

Ber. Nat.-Med. Ver. Innsbruck	Band 54	S. 159—165	Innsbruck, November 1966
-------------------------------	---------	------------	--------------------------

Probleme bei manometrischen Atmungsmessungen von langsamwüchsigen Basidiomyceten

von

F. TIEFENBRUNNER

(Aus dem Bodenbiologischen Labor der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Mariabrunn in Imst
[Tirol];

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. MOSER)

Synopsis. The author describes manometrical respiration measurement of the mycorrhizal fungus *Suillus plorans* (ROLL.) SING., (Zirbenröhrling) with the Warburg apparatus.

Methods for sufficient mycelial growth and valuable hints to avoid infections and to reduce inactive phases of mycelial suspensions are given. Errors of manometrical measurement at low-rate respiration activity are discussed.

Different ways of figuring respiration curves help exploit respiration activities in an easier way.

Einleitung

Seit 1952 wird in Österreich eine intensive Grundlagenforschung im Rahmen der Hochlagenaufforstung betrieben. Eines der vielen auftretende Probleme ist die Ernährung der Baumsetzlinge in diesen extremen, zum Teil schon länger waldentfremdeten Hochlagenböden. Eine große Bedeutung hat dabei die Mykorrhiza, eine Gemeinschaft zwischen Wurzeln höherer Pflanzen und Mycelien bestimmter Pilze.

MOSER (1958, 1959) gelang es, eine Torfkulturmethode mit künstlicher Impfung von Mykorrhizapilzen auszuarbeiten.

Die Intensivierung der Aufforstung bedingt eine Rationalisierung und eine straffe Kalkulation. Pflege- und Schutzmaßnahmen sollen ähnlich wie in landwirtschaftlichen Betrieben durch Anwendung chemischer Mittel vereinfacht werden.

Es galt nachzuweisen, ob und wie weit dadurch die Mykorrhiza geschädigt wird. In diesem Zusammenhang wurden Atmungsmessungen an *Suillus plorans* (Roll.) Sing., (Zirbenröhrling), dem wichtigsten Begleitpilz der Zirbe vorgenommen. Die

Institutsbezeichnung dieses Pilzes, *S4-h*, wird in dieser Arbeit statt des genauen Namens verwendet. *S4-h* wurde am 10. August 1958 in Obergurgl (1900 m) isoliert.

Atmungsmessung allgemein:

Atmungsmessungen werden seit ihrer Vervollkommenung durch WARBURG in den verschiedenen Richtungen der Biologie zur Erforschung und Überprüfung von Lebensvorgängen verwendet.

Findet in einem geschlossenen, mit einem Manometer verbundenen Gefäß Atmung statt, so wird sich dies in einer Abnahme des Gasdruckes zeigen, wenn man das entstehende Kohlendioxyd durch eine Lauge absorbiert. (Prinzip der „Direkten Methode“ von WARBURG.) Veränderungen des Stoffwechselgeschehens können in vielen Fällen durch eine Änderung der Atmungsintensität festgestellt werden. Von FREY wurde diese Methode bereits 1942 zur Bestimmung der Sulfonamidwirkung auf Bakterien herangezogen. Eine umfassende und genaue Beschreibung der manometrischen Atmungsmessungen wird von DIXON (1952) und UMBREIT et. al. (1951) gegeben. Bei *S4-h* sollte bestimmt werden, in welchem Zeitraum nach der Zugabe chemischer Stoffe sich eine Wirkung erkennen ließ.

Problematik

Der Großteil aller Respirationsmessungen wurden bisher mit schnellwüchsigen Organismen, meist Bakterien, durchgeführt. Dabei ist durch Bestimmung der genauen Einsaatmenge direkt in die Reaktionsgefäße oder in ein Vorkulturgefäß eine große Homogenität des Zellmaterials zu erreichen. Schnellwüchsige Kulturen sind gegenüber Infektionen weniger anfällig.

Bei *S4-h* handelt es sich dagegen um einen langsamwüchsigen, mycelbildenden Pilz. Er bildet in der Laborkultur keine Fruchtkörper und läßt sich im Labor auch nicht aus Sporen züchten. Es muß durch Verimpfung von Mycelstücken vermehrt werden. Zu seiner Kultur bedarf es einer komplizierten Nährlösung, in der sich viele andere Mikroorganismen äußerst rasch vermehren können. Darüberhinaus ist das Mycel von *S4-h* empfindlich gegenüber größeren Verletzungen, Temperaturabfall und zeigt eine jahreszeitliche Periodizität. Zwischen März und Oktober besteht eine Periode optimalen Wachstums und optimaler Atmungsaktivität, die während der Monate November bis Februar auf ein Minimum absinkt. Diese Periodizität wurde trotz genügender Nährstoffe und Temperaturkonstanz im verdunkelten Brutschrank über die ganze Zeit der Kultur beobachtet und läuft wahrscheinlich parallel mit der Zeit der Mykorrhizaaktivität im Freiland.

Daraus ergeben sich zwei Hauptprobleme:

1. Die Anzucht von Pilzmaterial, das gleiches physiologisches Verhalten zeigt, also möglichst gleich intensiv atmet.

2. Die Vermeidung von Infektionen:

- a) Während der langen Anzuchtperiode.
- b) Während der Vorbereitung und Übertragung in die Reaktionsgefäße.
- c) Während der Messung selbst.

Nährlösungen:

- a) In den Anzuchtkolben: Flüssigkeitsnährboden (MOSER, 1958)
 Biotin...1 gamma, Aneurin...50 gamma, KH_2PO_4 ...0,5 g, MgSO_4 ...0,5 g, ZnSO_4 ...0,5 ml (1:500), FeCl_3 ...1,0 ml (1%), CaCl_2 ...5,0 ml (0,1 m), MnSO_4 ...0,5 ml (1%), Inosit...0,05 g, Maltose...20,0 g, Glukose...10,0 g, Pepton...2,0 g, Asparagin...1,6 g, Aqua dest...1000 ml.

Bei einer Erhöhung der Maltosezugabe um 5,0 g, Glukose um 3,0 g und Pepton um 0,4 g (auf 1000 ml Aqua dest.) zeigt *S4-h* ein bedeutend besseres Wachstum. Im Spätherbst 1963 wurde beobachtet, daß Flüssigkeitskulturen von *S4-h* mit einer Infektion durch Hefe deutlich stimuliert wurden.

- b) In den Reaktionsgefäßen und Schüttelflaschen:

Stickstofffreie Nährlösung: (MOSER, 1958)

KH_2PO_4 ...0,5 g, MgSO_4 ...0,5 g, ZnSO_4 ...0,5 ml (1:500), FeCl_3 ...1,0 ml (1%), CaCl_2 ...5,0 ml (0,1 m), Inosit...0,04 g, Maltose...20,0 g, Glukose...10,0 g, Aqua dest...1000 ml.

Methodik

a) Anzucht von Pilzmaterial:

Die Stammkulturen wurden in mikrobiologischen Eprouvetten auf Schrägagar gehalten. Es erwies sich aber auch bei den daraus abgeimpften Flüssigkeitskulturen als wachstumsfördernd, zwischendurch auf festen Nährboden zu überimpfen.

Die Anzucht des Mycels für die Atmungsmessungen erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Nährlösung. Die Verimpfzeit betrug zwischen zwei und drei Wochen. Aus diesen Kolben wurden jeweils 9—10 Kulturen in die Schüttelflaschen übertragen. Nach verschiedenen Vorversuchen, wie Einwägen von Mycelstücken in die Reaktionsgefäße, oder Anzüchten von Mycelrasen in eigenen Reaktionsgefäßen, erwies sich die Herstellung einer Suspension als am einfachsten und geeignetsten. (Methode nach WIKEN et. al. 1951, 1952). Beim Zerkleinern mit dem Ultra-Turax-Gerät entstand eine große Schädigung und anschließend eine lange inaktive Phase des Zellmaterials. Günstiger wirkte sich Handschütteln in Schüttelflaschen aus, wobei 6—7 Sekunden Ultra-Turax-Zerkleinerung ungefähr 10 Minuten Handschütteln entsprach.

Vor dem Übertragen der Kulturen in die Schüttelflaschen, das sich am einfachsten über einem Dampftopf durchführen ließ, wurden sie zuerst optisch auf Infektionen überprüft und die bestwüchsigen ausgewählt. Mit Ausstrichen auf Agarplatten

wurden die Suspensionen auf einen eventuellen Keimgehalt (neben S4-h) untersucht. Die Zellwattestopfen der 100 ml Kolben wurden abgeflammt, die Kolben selbst und die Gummistopfen der Schüttelflaschen mit Alkohol gewaschen. In den Schüttelflaschen befanden sich bis zu einem Drittel der Höhe Glasperlen von 5–6 mm Durchmesser. Beim Überführen war besonders darauf zu achten, daß sich die Temperatur in den Schüttelflaschen durch die Einwirkung des Dampfes nur wenig erhöhte. Nach dem Schütteln wurden die Suspensionen mindestens 70 Stunden aufbewahrt, um beim Beschicken aufgetretene Infektionen festzustellen, und die durch den Schüttelschock bedingte inaktive Zeit zu überwinden. Danach wurden nochmals Proben unter dem Mikroskop überprüft. Aus den Schüttelflaschen wurden die Mycelsuspensionen über einem Filter aus Leinen angereichert und von diesem mit Pipetten in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Nährlösung und die Suspensionen der Spritzmittel, sowie die Kalilauge für die CO₂-Absorption wurden mit Injektionsspritzen zugegeben, da dies leichter, schneller und genauer durchzuführen war.

Reaktionsgefäße und alle anderen verwendeten Geräte waren mit Reinigungsflüssigkeit Gatt-G5 ausgekocht, gründlich mit Acqua dest. gespült, mindestens 12 Stunden in absolutem Alkohol desinfiziert und danach bei 110° C im Trockenschrank aufbewahrt worden. Die Reaktionsgefäße waren bis unmittelbar vor ihrem Aufsetzen auf die Manometer durch sterile Gummistopfen verschlossen. Die Manometeranschlüsse wurden sofort nach der Gefäßabnahme mit Alkohol von Fettresten gesäubert und vor dem Aufsetzen kurz abgeflammt. Bei länger dauernden Versuchen können auch Bakterienfilter zwischengeschaltet werden.

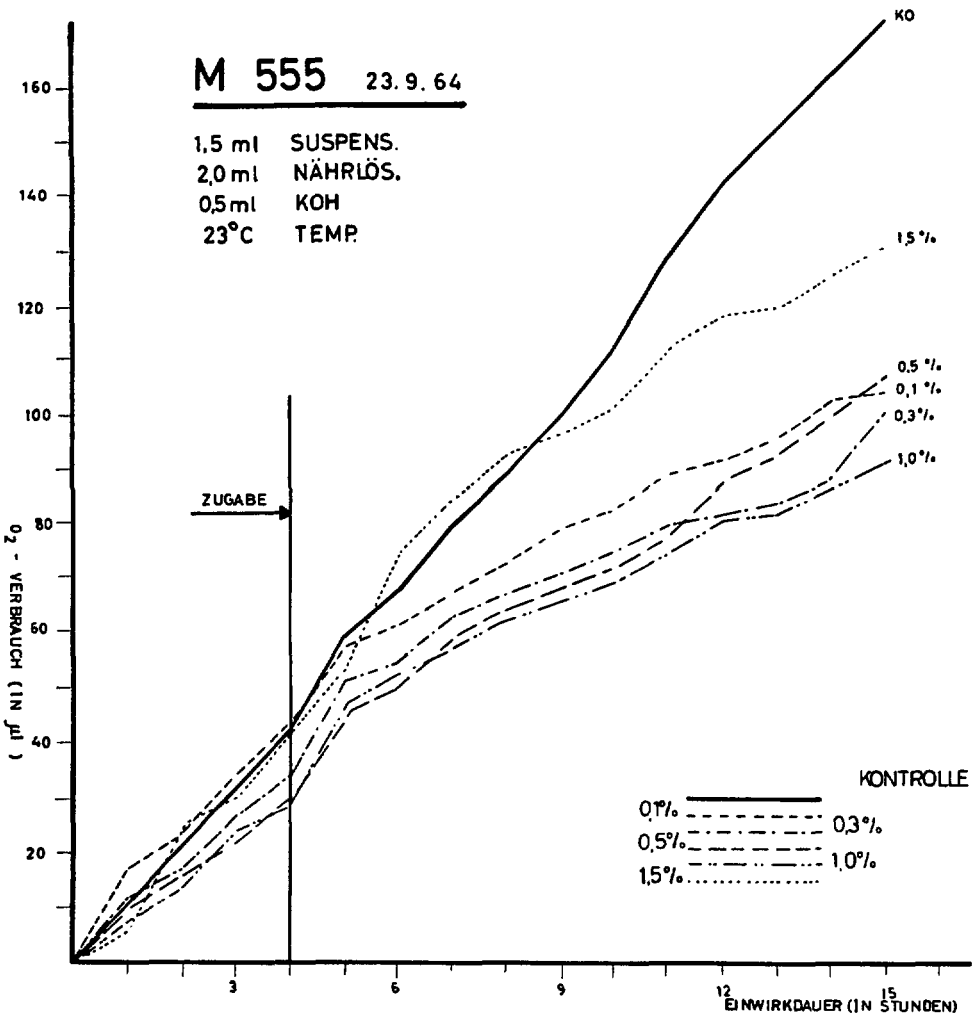
b) Atmungsmessung:

Es wurde die von der Firma Braun in Melsungen erzeugte Warburgapparatur Modell V verwendet. In der schüsselförmigen Thermostatenwanne ist bei diesem Modell Platz für 14 Manometer. Die Schüttelfrequenz war auf 75 pro Minute eingestellt. Das Thermostatenbad wurde mit der Genauigkeit von $\pm 0,2$ Grad auf 23° C gehalten. Abgelesen wurde alle 60 Minuten mit fünf Minuten Stillstand der Schüttelvorrichtung. Die Erfassung der Werte erfolgte summativ, d. h. die Apparatur blieb bis zum Versuchsende geschlossen. Da die durchschnittliche Atmungsaktivität von 1,5 bis 2,0 ml Mycelsuspension gering war, wäre durch das Öffnen eine starke Verfälschung der Ablesewerte entstanden. Ebenso kann durch eine größere Differenz zwischen der Raumtemperatur und der Thermostatenbadtemperatur beim Öffnen ein Schock eintreten, der für die Dauer von 30–60 Minuten eine Atmungsverminderung bis zu 50 Prozent auslöst.

Druckschwankungen in der Atmosphäre und leichte Temperaturunterschiede des Thermostatenbades werden allgemein durch Verwendung eines Thermobarometers erfaßt. Es empfiehlt sich bei einer so schwachen Atmung und der stündlichen Ablesung zwei dieser Gefäße zu verwenden und zu ihrer besseren Beurteilung ein geeichtes Barometer zu benützen. Während laufender Messungen durchziehende Gewitter oder auch nur Störungszonen, die kaum bemerkt heranziehen, bewirken nicht aus-

wertbare Zacken der Atmungskurven. Man kann diese Zacken bei Verwendung eines Barometers als nicht relevant ausscheiden. Bei Föhn (nordgerichteter Fallwind, niedriger Barometerstand bei meist klarem Wetter) durchgeführte Atmungsmessungen an *S4-h* konnten nicht ausgewertet werden.

Abb. 1 gibt Atmungskurven von *S4-h* wieder. Die Kontrolle stellt den Normaltyp der Atmungskurve am Ende der optimalen Aktivitätsperiode dar. Die anderen Kurven zeigen eine Veränderung der Normalatmung durch Zugabe verschiedener Konzentrationen eines Zineb-Präparates.



μl O₂ VERBRAUCH
IN % DER KONTR.

M 555 24.9.64
1.5 ml PILZSUSP. 0.5 ml KOH
20 ml NÄHRLÖS. 23°C TEMP.

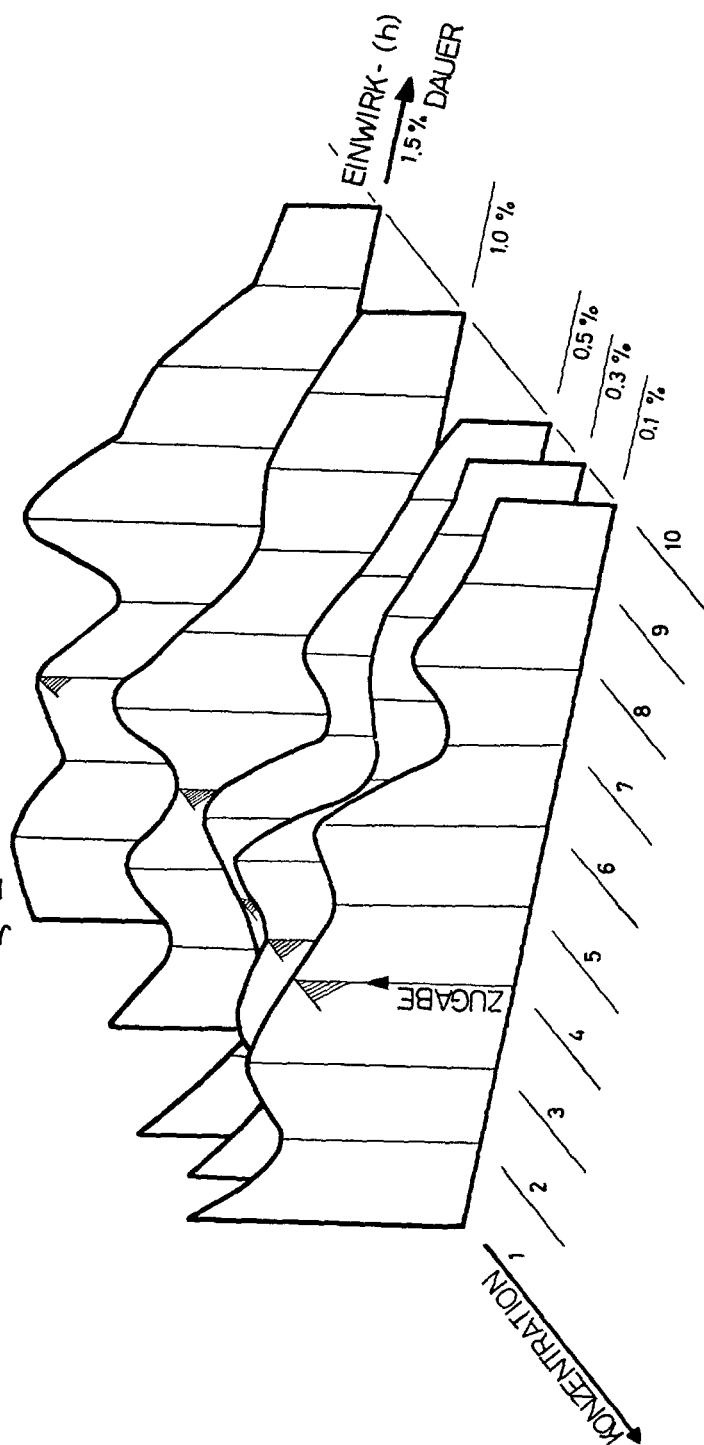


Abb. 2

Abb. 2 gibt die graphische Auswertung eines Atmungsversuches mit demselben Zineb-Präparat am darauffolgenden Tag wieder. Die Darstellung soll einen genaueren Vergleich der Konzentrationen untereinander und gegenüber der Kontrolle gestatten. Der Sauerstoffverbrauch ist in Prozenten der Kontrolle pro Ableseintervall angegeben. Zur besseren Übersicht wurde eine dreidimensionale Darstellung gewählt. Der Unterschied zur zweidimensionalen besteht darin, daß hier die sonst senkrecht auf die Zeichenebene ZY stehende Ebene ZX um die z -Achse etwas herausgedreht wurde. Die einzelnen Kurven erscheinen dadurch nicht als Projektion auf die Ebene ZY , sondern in ihrer tatsächlichen Lage im Raum. Die Kontrolle bildet eine Ebene in der Höhe 100%. (In der Darstellung entsprechen 3% einem Millimeter.)

Literatur

- DIXON, M. (1952): Manometric Methods applied to the Measurement of Cell-Respiration and other Processes. Cambridge Univ. Press 1952 (3. Auflage.)
- MOSER, M. (1958): Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. I. Die Erfahrungen bei der Reinkultur von Mykorrhizapilzen. Forstw. Cbl. 77, 32—40.
- MOSER, M. (1959): Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. III. Impfmethodik im Forstgarten. Forstw. Cbl. 78, 193—202.
- TIEFENBRUNNER, F. (1965): Der Einfluß von Captan, M 555, Nirit, Cupravit, Fuclasin auf *Suillus plorans* (Roll.) Sing. Ein Beitrag zur Kenntnis der Wirkung von Fungiziden auf Mykorrhizapartner der Nadelbäume. Dissertation an der Univ. Innsbruck, Mai 1965.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFFER, J. F. (1951): Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Burgess Publishing Co., Minneapolis. (7. Aufl.)
- WIKEN, T., KELLER, H. G., SCHELLING, G., STÖCKLI, A. (1951): Über die Verwendung von Mycelsuspensionen als Impfmateriel in Wachstumsversuchen mit Pilzen. Experientia, VIII, 6, 237.
- WIKEN, T., KELLER, H. G., SCHELLING, C. L., STÖCKLI, A. (1952): Wachstumsversuche mit Mycelsuspensionen von *Mycelium radialis atrovirens* in Ruhe und Schüttelkulturen. Experientia, VIII, 3, 110.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Friedrich TIEFENBRUNNER, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität,
6020 Innsbruck, Schöpfstraße 41.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck](#)

Jahr/Year: 1966

Band/Volume: [54](#)

Autor(en)/Author(s): Tiefenbrunner Friedrich

Artikel/Article: [Probleme bei manometrischen Atmungsmessungen von langsamwüchsigen Basidiomyceten. 159-165](#)