ich die Arbeiten Schopfers (95—100) besprechen. Referate über diese Arbeiten sah ich zur Zeit meiner Versuche über die Wirkung von Hefe. Nach Beendigung meiner Ernährungsversuche hatte ich Gelegenheit auch die Originale zu studieren. Obgleich Schopfer hauptsächlich die Entwicklung der Zygoten von *Phycomyces* untersucht hat, hat er doch auch schon die Verbesserung vom vegetativen Wachstum durch kleine Mengen bestimmter organischer Stoffe hervorgehoben. Auch die Anwesenheit dieser Stoffe in Hefe hat er nachgewiesen, obwohl sein Ausgangspunkt ein anderer war. Er beobachtete, dass das Wachstum von *Phycomyces* auf synthetischen Böden mit Maltose als Zucker verschieden war, je nach dem benutzten Maltosepräparat. Auf den am wenigsten gereinigten Sorten war die Entwicklung am besten, auf sehr reinen Präparaten fast gleich null. Wurde die unreine

Maltose aus Alkohol umkristallisiert, dann war die wachstumsfördernde Wirkung verschwunden, während der Alkohol das aktive Agens enthielt. Wurde er eingedampft und in kleinen Mengen einem Boden mit inaktiver Maltose zugesetzt, dann konnte Phycomyces darauf wachsen. Der wirksame Stoff war thermostabil und wurde erst bei 150°—160° vernichtet. Schopfer weist darauf hin, dass speziell das Vitamin B<sub>2</sub> und Bios so thermostabil sind. Von Hefe wusste man, dass das Vitamin B<sub>2</sub> und verwandte Stoffe darin reichlich vorhanden sind. Deshalb machte Schopfer auch Versuche mit Hefe. Ein Zusatz von ½—2 % Hefe förderte die Zygotenbildung bei Phycomyces sehr stark, sowie auch wässrige und alkoholische Hefeauszüge und durch Zusatz von Alkohol und Azeton erhaltene Präzipitate. Die stärkste wachstumsfördernde Wirkung erhielt S., indem er einer Kultur 2½ mgr konzentriertes Vitamin B nach Osborne & Wakeman, aus dem Harrislaboratorium in New York, zusetzte. Die Asche dieses Präparats war unwirksam. Auch in Verbindung mit andern Zuckerarten zeigten die aktiven Präparate ihre Wirkung.

Ob diese Wirkung dem Vitamin B<sub>2</sub> oder dem Bios zuzuschreiben ist, kann Schopfer nicht entscheiden. Wenn die Mitteilungen von Narayanan (77) und von Narayanan & Drummond (78) richtig sind (und es gibt m.E. kein Anlass dieses zu bezweifeln) dann werden Bios und Vitamin B<sub>2</sub> durch die Bearbeitung mit Bleiazetat (s. oben) getrennt. Aus meinen Versuchen geht dann hervor, dass die wachstumsfördernde Wirkung der Hefe auf Phycomyces, auf Bios zurückzuführen ist. In dem Fall müsste also das von Schopfer benutzte Vitaminpräparat, Bios als Beimischung enthalten haben, woraus man wohl schliessen kann, dass Bios auf Phycomyces schon in sehr geringen Mengen eine starke wachstumsfördernde Wirkung hat.

Wenn wir die in diesem Abschnitte besprochenen Ergebnisse kurz zusammenfassen, dann vergegenwärtigt ein

natürlicher Nährboden (z.B. Brot) in Anschluss an die schon von Nielsen gemachten Erfahrungen, folgende Wachstumsbedingungen:



In der letzten Zeit habe ich in der zunächst unklaren Rolle des „festen Substrats“ einen ersten Einblick bekommen können, den ich hier noch kurz besprechen möchte. Der Anlass dazu war die eben erschienene Arbeit von Kluyver & Perquin (26) über die Entwicklung von Pilzkulturen in einem Schüttelapparat. Bei dieser Kulturmethode wird ein Kolben mit Nährösung, worin Pilzsporen geimpft sind, während der ganzen Entwicklungszeit fortwährend geschüttelt. Das Ergebnis, das die Verfasser mit *Aspergillus niger* erzielten, war, dass jedes Conidium ein kleines untergetauchtes Myzel bildete, also Deckenbildung gänzlich verhindert und ein ideal homogenes Versuchsmaterial erhalten wurde.

Um die Entwicklungsmöglichkeit von Phycomyces unter diesen Bedingungen zu untersuchen, habe ich Sporen in 40 ccm N3 mit 4 % Glukose + 1 ccm Bios Filtrat 3c in einem 100 ccm Erlenmeyerkolben ohne festes Substrat geimpft und nachher fortwährend geschüttelt. Unter diesen Bedingungen tritt eine ganz rasche Entwicklung von separaten untergetauchten Myzellen ein. Die Entwicklungs geschwindigkeit steht derjenigen, die auf einer festen Oberfläche in derselben Nährösung erzielt wird, nicht nach, während sie ohne Schütteln und ohne Substrat sehr langsam ist. Bemerkenswert ist, dass sich geimpfte Sporen in der angegebenen Nährösung ohne Schütteln doch am Ende zu einer kräftigen Kultur entwickeln, allerdings dauert es

sehr lange. Der Gedanke liegt nahe, dass die bessere Durchlüftung, die durch die Schüttelung erreicht wird, für die raschere Entwicklung verantwortlich ist, und dass die feste Oberfläche in der gleichen Weise wirkt, nämlich durch Verhindern der Sporen in die sauerstoffärmeren Schichten der Flüssigkeit hinab zu sinken. Ich verfüge aber heute noch nicht über experimentelle Daten, die diese Deutung sicherstellen würden.

Vielleicht wird die Schüttelmethode sich besonders zu einer weiteren Analyse der begrenzenden Bedingungen bei der Atmung, zumal des Sauerstoffverbrauchs, eignen.

Die Frage, worauf die wachstumsfördernde Wirkung von Bios beruht, kann heute wohl noch nicht diskutiert werden. Als Komponente der Nährlösung steht es den anorganischen Salzen näher als der Kohlenstoffquelle. Ob ihm eine spezifische Bedeutung bei einem bestimmten Entwicklungsvorgang zukommt, kann man ohne reinere Präparate wohl nicht erfahren. Man könnte denken, dass Bios vielleicht den Zellteilungsvorgang beeinflusse. Beweise hierfür sind nur zu bringen durch Versuche an erwachsenen Geweben, worin nach Bioszusatz erneut Zellteilungen auftreten müssten. Man gelangt hier in das Gebiet der Wundhormone Haberlandts (63) und der Ansichten über Zellteilungsvorgänge überhaupt (s. z. B. Hammett [64, 65]), die hier ausser Diskussion bleiben, da hierzu keine experimentellen Anhaltspunkte vorhanden sind.

Vorläufig scheint es mir am besten nur an die Trennung zwischen der Energiequelle und der weiteren Nährlösung festzuhalten und keinen prinzipiellen Unterschied zwischen dem Bios und den in kleinen Mengen für die Entwicklung erforderlichen anorganischen Stoffen zu machen.

## ABSCHNITT II.

ATMUNGSVERSUCHE MIT KULTUREN OPTIMALER ENTWICKLUNG  
AUF 4 % GLUKOSE.

## § 1. Einführung.

Sachs (42) hat bereits darauf aufmerksam gemacht, dass im Verlauf der Entwicklung einer Pflanze die Geschwindigkeit verschiedener Lebensprozesse zuerst ansteigt, dann sich während einiger Zeit wenig ändert und schliesslich allmählich sinkt. Diese Erscheinung nennt Sachs (44) „Grosse Periode“. Für das Wachstum hat Sachs darauf hingewiesen, dass man den Einfluss der Temperatur nur an Stadien, die sich im selben Abschnitte der grossen Periode befinden, vergleichen soll (42). Weiter hat er berichtet, dass der Einfluss einer Temperaturänderung auf das Wachstum sich im Optimum der grossen Periode am schärfsten äussert (44). Man hat hieraus später meistens die Konsequenz gezogen dass man den Einfluss äusserer Faktoren auf einen physiologischen Prozess nur im Optimumgebiet der grossen Periode untersuchen soll.

So untersuchte de Boer (7) auch den Einfluss der Temperatur auf die Atmung von *Phycomyces* während des Optimums der Entwicklung. Die Atmung war während des 4. Tages nach der Keimung nahezu konstant. Wie bereits angeführt, kam er zu dem Ergebnis, dass die Temperaturkurve der Atmung unter diesen Verhältnissen eine Gerade ist, sowohl bezüglich der  $O_2$ -Aufnahme als der  $CO_2$ -Abgabe. Der respiratorische Quotient ist bei de Boer bei verschiedenen Temperaturen ungefähr derselbe. Mit ansteigender Temperatur sinkt der Wert des Temperaturkoeffizienten fortwährend. Z.B. fand de Boer auf Brot für  $Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$  den Wert 1.85, für  $Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$ : 1.48, für  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  : 1.30, für  $Q \frac{30^\circ}{25^\circ}$  : 1.22. Bis etwa  $30^\circ$  wird der

Schimmelpilz von der Temperatur nicht geschädigt, erst oberhalb  $30^{\circ}$  ist der Verlauf der Temperaturkurven von der Beobachtungszeit abhängig. Wie in der allgemeinen Einführung bereits auseinander gesetzt wurde, war es meine Absicht zu untersuchen, ob der von de Boer beobachtete Verlauf der Temperaturkurve dadurch bedingt sein könne, dass irgend ein begrenzender Faktor sich mit ansteigender Temperatur immer stärker geltend mache. Um zu beurteilen, ob dieser begrenzende Faktor mit der Spaltung der Stärke zusammenhänge, fand ich meine Versuche mit Kulturen von ungefähr gleicher Entwicklung wie diejenigen de Boers, auf einem Boden mit 4 % Glukose als Kohlenstoffquelle, an.

### § 2. Literaturbesprechung.

Ein ausführlicher Überblick über die ältere Literatur über den Einfluss der Temperatur auf die Atmung findet man bei Kuyper (29). Eine kurze Übersicht, worin auch neuere Beobachtungen verwertet worden sind, hat de Boer gegeben.

In meiner eigenen Arbeit wird nur von Versuchen bei Temperaturen die nicht „schädlich“ sind, deren Einwirkung also keine bleibende Beschädigung zur Folge hat, die Rede sein. Ich werde mich daher bei der Literaturbesprechung ebenfalls hierauf beschränken und die Angaben, die mit der Deutung des „Optimums“ in der Temperaturkurve zusammenhängen, ausser Betracht lassen. Bekanntlich kann man für die Frage des Optimums die Literatur vor Blackman eigentlich nicht verwenden, da die früheren Autoren die Beziehung zwischen der Einwirkungsdauer der hohen Temperaturen und der Lage des Optimums nicht klar erkannt haben. Zwar gibt es lange vor Blackman einzelne diesbezügliche Andeutungen (s. Sachs [43], Kreusler [27]). Bei niedrigen Temperaturen liegt eine derartige prinzipielle Schwierigkeit bei den Beobachtungen

der älteren Autoren nicht vor. Die Schwierigkeiten für eine Benutzung der vorhandenen Zahlen liegen hier meistens in Mängeln der Versuchsanordnung. Öfters verweilten die Objekte lange in stagnierender Luft oder wurden die Versuche zu lange hintereinander mit den gleichen Objekten fortgeführt. Am zuverlässigsten sind wohl diejenigen Reihen wo mit einer Durchströmungsapparatur mit  $\text{CO}_2$ -Bestimmung durch Absorption gearbeitet wurde — es wurden hier wenigstens Störungen durch weitgehende Herabsetzung des Sauerstoffdruckes vermieden. Es bedienten sich dieser Versuchsanordnung z.B. Pedersen (36), Rischawi (39), Kreusler (27), Ziegenbein (54), Clausen (13). Bei einigen dieser Autoren sind aber die verwendeten Objekte wohl nicht sehr geeignet (grüne Blätter, beblätterte Äste, die z.T. im Lichte untersucht wurden, Kartoffelknollen). Nur Pedersen, Rischawi und Clausen stellten ausgedehnte Versuchsreihen mit Keimpflänzchen an. Von den Autoren, die mit stagnierendem Luftvolumen arbeiteten, sind zu nennen: Volkoff & Mayer (53), Mayer (33), Bonnier & Mangin (8, 9). Nur Bonnier & Mangin haben ziemlich ausführliche Temperaturreihen untersucht. Die Methodik dieser Arbeit ist von grosser Genauigkeit. Jedoch lässt sich gegen die Versuchsobjekte (z.B. Fruchtkörper von Hymenomyceten) vieles einwenden und die Temperaturreihen sind auch zu unvollständig für eine weitere Verwertung.

In unterstehender Tabelle gebe ich  $Q_5$ -Werte, die ich aus Versuchsdaten von Pedersen, von Rischawi und von Clausen errechnete. Soweit die Temperaturintervalle nicht =  $5^\circ$  waren, habe ich  $Q_5$ -Werte ausgerechnet nach der Formel  $Q_5 = (Q_x)^{\frac{5}{x}}$ .

Bei Clausen äussert sich die schädigende Wirkung der Temperatur oberhalb  $40^\circ$  stark.

Rischawi 1877		Pedersen 1878		Clausen 1890			
Keimpflanzen von Triticum		Keimpflanzen von Hordeum		Keimpflanzen von		Syringablüten	
T	Q <sub>5</sub>	T	Q <sub>5</sub>	Lupinus	Triticum	Q <sub>5</sub>	Q <sub>5</sub>
5°—10°	1.7	0.3° — 5°	1.5	0°— 5°	1.9	1.8	1.7
10°—15°	1.9	5° — 16°	1.3	5°—10°	1.3	1.5	1.5
15°—20°	1.3	16° — 26°	1.55	10°—15°	1.9	1.5	1.6
20°—25°	1.4	26° — 33.6°	1.3	15°—20°	1.3	1.4	1.5
25°—30°	1.2	0.87°— 7°	1.3	20°—25°	1.4	1.4	1.3
30°—35°	1.3	7° — 16.5°	1.7	25°—30°	1.5	1.2	1.2
35°—40°	1.3	16.5° — 18°	1.9	30°—35°	1.2	1.1	1.4
		18° — 29.5°	1.4	35°—40°	1.2	1.0	1.2
		29.5° — 33.4°	1.3				

Im allgemeinen zeigt es sich also, dass auch diese besten Reihen aus der älteren Literatur noch ziemlich unregelmässige Werte für Q<sub>5</sub> aufweisen. Nur die Reihe von Rischawi und die von Clausen mit Triticumkeimlingen zeigen keine grossen Unregelmässigkeiten. Die Q<sub>5</sub>-Werte scheinen in diesen beiden Reihen mit der Erhöhung der Temperatur allmählich zu sinken.

Kuyper 1910	Pisum (Tab. 1)	Pisum (S. 175)	Lupinus (Tab. 6)	Triticum (Tab. 8)
Temp.	Q <sub>5</sub>	Q <sub>5</sub>	Q <sub>5</sub>	Q <sub>5</sub>
0°— 5°	1.6	1.4		1.7
5°—10°	1.9	1.7	1.5	1.5
10°—15°	1.7	1.8	1.4	2.0
15°—20°	1.5	1.6	1.9	1.2
20°—25°	1.4	1.3	1.5	1.3
25°—30°	1.3	1.4		1.3

Ich komme jetzt zu den neueren Arbeiten.

Kuyper (29) bestimmte die Temperaturkurve der CO<sub>2</sub>-

Abgabe von Keimlingen von *Pisum sativum*, *Lupinus luteus* und *Triticum vulgare*. Er gibt Übersichtstabellen über die Daten aus mehreren Versuchen, woraus er  $Q_{10}$ -Werte berechnet. S. 627 habe ich wiederum einige  $Q_5$ -Werte angeführt, die ich aus Kuypers Zahlen ausrechnete.

Für *Arachis hypogaea* fand Kuyper (30):

T	$Q_5$
15°—25°	1.65
25°—30°	1.75
30°—35°	1.2
35°—40°	1.3

Auch die aus Kuypers Daten berechneten  $Q_5$ -Werte schwanken noch einigermassen. Man kann aber wohl sagen, dass die Werte oberhalb 20° im allgemeinen sinken, wie das auch Kuyper für die  $Q_{10}$ -Werte, die er selber berechnete,

festgestellt hat. Kuyper vertritt die Ansicht, dass die Blackmansche Theorie im allgemeinen für seine Objekte wohl gültig ist.

Van Amstel und Van Iterson (1, 2) untersuchten die Abhängigkeit der Gärungsgeschwindigkeit von der Temperatur. Sie vertreten die Ansicht, dass hier, auch bei Eliminierung der schädlichen Wirkung höherer Temperaturen ein Temperaturoptimum auftritt, was sich also nicht in die Blackmansche Theorie einfügen lässt. Diese Frage beschäftigt uns hier aber weiter nicht. Bis zu 45° ist die Gärung von der Erwärmungszeit unabhängig. Es lassen sich hier wieder folgende  $Q_5$ -Werte berechnen:

T	$Q_5$
20°—25°	1.6
25°—30°	1.4
30°—33°	1.35
33°—36°	1.45
36°—39°	1.35
39°—42°	1.12
42°—45°	1.09

Man sieht auch hier, dass die Werte für  $Q_5$  mit Erhöhung der Temperatur immer abnehmen. Wie aber nachher aus meinen eigenen Versuchen hervorgehen wird, kann man hieraus noch nicht schliessen, dass die Anschauungen Blackmans hier keine Gültigkeit haben. Die Kurve sieht gerade so aus, als ob allmählich bei den Temperaturen

zwischen 25° und 35° ein bestimmter Faktor begrenzend wird, während oberhalb 40° die Begrenzung vollständig scheint. Zwar haben die Autoren Bestimmungen ausgeführt um dieses zu ermitteln, aber diese scheinen mir nicht ganz unter denselben Bedingungen ausgeführt zu sein, wie die Versuche. Für die Versuche wurden verwendet: 16 g. Hefe, 31.5 ccm Wasser und 10 ccm 30 % Zuckerlösung. Die CO<sub>2</sub>-Abgabe ist bis zu 30 % der Hefekonzentration proportional, oberhalb 40 % von dieser nicht mehr abhängig. Die benutzte Konzentration liegt gerade im Übergangsgebiet dieser Kurve. Der Einfluss der Glukosekonzentration wurde untersucht mit 6 g. Hefe, 35 ccm Wasser und 10 ccm Zuckerlösung. Oberhalb 10 % ist die Gärungsgeschwindigkeit konstant. Es ist hier nicht angegeben ob Totalkonzentration oder Konzentration der zugesetzten Lösung gemeint ist. Sogar wenn die Konzentration der zugesetzten Lösung gemeint ist, ist es m.E. nicht sicher, dass bei der 3-fach grösseren Hefemenge der Hauptversuche nicht schon eine Beschränkung aufgetreten ist. Von vorne herein ist es zu erwarten, dass eine Begrenzung nicht in einer ganzen Kultur bei einer bestimmten Temperatur auftritt, weil Zellen sehr ungleicher Entwicklung und wahrscheinlich also auch ungleicher physiologischer Eigenschaften anwesend sind.

Cohen Stuart (14) hat in einer theoretischen Arbeit hervorgehoben, dass eine Senkung von Q<sub>10</sub> auch bei chemischen Reaktionen auftritt und nach der Van 't Hoffschen Formel auch zu erwarten ist. Es ist nämlich  $\ln Q_{10} = \frac{10A}{T_1 T_2}$ . Nehmen wir vorläufig an, dass A eine Konstante ist, so ist Q<sub>10</sub> also abhängig von T<sub>1</sub> × T<sub>2</sub>. T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub> sind die um 10° verschiedenen absoluten Temperaturen. Bei Arrhenius wird die Grösse A durch  $\frac{\mu}{2}$  wiedergegeben. Der Wert  $\mu$  ist der Summe der Aktivie-

rungswärmen der reagierenden Moleküle proportional.

Man kann nun erstens davon ausgehen, dass eine bestimmte Reaktion durch eine bestimmte Grösse dieses Wertes charakterisiert wird. Wir werden nachher sehen, dass dieser Standpunkt von der Schule Croziers vertreten wird. Umgekehrt kann man auch davon ausgehen, dass man die experimentell gefundenen Werte für die Temperaturkoeffizienten ohne weiteres hinzunehmen hat. Dann kann man sehen, wie sich A infolgedessen ändert, um so einen Einblick darein zu bekommen, welche Faktoren, ausser den Aktivierungswärmen, die Grösse des Wertes A noch weiter beeinflussen können. Cohen Stuart folgt letztem Wege, und es erscheint ihm besonders einleuchtend, dass innere Reibungsänderungen, Viskositätsänderungen des Plasmas usw. dabei eine Rolle spielen. Cohen Stuart kommt besonders dadurch hierzu, dass Trautz & Volkmann ein Merkmal der Temperaturkoeffizientenkurve eines chemischen Prozesses durch eine Viskositätsänderung erklären konnten. Cohen Stuart hat auch die  $Q_{10}$ - und die A-Kurven für eine Anzahl Daten aus der damaligen Literatur, darunter auch die von Kuyper und von Van Amstel & Van Iterson graphisch dargestellt. Ausnahmslos sinken sie bei Temperaturerhöhung sehr viel stärker als diejenige Volkmanns.

In neuerer Zeit hat Belehradek (3, 4) die Erklärung von Änderungen des Temperaturkoeffizienten durch Viskositätsänderungen wieder in den Vordergrund gerückt. M.E. empfiehlt es sich nicht, dieses Erklärungsprinzip vorzeitig heranzuziehen, solange man nicht weiss, ob man im ganzen Temperaturbereich wirklich die Geschwindigkeitsänderung derselben Reaktion misst.

Belehradek nimmt also an, dass immer die physikalischen Reaktionen die Totalgeschwindigkeit eines Prozesses bestimmen.

Im Hinblick auf derartige Fragen vergleiche man auch besonders die Arbeit Van den Honerts (25).

Wie schon gesagt, vertritt die Schule Croziers die Ansicht, dass eine bestimmte Reaktion durch einen bestimmten, konstanten  $\mu$ -Wert charakterisiert wird, und dass einer Veränderung des  $\mu$ -Wertes ein Wechsel der begrenzenden Reaktionen zugrunde liegt. Dieser Standpunkt erscheint mir als Arbeitshypothese fruchtbare.

Die Beispiele, die Crozier und seine Mitarbeiter (15—18; 12; 31, 34, 45) um ihre Ansicht zu belegen, anführen, beziehen sich fast ausnahmslos auf verwickelte Vorgänge aus der Tierphysiologie. Eine der wenigen Ausnahmen hiervon macht eine Arbeit von Stier (45) über die Beziehung der Hefeatmung zu der Temperatur. Bei ihren graphischen Darstellungen geben Crozier und seine Schule immer die Werte für  $\mu$ , in Beziehung zu  $\frac{1}{T}$  abs. wieder. Meistens finden sie, dass die Temperaturkurve bei niedrigen Temperaturen einen (konstanten) hohen  $\mu$ -Wert aufweist, der plötzlich durch einen niedrigen Wert für die höheren Temperaturen ersetzt wird. Gelegentlich wird der Wert für  $\mu$  bei noch höheren Temperaturen noch niedriger. So fand Stier (l.c.) z.B.  $\mu = 19500$  für  $3^\circ$ — $15^\circ$ ,  $\mu = 12700$  für  $15^\circ$ — $30^\circ$ ,  $\mu = 8200$  für  $30^\circ$ — $35^\circ$ . Diese Autoren sträuben sich alle gegen den Gebrauch von „ $Q_{10}$ “ als Temperaturkoeffizienten, weil dieser nicht konstant ist. Navez, aus derselben Schule, studierte den Einfluss der Temperatur auf die Atmung von *Vicia Faba* (34). Er findet hier:  $Q \frac{17.5^\circ}{7.5^\circ} = 2.78$ ,  $Q \frac{20^\circ}{10^\circ} = 2.75$ ,  $Q \frac{22.5^\circ}{12^\circ} = 2.6$ ,  $Q \frac{25^\circ}{15^\circ} = 2.29$ . Also ist hier, wie bei Kuyper, den Navez auch zitiert,  $Q_{10}$  bis zu  $20^\circ$  nahezu konstant, während oberhalb  $20^\circ$  eine Senkung eintritt. Bis zu  $20^\circ$  hat  $\mu$  den Wert 16250. Oberhalb dieser Temperatur liegen die Werte

für  $\mu$ , dem niedrigeren  $Q_{10}$  entsprechend, unter dieser Kurve. Dass Navez  $Q_{10}$  im Gegensatz zu  $\mu$  als „a valueless „constant“, as it is variable“ charakterisiert, geht denn auch entschieden viel zu weit. Berechnet man aus der Formel von Arrhenius  $Q_{10}$  bei einem konstanten Wert für  $\mu = 16000$ , dann bekommt man  $Q \frac{10^\circ}{0^\circ} = 2.82$ ,  $Q \frac{30^\circ}{20^\circ} = 2.46$ .

Viel geringer ist noch die Senkung der  $Q_5$ -Werte: unter obiger Voraussetzung ist  $Q \frac{10^\circ}{5^\circ} = 1.66$ ,  $Q \frac{30^\circ}{25^\circ} = 1.56$ ,

eine Differenz, die kaum ausserhalb der Fehlergrenze liegen dürfte und sicherlich keine Erklärung für die immer wieder gefundenen starken Senkungen von  $Q_5$  bei physiologischen Prozessen geben kann. Bei der Analyse einer physiologischen Temperaturkurve muss man also ganz entschieden versuchen, diese Senkungen der  $Q$ -Werte zu erklären, die Einführung von  $\mu$ -Werten hilft hier nichts. Die Angabe von  $Q$ -Werten hat m.E. noch dazu den grossen praktischen Vorteil, dass die Kurven viel lesbarer als die

mit den  $\mu$ -Werten in Beziehung zu  $\frac{1}{T \text{ abs.}}$  sind. Einen

Massstab für die Änderungen vom Logarithmus der Geschwindigkeit kann man sich nicht mehr direkt vorstellen.

In dieselbe Reihe gehören die Arbeiten von Tang (49—51), der die Atmung von Keimlingen, besonders von Lupinus albus, in Beziehung zur Temperatur studierte. Er fand für die  $O_2$ -Aufnahme und für die  $CO_2$ -Abgabe Temperaturkurven die in 2 Teile mit verschiedenen  $\mu$ -Werten (hohe für die niedrigen Temperaturen und umgekehrt) zerlegt werden konnten. Jedoch waren die  $\mu$ -Werte für die beiden Prozesse jeweils verschieden, woraus eine starke Abhängigkeit des respiratorischen Quotienten von der Temperatur resultierte. Bei höherer Temperatur war sein Wert ebenfalls höher.

Dasselbe beobachtete Puriewitsch (38) bei verschiedenen Objekten (in stagnierender Luft).

Demgegenüber fand Fernandes (21) für Keimlinge von *Pisum sativum*, dass der Wert von  $\frac{CO_2}{O_2}$  unabhängig von der Temperatur ist.

Nach de Boer (7) ist auch der respiratorische Quotient bei optimal entwickelten Phycomyceskulturen bei allen Temperaturen gleichgross.

Pringsheim (37) fand bei *Triticum* eine geringe Erhöhung von  $\frac{CO_2}{O_2}$  mit ansteigender Temperatur.

Van der Paauw (35) fand für die Atmung der Alge *Hormidium flaccidum* eine ungefähr exponentiell ansteigende Temperaturkurve mit  $Q_{10} = \pm 2$ . Bei höheren Temperaturen sanken die  $Q_{10}$ -Werte allmählich. In den meisten Fällen wurde die Atmung bei 20° durch Zuckerzusatz etwas gefördert.

Kurbatov & Leonov (28) untersuchten die Beziehung der  $CO_2$ -Abgabe von Keimlingen von *Phaseolus aureus* zur Temperatur. Die Versuchsanordnung dieser Autoren, besonders die Wärmeregulierung, war ziemlich primitiv. Mit ansteigender Temperatur sank der  $\mu$ -Wert, ohne dass die Kurve in 2 scharf getrennte Abschnitte zerlegt werden konnte.

Die Frage von der Beziehung des Wertes für  $\frac{CO_2}{O_2}$  zur Temperatur ist wichtig seit Tamiya (46) die tiefere Bedeutung des respiratorischen Quotienten gezeigt hat. Tamiya beobachtete, dass der Wert des respiratorischen Quotienten auf verschiedenen Nährböden von der Relation zwischen dem Verbrennungsquotienten des Substrats und des Myzels (also des Mittelwertes aller beim Aufbau-stoffwechsel gebildeten Stoffe) abhängig ist. Auf Nährstoffquellen mit niedrigerem Verbrennungsquotienten als dem

des Myzels war der respiratorische Quotient noch niedriger, auf Nährstoffquellen mit höherem Verbrennungsquotienten als dem des Myzels, noch höher. Auf Substanzen, die ungefähr den gleichen Verbrennungsquotienten wie das Myzel aufwiesen, war der respiratorische Quotient dem Verbrennungsquotienten gleich. Als Wert des Verbrennungsquotienten für das Myzel seines Pilzes (*Aspergillus Oryzae*) fand Tamiya  $\pm 0.86$ . Veratmet dieser Pilz ein Kohlehydrat, dann ergibt sich ein respiratorischer Quotient = 1. Wächst er aber zugleich auf Kosten dieses Kohlehydrats, dann bildet er also aus dem Kohlehydrat stärker reduzierte Verbindungen. Dies hat zur Folge, dass andere Kohlehydratmoleküle, in letzter Instanz zu  $\text{CO}_2$  dehydrogeniert werden. Zu der  $\text{CO}_2$ -Abgabe der Atmung kommt also noch eine aus der Synthese stammende  $\text{CO}_2$ -Menge hinzu, m.a.W. der respiratorische Quotient  $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$  wird erhöht, wird also  $> 1$ . Wieviel diese Erhöhung betragen wird, hängt von der Wachstumsstärke ab. Bei jungen Myzelien wird sie also am grössten sein. Dies wurde auch schon von de Boer festgestellt und auch bereits als auf einer Bildung reduzierter Verbindungen beruhend, gedeutet.

Es ist nach dieser Überlegung leicht einzusehen, dass z.B. beim Wachstum auf Fetten eine extra Erniedrigung des respiratorischen Quotienten durch eine Sauerstoffaufnahme bei der Synthese auftreten wird. Auch dies wurde von de Boer bereits festgestellt. Zugleich ergibt sich hieraus, dass auf Kohlehydraten die Sauerstoffaufnahme, auf Fetten dagegen die Kohlensäureabgabe den richtigen Massstab für die Atmungsintensität darstellt.

Trotzdem habe ich bei meinen Versuchen über den Einfluss der Temperatur auf die Atmung von Kohlehydratkulturen nur  $\text{CO}_2$ -Bestimmungen gemacht. Dies geschah hauptsächlich um die Apparatur möglichst einfach gestalten zu können. Ferner glaube ich, durch die Resultate

de Boers, im Grossen und Ganzen dazu berechtigt zu sein, obgleich die Beziehung der Grösse von  $\frac{CO_2}{O_2}$  bei jungen Kulturen gesondert untersucht werden soll.

### § 3. Methode.

#### a. Kultur des Pilzes.

Es wurde so eingerichtet, dass der Kulturkolben ohne Änderungen als Atmungsgefäß benutzt werden konnte und also vor einem Versuch keine Manipulationen mit der Kultur ausgeführt zu werden brauchten. Die Anzucht in Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt, die ich bei den Ernährungsversuchen öfters verwendet hatte, war zu diesen Versuchen nicht geeignet, weil die Sporangienträger im verengten Oberteil eines Kolben gehäuft wurden, und dadurch eine gute Ventilation gehindert wurde.

Nach einigem Herumsuchen kam ich zu folgender Methode, die für alle Atmungsversuche verwendet worden ist.

Als Kulturkolben-Atmungsgefäß verwandte ich einen 1 l Erlenmeyerkolben aus Pyrexglas. Dieser wurde mit seiner Achse horizontal gelegt. Als Kulturflüssigkeit benutzte ich N3<sup>1)</sup> + 4 % Glukose. Auf 40 ccm, das für jede Kultur verwendete Quantum, wurde 1 ccm Bios f 3c (100 ccm von 1 kgr Hefe) zugesetzt. Als festes Substrat dienten Kiesstückchen, welche zuvor mit Salpetersäure und Salzsäure, und dann gründlich mit Wasser ausgekocht worden waren. Dieses grobe Substrat wurde benutzt, um Diffusionsgefälle in engen Räumen möglichst vorzubeugen. Für jede Kultur wurden 100 ccm Kiesstückchen (in einem Messglase von 500 ccm abgemessen) zusammen mit 41 ccm Nährlösung verwendet.

Der Kolben mit den Kiesstücken sowie die 2 Komponenten der Nährlösung (s. S. 620) wurden gesondert  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 120° steril-

---

1) s. Tabelle 1.

siert. Dann wurde die Nährlösung gemischt und — alles unter Einhaltung steriler Bedingungen — in den Kolben zu den Kiesstückchen zugesetzt. Die Kiesstückchen waren vor der Sterilisation so orientiert, dass eine horizontale dreieckige Oberfläche entstand; bei Benutzung der angegebenen Mengenverhältnisse stand die Kulturflüssigkeit im Kolben ungefähr gleich hoch. Geimpft wurde (soweit nicht sehr junge Stadien zur Untersuchung gelangten, s. Abschnitt III) mit 3 Blöckchen aus einer Malzagarkultur, unweit jeder Ecke der dreieckigen Kulturoberfläche.

Bis zum Anfang des Versuchs befanden sich die Kulturen in einem gasfreien Dunkelzimmer mit konstanter Temperatur von ungefähr 22° C und  $\pm$  90 % Luftfeuchtigkeit. Das Myzel entwickelte sich hauptsächlich auf den kleinen Flüssigkeitflächen zwischen den Kiesstückchen. Ohne festes Substrat trat keine Entwicklung ein. Es zeigte sich bald, dass sich das Myzel sehr leicht von den Kiesstückchen löste und vollständig sammeln liess. Es wurden denn auch ab 1.4.'33 die Trockengewichte der Versuchsmyzelen bestimmt. Bei den Versuchen mit keimenden Sporen (Abschnitt III) erwies es sich als notwendig, ein Stück Fliesspapier über die Kiesstückchen zu legen, damit eine regelmässig feuchte Oberfläche entstand. Vom 18.9.'33 ab wurde diese Einrichtung für alle Kulturen (auch für die älteren) benutzt. Es mussten dann stwas weniger Kiesstücke hereingebracht werden ( $\pm$  60 ccm).

#### *b. Atmungsapparat und Versuchsanordnung.*

Er zeigte sich bald, dass für eine Analyse der Temperaturkurve xiele Versuche notwendig sein würden. Es war also von grosser Bedeutung, möglichst wenige Komplikationen in die Apparatur einzuführen, und deshalb habe ich wie bereits erwähnt, von Sauerstoffbestimmungen abgesehen. Die abgeschiedene Kohlensäure wurde in Barytwasser von bekanntem Titer aufgefangen.

Als Apparat benutzte ich die „Ventilationsvorrichtung“ vom Apparat de Boers in Verbindung mit einem Paar

Baryt-Absorptionsrohren. Der Titer der verwendeten Barytlauge war  $\pm \frac{1}{20}$  n. Eine kurze Beschreibung möge hier folgen.

Mit Hilfe einer kleinen Pumpe mit 2 Ventilen wird ein regelmässiger Luftstrom durch den Apparat gesogen. Diese Luft geht erst durch 2 lange horizontale Absorptionsrohre, die mit Kaliumbichromatschwefelsäure bzw. 10-prozentiger Kalilauge beschickt sind. Von hier aus kommt sie in den Apparat, der in einem Wasserthermostaten mit elektrischer Temperaturregulierung steht. Im Apparat passiert die Luft hintereinander: ein Kontrollröhrenchen mit  $\frac{1}{20}$  n. Baryt, das anzeigt, ob die Luft kohlensäurefrei ist, eine Spirale zur Vorwärmung, das Atmungsgefäß, ein Röhrenchen mit  $\frac{1}{20}$  n. Schwefelsäure, einen Dreiwegehahn, die 2 Barytabsorptionsrohre, einen 2. Dreiwegehahn und geht dann durch die Pumpe hinaus. Zwischen dem einen Paar Röhrenchen der Dreiwegehähne finden sich also die Absorptionsrohre für die abgeschiedene Kohlensäure. Das andere Paar Röhrenchen der Hähne ist unmittelbar verbunden. Es ist also möglich, den Luftstrom in derselben Weise durch den Apparat zu führen, während die Barytrolle ausgeschaltet sind. Dieses wird durch Umstellen der Dreiwegehähne erreicht. Die Pumpe kann also beim Herausholen der Absorptionsrohre und bei den Temperaturwechseln weiterarbeiten, und es wird keine Kohlensäure im Atmungsgefäß angehäuft. Die Pumpe wird durch einen Elektromotor angetrieben und befördert 15 bis 20 l. Luft pro Stunde.

Als Atmungsgefäß wurden, wie bereits gesagt, 1-l-Kolben benutzt.

Diese wurden in den Apparat auf einer mit Blei beschwerten Blechbüchse, wie es in Abb. 2 angegeben ist, gestellt. Der Wattebausch wurde vor Anfang eines Versuchs durch einen Gummistöpsel ersetzt. Durch den Stöpsel stachen ein horizontal verlaufendes, gegabeltes Einlassröhrenchen, das bis hinten in den Kolben reichte, und ein Ausflussröhrenchen, das unmittelbar hinter dem Stöpsel anfing. Vor dem Einsticken wurden der Stöpsel und die Röhrenchen mit ein wenig Watte mit 0.1 % Sublimatlösung desinfiziert. Der Stöpsel wurde zum besseren Verschluss mit Vaseline eingefettet und mit einem Bindfaden befestigt, wodurch ein wasserdichter Verschluss erzielt wurde.

Um den Hals des Kolbens war ein metallener Streifen angebracht, der mit einem Stabe verbunden war, der die Bewegungen von der Saugstange der Pumpe mitmachte. Das weite Unterteil des Kolbens

wurde in einer Klammer, welche um eine horizontale Achse drehbar war, festgehalten. (s. Abb. 2).

Durch diese Vorrichtung wurde der Kolben, im Rythmus der Pumpenschläge in vertikaler Ebene, mit einer Amplitude von ungefähr 2 cm geschüttelt. Es wurde dadurch eine geringe, aber doch merkliche Bewegung der Kulturflüssigkeit verursacht, was zur Erzielung einer möglichst grossen Homogenität in den Bedingungen beitrug. Die Röhrchen des Atmungsgefäßes wurden mittels so langer Kautschukschläuche mit den entsprechenden Teilen der Apparatur verbunden, dass die Bewegung des Kolbens gerade möglich war.

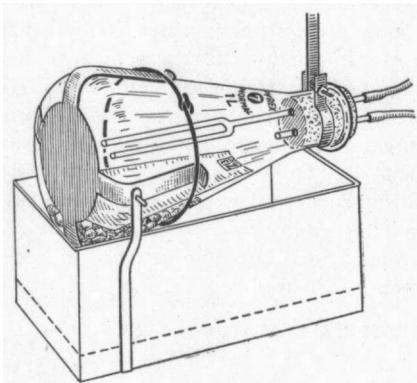


Abb. 2. Montierung des Kulturkolben-Atmungsgefäßes im Apparat.

Das Röhrchen mit der  $\frac{1}{20}$  n Schwefelsäure, durch das die Luft nach dem Verlassen des Atmungsgefäßes passierte, bezweckte die Regulierung der Wasserdampfspannung auf einem Niveau, das ungefähr mit demjenigen über  $\frac{1}{20}$  n Barytlauge übereinstimmte.

Die Barytlauge für die Absorptionsrohre wurde nach den Angaben de Boers hergestellt. Pro Liter Lösung waren 9 g kristallisiertes Bariumhydroxyd und 1 g Bariumchlorid erforderlich.

Diese Stoffe wurden in einer kleinen Menge heissen Wassers

gelöst, und die Lösung weiter mit Leitungswasser verdünnt. Es entsteht so eine trübe Flüssigkeit, die sich nach ungefähr einem halben Tage klärt, in dem die festen Teilchen, welche hauptsächlich aus Bariumkarbonat bestehen, zu Boden sinken. Die klare Lösung wurde mit einem Hebersystem mit Quetschhahn durch deren Seitenrohr in eine Burette überführt. Auf die Burette war, wie auch auf die Vorratsflasche ein Röhrchen mit Natronkalk gestellt. Für jede Bestimmung diente ein Satz aus 2 Pettenkofer-Absorptionsrohren, welche so aufgestellt waren, dass die Luft sie nacheinander durchströmte. In jedem Rohre wurden 80 ccm Lauge mit Hilfe der Burette abgemessen. Zwischen zwei Bestimmungen wurden die Absorptionsrohre mit verdünnter Salpetersäure gereinigt, gründlich gespült und so weit möglich mit einem um einen Stab gewickelten Läppchen getrocknet. Der Titer der Barytlösung wurde zuvor bestimmt. Für eine solche Bestimmung wurden 80 ccm der Lösung in derselben Weise wie für einen Versuch in ein Absorptionsrohr gegeben, das in der üblichen Weise gereinigt worden war. Hierdurch wurden Fehler durch Stärkeänderungen der Barytlauge während des Einstellens eines Versuchs vermieden.

Der Titer der Barytlösung wurde folgendermassen bestimmt. Es wurde eine 0.1 n-Lösung aus Oxalsäure pro Analysi hergestellt. Die Barytlauge wurde hiergegen mit Phenolphthalein als Indikator titriert. Sodann wurde eine Salzsäurelösung von ungefähr  $\frac{1}{20}$  n durch Verdünnen reiner konzentrierter Salzsäure hergestellt. Diese Salzsäure wurde gegen die Barytlösung titriert und für alle weiteren Bestimmungen benutzt.

Der HCl-Äquivalent von 10 ccm Baryt wurde jeden Tag aus 2 Parallelbestimmungen festgestellt. Nach einem jeden Versuch wurde die Abnahme des Titers der Barytlauge durch 2 Parallelbestimmungen von 10 ccm gegen Salzsäure festgestellt. Es konnte so der HCl-Äquivalent der gebildeten Kohlensäure ermittelt werden. Mit Hilfe der zuvor bestimmten Normalitäten der verschiedenen Flüssigkeiten wurde die  $\text{CO}_2$ -Abgabe in ccm bei  $0^\circ$  und 1 Atm. Druck ausgedrückt. Dieser Wert ist in den Tabellen angegeben worden.

Einige Details der Bestimmungen mögen noch weiter angeführt werden.

In der Regel wurde der Mittelwert für jedes Pettenkoferrohr aus 2 Titrationen gefunden. Wenn diese 2 Bestimmungen mehr als 0.04 ccm HCl verschieden waren, dann wurde eine 3. Titration vorgenommen, und der Mittelwert bestimmt zwischen jenen 2 Titrationen, welche nicht mehr als 0.04 ccm HCl divergierten. Es wurde nämlich allmählich die Erfahrung gemacht, dass ein grösserer

Fehler als 0.04 HCl nicht mehr zu den zufälligen Versuchsfehlern gehörte. In den meisten Fällen divergierten 2 Parallelbestimmungen nicht mehr als 0.02 ccm HCl.

Von der Salzsäure und dem Barytwasser wurden Vorratslösungen von  $\pm 10$  l gleichzeitig hergestellt. Jede Flasche mit Barytwasser wurde mindestens einmal, aber meistens öfter in der oben angegebenen Weise gegen 0.1 n Oxalsäure titriert. Für die Bestimmung nach einem Versuch wurden die 2 Pettenkoferrohre von einander losgelöst, die Ausflussöffnungen mit gläsernen Stöpseln geschlossen und die Rohre aufrecht in 2 Klammern gestellt. Aus jedem Rohr wurden dann zweimal 10 ccm wie oben angegeben titriert.

Für einen Versuch, der meistens von 9—21 Uhr dauerte, wurde die Kultur am Abend vorher in den Apparat

TABELLE 15.

4 Tage alte Kulturen.

Beispiele aufeinanderfolgender Werte (ccm  $\text{CO}_2$  p. Stunde) nach Temperaturwechsel.

Datum	Best.zeit	T	Wert	Datum	Best.zeit	T	Wert	Datum	Best.zeit	T	Wert
22.5.33	14. <sup>10</sup> -15. <sup>10</sup>	25°	9.16	23.5	13.-14.	25°	9.35	27.5	14.-14. <sup>45</sup>	25°	9.34
	16.-17.	20°	6.43		15. <sup>30</sup> -16. <sup>20</sup>	20°	6.53		15. <sup>45</sup> -16. <sup>45</sup>	20°	6.23
	17.-18.	20°	6.23		16. <sup>25</sup> -17. <sup>25</sup>	20°	6.72		16. <sup>45</sup> -17. <sup>45</sup>	20°	6.27
	18.-19.	20°	6.09						18. <sup>15</sup> -19. <sup>30</sup>	20°	6.90
29.5	13.-14.	25°	7.60	30.5	13.-14.	25°	9.43				
	15.-16.	20°	5.48		15.-16.	20°	6.54				
	16.-17.	20°	5.58		16.-17.	20°	6.49				
	17. <sup>10</sup> -18. <sup>10</sup>	20°	5.58								

gestellt und während der Nacht bei 20° ventilirt. Durch die ziemlich grosse Geschwindigkeit der Pumpe ist nämlich die  $\text{CO}_2$ -Spannung in allen Teilen des Apparats während des Versuchs sehr niedrig, und da man annehmen kann, dass sich während der vorhergehenden Kulturtage ziemlich viel Kohlensäure angehäuft hat, ist eine lang andauernde

Ventilation vor Anfang eines Versuchs notwendig (vgl. auch Geiger [22] und [23]). Die niedrige  $\text{CO}_2$ -Spannung während eines Versuchs hat den grossen Vorteil, dass die Gleichgewichtsverschiebungen zwischen Kulturflüssigkeit und Luft bei Temperaturwechseln in absoluten Werten gering sein werden und also zwischen 2 Bestimmungen keine sehr langen Ventilationszeiten erforderlich sind.

Die aufeinanderfolgenden Temperaturen waren meist um  $5^\circ$ , bisweilen um  $10^\circ$  verschieden. Gleich nach Beendigung eines Versuchs wurde die Temperatur gewechselt. Mit Hilfe von kochendem Wasser, kaltem Wasser oder zerstückeltem Eis war der Thermostat innerhalb 10 Minuten auf die gewünschte Temperatur zu bringen. Die Temperatur des Kulturmediums und der Luft im Atmungsgefäß änderte sich erst rasch, dann immer langsamer. Nach einer halben Stunde war die neue Temperatur ungefähr, nach 45 Minuten völlig erreicht. Zwischen zwei Bestimmungen wurde meistens eine Stunde ventiliert. Es zeigte sich, dass auch die  $\text{CO}_2$ -Spannung sich nach dieser Stunde bis auf zu vernachlässigende Fehler auf das neue Gleichgewicht eingestellt hatte. Wurden nämlich hintereinander mehrere Bestimmungen bei derselben Temperatur vorgenommen, so waren diese nicht nennenswert verschieden, wenigstens bewegten sich die Differenzen nicht in einer bestimmten Richtung (Tabelle 15).

Die meiste abgeschiedene Kohlensäure wird durch das 1. Absorptionsrohr aufgenommen, das 2. enthält nur sehr wenig. Es entweicht selbstverständlich auch noch etwas Kohlensäure aus dem 2. Pettenkoferrohre, das zum Teil in einem 3. aufgenommen werden könnte, während der Rest auch hier hindurchgehen würde, usw. Mehr als 2 Rohre habe ich niemals verwendet.

Wie oben auseinandergesetzt, kann der Mittelwert aus den 2 Parallelbestimmungen eines Absorptionsrohrs um 0.04 ccm HCl divergieren, für beide Rohre zusammen könnte dies in einem ungünstigen Fall 0.08 ccm HCl betragen, wenn sich nämlich 2 maximale Ablenkungen in der gleichen Richtung summieren. Im allgemeinen

beträgt aber der Versuchsfehler eines ganzen Versuchs nicht mehr als 0.04 ccm HCl =  $\pm$  0.3 ccm CO<sub>2</sub>, meistens weniger.

Temperaturen oberhalb der Zimmertemperatur wurden im Thermostaten mit Hilfe eines elektrischen Heizkörpers mit einem Thermoregulator und einem Rührer konstant gehalten. Bei der Temperatur 15° wurde gleichzeitig Leitungswasser durch eine im Thermostaten angebrachte Spirale geschickt; niedrigere Temperaturen wurden konstant gehalten, indem regelmässig kleine Stückchen Eis in das Thermostatwasser geworfen wurden. Die Temperatur des Thermostaten konnte so innerhalb 0.1° C konstant gehalten werden.

TABELLE 16.  
Verlauf der Atmung am 4. Entwicklungstage.  
ccm CO<sub>2</sub> p. Stunde bei 20°.

	Zeit	Werte	Zeit	Werte	Zeit	Werte
1. Bestimmung	8. <sup>50</sup> -9. <sup>50</sup>	7.45	9. <sup>20</sup> -10. <sup>50</sup>	7.98	9. <sup>55</sup> -11. <sup>10</sup>	8.24
Zwischengeschaltete Temperaturen	10°, 15°, 5°		10°, 15°		10°, 15°	
2. Bestimmung	20. <sup>30</sup> -21. <sup>30</sup>	7.07	18. <sup>15</sup> -19. <sup>45</sup>	8.17	18. <sup>10</sup> -19. <sup>25</sup>	8.33
Versuchsdatum	9.3.33		15.3.33		16.3.33	
1. Bestimmung	9. <sup>40</sup> -10. <sup>55</sup>	9.56	9. <sup>10</sup> -10. <sup>10</sup>	6.18	8. <sup>51</sup> -9. <sup>51</sup>	6.61
Zwischengeschaltete Temperaturen	10°, 15°		10°, 15°		10°, 15°	
2. Bestimmung	18.-19. <sup>15</sup>	9.42	18. <sup>25</sup> -19. <sup>40</sup>	5.99	18.-19. <sup>30</sup>	6.08
Versuchsdatum	18.3.33		20.3.33		31.7.33	
1. Bestimmung	8. <sup>54</sup> -9. <sup>54</sup>	4.98	8. <sup>51</sup> -9. <sup>51</sup>	6.31	8. <sup>54</sup> -9. <sup>54</sup>	6.16
Zwischengeschaltete Temperaturen	15°, 10°		10°, 15°		10°, 15°	
2. Bestimmung	16. <sup>20</sup> -17. <sup>20</sup>	4.84	16. <sup>20</sup> -17. <sup>20</sup>	6.17	16. <sup>25</sup> -17. <sup>25</sup>	6.02
Versuchsdatum	1.8.33		2.8.33		3.8.33	

Vom 5.7.'33 ab wurde die durch den Apparat gesogene Luft durch ein Glasrohr aus dem Garten zugeführt. Das Reinigungsrohr mit Bichromatschwefelsäure wurde von da ab fortgelassen. Bestimmte Änderungen, welche auf

eine schädigende Wirkung der Laboratoriumsluft schliessen liessen, wurden nicht beobachtet.

Das Atmungsgefäß wurde nicht vor Licht geschützt. Nach De Boer hat Licht auf die Atmung von Phycomyces keinen Einfluss.

#### § 4. Besprechung der Versuche.

Die Kulturen wurden abends um zirka 21 Uhr mit 3 Blöckchen aus einem Malzagar-Myzel geimpft. Von den 3 Zentren aus wurde der Boden gleichmäßig überwachsen. Nach  $\pm 2$  Tagen waren kleine Sporangienträger sichtbar, die grossen Sporangienträger erschienen im Verlauf des 3. Tages (den Tag nach dem Impfen als 1. gerechnet). Während des 4. Tages war die Atmungsgeschwindigkeit nahezu konstant (Tabelle 16). Die ersten Versuchsreihen wurden mit „4-tägigen“ Kulturen angestellt. Um möglichst zu erreichen, dass allen Teilen des Myzels genügend Glukose zur Verfügung stand, wurde abends zuvor 40 ccm 4 %-iger Glukoselösung zugesetzt, worin das Myzel nahezu ganz untertauchte. Nur die Sporangienträger ragten heraus.

In der Tabelle 17 sind einige Versuche mit derartigen Kulturen angeführt worden, in untenstehender Tabelle sind die aus allen Versuchen erhaltenen Mittelwerte angegeben worden. Einzelne sehr abweichende Werte sind für die Berechnung der Mittelwerte für  $Q_5$  nicht in Betracht gezogen. Diese sind in der Tabelle 17 mit \* angegeben.

Die Mittelwerte sind also:

	Q $\frac{10^\circ}{5^\circ}$	Q $\frac{15^\circ}{10^\circ}$	Q $\frac{20^\circ}{15^\circ}$	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$	Relative Werte der $\text{CO}_2$ -Abgabe				
					5°	10°	15°	20°	25°
Die Werte mit * ausgeschieden:	1.64	1.61	1.40	1.33	27	44	71	100	133
Aus allen Werten berechnet	1.68	1.59	1.43	1.31	26	44	70	100	131

Die rechts stehenden Zahlen geben die relativen Werte der  $\text{CO}_2$ -Abgabe für die verschiedenen Temperaturen an, wenn der Wert für  $20^\circ = 100$  gesetzt wird. Man sieht, dass das Fortlassen einzelner extremer Werte das Bild der Kurve für die relativen  $\text{CO}_2$ -Werte nahezu nicht ändert. Etwas grösser sind die Änderungen in den  $Q_5$ -Werten, wo die obere Zeile die Verhältnisse besser wiedergibt (vgl. die Einzelwerte).

TABELLE 17.  
4 Tage alte Kulturen.

Versuchs-datum	Zugegeben 40 ccm Glukose 4 %			
	$Q \frac{10^\circ}{5^\circ}$	$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$
8.3.33	1.70	1.62	1.42	
9.3	1.61	1.59	1.39	
11.3	1.64	1.54		
13.3	1.57	1.59		
14.3	*1.90	1.61		
15.3		1.68	1.40	1.28
16.3		1.57	1.40	1.36
18.3		1.63	1.43	1.34
20.3		*1.40	1.38	1.41
22.3	1.68	1.62	*1.59	*1.10
25.3				1.26
Mittel:	1.64	1.61	1.40	1.33

\* ausgeschieden.

Versuchs-datum	Zugegeben 5 ccm Glukose 20 %			
	$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	$Q \frac{30^\circ}{25^\circ}$
31.7.33	1.63	1.44	1.23	1.15
1.8	1.84	1.47	1.33	1.15
2.8	1.90	1.37	1.38	1.11
3.8	1.57	1.51	1.36	1.15
Mittel:	1.75	1.45	1.33	1.14

In einer anderen Versuchsreihe mit 4-tägigen Kulturen wurde der Glukosezusatz als 5 ccm einer 20 % Lösung zugegeben. Diese Reihe führe ich hier an, weil dabei einige Werte für den Temperaturintervall 25°—30° erhalten wurden, die für den Gesamtverlauf der Kurve von Bedeutung sind. In der Tabelle 17 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die Mittelwerte für  $Q_5$  sind also:

$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	$Q \frac{30^\circ}{25^\circ}$
1.75	1.45	1.33	1.14

Beim Vergleich mit der vorigen Übersichtstabelle sieht man, dass die Werte für  $Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$  und  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  nicht nennenswert verschieden sind, nur der Wert für  $Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$  ist ziemlich bedeutend höher, was aber wahrscheinlich dem zuzuschreiben ist, dass sich zufällig 2 sehr hohe Werte vorfinden (s. Tabelle 17). Auch in Anbetracht von später zu besprechenden Ergebnissen möchte ich dem hier gefundenen höheren Mittelwert für  $Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$  keine prinzipielle Bedeutung beimessen. (s. S. 655 und 664).

Als Zahlen für die Temperaturkurve der  $\text{CO}_2$ -Abgabe finde ich also aus beiden Versuchsreihen mit 4-tägigen Kulturen:

	5°	10°	15°	20°	25°	30°
+ 40 ccm 4 % Glukose	27	44	71	100	133	
+ 5 ccm 20 % Glukose		(40)	69	100	133	151

In der Figur 3 wurde eine Kurve gezeichnet, die die Zahlen: 27 — 44 — 71 — 100 — 133 — 151 darstellt (Kurve a.).

Wenn man diese Kurve aus experimentellen Daten erhält, dann ist hieraus vorläufig kein weiterer Schluss zu ziehen, als dass die Temperaturkurve ungefähr eine Gerade ist. Doch möchte ich darauf hinweisen, dass den Einzelheiten dieser Kurve ein grösserer Wert beizumessen ist als denen

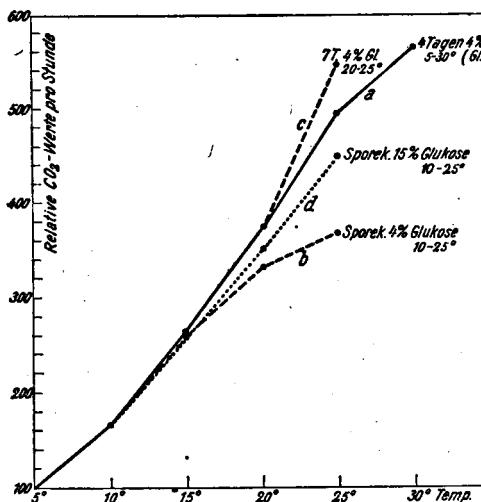


Abb. 3. Verschiedene relative Temperaturkurven. Die Kurve *a* wurde konstruiert, indem der Wert für  $5^{\circ}=100$  gesetzt wurde, und die zugehörigen Werte für die höheren Temperaturen mit Hilfe der ermittelten  $Q_s$ -Werte berechnet wurden. Für jede weitere Kurve wurde der Wert für die niedrigste untersuchte Temperatur dem entsprechenden Werte der Kurve *a* gleichgesetzt.

einer aus einem einzelnen Versuch gewonnenen Kurve, da jeder Punkt der erhaltenen Kurve auf einer Anzahl Daten beruht.

Gestützt auf später zu besprechenden Beobachtungen, will ich einige dieser Einzelheiten herausgreifen.

Es sind 2 Zahlenreihen für den Verlauf der Kurve von Bedeutung, und zwar:

1°. Die Grössen der Verhältniszahlen zwischen den Atmungswerten bei verschiedenen Temperaturen.

2°. Die Grössen der Differenzen zwischen den aufeinanderfolgenden Werten.

Diese Zahlenreihen sind für die erhaltene Kurve:

	5°—10°	10°—15°	15°—20°	20°—25°	25°—30°
1°	1.64	1.61	1.40	1.33	1.14
2°	17	27	29	33	18

Hieraus sind verschiedene Dinge abzulesen.

Aus der zweiten Zeile geht hervor, dass die Kurve zwischen 10° und 25° etwas, aber nur wenig stärker ansteigt als eine Gerade. Demgegenüber steigt die Kurve von 10° auf 15° beträchtlich mehr an als nach der Differenz zwischen den Werten für 5° und 10° zu erwarten wäre; zwischen 25° und 30° steigt sie viel weniger an als mit dem vorhergehenden Verlauf übereinstimmen würde.

Aus den in der ersten Zeile erhaltenen Zahlen geht hervor, dass die CO<sub>2</sub>-Abgabe zwischen 5° und 15° ziemlich einer Exponentialkurve mit  $Q_5 = 1.6$  gemäss verläuft. Eine Diskussion, ob  $Q_5$  in diesem Gebiete bereits einigermassen sinkt, kann man bei den zur Verfügung stehenden Daten nicht anstellen. Theoretisch ist dies auch nicht von grosser Bedeutung, wie sich später näher zeigen wird.

Oberhalb 15° sieht man  $Q_5$  stark und immer weiter sinken. Die Folge davon ist, dass die Kurve in diesem Gebiete bedeutend tiefer verläuft als man nach ihrem anfänglichen exponentiellen Verlauf erwarten sollte, in einem Teile ungefähr geradlinig verläuft und schliesslich (oberhalb 25°) sogar unterhalb die Fortsetzung des geradlinigen Abschnitts gelangt, wie oben ausgeführt wurde.

Nach dieser Betrachtungsweise ist die beschriebene Kurve also bei den niedrigen Temperaturen eine Exponentialkurve, d.h. sie hat einen konstanten  $Q_5$ , während der  $Q_5$

oberhalb  $15^{\circ}$  fortwährend absinkt und die Kurve also stark vom exponentiellen Verlauf divergiert. Dass die Kurve während dieser Ablenkung in einem Abschnitt ungefähr geradlinig verläuft, ist in dieser Beziehung also als etwas Nebensächliches zu betrachten.

Ich will hier nochmals nachdrücklich hervorheben, dass diese Deutung auf Grund der bisher besprochenen Tatsachen eigentlich noch nicht zu geben ist. Ich habe sie hier aber schon vorausgeschickt, um zu zeigen, dass die erhaltene Kurve diese Deutung zulässt. In den folgenden Abschnitten werde ich weitere Belege für diese Betrachtungsweise bringen.

Als direkter Schluss aus den Versuchsergebnissen mit 4-tägigen Kulturen bleibt vorläufig also nur:

*Die erhaltene Kurve ist ungefähr eine Gerade, der Wert für die  $\text{CO}_2$ -Abgabe bei  $5^{\circ}$  liegt etwas oberhalb, der Wert für  $30^{\circ}$  etwas unterhalb dieser Geraden.*

Es zeigt sich also, dass die Kultur von *Phycomyces* auf Glukose eine ähnliche Temperaturkurve für die Atmung aufweist wie das selbe Entwicklungsstadium auf Brot (s. De Boer). Die Tatsache, dass der Pilz in der Brotkultur seine plastischen Nährstoffe vorwiegend selber durch enzymatische Spaltungen herstellen muss, ist also kein limitierender Faktor für die Grösse der Atmung. Dieses besagt aber noch nicht, dass die Glukose überhaupt kein begrenzender Faktor sein könne.

### ABSCHNITT III.

#### VERSUCHE MIT KULTUREN VERSCHIEDENEN ALTERS.

##### § 1. Einführung.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Kultur von *Phycomyces* auf Nährböden mit einer einfachen Kohlenstoffquelle (hier Glukose) an sich den Schlüssel für die

Deutung der geradlinigen Temperaturkurve nicht lieferte, wurde versucht, ob vielleicht folgende Überlegung näher zum Ziele führe.

Eine 4-tägige Kultur von *Phycomyces* ist ein ziemlich differenziertes Versuchsobjekt. Man hat darin z.B.: junge wachsende Myzel spitzen; ältere Hyphen; dünne kurze Sporangienträger; lange, dicke Sporangienträger mit ihren Sporangien in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Man ist im allgemeinen geneigt gewesen anzunehmen, dass eine Schimmelpilzkultur ein bedeutend günstigeres, einheitlicheres Versuchsobjekt sei als z.B. keimende Samen. (vgl. de Boer). Es leuchtet ein, dass man nach obenstehender Überlegung für diese Behauptung im voraus keine Gründe anführen kann. Es ist a priori kaum zu erwarten, dass die Atmung aller verschiedenen Myzelteile <sup>1)</sup>), die in einer 4-tägigen Kultur vorhanden sind, auf eine bestimmte Temperaturänderung, z.B. von 20° bis 25° gleichartig reagieren würde. Nach der in der Einleitung gegebenen Auseinandersetzung bedeutet die Veränderung der Atmung bei einer Temperaturänderung die Veränderung der Intensität des begrenzenden Teilprozesses. Ist der begrenzende Teilprozess ein chemischer Prozess, so wird man mit einem hohen Temperaturkoeffizienten rechnen können, während bei Limitierung durch einen Diffusionsprozess die Erhöhung der gemessenen Geschwindigkeit der Atmung bei Temperatursteigerung geringer sein wird. Die Frage nach der Reaktion eines bestimmten Myzelteiles auf eine bestimmte Temperaturänderung ist also zurückzuführen auf die Frage, welcher Teilprozess unter den gewählten Versuchsverhältnissen die begrenzende Bedingung darstellt. Ist dieser Teilprozess ein Diffusionsprozess, so wird man für das gewählte Temperaturintervall einen

---

<sup>1)</sup> Dieser Ausdruck wird hier der Kürze halber benutzt. Man wolle auch die Sporangienträger darein beziehen.

TABELLE 18.  
Kulturen verschiedenen Alters.

Alter 2½ Tage. Nichts zugesetzt.				Alter 5 Tage. Nichts zugesetzt. s.a. Tabelle 20.			
Ver- suchs- datum	Q $\frac{15^\circ}{10^\circ}$	Q $\frac{20^\circ}{15^\circ}$	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$
20.7.33			1.16	11.10.33	1.36	13.11	1.36
24.7		1.25	1.23		1.37		1.45
25.7		1.44	1.32	16.10	1.37	20.11	1.24
27.7	1.80	1.25	1.21		1.39		1.33
Mittel:		1.31	1.23	30.10	1.38	Mittel:	1.36
Alter 3 Tage. Zugegeben 5 ccm Glukose 20 %.				Alter 5 Tage. Zugegeben 5 ccm Glukose 20 %.			
Ver- suchs- datum	Q $\frac{15^\circ}{10^\circ}$	Q $\frac{20^\circ}{15^\circ}$	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{15^\circ}{10^\circ}$	Q $\frac{20^\circ}{15^\circ}$	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$
5.7.33			1.32	4.9.33	1.63	1.40	1.39
6.7			1.28	6.9	1.63	1.45	1.34
8.7			1.30	9.9	1.56	1.46	1.37
18.5**			1.29	Mittel:	1.61	1.44	1.37
10.7	1.65	1.38	1.37				
11.7	*1.35	*1.61	1.35				
12.7	1.53	1.44	1.30				
13.7	1.61	1.44	1.25				
2.9			1.39				
18.9	1.65	1.41	1.41				
20.9	1.72	1.47	1.25				
Mittel:	1.63	1.43	1.32				
Alter 3 Tage. Zugegeben 40 ccm Glukose 4 %.				Alter 5 Tage. Zugegeben 40 ccm Glukose 4 %.			
Ver- suchs- datum	Q $\frac{15^\circ}{10^\circ}$	Q $\frac{20^\circ}{15^\circ}$	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{15^\circ}{10^\circ}$	Q $\frac{20^\circ}{15^\circ}$	Q $\frac{25^\circ}{20^\circ}$
27.3.33	1.50	1.32	1.19	3.4.33	1.42	1.69	1.39
28.3	1.44	1.48	1.25	4.4	1.64	1.51	1.39
29.3	1.74	1.38	1.27	5.4	1.55	1.44	1.35
30.3	1.41	1.34	1.26	2.5			1.27
1.4	1.50	1.40	1.32	3.5			1.31
11.5			1.19	4.5			1.28
13.5			*1.12	6.5			1.29
17.5			1.21	15.5		1.28	
Mittel:	1.52	1.38	1.24	16.5		1.40	
*) ausgeschieden.				Mittel:	1.54	1.46	1.33

niedrigen  $Q_5$  finden; ist ein chemischer Prozess begrenzend, so wird man einen höheren  $Q_5$  finden.

Hat man nun ein Versuchsobjekt mit verschiedenen Gewebearten, so ist es klar, dass man nur in dem Falle, dass im ganzen untersuchten Temperaturgebiet für jede dieser Gewebearten der gleiche Teilprozess limitiert, eine Temperaturkurve mit konstantem  $Q_5$  finden wird. Es ist aber ebenfalls klar, dass man von diesem Gesichtspunkte aus nicht die geringste Schwierigkeit hat, eine kompliziert aussehende Kurve, wie z.B. die in Kapitel II besprochene, dennoch im Rahmen der Blackmanschen Theorie zu verstehen. Eine derartige Kurve kann nämlich der Ausdruck von der durchaus auf der Hand liegenden Möglichkeit sein, dass nicht für das ganze Temperaturgebiet der gleiche Teilprozess limitiert und dass der Wechelpunkt zweier Limitierungen für die verschiedenen Gewebearten nicht bei derselben Temperatur liegt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, stellte ich Versuche mit Kulturen verschiedenen Alters an. In verschiedenen Altersstadien ist der Anteil der verschiedenen Gewebearten am Aufbau des Myzels verschieden. Wenn tatsächlich die Atmung dieser Gewebearten nicht in gleicher Weise auf eine Temperaturänderung reagiert, so müssen die Temperaturkurven für Myzelien verschiedenen Alters verschieden aussehen.

## § 2. Versuche mit Kulturen verschiedenen Alters.

Zunächst beschränkte ich mich auf Entwicklungsstadien bei denen die Intensitätsänderung der Atmung an sich (also gemessen bei derselben Temperatur) noch ziemlich gering ist, nämlich Kulturen im Alter von 3 und von 5 Tagen. Ich führe zunächst nur die Ergebnisse jener Versuche an, die alle mit der gleichen Versuchsmethodik gemacht worden sind. Es wurde hier abends vor dem Versuchstage 5 ccm 20-prozentige Glukose zugesetzt und nachts bei 20° ventiliert. Am folgenden Tage wurden die verschiedenen Tempera-

turen zur Einwirkung gebracht. In Tabelle 18 sind diese Versuchsresultate zusammengefasst worden. In unterstehender Tabelle findet man eine Zusammenstellung der Werte von  $Q_5$  und der relativen Atmungsgrößen bei den verschiedenen Temperaturen.

Alter	$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	$Q \frac{30^\circ}{25^\circ}$	10°	15°	20°	25°	30°
3 T	1.63	1.43	1.32		43	70	100	132	
4 T (Abschn. II)	(1.75)	1.45	1.33	1.14	(40)	69	100	133	151
5 T	1.61	1.44	1.37		43	69	100	137	

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass die Temperaturkurven von 3 bis 5 Tagen alten Kulturen einander sehr ähnlich sehen, und dass von einer nennenswerten Verschiebung hier noch keine Rede ist.

Zur Vervollständigung gebe ich hier ebenfalls noch einige Versuchsdaten mit etwas anderer Versuchsanordnung, nämlich: eine Versuchsreihe mit 3 Tagen alten Kulturen unter Zusatz von 40 ccm 4 % Glukose und eine mit 5 Tagen alten Kulturen ohne nachträglichen Glukosezusatz. (Tabelle 18 und unterstehende).

	$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	10°	15°	20°	25°
3 T. + 40 ccm 4 % Gluk.	1.52	1.38	1.24	47	72	100	124
5 T. ohne Gluk. Zusatz			1.36			100	136

Aus diesen Werten sieht man, dass ein Glukosezusatz bei einer 5-tägigen Kultur keinen Einfluss auf die Grösse des Temperaturkoeffizienten  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  hat, während die bei den dreitägigen Kulturen gewählte Versuchsanordnung niedrigere Temperaturkoeffizienten zur Folge hat, wovon besonders der Wert 1.24 für den am genauesten bestimmten Intervall als besonders niedrig auffällt.

Einige Versuche mit Kulturen von  $2\frac{1}{2}$  Tagen alt ergaben (s. auch Tab. 18):

	Q $\frac{20^{\circ}}{15^{\circ}}$	Q $\frac{25^{\circ}}{20^{\circ}}$	15°	20°	25°
2 $\frac{1}{2}$ T. ohne Gluk. Zusatz .....	1.31	1.23	76	100	123

Es scheint also, als ob man bei jüngeren Kulturen im allgemeinen etwas niedrigere Werte für die Temperaturkoeffizienten bekommt, aber ein klares Bild lässt sich aus obigen Daten noch nicht gewinnen.

Ein solches zeigte sich erst als ich die Untersuchung verschiedener Altersstadien nach beiden Seiten viel weiter ausdehnte. Diese Versuchsreihen fing ich mit der Untersuchung von jungen Entwicklungsstadien ausgesäter Sporen an. Um derartige Kulturen zu bekommen, musste die übliche Kulturmethode etwas verändert werden. Es wurde nämlich auf die Oberfläche der Kiesstückchen in dem mit der gewöhnlichen Menge Nährlösung beschickten Versuchskolben (s. S. 635) ein passendes dreieckiges Stück Fliesspapier gelegt, wodurch eine gleichmässig feuchte Fläche entstand. Auf dieser Fläche gelangten ausgesäte Sporen in kurzer Zeit zur Keimung. Die Aussaat geschah abends gegen 21 Uhr. Bei den hauptsächlichsten Versuchsreihen, die im Herbste angestellt wurden, verblieben die Kulturen bis zum nächsten Morgen im gewöhnlichen Arbeitszimmer bei einer Temperatur von  $\pm 18^{\circ}$  C, dann wurden sie ins Dunkelzimmer mit konstanter Feuchtigkeit und konstanter Temperatur ( $\pm 22^{\circ}$ , s.o.) gestellt, wo sie bis zum Abend verblieben. Sodann wurden sie in den Atmungsapparat hineingesetzt, nachts bei  $20^{\circ}$  in üblicher Weise mit kohlen-säurefreier Luft ventiliert, und am nächsten Tage für den Versuch benutzt. Am Morgen des Versuchstages war unter den gewählten Umständen die Kultur eben sichtbar, im Laufe des Tages wurde das gelbliche Myzel immer deutlicher. Am Abend dieses Tages waren auf den am weitesten

entwickelten Stellen die ersten sehr kurzen, dünnen Sporangienträger sichtbar.

Die Kultur entwickelte sich also im Laufe des Versuchstages bedeutend weiter, was sich in einer starken Steigerung der Atmung wiederspiegelte. Diese Versuchsanordnung entspricht also nicht der üblichen Forderung dass man die Wirkung eines äusseren Faktors auf einen physiologischen Prozess nur studieren sollte, wenn dieser Prozess an sich konstant bleibt. Das machte eine spezielle Versuchsfolge notwendig.

TABELLE 19.  
Sporenkulturen auf 4 % Glukose. Nichts zugesetzt.

Ver- suchs- datum	Q $\frac{20}{10}$	Q $\frac{15}{10}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{20}{15}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{25}{20}$	Ver- suchs- datum	Q $\frac{25}{20}$
2.10.33	1.91		30.9	1.29	19.9	1.06	25.9	1.13
	2.16			1.21		1.13		1.24
21.10	2.13		19.10	1.32	21.9	1.00	29.9	1.07
	1.90			1.27		1.13		1.06
Mittel:	2.03	1.60 <sup>1)</sup>		1.27				1.10

<sup>1)</sup> Berechnet aus den Mittelwerten für Q  $\frac{20}{15}$  und Q  $\frac{20}{10}$

Aus den Versuchen mit „optimal entwickelten“ Kulturen hatte ich schon gelernt, dass man mit einer Temperaturreihe, die an einer einzelnen Kultur gewonnen ist, schliesslich doch wenig anfangen kann, und für die Schlüsse immer auf Mittelwerte aus verschiedenen Versuchen angewiesen ist. Deshalb entschloss ich mich, jedes Temperaturintervall an einer Anzahl Kulturen gesondert zu studieren, und zwar so, dass immer  $20^\circ$  als Vergleichstemperatur benutzt wurde. Die Versuchsreihe eines Tages sah dann z.B. so aus:  $20^\circ$ ,  $25^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $25^\circ$ ,  $20^\circ$ , jedesmal mit einer Stunde Ventilation zwischen den Bestimmungen bei verschiedenen

Temperaturen. Das Verhältnis der  $\text{CO}_2$ -Abgaben bei  $20^\circ$  und  $25^\circ$  wurde dann so bestimmt, dass jeder Betrag für  $25^\circ$  durch einen Betrag für  $20^\circ$  dividiert wurde, der durch Interpolation zwischen den unmittelbar vor und nach dem Versuch bei  $25^\circ$  gewonnenen Werten gefunden wurde. Meistens wurde hierfür das arithmetische Mittel zwischen beiden Werten für  $20^\circ$  genommen.

Eine Zusammenstellung der Daten, die aus diesen Versuchen gewonnen wurden, findet man in der Tabelle 19. Untenstehende Tabelle gibt die Mittelwerte für die verschiedenen  $Q_5$  und die relativen Atmungswerte bei den verschiedenen Temperaturen (der Wert für  $20^\circ$  ist gleich 100 gesetzt).

$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	$10^\circ$	$15^\circ$	$20^\circ$	$25^\circ$
1.60	1.27	1.10	49	79	100	110

*Der ausserordentlich niedrige Wert für  $\frac{25^\circ}{20^\circ}$  ist hier auffällig.*

Weiter ist bemerkenswert, dass auch  $Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$  niedriger ist als  $Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$  bei viertägigen Kulturen, während  $Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$  demgegenüber ungefähr denselben Wert aufweist wie bei viertägigen Kulturen. (s. Abb. 3 Kurve b.)

Wenn wir diese für die jüngsten Entwicklungsstadien erhaltene Temperaturkurve der Atmung mit derjenigen der vier Tage alten Kulturen (Kap. II) vergleichen, so kommen wir zu folgenden Schlüssen:

Die Neigung beider Kurven ist auf der Strecke  $10^\circ$ — $15^\circ$  die gleiche, und zwar ist  $Q_5$  in beiden Fällen  $\pm 1.6$ . Die Kurve der jungen Stadien sinkt bei den höheren Temperaturen stärker als die der älteren Kulturen. Die Neigung der Kurve für 4-tägige Kulturen zwischen  $25^\circ$  und  $30^\circ$

ist ungefähr dieselbe, welche junge Kulturen auf der Strecke  $20^{\circ}$ — $25^{\circ}$  aufweisen ( $Q_5 = \pm 1.1$ ).

*M.E. stützt dieser Kurvenverlauf die im II. Kapitel vertretene Meinung, dass der geradlinige Verlauf der Temperaturkurve für die Atmung von Kulturen mit optimaler Entwicklung keine prinzipielle Bedeutung hat, sondern einen Übergangszustand darstellt.*

*Besonders möchte ich noch auf die Tatsache hinweisen, dass beide Kurven mit  $Q_5$ -Werten von 1.6 anfangen und mit Werten von 1.1 enden. Die anfänglichen Werte von 1.6 finden wir auch bei dem Kurven für 3 und 5 Tage alte Kulturen wieder.*

Wie ist das nun zu verstehen? Ich möchte das Gesamtbild beider Kurven folgendermassen interpretieren.

Die Tatsache, dass der Temperaturkoeffizient  $Q_5$  bei den niedrigen Temperaturen für alle erhaltenen Kurven einen Wert von 1.6 aufweist und ferner, dass bei 4 Tage alten Kulturen dieser Wert sowohl für die Strecke  $5^{\circ}$ — $10^{\circ}$  wie für die Strecke  $10^{\circ}$ — $15^{\circ}$  erreicht wird, deutet darauf hin, dass wir in diesem Werte den Temperaturkoeffizienten des „reinen Atmungsprozesses“, also des Oxydationsprozesses zu sehen haben. In § 1 dieses Abschnittes habe ich erörtert, dass eine Senkung des Temperaturkoeffizienten  $Q_5$  zustande kommen könne, wenn irgendein begrenzender Faktor für einen Teil des Myzels wirksam wird. Es wurde dort auseinandergesetzt, wie dieses einen verschiedenen Verlauf der Temperaturkurven für verschiedene Entwicklungsstadien zur Folge haben würde. Wir haben jetzt gesehen, dass diese Erwartung der Wirklichkeit entspricht. Wir können also vorläufig daran festhalten, dass irgend ein begrenzender Faktor bei Temperaturerhöhung den Anstieg der Atmungsintensität zurückhält, und können jetzt weiter noch feststellen, dass dieser Faktor sich bei jungen Myzelien stärker als bei älteren bemerkbar macht. Hieraus folgt offenbar, dass junge Myzelien zu einem grösseren Prozentsatz aus Teilen bestehen, für die die

Beschränkung der Atmungsintensität bei Temperaturerhöhung auftritt. In den älteren Myzelien werden es also in erster Linie die jungen Teile sein, die für die Senkung der Temperaturkoeffizienten der Atmung bei Temperaturerhöhung verantwortlich zu machen sind. In diesem

TABELLE 20.

Reihenversuche mit alten Kulturen ohne Glukosezusatz.  
Glukosekonzentration beim Impfen 4 %, Endkonzentration  $\pm = 0$ .

Ver- suchs- datum	Alter	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	Ver- suchs- datum	Alter	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	Ver- suchs- datum	Alter	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$
11.10.33	5 T	1.36 1.37	12.10	6 T	1.51 1.40	13.10	7 T	1.62 1.49
16.10	5 T	1.37 1.39	17.10	6 T	1.47 1.48	18.10	7 T	1.73 1.62
30.10	5 T	1.38 1.32	31.10	6 T	1.30 1.31	1.11	7 T	1.45 1.39 1.40
6.11	5 T	1.44 1.30	7.11	6 T	1.36 1.48	8.11	7 T	1.51 1.35
13.11	5 T	1.36 1.45	14.11	6 T	1.24 1.55	15.11	7 T	1.34 1.42
20.11	5 T	1.24 1.33	21.11	6 T	1.43 1.36	22.11	7 T	1.29 1.56
Mittel	5 T	1.36		6 T	1.41		7 T	1.47
Mittel [Vers. von 30.10 ab]		[1.35]			[1.38]			[1.41]

Zusammenhang ist es besonders beachtenswert, dass das zweite am Versuchstage gefundene Verhältnis für  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  in den meisten Fällen schon etwas höher ist als das erste, als Ausdruck des Alterwerdens. Den Koeffizienten 1.1 betrachte ich als das Resultat der Beschränkung der Atmung aller Myzelteile durch vorgeschaltete Diffusions- und Transportprozesse.

Von diesem Gesichtspunkte aus könnte man erwarten, dass man bei der Untersuchung von Kulturen die z.B. 5, 6 und 7 Tage alt sind, immer höheren Temperaturkoeffizienten begegnen würde. Nun ist aber gleich vorweg zu nehmen, dass es bei weitem nicht so leicht ist, Kulturen herzustellen, worin alte Myzelteile die Hauptrolle spielen als mehr oder weniger homogene junge Kulturen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass auch Kulturen, die schon weit über das „Optimum“ ihrer Entwicklung heraus sind, immer noch wachsen, also immer noch ein gewisses Quantum an jungen Entwicklungsstadien enthalten. Auch Tamiya (48) hat neuerdings darauf aufmerksam gemacht. Daneben besteht die Tatsache, dass die Atmungsintensität bei den alten Myzelteilen auffallend geringer ist als bei den jungen, worauf ich im nächsten Abschnitt ausführlicher zurückkommen werde. Alles zusammen genommen, gestaltet sich die Sache für das Finden reiner Temperaturkoeffizienten von der Atmung der alten Myzelteile möglichst ungünstig. Der Zusatz von neuer Glukose vor Anfang des Versuches hat immer ein erneutes Aussprossen der Kultur zur Folge, schafft also noch mehr neue Myzelteile und macht die Sachlage verwickelt. Auch das Einsetzen in den Apparat, wobei die Temperatur etwas schwankt und die Kultur in Tageslicht gelangt, hat namentlich bei alten Kulturen Aussprossen zur Folge. Andererseits zeigte es sich, dass der Glukosezusatz auf den Temperaturkoeffizienten  $Q \frac{25}{20}$  bei 5-tägigen Kulturen keinen merkbaren Einfluss hatte, dass also die Erhöhung der Glukosekonzentration in der Nährösung hier für die Atmung nicht von ausschlaggebender Bedeutung ist (Tabelle 18). Deshalb entschloss ich mich, um die Atmung der alternden Myzelteile möglichst rein heraus zu bekommen, mit 5 Tage alten Kulturen ohne Glukosezusatz anzufangen und die Versuche am 6. und am 7. Tage mit denselben Kulturen fortzuführen.

Da es sich gezeigt hatte, dass das Temperaturintervall 20°—25° für die Analyse der begrenzenden Faktoren am Günstigsten ist, wurde dieses Intervall für die Untersuchung benutzt. Die Resultate sämtlicher Versuche findet man in Tabelle 20. *Es zeigt sich, dass die Mittelwerte aus allen Versuchen ein deutliches Ansteigen von  $Q \frac{25}{20}$  vom 5. bis zum 7. Entwicklungstage erkennen lassen*, nämlich von 1.35—1.47 (s. Abb. 3, Kurve c). Weiter ist aus der Tabelle ersichtlich, dass besonders bei den zwei ersten Versuchsreihen (11.10—13.10 u. 16.10—18.10) der regelmässige Anstieg sehr schön zum Ausdruck kommt. Die weiteren Versuche zeigen ein weniger regelmässiges Bild, aber auch wenn man nur aus diesen Versuchen die Mittelwerte bestimmt, tritt das Ansteigen noch hervor (1.35—1.41). Weshalb gerade die ersten Versuche am schönsten ausfielen, ist nicht ohne weiteres zu sagen, vielleicht hat die immer ungünstiger werdende Jahreszeit, die sich bekanntlich auch unter anscheinend konstanten äusseren Umständen auf die Versuchspflanzen geltend macht (vgl. z.B. Dijkman (20), eine Rolle gespielt.

*Die Erwartung, dass der Temperaturkoeffizient für ein Temperaturintervall oberhalb 15° nach dem 4. Entwicklungstage noch höher steigen werde, hat sich also im grossen und ganzen als berechtigt erwiesen, womit eine weitere Stütze für die Auffassung der komplexen Natur der anfangs erhaltenen geradlinigen Temperaturkurve gebracht worden ist.*

In Abb. 4 ist die Veränderung des Temperaturkoeffizienten  $Q \frac{25}{20}$  mit dem Altern der Kultur graphisch dargestellt worden. Zu dieser Abbildung möchte ich ergänzend nur noch bemerken, dass das für Versuche über Einwirkung äusserer Umstände besonders empfohlene optimale Entwicklungsstadium — ± 4 Tage — sich in dieser Kurve keineswegs als ein spezieller Punkt herausstellt und be-

sondere Beachtung dieses Alters in dieser Hinsicht nicht gerechtfertigt erscheint. Die Kurve zeigt einen Knick bei 3T. Ich glaube nicht, dass dieser eine spezielle Bedeutung hat. Höchstens kann man schliessen, dass die Kurve im Anfang der Entwicklung rasch, später langsamer ansteigt.

Zum Schlusse dieses Abschnittes möchte ich noch eine Figur besprechen, die die gegebene Deutung der Temperaturkurven verschiedener Entwicklungsstadien besonders

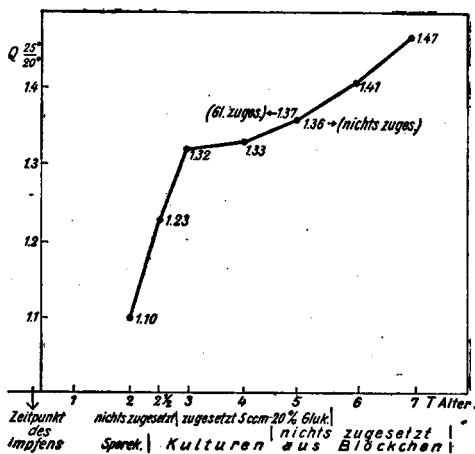


Abb. 4. Änderung von  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  mit dem Alter. Kulturen auf 4 % Glukose.

einleuchtend illustriert. In jedem der drei Teile der Figur 5 ist ein Temperaturintervall von 5° dargestellt und der  $CO_2$ -Wert für die niedrige Temperatur in jedem Entwicklungsstadium = 1 gesetzt. Auf die Ordinate der höheren Temperatur sind die dazu gehörigen  $CO_2$ -Werte eingetragen. Diese Werte geben also die für die verschiedenen Entwicklungsstadien für jeden betreffenden Temperaturbereich gültigen  $Q_5$ -Werte wieder und wurden mit dem

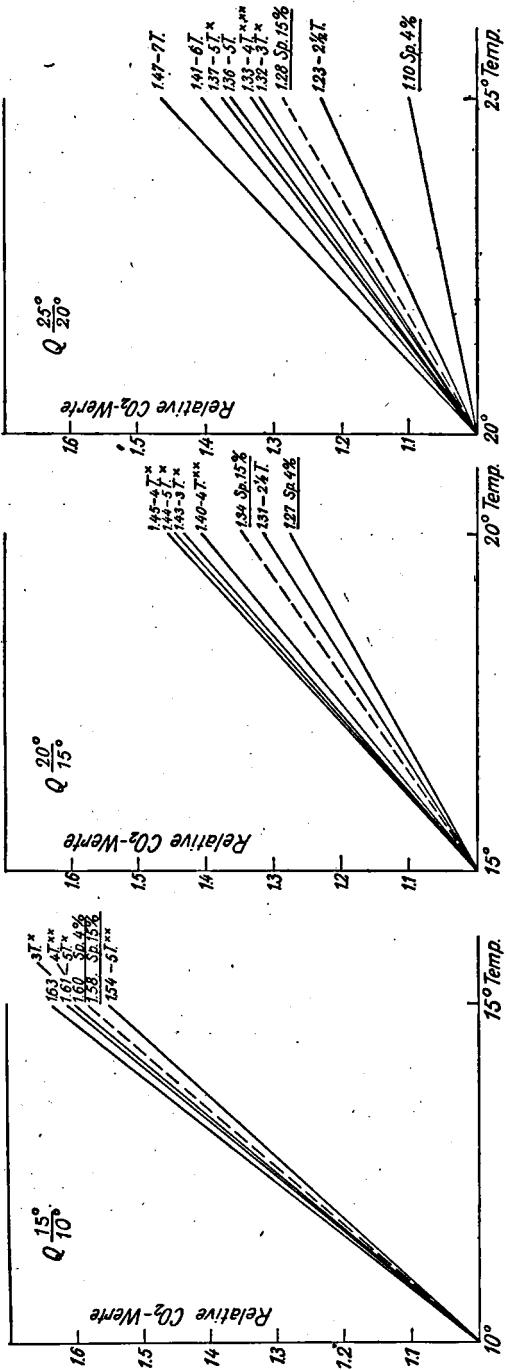


Abb. 5. Abhängigkeit der  $Q_{CO_2}$ -Werte der verschiedenen Temperaturintervalle von den Versuchsbedingungen.  
ohne \* = nichts zugegeben. \* = + 5 ccm Glukose 20 %. \*\* = + 40 ccm Glukose 4 %. Nähere Erläuterung s. Text.

Wert 1 durch Linien verbunden. Diese Linien drücken also die Neigung der Temperaturkurve für die  $\text{CO}_2$ -Abgabe im in Frage stehenden Temperaturintervall aus. Man sieht hier, dass alle Linien von  $10^\circ$ — $15^\circ$  gedrängt nebeneinander verlaufen und  $Q_5$  bei allen Entwicklungsstadien ungefähr = 1.6 ist.

Im Intervall von  $15^\circ$ — $20^\circ$  weichen die Linien mehr auseinander, und liegen sämtlich auf niedrigerem Niveau, am meisten die der jüngsten Stadien. Dies besagt, dass hier für einen Teil des Myzels schon ein begrenzender Faktor auftritt und dass dieser Teil bei den jüngsten Stadien am grössten ist. Im Intervall  $20^\circ$ — $25^\circ$  tritt dies noch deutlicher hervor, die Begrenzung der Atmung durch einen anderen Faktor dürfte für die jüngsten Kulturen vollständig sein. Für das Intervall  $25^\circ$ — $30^\circ$ , wofür ich leider nur über wenige Daten verfüge (s. Tabelle 17), kann man voraussagen, dass die Linien sich aufs neue häufen werden, und zwar jetzt gegen Wert 1.1 hin.

Ich habe einen vorläufigen Versuch mit einer dauernd geschüttelten Sporenkultur, ohne festes Substrat (s. S. 622) gemacht. Die erhaltenen Temperaturkoeffizienten  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  waren 1.12 und 1.21, also von ungefähr derselben Grösse als bei einer Oberflächenkultur im gleichen Entwicklungsstadium.

#### ABSCHNITT IV.

##### VERSUCHE ZUR ANALYSE DER BEGRENZENDEN BEDINGUNGEN.

###### § 1. Einführung. Glukose als limitierender Faktor.

Es hat sich gezeigt, dass der Temperaturkoeffizient  $Q_5$  für das Temperaturintervall von  $20^\circ$ — $25^\circ$  bei jungen Kulturen = 1.1 ist. Nach meiner Auffassung wird hier bei  $25^\circ$  die Intensität der  $\text{CO}_2$ -Abgabe völlig durch die

Geschwindigkeit vorgeschalteter Prozesse, besonders Diffusionsprozesse, beschränkt. Der Atmungsvorgang im engeren Sinne, also die endgültigen Oxydationsvorgänge, spielen sich bei einer Glukosekultur zwischen Glukosemolekülen, oder deren durch hydrolytische Spaltungen entstandenen Teile, und Sauerstoff ab. Deshalb kann man ganz im allgemeinen sagen, dass die Zufuhr der Glukose sowie die Zufuhr des Sauerstoffs gleichzeitig einen bestimmenden Einfluss auf die Grösse der  $\text{CO}_2$ -Abgabe haben können.

Da die Herkunft und wahrscheinlich auch der Transportmechanismus für beide verschieden sind, wird man für beide gesondert untersuchen müssen, ob einer dieser Faktoren in einem gegebenen Falle als begrenzende Bedingung fungiert. Versuche über den limitierenden Einfluss des Sauerstoffs habe ich bisher noch nicht angestellt.

Um zu untersuchen, ob die pro Zeiteinheit zugeführte Glukosemenge bei den jungen Kulturen die Atmungsintensität begrenzt, führte ich eine Anzahl Versuche mit Kulturen, welche statt 4 %, 15 % Glukose im Nährboden enthielten, aus. Ich wählte dafür junge Kulturen aus ausgesäten Sporen. Die Resultate dieser Versuche sind in der Tabelle 21 angeführt worden; in untenstehender Tabelle findet man die Mittelwerte für die verschiedenen  $Q_5$  und für die relativen Werte der  $\text{CO}_2$ -Abgabe.

	$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$	10°	15°	20°	25°
15 % Glukose	1.58	1.34	1.28	47	75	100	128
4 % Glukose	1.60	1.27	1.10	49	79	100	110

Vergleichen wir diese Werte mit den ebenfalls in der Tabelle nochmals angeführten Werten für junge Entwicklungsstadien auf 4 % Glukose, so sehen wir, dass die

*Erhöhung der dargebotenen Glukosekonzentration das Bild der Temperaturkurve stark verändert, besonders, dass die Steigerung der Atmung von 20°—25° viel stärker ist, dass also der limitierende Faktor sich weniger äussert (Fig. 3, Kurve d.) Das berechtigt zu dem Schlusse, dass die Glukosezufuhr bei den jungen Kulturen auf 4 % Glukose als limitierender Faktor auftritt. Ganz der Erwartung entsprechend prägt sich die Differenz zwischen beiden Kurven im Temperaturbezirk von 15°—20° weniger deutlich aus.*

TABELLE 21.  
Sporenkulturen auf 15 % Glukose. Nichts zugesetzt.

Versuchs-datum	$Q \frac{20^\circ}{10^\circ}$	$Q \frac{15^\circ}{10^\circ}$	Versuchs-datum	$Q \frac{20^\circ}{15^\circ}$	Versuchs-datum	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$
4.1.34	2.00		16.11.33	1.29	26.10.33	*1.45
	2.00			1.27		*1.18
5.1.34	2.16		18.11.33	1.38	4.11.33	1.19
	2.27			1.41		1.30
11.1.34	2.14		23.11.33	1.34	9.11.33	1.33
	2.04			1.34		1.42
Mittel	2.10	1.58		1.34	11.11.33	1.14
						1.32
						1.28

\* ausgeschieden.

Schliesslich möchte ich besonders darauf hinweisen, dass auch auf 15 % Glukose  $Q \frac{15^\circ}{10^\circ} = \pm 1.6$  ist. Diese Tatsache stellt eine weitere Stütze für die im III. Kapitel vertretene Auffassung dar, dass wir hierin den Temperaturkoeffizienten der oxydativen Prozesse zu sehen haben. (s. auch Abb. 5).

Das Verhältnis der in beiden Versuchsreihen dargebotenen Glukosekonzentrationen ist beinahe 4 : 1. Setzen wir für den ganzen Temperaturbereich  $Q_5$ -Werte von 1.6 ein, so würde der Wert der  $\text{CO}_2$ -Abgabe bei 25° beinahe 2 mal

so hoch ausfallen wie derjenige, der auf 4 %-Glukose erreicht wird. Wenn wir uns vorstellen, dass die Glukosezufuhr von ausserhalb des Myzels bis an die Orte, wo das Gewebe atmet, durch gewöhnliche Diffusion in homogenem Milieu erfolge, so würde die 4-fach höhere Aussenkonzentration völlig genügen, um die Glukoselimitierung im ganzen Temperaturgebiet zu beseitigen, und also bis 25° die  $Q_5$ -Werte auf 1.6 zu bringen. Ich habe bisher noch nicht weiter untersucht, weshalb dies nicht erzielt wird. Erstens ist natürlich schon gleich zu sagen, dass die Annahme einer einfachen Diffusion in homogenem Milieu sehr wahrscheinlich für den Transportmechanismus der Glukose nicht zutrifft. Weiter ist es bei der für Phycomyces notwendigen Oberflächenkultur möglich, dass auch beim schüttelnden Versuchskolben dennoch merkliche Konzentrationsgefälle um eine Anzahl der Hyphen herum entstehen, so dass die Konzentration nicht durchweg 4-fach erhöht zu sein braucht. Schliesslich ist es möglich, dass auch die Sauerstoffzufuhr einen limitierenden Faktor darstellt. Wenn der Sauerstoff in dieselben Einzelreaktionen der ganzen Kette eingreift wie die Glukose, so können beide (nach dem Massenwirkungsgesetz) gleichzeitig limitieren. Es gibt also eine Anzahl Erklärungsmöglichkeiten für die Tatsache, dass die Limitierung der Atmungsintensität bei Kultur auf 15 % Glukose nicht gänzlich behoben wird. Andererseits gibt uns das Eintreffen einer Verschiebung in der zu erwartenden Richtung die Gewissheit, dass tatsächlich *die Glukoseversorgung des Myzels eine begrenzende Bedingung darstellt*.

Auf einen Punkt muss noch hingewiesen werden. So wie die Sache oben auseinander gesetzt worden ist, hat sie ohne weiteres noch keine Beweiskraft für den gezogenen Schluss. Die Frage, die ebenfalls noch beantwortet werden muss, ist die: „Ist die Atmungsintensität bei 20° bei den Kulturen auf 15 % Glukose nicht niedriger als bei den-

TABELLE 22. ccm  $\text{CO}_2$  pro Stunde bei 20° pro 1 g Trockengewicht auf 4% Glukose in verschiedenen Entwicklungsgestadien.

jenigen auf 4 % Glukose?" Es wäre doch möglich, dass infolge der Kultur auf der osmotisch wirksameren Nährlösung die Atmungsintensität verringert wäre. Wenn dieses der Fall wäre, so wäre es selbstverständlich, dass ein etwaiger limitierender Faktor sich weniger äusserte, auch wenn dieser mit der Glukoseversorgung an sich nichts zu schaffen hätte. Wir werden unten sehen, dass die Atmungsintensität bei Kulturen auf 15 % Glukose nicht herabgesetzt ist.

Es hat sich also gezeigt, dass die Glukosezufuhr speziell bei jungen Myzelien einen limitierenden Faktor für die Atmung darstellt. Auf den ersten Blick kann man sich darüber wundern, weil gerade diese Stadien auf der am wenigsten erschöpften Nährösung wachsen, und zudem noch ringsum in der Flüssigkeit sitzen. Über diese Merkwürdigkeit gibt die Vergleichung der Atmungsintensitäten pro Einheit von Trockengewicht in verschiedenen Entwicklungsstadien Aufschluss.

### § 2. Die Atmung pro Einheit von Trockengewicht.

Im II. Kapitel wurde bereits mitgeteilt, dass die Myzelien aller späteren Versuche nachher getrocknet und gewogen wurden. Die Myzelien wurden in ein gewogenes Papier ge packt, mehrere Tage bei 70° und schliesslich lange Zeit im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Soweit sie auf Filterpapieren wuchsen, waren diese vorher im trockenen Zustande gewogen worden. Aus den erhaltenen Trockengewichten und den gefundenen Werten der CO<sub>2</sub>-Abgabe bei 20° wurde für jeden Versuch die Atmungsintensität pro Einheit von Trockengewicht bei 20° bestimmt. Die für unsere weiteren Betrachtungen zu verwendenden Daten hierüber sind in der Tabelle 22 zusammengestellt. Sie beziehen sich auf verschiedene Entwicklungsstadien und Versuchsanordnungen auf 4 % Glukose. In der Figur 6 ist die Änderung der Mittel für die CO<sub>2</sub>-Abgabe pro 1 Gramm Trockengewicht pro Stunde bei 20°, mit

dem Älterwerden der Kultur, graphisch dargestellt worden.

Es ist aus der Abbildung ersichtlich, dass die „absolute Atmungsintensität“ im Laufe der Entwicklung stark und regelmässig sinkt. Im Alter von 4 Tagen, wenn die Atmung der Kultur an sich so ziemlich „optimal“ ist, beträgt die absolute Atmungsintensität nur noch ungefähr 50 % vom

TABELLE 23.

ccm  $\text{CO}_2$  p. Stunde bei  $20^\circ$  p. 1 g Trockengewicht bei Sporenkulturen auf Glukose.

4 % (Tab. 22)				15 %			
Versuchsdatum	Bezugswert d. $\text{CO}_2$ -Abgabe b. $20^\circ$ (ccm p-St.)	Trockengew. (g)	ccm $\text{CO}_2$ p. St. b. $20^\circ$ p. 1 g	Versuchsdatum	Bezugswert d. $\text{CO}_2$ -Abgabe b. $20^\circ$ (ccm p-St.)	Trockengew. (g)	ccm $\text{CO}_2$ p. St. b. $20^\circ$ p. 1 g
21.10.33	2.77	0.097	28.6	26.10.33	2.43	0.030	*81.0
19.9	4.40	0.140	31.4	27.11.33	4.21	0.074	*56.9
2.10	3.84	0.146	26.3	16.11.33	3.85	0.100	38.5
30.9	4.94	0.182	27.1	23.11.33	4.57	0.108	42.3
29.9	4.69	0.189	24.8	11. 1.34	4.27	0.128	33.4
21.9	5.58	0.199	28.0	9.11.33	3.23	0.128	25.2
19.10	5.84	0.221	26.4	4. 1.34	4.62	0.135	34.2
25.9	5.90	0.244	24.2	11.11.33	3.45	0.177	19.5
		Mittelwert	27.1	5. 1.34	4.84	0.192	25.2
				18.11.33	6.10	0.221	23.1
				4.11.33	4.55	0.248	18.3
				Mittelwert [ ausser * ]		28.9	

Wert bei jungen Keimungsstadien. Bei alten Kulturen von 7 und 8 Tagen ist die Atmungsintensität sehr gering. Dieser Kurvenverlauf macht es ohne weiteres verständlich, dass ein bestimmter Faktor, z.B. die Glukoseversorgung in den jungen Stadien viel eher beschränkend für die Atmungsintensität sein wird als in älteren Stadien. Auch hinsichtlich dieser Kurve möchte ich wie bei der Kurve der Fig. 4 darauf aufmerksam machen, dass das „optimale“

Entwicklungsstadium einer ganzen Kultur ( $\pm 4$  Tage) auch in dieser Hinsicht in keiner Weise einen prinzipiell wichtigen Punkt der Kurve darstellt und auch diese Kurve keine Anhaltspunkte dafür gibt, dass man gerade dieses Stadium für die Untersuchung wählen sollte.

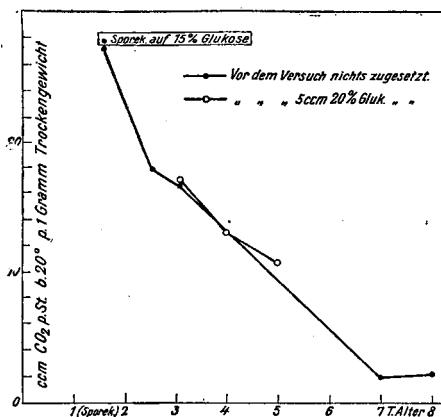


Abb. 6. Abhängigkeit der absoluten Atmungsgrössen vom Alter. Soweit nichts angegeben, Anfangskonzentration der Glukose 4 %.

Aus der Tabelle 22 ist ersichtlich dass, soweit bei 3 bis 5 Tage alten Kulturen die Versuchsumstände variiert worden sind, dies keinen grossen Einfluss auf die absoluten Atmungsgrössen bei  $20^\circ$  gehabt hat. Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass bis  $20^\circ$  die Limitierung der Oxydation durch anderweitige Prozesse nur noch gering ist ( $Q \frac{20^\circ}{15^\circ} = \pm 1.45$ , vgl. auch die Fig. 5).

Jetzt wollen wir noch die absoluten Atmungsintensitäten der Kulturen aus kurz zuvor ausgesäten Sporen betrachten. Die hierüber im Herbste 1933 gesammelten Daten sind in der Tabelle 23 zusammengestellt: in der linken Hälfte

die auch bereits in der Tabelle 22 angeführten Daten für Kulturen auf 4 % Glukose, in der rechten Hälfte die Daten für die Kulturen auf 15 % Glukose. Es fällt auf, dass die Werte für Kulturen auf 15 % Glukose mehr variierten als diejenigen für Kulturen auf 4 % Glukose. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden aus der Reihe für 15 %-Glukose die sehr hohen Werte\* ausgeschieden. In Figur 7 ist die Beziehung der absoluten Atmungsintensitäten zum Trockengewicht der Kulturen wiedergegeben. Ich habe diese Kurve konstruiert um zu sehen,

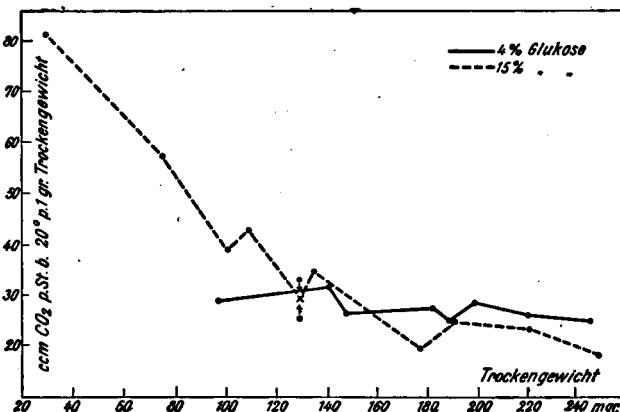


Abb. 7. Absolute Atmungsintensitäten von Sporenkulturen in Beziehung zu ihrem Trockengewicht.

ob sich schon innerhalb dieser Stadien ein Abfall der Atmungsintensität bemerkbar macht. Im allgemeinen wird ein grösseres Trockengewicht ein vorgeschrittenes Entwicklungsstadium andeuten, obgleich man hieran nicht zu streng festhalten darf, weil die Sporenaussaat gewissen Schwankungen unterliegt.

Eine streng regelmässige Relation zwischen Trockengewicht und absoluter Atmungsintensität wird man also von vorne herein nicht erwarten können. Auch sind gerade

die kleinsten Gewichte schwer bestimmbar, weil man die grossen toten Gewichte von dem Kulturpapier und dem Packpapier (zusammen etwa 1.2 gr) dabei hat. Besonders den Werten, die aus diesen kleinen Gewichten gewonnen sind, möchte ich deshalb keinen grossen Wert beilegen. Immerhin zeigt die Kurve für die Kulturen auf 15 % Glukose einen ziemlich regelmässigen Verlauf und gerade die abnorm hohen Atmungswerte für die sehr jungen Stadien sehen in diesem Verband nicht so sinnlos aus als man auf dem ersten Blick sagen sollte.

Es hat mir bis jetzt die Zeit gefehlt, diese Sache weiter zu verfolgen. Als Konsequenz aus der in dieser Arbeit entwickelten Anschauung könnte man erwarten, dass bei sehr jungen Stadien z.B. auf 4 % Glukose, auch im Temperaturbezirk von 15—20° bereits eine starke Limitierung der Atmung auftrate. So wäre auch bei 20° besonders in den sehr jungen Stadien auf 15 % Glukose eine Erhöhung der Atmungsintensität zu bekommen. Ob der durch die vorhandenen Zahlen gegebene Anhaltspunkt eine Bedeutung in dieser Richtung zukommt, ist ohne weitere Versuche nicht zu entscheiden. Man sieht, dass die übrigen Werte ein etwas höheres Mittel ergeben als die der Kulturen auf 4 % Glukose. Das Mittel für 20° ist auf 4 % Glukose 27.1 ccm  $\text{CO}_2$  p. Stunde, für 15 % Glukose 28.9 ccm. Diese Zahlen differieren auffallend wenig. Es fragt sich nun, ob man aus den Temperaturkurven der Atmung nicht eine viel grössere Differenz erwarten sollte. Nimmt man die Zahl 27.1 ccm für 4 % Kulturen als Basis und rechnet man mit Hilfe der  $Q_5$ -Werte aus der Tabelle 21 aus, was man bei 20° für die 15 %-Kulturen auf Grund des gefundenen Atmungsverlaufes erwarten kann, so findet man 28.2 ccm. Eine scharf hervortretende Differenz war hier also nicht zu erwarten. Immer ist wieder auf die Figur 5 hinzuweisen, welche zeigt, dass erst oberhalb 20° der limitierende Faktor sich deutlich geltend macht.

TABELLE 24.

5 Tage alte Kulturen. Nährlösung durch Leitungswasser ersetzt.

Versuchsdatum		8.1.'34		9.1		12.1		15.1			
Leitungswasser zugesetzt		7.1 - 18.-		9.1 - 8.45		12.1 - 8.40		15.1 - 8.40			
Zeit	T	ccm CO <sub>2</sub> p. St.	Q <sub>s</sub>	Zeit	T	ccm CO <sub>2</sub> p. St.	Q <sub>s</sub>	Zeit	T	ccm CO <sub>2</sub> p. St.	Q <sub>s</sub>
8. <sup>45</sup> -10. <sup>10</sup>	20°	1.48		11.-12.	20°	2.44		10. <sup>30</sup> -11. <sup>30</sup>	20°	2.70	
11. <sup>05</sup> -12. <sup>05</sup>	25°	2.01	1.28	13. <sup>15</sup> -14. <sup>15</sup>	25°	2.83	1.35	12. <sup>35</sup> -13. <sup>35</sup>	25°	2.62	1.15
13. <sup>10</sup> -14. <sup>30</sup>	20°	(?)1.66		15. <sup>10</sup> -16. <sup>25</sup>	20°	1.70	1.42	14. <sup>30</sup> -15. <sup>35</sup>	20°	1.79	13. <sup>15</sup> -14. <sup>15</sup>
15. <sup>35</sup> -16. <sup>25</sup>	25°	1.83	1.23	17. <sup>30</sup> -18. <sup>40</sup>	25°	2.22	1.42	16. <sup>30</sup> -17. <sup>30</sup>	25°	2.18	1.39
17. <sup>35</sup> -18. <sup>35</sup>	20°	1.26		19. <sup>35</sup> -21. <sup>05</sup>	20°	1.40	1.40	18. <sup>45</sup> -20.	20°	1.40	19. <sup>40</sup> -21.
Trockengew. in g		0.480		0.590		0.536		0.533			
ccm CO <sub>2</sub> p. St. b. 20°	1. Best.	3.1		4.2		4.6		4.9			
p. 1 g.	Letzte Best.	2.7		2.4		2.4		3.1			

### § 3. Versuche zur weiteren Analyse des Verhaltens von 5-tägigen Kulturen.

Mit diesen Versuchen kann ich kurz sein, weil sie mir wenig weitere Anhaltspunkte zur Deutung der Verhältnisse gegeben haben. Oben wurde bereits auseinandergesetzt, (S. 658), dass experimentelle Eingriffe bei alten Kulturen immer Komplikationen zur Folge haben.

Die Frage, die ich zu beantworten suchte, war die: Ist der Rückgang der Atmungsintensität allein die Ursache des Ansteigens der Temperaturkoeffizienten beim Altern, oder ist es vielleicht möglich, dass sich in alten Myzelien noch ein anderes Atmungssubstrat vorfindet als die Kohlenstoffquelle aus der Nährösung. Man könnte sich vorstellen, dass nur die jüngeren Myzelspitzen die Kohlenstoffquelle für ihre Atmung mehr oder weniger geradewegs aus der Nährösung beziehen, während die älteren Teile, z.B. die erwachsenen Sporangenträger auf Kosten vorhandener Reservestoffe atmeten, welche geringeren Diffusionschwierigkeiten unterliegen und so zu höheren Temperaturkoeffizienten Anlass geben würden.

Um eine eventuelle Atmung auf Kosten vorhandener Reservestoffe rein zu bekommen, entfernte ich die Kulturflüssigkeit, wusch einige Male mit Leitungswasser aus, wodurch ich nachher auch die Kulturflüssigkeit ersetzte. In dieser Weise war eine Atmung auf Kosten direkt aus der Nährösung zugeführter Stoffe nicht mehr möglich. Zwei Arten von Versuchen wurden hierbei gemacht. Bei der einen Reihe wurde die Kulturflüssigkeit schon abends vor dem Versuchstage entfernt, damit sich beim Anfang der Versuche keine bereits aufgenommene Glukose mehr im Myzel befände. Bei der 2. Reihe wurde die Kulturflüssigkeit erst kurz vor dem Anfang der Versuche durch Leitungswasser ersetzt. In Tabelle 24 findet man die Resultate dieser Versuche.

Vom ersten Typus verfüge ich nur über einen Versuch

(8.1.'34), dessen Atmungswerte bei 20° noch dazu unregelmässig sind, so dass ich über die erhaltenen Werte nicht weiter zu sprechen brauche. Aus den 3 anderen Versuchen sieht man, dass der Atmungswert schon 2 St. nach Entfernen der Nährlösung niedrig ist und zwischen der ersten und der zweiten Bestimmung bei 20° noch auffallend stark sinkt. In den weiteren Stunden ist die Senkung geringer. Die

TABELLE 25.  
Beispiele von der Reaktion der Atmung auf Zusätze  
von Aethylurethan [ccm 3-Mol. Lösung].

Ver- suchs- datum	Zeit	Zusatz (Zeit, Menge)	T	ccm CO <sub>2</sub> p. St.	Ver- suchs- datum	Zeit	Zusatz (Zeit, Menge)	T	ccm CO <sub>2</sub> p. St.
1.2.34	9.-9. <sup>45</sup>	9. <sup>50</sup> : 2 ccm	20°	6.81	15.2	9.-9. <sup>45</sup>	9. <sup>50</sup> : 3 ccm	20°	4.61
	11.-12.		20°	3.55		12.-13. <sup>40</sup>		20°	2.12
	13. <sup>30</sup> -14. <sup>30</sup>		20°	3.85		14. <sup>40</sup> -15. <sup>40</sup>		25°	2.45
	15. <sup>35</sup> -17. <sup>15</sup>		25°	5.12		16. <sup>50</sup> -18. <sup>20</sup>		20°	1.57
	18. <sup>35</sup> -19. <sup>50</sup>		20°	3.47					
8.2	9. <sup>05</sup> -9. <sup>50</sup>	9. <sup>55</sup> : 2 ccm	20°	7.32	19.2	9. <sup>05</sup> -10. <sup>20</sup>	10. <sup>25</sup> : 3 ccm	20°	3.41
	12. <sup>25</sup> -13. <sup>25</sup>		20°	4.74		12. <sup>25</sup> -13. <sup>40</sup>		20°	1.89
	14. <sup>40</sup> -15. <sup>40</sup>		25°	5.92		14. <sup>35</sup> -15. <sup>35</sup>		25°	2.15
	16. <sup>40</sup> -17. <sup>40</sup>		20°	3.93		16. <sup>35</sup> -18. <sup>05</sup>		20°	1.39

Interpolation für einen Vergleichswert bei 20° zur Zeit der ersten Bestimmung bei 25° wird dadurch ziemlich unsicher, was natürlich auch vom hier bestimmten Temperaturkoeffizienten gilt. Für den 2. Versuch des Tages liegen diese Verhältnisse besser. Die hier erhaltenen Temperaturkoeffizienten  $Q \frac{25}{20}$  sind ziemlich hoch. Die Atmungsintensitäten, die sich am Ende des Versuchstages wohl auf die reine Reservestoffveratmung beziehen, nähern

sich den Werten für normale 7-tägige Kulturen (s. Tabelle 22). Auch die dort erhaltenen Werte sind zweifellos grösstenteils auf die Reservestoffveratmung zurückzuführen. Eine bei einer jener alten Kulturen vorgenommene Zuckertitration der Kulturflüssigkeit zeigte, dass die Lösung nach Beendigung der Versuchsreihe nur noch sehr wenig Zucker enthielt.

Das Versuchsmaterial ist nach dieser Richtung zu dürftig, um die Frage, weshalb  $Q \frac{25}{20}$  für die Reservestoffveratmung nicht gleich 1.6 ist, zu diskutieren.

#### § 4. Versuche mit narkotisierten Myzelien.

Diese Versuche wurden von der folgenden Überlegung ausgehend, angestellt:

Es hat sich gezeigt, dass man bei jungen Kulturen  $Q \frac{25}{20}$  erhöhen kann, wenn man die Konzentration der zu veratmenden Glukose erhöht (dieser Abschn. § 1.), also die Versorgung mit Nährstoffen verbessert. Das gleiche Resultat wird man zu erwarten haben, wenn man die Versorgung mit Nährstoffen unverändert lässt, aber die Atmungsintensität herabsetzt. Letzteres kann man z.B. durch Narkose erzielen.

Bei einem Vorversuch wurde probiert, das junge Myzel mit Aether zu narkotisieren. Es wurde den 40 ccm Kulturflüssigkeit 5 ccm mit Aether gesättigtes Wasser zugesetzt, und weiterhin der Kulturkolben mit Luft durchströmt, welche mit Aether gesättigtes Wasser passiert hatte. Obgleich z.B. die Barytlauge in den Absorptionsrohren nach Beendigung eines Versuchs stark nach Aether roch, war in dieser Weise so gut wie keine Narkose herbeizuführen.

Da die Versuchsanordnung überdies kompliziert war, habe ich mich mit der Aethernarkose nicht weiter beschäftigt, aber die Narkose fernerhin durch Aethylurethan

bewirkt. Es wurde hiervon eine Lösung hergestellt die 3 Mol. Aethylurethan pro l. enthielt (27 %). Den 40 ccm Kulturflüssigkeit wurde hiervon vor Anfang des Narkoseversuchs 5 ccm zugesetzt. Die ganze Flüssigkeitsmenge hatte dann eine Urethankonzentration von 3 % oder 0.33 Mol., mit der nach Angabe Warburgs (52 : S. 2, 15) eine Atmungshemmung von  $\pm$  50 % erzielt wird.

TABELLE 26.  
Sporenkulturen 4%  
Glukose.  
Narkose  $\pm$  50 %  
mit Aethylurethan.

Versuchs-datum	$Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$
1.2.'34	1.39
2.2	1.29
3.2	1.24
6.2	1.26
8.2	1.36
9.2	1.33
10.2	1.33
13.2	1.30
15.2	1.32
16.2	1.40
19.2	1.31
22.2	1.35
Mittel	1.32

Vor der Zugabe des Narkotikums wurde eine  $\text{CO}_2$ -Bestimmung bei  $20^\circ$  gemacht, um die Grösse der Hemmung ermitteln zu können und ausserdem eine Vorstellung von dem Entwicklungsstadium der Kultur zu bekommen. Es zeigte sich, dass *Phycomyces* durch die oben angegebene Urethamenge nahezu 100 % narkotisiert wurde.

Durch Zugabe von 1 ccm einer 3 Mol. Aethylurethanlösung wurde eine Atmungshemmung von ungefähr 25 % erzielt, durch Zugabe von 2 ccm war die Hemmung rund 40 %, durch Zugabe von 3 ccm gegen 60 %.

Mit einer Anzahl Kulturen, denen 2 oder 3 ccm Urethan zugesetzt worden war, wurde das Verhältnis der  $\text{CO}_2$ -Abgaben für  $20^\circ$  und  $25^\circ$  untersucht. Nach Zugabe des Narkotikums wurde 2 bis 3 Stunden ventiliert (s. Tabelle 25). Die gesamten Versuchsdaten sind in der Tabelle 26 enthalten. Aus der Tabelle sieht man, dass die

erhaltenen Werte für  $Q \frac{25^\circ}{20^\circ}$  sämtlich höher liegen als bei nicht narkotisierten jungen Kulturen auf 4 % Glukose. Aus Tabelle 25 ist weiter ersichtlich, dass, besonders bei der stärkeren Narkose, der Atmungswert für  $20^\circ$  während

des Versuches noch ziemlich stark abfällt. Ich habe nicht bestimmt, inwieweit eine Wiederherstellung der Lebensfunktionen aus der Narkose möglich ist. M.E. ist diese Frage für die Deutung der vorliegenden Versuche nicht von primärer Bedeutung. Wenn man annähme, dass das Resultat der sogenannten Narkose nur ein teilweises Absterben der Gewebe und Intaktlassen des Überrestes wäre, dann wären gerade die erhöhten Temperaturkoeffizienten unverständlich.

Schliesslich weise ich darauf hin, dass die Kulturen bis zum 13.2 am Anfang des Versuchstages etwas weiter entwickelt waren als im Herbste der Fall war und hier also im normalen Versuche auch schon etwas höhere Temperaturkoeffizienten zu erwarten wären. Deshalb wurden ab 15.2 noch einige Versuche mit sehr jungen Kulturen aus gekeimten Sporen ausgeführt, welche erst am Morgen des Tages vor dem Versuch ausgesät waren. Man sieht, dass diese genau das gleiche Bild lieferten.

Gegen Narkoseversuche ist an sich manches einzuwenden. Ich sehe in diesen Versuchen denn auch nicht die Hauptstütze für die in den vorangehenden Seiten auseinander gesetzte Auffassung der Temperaturkurve für die Atmung von Phycomyces-Kulturen. Dennoch wage ich zu behaupten, dass es eine Stütze für diese Auffassung bildet, dass die Resultate dieser Versuche in der vorauszusehenden Richtung liegen.

Es wäre interessant zu erfahren, wie die Temperaturkurve der Atmung junger Kulturen aussieht, die eine Cyangabe erhalten haben. M.E. wird hier etwas Ähnliches auftreten wie bei den Narkoseversuchen. Es fehlte mir bisher die Zeit, dieses zu untersuchen.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Die Arbeit musste heute zu einem vorläufigen Abschluss gebracht werden. Deshalb musste an mehreren Stellen auf noch offene Fragen hingewiesen werden.

## ABSCHNITT V.

## ALLGEMEINE BETRACHTUNGEN.

**§ 1. Die Temperaturabhängigkeit  
der Protoplasmaströmung.**

Hille Ris Lambers (24) fand für die Temperaturkurve der Protoplasmaströmung bei *Nitella* eine Gerade, die er als Temperaturkurve der Plasmaviskosität deutete. Neuerdings hat Bottelier (10) den Einfluss der Temperatur auf die Protoplasmaströmung in Avenakoleoptilen verschiedenen Alters untersucht. Merkwürdigerweise war hier eine ähnliche Verschiebung zu beobachten, wie bei der Atmung von *Phycomyces*. Bei jungen Koleoptilen waren die Temperaturkoeffizienten unterhalb  $15^{\circ}$  hoch, darüber niedrig; bei alten Koleoptilen waren sie bis zu ungefähr  $25^{\circ}$  hoch. Man könnte geneigt sein, in diese Übereinstimmung eine Stütze für die Anschauung Belehradeks zu sehen (s. S. 630). Man beachte aber gleichfalls die Arbeit Romijns (41), der für *Nitella* auf Grund von Änderungen in der Plasmolyseform, zu einem Viskositätsmaximum bei  $\pm 20^{\circ}$  schloss. Wenn auch die Plasmolyseformen keine Aussage über Viskositätsänderungen in den Schichten, wo Strömung stattfindet, zu geben brauchen, so beweisen die Versuche Romijns doch, dass „Viskositätsänderungen“ im Plasma, an sich sehr komplizierte Prozesse mit einer keineswegs universell verwendbaren Temperaturkurve, sein können.

**§ 2. Reversible Beschädigungen durch  
hohe Temperaturen.**

Öfters ist beobachtet worden, dass Pflanzen bei einer normalen Temperatur, z.B. bei  $20^{\circ}$  weniger als vorher atmen, nachdem sie eine Zeit lang auf einer hohen Temperatur, z.B. auf  $40^{\circ}$ , gehalten worden sind. (s. bei Kuyper). Ist die Temperatur nicht zu hoch gewesen, dann wird

diese Beschädigung nach einiger Zeit wieder rückgängig gemacht. Es liegt m.E. auf der Hand, diese reversiblen Beschädigungen ganz oder teilweise als Beschränkungen zu deuten. Durch die grosse Intensität der Atmung bei der hohen Temperatur wird die vorhandene Menge Substrat stark in Anspruch genommen, das Gleichgewicht zwischen Zufuhr und Verbrauch, das sich bei 20° eingestellt hatte, gestört, und die im Innern der Gewebe vorhandene Konzentration herabgesetzt. Diese Verschiebung wird sich bei erneuter Senkung der Temperatur in der ersten Zeit noch in den Atmungswerten äussern können. Kuyper fand die besprochene Erscheinung für die Temperaturreihe 20°—40°—20°. Für die Reihe 5°—25°—5° trat sie nicht auf. Es ist hier wahrscheinlich von Bedeutung, dass die Atmung bei 5° im Falle Kuypers weit von einer Beschränkung durch die Nährstoffmenge entfernt ist.

### § 3. Allgemeine Schlüsse.

Es wurde am Anfang dieser Arbeit sozusagen die Richtigkeit der Blackmanschen Anschauung über die Natur der begrenzenden Bedingungen vorausgesetzt. Während der Untersuchung zeigte sich, dass die beobachteten Erscheinungen sich im Rahmen dieser Theorie erklären liessen. Wie in der Arbeit Van den Honerts wurde die Temperaturkurve als Indikator für die Natur der begrenzenden Bedingungen benutzt. Es wurde immer wieder darauf hingewiesen, dass die Veränderung der Menge des Endproduktes mit der Temperatur von der Reaktion des beschränkenden Teilprozesses auf die Temperaturänderung abhängig ist, wie das auch von der Schule Croziers hervorgehoben wird.

Die Temperaturkurve liefert also ein Mittel um zu bestimmen, von welcher Art der begrenzende Teilprozess ist. Es ist im allgemeinen möglich, dass mitten im untersuchten Temperaturbereich ein anderer Teilprozess beschränkend

wird. Sind diese beiden Teilprozesse gleichartig, so wird man es in der Temperaturkurve nicht bemerken. Sind sie aber verschiedener Art — beschränkt z.B. bei den niederen Temperaturen ein chemischer Prozess, bei den höheren ein Diffusionsvorgang — so bekommt man eine Temperaturkurve mit einem Knick. Wenn das Versuchsobjekt mehrere Gewebearten enthält, so wird im allgemeinen dieser Knick für jede Art nicht bei derselben Temperatur liegen, und man bekommt eine Kurve mit einem langen Übergangsgebiet. So begrenzt, wie oben schon angedeutet, in der in Abschnitt II besprochenen Temperaturkurve der eigentliche Atmungsvorgang die Grösse der  $\text{CO}_2$ -Abgabe unterhalb  $\pm 15^\circ$ , oberhalb  $25^\circ$  ist wahrscheinlich für beinahe alle Myzelteile die Zufuhr der Nährstoffe „limiting factor“. Das Übergangsgebiet dehnt sich von  $15^\circ$ — $25^\circ$  aus. Ich möchte noch darauf hinweisen, dass man auch in einer Kurve, wo der Wechsel der Begrenzung für alle Gewebearten bei derselben Temperatur liegt, ein Übergangsgebiet erhalten kann, wenn man nämlich nicht bei der Wechseltemperatur beobachtet. Beobachtet man z.B. bei  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $25^\circ$ ,  $30^\circ$ , und die Wechseltemperatur ist für alle Gewebe  $20^\circ$ , dann hat die Temperaturkurve kein Übergangsgebiet und einen Knick bei  $20^\circ$ . Liegt der Wechsel bei  $17^\circ$ , dann bekommt man bei der gewählten Versuchsanordnung eine Kurve, worin die Strecke von  $15^\circ$ — $20^\circ$  ein Übergangsgebiet darstellt. Das Übergangsgebiet kann sich mit homogenem Material nie weiter als über ein Temperaturintervall ausdehnen. Möglicherweise ist dieser Fall bei meiner Temperaturkurve für junge Stadien auf 4 % Glukose realisiert. In Beziehung zu dieser Frage haben Crozier und seine Mitarbeiter mit Recht auf die Bedeutung möglichst kleiner Temperaturintervalle hingewiesen.

Eine Pilzkultur, die sich in einer Nährösung entwickelt, könnte man in mancher Hinsicht ein Individuum nennen. Sie wächst, differenziert sich, ist eine Zeit lang „erwachsen“

und altert. Welche Bedingungen diese typische Entwicklung veranlassen oder beeinflussen, ist noch sehr ungenügend bekannt. Das Erwachsensein äussert sich hinsichtlich der Atmung in der Konstanz der Intensität, wenn die äusseren Bedingungen gleichbleiben. Man ist früher der Meinung gewesen, dass dieses Stadium deshalb für die Untersuchung äusserer Einflüsse besonders geeignet sei. M.E. trifft dieses Kriterium nicht den Kernpunkt der Verhältnisse. Wir haben gesehen, dass gerade dieses Stadium hinsichtlich der beschränkenden Faktoren bei der Atmung am kompliziertesten ist. Ob ein gewisser Lebensvorgang ohne experimentelle Eingriffe eine Zeit lang konstant bleibt oder nicht, ist für einen Versuch über äussere Einflüsse nur von sekundärer Bedeutung. Die aus einer Veränderung resultierenden Schwierigkeiten soll man durch die Versuchsanordnung zu beseitigen suchen. Worauf es für die physiologischen Schlüsse ankommt, ist, dass das gesamte Material gegenüber dem zu variierenden Faktor in der gleichen Lage ist, m.a.W., dass die beschränkenden Bedingungen für alle vorhandenen Gewebeteile die gleichen sind.

#### § 4. Uebersicht der Ergebnisse.

Aus der vorliegenden Arbeit möchte ich folgendes hervorheben:

1. Der Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleanus Burgeff* (*Ph. nitens* Kunze) kann auf einer Nährlösung aus Zucker und anorganischen Salzen ohne Weiteres nicht wachsen. (Es wurde mit einem — -Stamm gearbeitet.) Die Kultur gelingt aber leicht, wenn man dieser Nährlösung etwas gereinigten Hefeextrakt zusetzt, (der an sich keinen nennenswerten Nährwert mehr hat) und ein festes Substrat hineinbringt. (Abschnitt I).

Als wirksamer Bestandteil des Hefeextraktes ist wohl das Bios Wildiers anzusehen. In der letzten Zeit habe ich die Erfahrung gemacht, dass sich das feste

- Substrat bei einer dauernd geschüttelten Kultur (nach der Methode von Kluyver & Perquin) erübrigt.
- 2. An Myzelien, die auf glukosehaltigen Lösungen mit festem Substrat gezüchtet wurden, wurde die Temperaturkurve der  $\text{CO}_2$ -Abgabe im Stadium optimaler Entwicklung bestimmt. Diese Kurve war ungefähr geradlinig, ähnlich wie de Boer das im gleichen Entwicklungsstadium auf einem natürlichen Kohlehydrat-substrat erhielt (Abschnitt II).
- 3. Durch Versuche an Kulturen verschiedenen Alters wurde gezeigt, dass der geradlinige Verlauf nicht etwas prinzipiell Wichtiges ist, sondern ein Übergangsstadium darstellt. Dies kommt dadurch zustande, dass mit zunehmendem Alter die  $Q_5$ -Werte für die höheren Temperaturbereiche ansteigen, während der Wert für das Intervall  $10^\circ$ — $15^\circ$  vom Entwicklungsstadium unabhängig ist. (Abschnitt III). Dies legt die Deutung nahe, dass die Atmung der verschiedenen Myzelteile bei verschiedenen hohen Temperaturen einer Beschränkung unterworfen wird. Es liegt auf der Hand, diese Beschränkung in der Zufuhr der bei der Atmung reagierenden Stoffe zu suchen. Versuche mit narkotisierten Myzelien stützten diese Anschauung (Abschnitt IV). Für die Glukose konnte nachgewiesen werden, dass sie bei jungen Kulturen im Intervall  $20^\circ$ — $25^\circ$  als begrenzende Bedingung fungiert (Abschnitt IV). Ob gleichfalls Beschränkung durch Sauerstoffzufuhr besteht, habe ich noch nicht untersucht.

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Versuche wurden im Botanischen Institut der Universität Utrecht ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. F. A. F. C. Went, danke ich für sein fortwährendes Interesse an meinen Versuchen und für viele Ratschläge. Fräulein Prof. Dr. G. von Ubisch und Fräulein Dr.

L. Ronsdorf danke ich bestens für ihre Hilfe bei der Korrektur des deutschen Textes.

LITERATURVERZEICHNIS.

1. Amstel, J. van & G. van Iterson. — Over het temperatuur-optimum van physiologische processen. — Versl. v. d. gewone Verg. v. d. Wis- en Natuurk. Afd. v. d. Kon. Acad. v. Wetensch. Amsterdam 19. 1910. S. 106.
2. Amstel, J. van & G. van Iterson. — Over het temperatuur-optimum van physiologische processen II. — Ebenda S. 534.
3. Belehradek, J. — Sur la signification des coéfficients de température. — *Protoplasma* 7. 1929. S. 232.
4. Belehradek, J. — A propos de la base théorique des coéfficients de température des processus protoplasmiques. — *Protoplasma* 16. 1932. S. 102.
5. Belehradek, J. & M. Belehradkova — Influence of age on the respiration rate in leaves of *Scolopendrium scolopendrium* Karst. — *The New Phytologist* 28. 1929. S. 313.
6. Blackman, F. F. — Optima and limiting factors. — *Annals of Botany* 19. 1905. S. 281.
7. Boer, S. R. de — Respiration of *Phycomyces*. — *Recueil d. trav. bot. néerlandais* 25. 1928. S. 117.
8. Bonnier, G. & L. Mangin — Recherches sur la respiration et la transpiration des champignons. — *Ann. d. Sciences nat., Botanique*, 6e série 17. 1884. S. 210.
9. Bonnier, G. & L. Mangin — Recherches sur la respiration des tissus sans chlorophylle. — *Ann. d. Sciences nat., Botanique* 6e série 18. 1884. S. 293.
10. Bottelier, H. P. — Über den Einfluss äusserer Faktoren auf die Protoplasmaströmung in der *Avena-Koleoptile*. — *Recueil d. trav. bot. néerlandais* 31. 1934. S. 474.
11. Brown, W. H. — The theory of limiting factors. — *The Philippine Journal of Science C* 13. 1918. S. 345.
12. Castle, E. S. — Temperature characteristics for the growth of the sporangiophores of *Phycomyces*. — *The Journ. of Gen. Physiology* 11. 1928. S. 407.
13. Clausen, H. — Beiträge zur Kenntnis der Athmung der Gewächse und des pflanzlichen Stoffwechsels. — *Landw. Jahrb.* 19. 1890. S. 893.

14. Cohen Stuart, C. P. — Een studie over temperatuurcoëfficiënten en den regel van Van 't Hoff. — Versl. v. d. gewone Verg. v. d. Wis- en Natuurk. Afd. v. d. Kon. Acad. v. Wetenschappen Amsterdam. 20. 1912. S. 1270.
15. Crozier, W. J. — On biological oxydations as function of temperature. — The Journ. of Gen. Physiology 7. 1925. S. 189.
16. Crozier, W. J. — Note on the distribution of critical temperatures for biological processes. — The Journ. of Gen. Physiology 9. 1926. S. 525.
17. Crozier, W. J. & A. E. Navez — Temperature characteristics for production of  $\text{CO}_2$  by Phaseolus seedlings. — The Journ. of Gen. Physiology 14. 1931. S. 617.
18. Crozier, W. J. & T. J. B. Stier — On the modification of temperature characteristics. — The Journ. of Gen. Physiology 9. 1926. S. 547.
19. Dehérain, P. P. & H. Moissan — Recherches sur l'absorption d'oxygène et l'émission d'acide carbonique par les plantes maintenues dans l'obscurité. — Ann. d. Sciences nat., Botanique, 5e série 19. 1874. S. 321.
20. Dijkman, M. J. — Wuchsstoff und geotropische Krümmung bei Lupinus. — Recueil d. trav. bot. néerlandais 31. 1934. S. 391.
21. Fernandes, D. S. — Aerobe und anaerobe Atmung bei Keimlingen von *Pisum sativum*. — Recueil d. trav. bot. néerlandais 20, 1923. S. 107.
22. Geiger, M. — Studien zum Gaswechsel einer extremen Schattenpflanze (*Aspidistra*) und zur Methodik der Gaswechselversuche. — Jahrb. f. wiss. Bot. 67. 1928. S. 635.
23. Geiger, M. — Beitrag zur Kenntnis der Physiologie keimender Samen. I. Einfluss der Quellungsbedingungen auf den Gas austausch. — Jahrb. f. wiss. Bot. 69. 1928. S. 331.
24. Hille Ris Lambers, M. — Temperatuur en protoplasma-strooming. — Diss. Utrecht 1926.
25. Honert, T. H. van den — Koolzuurassimilatie en beperkende factoren. — Diss. Utrecht 1928. (s. auch: Recueil d. trav. bot. néerlandais 27. 1930. S. 149. [englisch]).
26. Kluyver, A. J. & L. H. C. Perquin — Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. — Bioch. Zeitschr. 226. 1933. S. 68.

27. Kreusler, U. — Beobachtungen über die Kohlensäure-Aufnahme und -Ausgabe (Assimilation und Athmung) der Pflanzen II. — Landw. Jahrb. 16. 1887. S. 711.
28. Kurbatov, M. I. & N. D. Leonov — Über den Einfluss der Temperatur auf die Atmung der Keimlinge von *Phaseolus aureus*. — *Planta* 12. 1930. S. 147.
29. Kuyper, J. — Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Atmung der höheren Pflanzen. — Recueil d. trav. bot. néerlandais 7. 1910. S.
30. Kuyper, J. — Einige weiteren Versuche über den Einfluss der Temperatur auf die Atmung der höheren Pflanzen. — Ann. d. Jard. Bot. de Buitenzorg 24. 1911. S. 45.
31. Lineweaver, H., D. Burk & C. K. Horner — The temperature characteristic of respiration of *Azotobacter*. — The Journ. of Gen. Physiology 15. 1932. S. 497.
32. Mack, W. B. — The relation of temperature and the partial pressure of oxygen to respiration and growth in germinating wheat. — Plant Physiology 5. 1930. S. 1.
33. Mayer, A. — Die Abhängigkeit der Pflanzenathmung von der Temperatur. — Landw. Vers. Stat. 19. 1876. S. 340.
34. Navez, A. E., Respiration and geotropism in *Vicia Faba* I. — The Journ. of Gen. Physiology 12. 1929. S. 641.
35. Paauw, F. van der — The indirect action of external factors on photosynthesis. — Recueil d. trav. bot. néerlandais 29. 1931. S. 497.
36. Pedersen, R. — Recherches sur l'influence de la température sur la production de l'acide carbonique par l'orge germée dans l'obscurité. (1878) — Meddel. f. Carlsberg Lab. 1. 1882, franz. Rés. S. 44.
37. Pringsheim, E. G. — Untersuchungen über Samenquellelung III. — *Planta* 19. 1933. S. 653.
38. Puriewitsch, K. — Influence de la température sur la respiration des plantes. — Ann. d. Sciences natur. 9e série, Botanique I. 1905. S. 1.
39. Rischawi, L. — Zur Frage über die Athmung der Pflanzen (russisch) — Referat: Justs Botanischer Jahresbericht 5. 1877. S. 721.
40. Romell, L. G. — Über das Zusammenwirken der Produktionsfaktoren. — Jahrb. f. wiss. Bot. 65. 1926. S. 739.
41. Romijn, C. — Über den Einfluss der Temperatur auf die Protoplasmaströmung bei *Nitella flexilis*. — Proceedings K.A.W. Amsterdam 34. 1931. S. 289.

42. Sachs, J. — Physiologische Untersuchungen über die Abhängigkeit der Keimung von der Temperatur. — Jahrb. f. wiss. Bot. 2. 1860. S. 338. (Ges. Abh. 1. S. 49.)
43. Sachs, J. — Über die Temperaturgrenze der Vegetation. — Flora 22. 1864. S. 8. (Ges. Abh. 1. S. 111.)
44. Sachs, J. — Über den Einfluss der Lufttemperatur und des Tageslichts auf die stündlichen und täglichen Änderungen des Langenwachstums der Internodien (1871). Arb. Bot. Inst. Würzburg 1. 1872. S. 100.
45. Stier, T. J. B. — The rate of oxygen utilization by yeast as related to temperature. — The Journ. of Gen. Physiology 16. 1933. S. 815.
46. Tamiya, H. — Zur Theorie des respiratorischen Quotienten nebst einer Bemerkung über den Einfluss der oxydoreduktiven Zellvorgänge auf den Gaswechsel der Zellen. — Acta phytochimica 6. 1932. S. 227.
47. Tamiya, H. — Über die Stoff- und die Energiebilanz bei dem Wachstumsvorgang des Schimmelpilzes — Acta phytochimica 7. 1933. S. 27.
48. Tamiya, H. & S. Yamaguchi — Über die Aufbau- und die Erhaltungssatmung. — Acta phytochimica 7. 1933. S. 43.
49. Tang, P. S. — Temperature characteristics for the oxygen consumption of germinating seeds of *Lupinus albus* and *Zea Mays*. — The Journ. of Gen. Physiology 14. 1931. S. 631.
50. Tang, P. S. — Temperature characteristics for the production of  $\text{CO}_2$  by germinating seeds of *Lupinus albus* and *Zea Mays*. — The Journ. of Gen. Physiology 15. 1932. S. 87.
51. Tang, P. S. — On the respiratory quotient of *Lupinus albus* as a function of temperature. — The Journ. of Gen. Physiology 15. 1932. S. 561.
52. Warburg, O. — Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. — Berlin 1928.
53. Wolkoff, A. v. & A. Mayer — Beiträge zur Lehre über die Athmung der Pflanzen — Landw. Jahrb. 3. 1874. S. 481.
54. Ziegenbein, E. — Untersuchungen über den Stoffwechsel und die Atmung keimender Kartoffelknollen sowie anderer Pflanzen. — Jahrb. f. wiss. Bot. 25. 1893. S. 563.
- Spezielle Literatur zu Abschnitt I.
55. Bachmann, F. M. — Vitamine requirements of certain yeasts. — The Journ. of biologic. chem. 39. 1919. S. 235.

- 55a. Boas, F. — Beiträge zur Wirkungsphysiologie einheimischer Pflanzen. I. — Ber. d. deutschen bot. Ges. 52. 1934. S. 126.
56. Bottomley, W. B. — The significance of certain food substances for plant growth. — Ann. of Bot. 28. 1914. S. 531.
57. Bottomley, W. B. — The effect of organic matter on the growth of various water plants in culture solution. — Ann. of Bot. 34. 1920. S. 353.
58. Branscheidt, P. — Zur Physiologie der Pollenkeimung und ihrer experimentellen Beeinflussung. — Planta 11. 1930. S. 368.
59. Brink, R. A. — The physiology of pollen. — Amer. Journ. of Botany 11. 1924. S. 218, 283, 351, 417.
60. Den Dooren de Jong, L. E. — Über Micrococcus Eykmanii n. spec., ein Bakterium, welches für sein Wachstum vitaminartige Stoffe braucht. — Arch. f. Mikrobiologie 5. 1934. S. 1.
61. Eddy, W. H., R. W. Kerr & R. R. Williams — The isolation from autolyzed yeast of a crystalline substance, melting at 223°, having the properties of a bios. — The Journ. of the Amer. Chem. Soc. 46. 1924. S. 2846.
62. Euler, H. von & T. Philipson — Wasserlösliche Wachstumsfaktoren. Bioch. Zeitschr. 245. 1932. S. 418.
63. Haberlandt, G. — Wundhormone als Erreger von Zellteilungen. — Beiträge zur allgemeinen Botanik 2. 1923. S. 1.
64. Hammett, F. S. — The chemical stimulus essential for growth by increase in cell number. — Protoplasma 7. 1929. S. 297.
65. Hammett, F. S. — The natural chemical equilibrium regulative of growth by increase in cell number. — Protoplasma 11. 1930. S. 382.
66. Harder, R. — Über das Verhalten von Basidiomyceten und Ascomyceten in Mischkulturen. — Naturw. Zeitschr. f. Forst- und Landw. 9. 1911. S. 129.
67. Hartelius, V. — The occurrence of growth substance B in urine. — Comptes rendus des trav. du Lab. Carlsberg 19. 1933. Nr 18.
68. Hartelius, V. — Über das Vorkommen von Wuchsstoff B im Harn. — Bioch. Zeitschr. 261. 1933. S. 76.
69. Hartelius, V. Über das Vorkommen von Wuchsstoff B. — Bioch. Zeitschr. 261. 1933. S. 89.
70. Klinkenberg, G. A. van — Über die Spezifität der

- Amylasen. — Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie 209. 1932. S. 253.
71. Kögl, F., A. J. Haagen Smit & H. Erxleben — Über ein Phytohormon der Zellstreckung. — Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie 214. 1933. S. 241.
72. Lepeschkin, W. — The influence of vitamins upon the development of yeasts and molds (Contribution to the bios-problem). — Amer. Journ. of Botany 11, 1924. S. 164.
73. Lucas, G. H. W. — The fractionation of bios, and comparision of bios with vitamins B and C. — Journ. of physic. chemistry 28. 1924. S. 1180.
74. Miller, W. L., E. V. Eastcott & J. E. Maconachie — Wildiers' bios: The fractionation of bios from yeast. — Journ. of the Amer. Chem. Soc. 55. 1933. S. 1502.
75. Mockeridge, F. A. — The occurrence and nature of the plant growth-promoting substances in various organic manural composts. — The bioch. Journ. 14. 1920. S. 432.
76. Mockeridge, F. A. — The formation of plant growth-promoting substances by micro-organisms. — Ann. of Bot. 38. 1924. S. 723.
77. Narayanan, B. T. — The chemical investigation of „bios“ I. — The Biochemical Journ. 24. 1930. S. 6.
78. Narayanan, B. T. & J. C. Drummond — The concentration of vitamin B<sub>2</sub>. — The Biochemical Journ. 24. 1930. S. 19.
79. Nielsen, N. — Untersuchungen über einen wachstums-regulierenden Stoff: Rhizopin. — Jahrb. f. wiss. Bot. 73. 1930. S. 125.
80. Nielsen, N. — Über die Wirkung des Rhizopins auf Wachstum und Gärung. Vorl. Mitt. — Zentr. bl. f. Bakt. II 82. 1930. S. 70. Ref. Bot. Cbl. 18. 1931. S. 339.
81. Nielsen, N. — The effect of rhizopin on the production of matter of *Aspergillus niger*. — Comptes rendus d. trav. du lab. Carlsberg 19. 1931. Nr 5.
82. Nielsen, N. & V. Hartelius — The separation of growth-promoting substances. — Comptes rendus d. trav. du lab. Carlsberg 19. 1932. Nr 8.
83. Nielsen, N. & V. Hartelius — Über die Bildung eines Wuchsstoffes (Gruppe B) auf chemischem Wege. — Bioch. Zeitschr. 256. 1932. S. 2.
84. Nielsen, N. & V. Hartelius — Untersuchungen über die Wirkung einiger Metalle als Co-Wuchsstoffe. — Bioch. Zeitschr. 259. 1933. S. 340.

85. Nielsen, N. & V. Hartelius — Investigations of the growth of *Aspergillus niger* at different hydrogen ion concentrations, with and without the addition of growth promoting substance B. — *Comptes rendus d. trav. du lab. Carlsberg* 19. 1933. Nr. 15.
86. Okunuki, K. Über die Beeinflussung des Wachstums der Schimmelpilze durch die von Rosahefen gebildeten Stoffe. — *Japan. Journ. of Botany* 5. 1931. S. 402.
87. Olsen, C. — On the influence of humus substances on the growth of green plants in water culture. — *Comptes rendus d. trav. du lab. Carlsberg* 18. 1931. Nr. 1.
88. Philipson, T. — Über den Aktivator Z und seine Stellung zum Wachstumsfaktor der Hefe, Bios, und den Vitaminen B. — *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.* 193. 1930. S. 15.
89. Philipson, T. — Beobachtungen über Hefezuwachs — *Bioch. Zeitschr.* 258. 1933. S. 244.
90. Porter, C. L. — Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. — *Amer. Journ. of Botany* 11. 1924. S. 168.
91. Robbins, W. J. — Effect of autolized yeast and peptone on growth of excised corn root tips in the dark. — *Bot. Gazette* 74. 1922. S. 59.
92. Robbins, W. J. & W. E. Maneval — Further experiments on growth of excised root tips under sterile conditions. — *Bot. Gazette* 76. 1923. S. 274.
93. Saeger, A. — The growth of duckweeds in mineral nutrient solutions with and without organic extracts. — *The Journ. of Gen. Physiology* 7. 1925. S. 517.
94. Satoh, S. — Studien über die Wirkungen der durch Ophiobolus Miyabeanus gebrauchten Nährlösungen auf die Keimung und Entwicklung eines anderen Pilzes. — *Mem. Coll. Agric. Tokyo* 13. 1931. S. 41. (Ref. *Bot. Cbl.* 161. 1931. S. 453.).
95. Schopfer, W. H. — Sur une substance active jointe au maltose. Action physiologique. — *Compt. rend. d. Sc. de la Soc. d. phys. et d'hist. nat. de Genève* 47. 1930. S. 165.
96. Schopfer, W. H. — Etude de l'influence du maltose sur la croissance et la genèse des zygotes de *Phycomyces Blakesleeanus*. — *Extr. Act. d. la Soc. helvét. d. Sc. nat., St. Gallen* 1930. S. 312.

97. Schopfer, W. H. — Sur l'emploi des maltoses du commerce et du maltose de synthèse dans les recherches biologiques. — *Helvetica chimica acta* 14. 1931. S. 1067.
98. Schopfer, W. H. — Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez *Phycomyces Blakesleeanus*. Influence des substances vitaminiques. — *Bull. de la Soc. bot. Suisse* 40. 1931. S. 87 und 41. 1932. S. 73.
99. Schopfer, W. H. — Sur le facteur accessoire de croissance de micro-organisme contenu dans le germe du blé; son action sur la sexualité de *Phycomyces*. — *C. R. Séanc. Soc. Phys. et Hist. Nat. Genève* 49. 1932. S. 70 (Ref. *Bot. Cbl.* 165. 1933. S. 11.)
100. Schopfer, W. H. — Sur l'action vitaminique supposée de quelques amines. — *Ebenda* S. 146. (Ref. *Bot. Cbl.* 165. 1933. S. 11.)
101. Schwartz, W. & R. Kautzmann — Beiträge zur Kenntnis der Ernährungs-physiologie einer obergärigen Kulturhefe. — *Arch. f. Mikrobiologie* 2. 1931. S. 537.
102. Went, F. W. — Wuchsstoff und Wachstum. — *Recueil d. trav. bot. néerlandais* 25. 1928. S. 1.
103. Wildiers, E. — Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. — *La Cellule* 18. 1901. S. 311.
104. Williams, R. J. — Vitamines and yeast growth. — *The Journ. of biolog. chem.* 46. 1921. S. 113.
105. Williams, R. J., J. L. Wilson & F. H. von der Ahe — The control of bios testing and the concentration of a bios. — *The Journ. of the Amer. Chem. Soc.* 49. 1927. S. 227.
106. Williams, R. J., M. E. Warner & R. R. Roehm — The effect of various preparations on the growth of bakers' and brewers' yeasts. — *The Journ. of the Amer. Chem. Soc.* 51. 1929. S. 2764.
107. Williams, R. J. & J. M. Honn — Rôle of „nutrilites” in the nutrition of molds and other fungi. — *Plant Physiology* 7. 1932. S. 629.
108. Wijsman, H. P. — De diastase, beschouwd als mengsel van maltase en dextrinase. — *Diss. Amsterdam* 1889.
109. Zeller, S. M. & H. Schmitz — Studies in the physiology of the fungi VIII. Mixed Cultures. — *Ann. of the Missouri Bot. Gard.* 6. 1919. S. 183.