Über die Bedingungen der Farbbildung bei Fusarium.

Von **Ernst A. Bessey.**

Die zahlreichen Untersuchungen, welche sich mit den Farbstoffen der Pilze und Bakterien befassen, haben zumeist nur die chemische Erforschung der Pigmente zur Aufgabe oder begnügen sich damit, das Auftreten von Farbstoffen bei irgendwelchen Formen zu konstatieren. Die Frage nach dem Einflufs äufserer Bedingungen auf die Farbstoffproduktion hat bisher verhältnismäfsig wenig Bearbeiter gefunden; ganz besonders gilt das für die Farbstoffe der Pilze, mit welchen wir es im folgenden ausschliefslich zu tun haben werden.

Bevor wir uns unserer Aufgabe, bei einigen Fusarien die Bedingungen der Farbstoffbildung näher zu erforschen, zuwenden, wollen wir einen Blick auf die einschlägigen Arbeiten früherer Autoren werfen.

I. Frühere Untersuchungen.

Schacht (56, s. auch 63, S. 446)[1]) erwähnt die Anwesenheit violett gefärbter Hyphen von *Fusisporium solani* Mart., dem Erreger der Kartoffelfäulnis. Die farbigen Hyphen des Pilzes finden sich nicht im Stadium der sog. nassen Fäulnis, sondern umschliefsen die trokkenen Höhlungen, welche durch die Fäulnis in den Knollen verursacht werden. Die Stärkekörner werden von den pigmenthaltigen Hyphen durchbohrt und zum Teil aufgelöst. Der Farbstoff wird innerhalb der Hyphen gebildet. Die gefärbten Hyphen können zu farblosen, roten oder gelben Hyphen auswachsen.

Im Jahre 1890 beschrieb Harz (90) einen neuen Pilz, *Physomyces heterosporus n. g. et n. sp.,* der in Wirklichkeit eine Spezies von *Monascus* ist. Der Pilz wurde in den Glyzerinpfannen einer Licht- und Seifenfabrik gefunden. Er wuchs in einer Flüssigkeit, deren Glyzeringehalt zwischen 35 und 76,8 % und deren Aschegehalt zwischen 2,4 und 3,1 % schwankte und deren Temperatur, gewöhnlich von 32,8° bis 34,6° C., bei Zuführung neuen Glyzerins vorübergehend auf 50° bis 60° stieg. In diesem rohen warmen Glyzerin waren die Massen des Mycels dunkelbraunrot, stellenweise karmin-

1) Die vollständigen Titel finden sich in der Literaturübersicht am Ende der Abhandlung. Das Jahr der Herausgabe des Werkes (mit Weglassung der ersten beiden Ziffern) wird im Texte zugefügt werden, um verschiedene Werke desselben Verfassers unterscheiden zu können.

bis rosarot. Die Farbe wird geliefert von einem Stoff, der in den Hyphen enthalten ist und den Harz Physomycin nennt. Als der Pilz künstlich gezüchtet wurde, brachte er den Farbstoff hervor sowohl in Lösungen, die gereinigtes, wie in denen, die rohes Glyzerin enthielten. In festen Medien wurde die Farbe nicht so reichlich hervorgebracht wie in flüssigen.

Ferner werden die Malzkörner manchmal von einem Pilz befallen, der eine mehr oder weniger rote Farbe annimmt. Klein (92) hat diesen Pilz, der in enger Verwandtschaft mit „*Fusarium graminearum*“ stehen soll, einem eingehenden Studium unterzogen. Isoliert und gezüchtet kam er auf fast allen Nährböden fort, besonders gut jedoch auf stärkehaltigen. Nur auf Medien, die Kohlehydrate enthielten, wurde die Farbe hervorgebracht. Der rote Farbstoff findet sich in den Hyphen. Sauerstoff schien zu seiner Erzeugung notwendig zu sein, denn das submers in der Nährflüssigkeit erwachsene Mycel blieb stets farblos. In einem flüssigen sowie in einem gelatinehaltigen Nährboden quellen die Zellenmembranen des eingetauchten Mycelteils und werden gelblich und gallertartig. Der Teil des Mycels, der bisher nur schwach rot gefärbt ist, wird bei Erwärmung in Wasser dunkelrot. Klein schreibt (l. c. pag. 40): „Das schwach tingierte Mycel wird dunkelrot . . ., was seine Erklärung darin finden dürfte, dafs die vorhandenen leicht flüchtigen Säuren, die eine kräftigere Entwicklung der roten Farbe unterdrücken, schon bei Erwärmung des Wassers auf etwa 80° C. entweichen.“ [1])

Costantin (93) beschreibt einen Pilz, *Eurotiopsis Gayoni,* der auf Stärkekleister eine rote Färbung hervorbringt. In Traubenmost bildet er ein dickes, rosaweifses, hie und da blutrotes Mycel. Auf Kartoffel wächst er spärlich und gewöhnlich farblos. Im Most entstehen stark gefärbte Perithecien, auf Kartoffel weifse.

Laborde (96) unternahm eine gründliche Untersuchung der Physiologie desselben Pilzes. Gut gedieh der Pilz auf Nährböden, die aufser den nötigen Mineralstoffen und Stickstoffverbindungen (Ammoniumsalze oder Nitrate) noch einen der folgenden Stoffe enthielten: Kohlehydrate wie Stärke, Dextrin, Invertzucker, Glukose, Levulose, Rohrzucker, Milchzucker, Invertmilchzucker, Galactose und Trehalose. Minder ergiebig fiel das Wachstum aus bei Zugabe von Amygdalin,

---

1) Ich benutze hier die Gelegenheit, Herrn Prof. D. M. Holrung, Direktor der Versuchsstation für Pflanzenkrankheiten der Landwirtschaftskammer für die Provinz Sachsen, der mir das schwer zugängliche Werk besorgte, hierdurch bestens zu danken.

Koniferin, Salicin, Äthylalkohol, Butter und einem Öl (Olivenöl?). Auf die Farbstoffbildung kommt Laborde bei Behandlung dieser Kulturen nur beiläufig zu sprechen, er erwähnt die Bildung gelblicher Perithecien auf stärkehaltigen Kulturen und die Bildung rosafarbenen Mycels auf mannithaltigen Nährböden. Aufserdem berichtet Laborde von der Produktion eines roten Farbstoffes in einem Stärkekleister, dessen nähere chemische Zusammensetzung freilich nicht näher angegeben wird. Blutrote Färbung trat auf Milch auf, die unter dem Einflufs des Pilzes alkalisch wurde und ungeronnen blieb; Casein und Milchzucker wurden vom Pilz aufgebraucht. Weizenmehlkleister wird unter dem Einflufs des Pilzes ebenfalls alkalisch, doch weniger als die Milch; der Pilz färbt sich auf ihm noch intensiver rot. Die gleiche Farbe entstand auf Casein, das mit Minerallösung getränkt war, sowie auf Gluten. Die Farbproduktion fiel auf neutralem oder schwach saurem oder alkalischem Boden am reichlichsten aus. In stark sauren Lösungen sah Laborde die Farbbildung ausbleiben. In Milch, die mit Milchsäurebakterien geimpft war, wuchs der Pilz zunächst untergetaucht und wurde rot, wie in keimfreier Milch, aber bei zunehmendem Säuregehalt hörte er auf den Farbstoff hervorzubringen und bildete farblose Lufthyphen. Auf den für ihre Erzeugung günstigen Nährböden ist die Farbe anfangs blutrot, manchmal mit einem Stich ins Violette, in alternden Kulturen geht sie in Orangerot über. Laborde fafst seine Beobachtungen wie folgt zusammen (l. c. pag. 109): „La pigmentation des cultures a été signalée en diverses circonstances, mais toujours lorsque le milieu était très légèrement acide, neutre, ou légèrement alcalin; elle était d'autant plus intense que ce milieu contenait une plus forte proportion de matières albuminoïdes. . . . D'ailleurs, la présence d'une matière hydrocarbonée n'est pas toujours nécessaire, d'après ce qu'on a vu, pour l'*Eurotiopsis* cultivé sur la plaque de caseïne. . . . Ces pigments paraissent donc dériver des matières albuminoïdes.“ Bei schwachem Luftzutritt und bei Anwendung flüssiger Medien fiel die Farbstoffbildung nur schwach aus, erfolgte aber manchmal sehr schnell bei nachträglicher reichlicher Luftzufuhr. In gut durchlüfteten Kulturen war die Farbe am intensivsten in dem Augenblick, wann die Kohlehydratnährstoffe erschöpft waren und der Pilz seine Reservestoffe aufgezehrt hatte und daher seine eigenen cytoplasmatischen Bestandteile zu verbrauchen anfing.

Der Farbstoff Ang-Khak, der in China und Ostindien vielfach praktische Verwendung findet, wird durch einen *Monascus* erzeugt, den Went (95) als *M. purpureus* beschrieben hat. Uyeda (01) unter-

suchte Material von demselben Pilz aus Formosa. Der Farbstoff ist in dem Protoplasma enthalten, nicht in dem Zellsaft der Hyphen; in diesem ist er offenbar gleichmäfsig verteilt, und es erscheinen erst beim Absterben der Zelle gefärbte Körner in den Zellen. In demselben Faden sieht man rote und farblose Zellen miteinander wechseln. Untergetauchtes Material bleibt durchweg farblos — anscheinend infolge Sauerstoffmangels, da es nach Berührung mit Luft sich nachträglich rötet. Totes farbloses Material wird an der Luft nicht mehr rot. Der Pilz lebt durchaus nur aërob. Die Zusammensetzung des Nährbodens hat auf die Entwicklung der Farbe nur indirekten Einflufs; je kräftiger das Wachstum, um so intensiver die Pigmentbildung.

Ein weiteres, gut untersuchtes Beispiel für Farbstoffbildung bei Pilzen liefert der Erreger einer viel gefürchteten Krankheit der Baumwollpflanze, des „cowpea" (*Vigna catjang*) und der Wassermelone. Auf seine Konidienbildung hin ist der Pilz zur Gattung *Fusarium* zu stellen, seine Ascosporenfrucht erweist seine Zugehörigkeit zu *Neocosmospora vasinfecta*. Er bringt auf verschiedenen Nährböden einen roten Farbstoff hervor, besonders auf gekochtem Reis.

„On neutral or acid media", sagt E. F. Smith (99), „in the presents of free oxygen and of starchy foods — e. g. potato, bread, rice, tapioca, wheat, hominy, cucumber agar etc. — this fungus develops in the substratum a series of the most brilliant colors, which are then absorbed by the hyphae. These hues include many shades of pink, red, purple, and violet, and in some of the substrata — e. g. bread or boiled rice — are particularly brilliant, changing gradually from shades of purple and rose color into the deepest crimson.... During the development of this pigment the substratum becomes intensely acid (mostly CO_2, but some lactic acid...). If, however, alkaline substances (caustic lime, carbonate of soda etc.) be added to the substratum in advance, so as to neutralize the acid or acids as fast as formed, no color is developed, the fungus remaining snow white, as in the vessels of the melon plant. If less alkali be added, the colors appear gradually after a time, which is longer or shorter according to the amount added."

Van den Dries (97) berichtet über einige Erfahrungen mit *Fusarium hordei*. Er findet, dafs auf stärkereichen Nährböden die dem Substrat unmittelbar aufliegenden Mycelteile eine rosenrote Färbung annehmen. Bei günstigen Medien, wie z. B. Brot getränkt mit Raulin's Nährlösung, ist die Färbung lebhafter und wird scharlach-, purpur- oder schwarzrot.

Neulich haben Smith und Swingle (04) den Erreger einer in Amerika und Europa beobachteten Kartoffelkrankheit, *Fusarium oxysporum* Schlecht., untersucht, der vielleicht mit Schachts Untersuchungsobjekte identisch ist. Am Licht gezogen, wird der Pilz schön lachsfarben. In rotem Licht (hinter Kaliumbichromat) blieb die Farbstoffbildung aus, in blauem Licht (hinter Kupferoxydulammoniak) trat sie ein. — Ebenso verhielt sich *Neocosmospora vasinfecta,* der Erreger der schon genannten Vignakrankheit.

Aufser diesem lachsfarbigen Pigment bringt das *Fusarium* auf vielen Nährböden unabhängig von der Beleuchtung einen rosenroten oder violetten Farbstoff hervor, am besten auf gekochtem Reis, gekochter Tapioka usw. Alkalien hemmten die Erzeugung der Farbe. „One of the most noticeable effects of the increasing strength of alkali was the decrease in the amount of pigment formed, especially the pink“ (l. c. pag. 42). Wohingegen „the general effect of all the acids is to increase the production of the pigments, both lilac and pink-particuliarly the latter. This is somewhat noticeable in the rice tubes, but much more so in the potato tubes, where if no acid be added the growth (in darkness) is almost always pure white“ (l. c. pag. 46).

Nach Abschlufs der Arbeit wurde ich noch mit der Arbeit von Conpin und Friedel (04) über *Sterigmatocystis versicolor* bekannt. Die Verfasser stellen fest, dafs die Reaktion des Nährmediums auf die Nuance des vom Pilz ausgeschiedenen Pigments weitgehenden Einflufs hat; auf saurem Substrat fällt die Farbe gelb aus, auf alkalischem rot. Auch die in den Sporen enthaltene Farbe (grün oder graurot) wechselt mit den Nährbedingungen.

II. Eigene Untersuchungen.

Der Zweck der nachfolgenden Blätter soll es sein, die Angaben der früheren Autoren über die Bedingungen der Farbstoffbildung bei Pilzen zu ergänzen und bei einer Anzahl bisher nicht näher untersuchter Formen das von jenen bereits gestreifte Problem möglichst erschöpfend zu behandeln.

Bevor wir die von uns angestellten mannigfaltigen Kulturen näher schildern, wird eine kurze Auskunft über die Pilze selbst am Platze sein.

1. Untersuchte Pilze.

Zur Untersuchung kamen folgende Pilze:

1. Ein Pilz, der von dem Innern der Wurzel einer kranken Sesampflanze isoliert wurde. Mehrere verschiedene Wurzeln wurden

untersucht und von allen derselbe Pilze isoliert. Die kranken Pflanzen wurden von mir in Golodnaja Step in Turkestan im September 1902 gesammelt, nachdem Herr Graebner, der Direktor der dortigen Versuchsstation, meine Aufmerksamkeit auf sie gelenkt hatte. Die infizierten Exemplare fielen auf durch ihren welken Zustand, ebenso wie die von der „wiltdisease“ befallenen Vigna- und Baumwollexemplare (*Neocosmospora vasinfecta*). Man traf sie gewöhnlich gruppenweise, zonenweise an Gröfse zunehmend, derart, dafs die am Rande stehenden Pflanzen gerade anfingen zu welken und die am Mittelpunkt stehenden bereits abgestorben waren. Auf Stengelquerschnitten von kranken Pflanzen fallen — wie bei der wiltdisease — die geschwärzten Gefäfsbündel auf. Der untere Teil der abgestorbenen Stengel liefs unter der Epidermis eine lachsfarbene oder weifsliche Schicht erkennen, die, wie das Mikroskop lehrte, aus Mycel bestand. Der im Innern der Wurzeln gefundene Pilz wurde auf künstlichen Böden fortkultiviert; er zeigte grofse Ähnlichkeit mit *Neocosmospora vasinfecta* Smith. Drei Sporenformen sind vorhanden — Mikrosporen (das *Cephalosporium*-Stadium), Makrosporen (das *Fusarium*-Stadium) und Chlamydosporen —, die sich weder in Gröfse noch Aussehen von denen der *Neocosmospora* unterscheiden. Vorliegendender Pilz ist wahrscheinlich identisch mit der von Jaczewski (03) auf erkrankten Sesampflanzen aus Turkestan gefundenen und als *Neocosmospora vasinfecta* Smith beschriebenen Form.

2. Stücke des kranken Sesamstengels wurden in eine Feuchtkammer übertragen, wo sie sich nach wenigen Tagen mit einem weifsen, baumwollartigen Mycelüberzug bedeckten. Aus diesem wurde ein Pilz isoliert, der morphologisch von dem vorhergehenden nur dadurch zu unterscheiden war, dafs er niemals die sclerotiumähnlichen pseudoparenchymatischen Massen entwickelt, die bei Kultur auf Stengelstücken von *Vicia faba* von dem anderen, zuerst genannten Sesampilz nicht selten gebildet werden. Physiologisch unterscheiden sich die Pilze dadurch, dafs der erste sehr schnell in der Sonne orangegelb wird, während dieser Prozefs bei dem zweiten Pilz langsamer und weniger intensiv vor sich geht. Bei den meisten Nährböden aber erzeugt der zweite Pilz den roten Farbstoff reichlicher als der erste. Es ist unmöglich ohne Berücksichtigung dieser physiologischen Merkmale zu entscheiden, ob der von Jaczewski beschriebene Pilz zu der ersten oder zweiten Form gehört. Wahrscheinlich ist er mit dem ersten identisch, da Jaczewski seinen Pilz aus dem Innern des Stengels isolierte und nach meinen Er-

fahrungen auf diese Weise nur die zuerst beschriebene Form gewonnen wird.[1]) Da sich ohne Infektionsversuche nicht entscheiden läfst, welche von den obenerwähnten zwei Pilzen der Sesamparasit ist oder ob vielleicht beide leicht modifizierte Formen derselben Spezies sind, wird der aus dem Innern des Stengels isolierte Pilz der a-Pilz, und der vom Äufseren des Stengels stammende der b-Pilz genannt. Gleichzeitig mit dem letzteren trat in den Kulturen in der Feuchtkammer fast immer eine Spezies von *Melanospora* mit ähnlichem Mycel auf, die jedoch weder zu dem a- noch zu dem b-Pilz als Askosporenstadium gehörte.

3. und 4. *Neocosmospora vasinfecta* (Atk.) Smith und *N. vasinfecta var. nivea.* Smith, die Pilze, welche die Krankheiten der Baumwollpflanze und der Wassermelone verursachen. Material von diesen Arten wurde mir in Reinkulturen von W. A. Orton (Washington) gütigst zur Verfügung gestellt.

5. *Fusarium culmorum* (W. Sm.) Sacc., das ich von den mit dem sog. „wheat-scab" befallenen Weizenähren isolierte, die mir mein Vater aus Nebraska zusandte. Diese Krankheit wird oft auf *Fusarium roseum* zurückgeführt, wird aber wahrscheinlich durch *F. culmorum* verursacht.

2. Die von den Pilzen erzeugten Farbstoffe.

A. Vorkommen.

Bei dem a- und b-Pilz wie den Neocosmosporaarten wird der Farbstoff innerhalb der Hyphen gebildet. Gewöhnlich werden nur die dem Substrat aufliegenden oder in seiner nächsten Nähe befindlichen Hyphen gefärbt: in Kulturen auf gekochtem Reis erscheint die Farbe in den Hyphen, die im äufseren Teil der Reiskörner oder unweit der Körneroberfläche liegen. Die Hyphen, die in einigem Abstand von den Körnern eine lockere oder dicht geflochtene Mycelmasse bilden, sind meist farblos. Hie und da kommen gefärbte und farblose Zellen in derselben Hypha vor. Im Zentrum der Zellen liegen schwach oder stark gefärbte Tropfen, die namentlich in sterbenden Zellen das Aussehen eines festen Körpers annehmen. Der Farbstoff liegt nicht

1) W. A. Orton, dem ich einige Proben zusandte, impfte mit dem von ihm aus dem Inneren der Stengel isolierten Pilz einige Sesampflanzen mit positivem Erfolg. Kontrollversuche, worin statt des Sesampilzes Kulturen von Neocosmospora benutzt wurden, fielen negativ aus. Eigene Versuche in Halle mifsglückten, da die Kontrollpflanzen auch auf sterilisiertem Boden von anderen Pilzen befallen wurden und eingingen.

anfänglich im Substrat, wie Smith (99 pag. 23) annahm, und wird nicht nachträglich von den Zellen absorbiert, denn in farblosen flüssigen Kulturmedien sehen wir gefärbtes Mycel auftreten, ohne dafs die Flüssigkeit sich färbte. Auch feste Nährböden werden nur durch den Belag mit gefärbten Hyphen rot oder blau. Erst nach Absterben der Hyphen kann ein noch säurehaltiges Medium infolge Austretens des Farbstoffes etwas gefärbt werden. Aufser dieser Farbe bilden dieselben Pilze unter dem Einflufs des Lichtes ein orangenfarbiges oder orangegelbes Pigment, das ebenfalls in den Hyphen liegt. Der Farbstoff ist in solchen Hyphen an sehr zahlreiche, kleine, stark lichtbrechende Körnchen gebunden, die im wandständigen Plasma angehäuft liegen. Plasmolytische Versuche geben über ihre Lage im Plasma deutlich Aufschlufs.

Der von *Fusarium culmorum* erzeugte Farbstoff fällt je nach der Reaktion des Nährbodens gelb oder violett aus. Das Pigment liegt ebenfalls in Tropfenform in den Zellen; beim Altern oder Absterben der Hyphen werden die Tropfen unregelmäfsiger konturiert und scheinen fest oder halbfest zu werden.

B. Eigenschaften der Farbstoffe.

a) Die rote Farbe.

Der Farbstoff, der von dem a- und b-Pilz und von den oben erwähnten Neocosmosporaarten erzeugt wird, ist zuerst rot oder rotviolett, äufserzt selten violettblau. Auf Nährböden, die im Laufe der Zeit saurer werden, bleibt die Farbe rot und kann sogar intensiv rot oder dunkel scharlach werden. Andrerseits wird in den Medien, die zuerst leicht sauer sind, später aber alkalisch werden, die Farbe violett, blau oder sogar blauschwarz. Behandelt man solche Kulturen mit starken mineralischen oder organischen Säuren, so schlägt die Farbe zu intensivem Scharlach um, das, wie das Scharlach der Säurekulturen, wieder violettblau bis violettschwarz wird, wenn man es mit Alkalien behandelt. Von roten Kulturen auf Reis wird der Farbstoff durch folgende Reagentien gelöst: Äthylalkohol, Chloroform, Benzol, Chloralhydratlösung, Äther, geschmolzenes Paraffin, Essigsäure, Ameisensäure, Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure und andere Säuren. Unlöslich ist er in Wasser, Xylol, Petroleumäther, Benzin und in alkoholischen und wässrigen Lösungen der Alkalien.

Der Farbstoff derjenigen Kulturen, die durch Behandlung mit Alkalien blau geworden sind, löst sich nur in denjenigen der oben genannten Lösungsmittel, die von saurer Reaktion sind. In ihnen

verwandelt sich die Farbe in Rot, bevor sie sich löst. Lösungen von verschiedenen Salzen in absolutem Alkohol können, auch wenn sie alkalisch reagieren, die blaue Farbe ebenfalls lösen. Leicht löslich ist die Farbe in essigsaurem und ameisensaurem Ammonium und Kalium, schwerer in salpetersaurem Ammonium, unlöslich ist sie in salzsaurem und kohlensaurem Ammonium. In Abwesenheit von einem jener Salze wird der Farbstoff aus einer sauren Lösung durch Alkalien gefällt. Am leichtesten und schnellsten läfst sich der Farbstoff durch Kultur des Pilzes auf Reis gewinnen. Aus Kulturen, die durch das erste Stadium von Blafs- und Scharlachrot gegangen sind und violett zu werden anfangen, liefert ein Teil des Farbstoffes beim Zerreiben oder beim Liegen in starkem Alkohol eine tief weinrote Lösung, während der Reis blau bleibt. Bei den jüngeren Kulturen, die noch blafs- oder scharlachrot sind, wird nur sehr wenig Farbstoff aufgelöst, der Reis bleibt rot. Beim Kochen erscheint eine tief weinrote Lösung, und der Reis wird blau. Beim Kochen der Kultur in Wasser geht die Farbe des Reises von Rot zu Blau über, da die von Pilz produzierten Säuren dabei sich verflüchtigen. Das Wasser bleibt farblos. Das dunkel scharlachrote Mycel einer schwefelsäurehaltigen Nährlösung wird, nach gründlicher Waschung, bei anhaltendem Kochen in Alkohol blau, während der Alkohol rote Farbe annimmt. Der blaue Stoff, der nach dem Kochen mit Alkohol oder Wasser zurückbleibt, ist unlöslich in Wasser, Methyl-, Äthyl-, Amyl- oder Propylalkohol, Chloroform, Benzol, Äther, Xylol, Petroleumäther, Bergamotöl, alkoholischem Ätzkali oder wässeriger Sodalösung, löslich dagegen in Säuren (aufser CO_2), welche das Blau in Rot verwandeln. Der blaue Farbstoff bildet in gesättigter alkoholischer Lösung von essigsaurem Kali eine violette Flüssigkeit. In Alkohol, der mit Essig- oder Ameisensäure angesäuert ist, entsteht von dem im Reis zurückbleibenden Farbstoff eine Lösung von gleichen Eigenschaften wie beim Kochen des Reises in Alkohol. Neutrale oder schwach (organisch-) saure Lösungen des roten Farbstoffes liefern am Licht nach mehreren Tagen einen blauen Niederschlag; mit Schwefelsäure tritt die Umwandlung nicht ein. — Alle diese Versuche zeigen, dafs das nach Extraktion mit Alkohol im Reis zurückbleibende Pigment nur die alkalische Form des roten ist.

Die alkoholische Lösung der roten Farbe zeigt kein sehr charakteristisches Spektrum. Rot und ein Teil von Orange werden in einer 13 mm dicken Schicht gar nicht, Blau etwas, Gelb und Grün noch mehr, und Violett gänzlich absorbiert. In einer 30 mm dicken Schicht

scheinen Rot und der Anfang von Orange gar nicht absorbiert zu werden, von dem übrigen Teil des Spektrums läfst sich nur noch ein schwacher Schein der blauen Zone erkennen. Bei der Neutralisierung mit Ammoniak läfst, auch bevor sich ein Niederschlag bildet, die Lösung viel weniger Licht durch; gegenüber dem Rot erscheint das Blau viel intensiver, da es viel weniger absorbiert wird als jenes. Von Orange bis Blau wird alles stark absorbiert. Violett verschwindet gänzlich. Zu beiden Seiten des Gelb erscheint je ein schmaler Streifen besonders starker Absorption. Die blaue Lösung fluoresziert violett, die rote Lösung fluoresziert nicht.

Aus der alkoholischen Lösung des roten Farbstoffes liefsen sich keine Kristalle erzielen. Verdunstung gibt eine rotbraune amorphe Masse, die aufser dem Pigment noch andere Stoffe enthält. Die ein wenig eingedickte Lösung färbt Papier rot, so dafs es wie Lakmuspapier aussieht. Solches Papier wird blauviolett mit Alkalien und rot mit Säuren und ist offenbar fast ebenso empfindlich wie Lakmuspapier. Die rote amorphe Masse verhält sich hinsichtlich ihrer Lösungsverhältnisse ebenso wie der rote auf Reis entstandene Farbstoff.

Die durch Säuren an dem Farbstoff hervorgerufenen Änderungen sind stets dieselben, — zur Anwendung kamen Schwefel-, Salz-, Essig-, Phosphor-, Ameisen-, Milchsäure, gesättigte wässerige Lösungen von Weinsäure und kalte Salpetersäure. Mit warmer Salpetersäure entfärbt sich die Lösung wie bei Erwärmung mit Wasserstoffsuperoxyd; der Zusatz von Zinkstaub stellt die Farbe nicht wieder her. In neutraler wie in saurer Lösung zerstört nascierender Wasserstoff (von Zinkstaub) die Farbe nicht. Ein Überschufs von Zink jedoch bewirkt, dafs die Farbe als blauvioletter Niederschlag gefällt wird.

Beachtenswert ist, dafs bei Behandlung mit verschiedenen Alkalien ungleichartige Veränderungen in den Farbstofflösungen hervorgerufen werden. Die Nuancen der entstehenden Lösungen und Niederschläge wechseln bei Anwendung von Basen verschiedener chemischer Zusammensetzungen und werden beeinflufst durch den Grad der Acidität und Alkalescenz der angewandten Lösungen und Reagentien. Aus einer neutralen oder schwach sauren alkoholischen Lösung wird der Farbstoff durch Ammoniak oder wässerige oder alkoholische Kalium- oder Natriumhydratlösungen als ein mehr oder weniger violett getönter blauer Niederschlag gefällt. Baryumhydroxyd verursacht die Bildung eines rotvioletten Niederschlags. Wenn die alkoholische Lösung einen grofsen Überschufs von Ameisen- oder Essigsäure enthält, so entsteht zunächst ein ameisensaures resp. essigsaures Salz, dann wirkt die Base

auf den Farbstoff ein, wobei Ammoniak im Überschufs die Bildung eines blauvioletten Niederschlags bewirkt; ein grofser Anteil des Farbstoffes bleibt aber in Lösung und die Flüssigkeit wird violettrot. Soda und Natronlauge bilden unter gleichen Umständen einen rotvioletten Niederschlag, nur geringe Farbstoffmengen bleiben gelöst; mit den entsprechenden Kaliverbindungen ist der Niederschlag anscheinend schwächer rot — d. h. reiner violett — und die Lösung nicht so stark gefärbt. Diese violetten Lösungen werden nach Zusatz von Säure rot und bei Zusatz von Alkalien wieder violett. Bei Behandlung der oben erwähnten sauren alkoholischen Lösung mit Kupfer- und Quecksilberoxyd verschwindet die Farbe; im ersteren Falle wird sie vielleicht niedergeschlagen, im zweiten Falle wahrscheinlich oxydiert. Kupfersulfat ruft einen blauen Niederschlag hervor, die Flüssigkeit bleibt blau. Bei Überschufs von Zinkstaub bildet sich nach einiger Zeit ein violetter Niederschlag, die Flüssigkeit wird blafsrot. Magnesiumoxyd gibt einen violetten Niederschlag. Essigsaures Blei bringt nach mehreren Stunden den Farbstoff in Form rötlicher amorpher Körper zur Ablagerung; einmal sah ich rote nadelförmige Kristalle entstehen. Die Flüssigkeit über dem ungelösten essigsauren Blei, das im Überschufs zugefügt wurde, ist rot, so lange sie sauer bleibt; macht man sie alkalisch, so wird sie blaugrün. Zinnoxyd, Koffein, Strychnin und Chloralhydrat brachten keine Veränderung in der sauren alkoholischen Lösung hervor.

Aus den angeführten Reaktionen geht mit grofser Wahrscheinlichkeit hervor, dafs die rote Form des Farbstoffes eine Säure ist, die mit verschiedenen Basen verschieden gefärbte, blaue oder violette, in starkem Alkohol unlösliche Salze bildet. Vielleicht entsteht dieser Farbstoff erst in Verbindung mit einer Proteidsubstanz — einer Art Chromogen —, von der er später durch die Wirkung des Pilzes selbst oder beim Kochen mit Alkohol oder Wasser sowie durch Behandlung mit starken Säuren oder Alkalien freigemacht wird. Die Bildung eines blauen oder violetten Niederschlages in Lösungen, die dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, erklärt sich vielleicht durch die Zerspaltung der in der Lösung vorhandenen Salze organischer Säuren, mit deren Basen das saure Pigment sich bindet.

Smiths Behauptungen (99 pag. 21): „It would seem, therefore, that two colors may be present — a blue and a red — the latter soluble in alcohol and easily destroyed by light and by caustic potash and soda, the former insoluble in alcohol, more resistant to light and

unaffected by alkalies", sind hiernach nicht zutreffend. Sein Irrtum läfst sich darauf zurückführen, dafs, wie wir gesehen haben, beide Farbstoffe nur Säure- und Salzform desselben Pigments darstellen: die von ihm angeführte Zerstörung des roten Farbstoffes durch Licht und durch Natron- und Kalilauge war wahrscheinlich nur seine Verwandlung in das unlösliche Salz. Wenigstens verhielt sich das von mir zum Vergleich herausgezogene Pigment des Wassermelonenpilzes genau wie das der a- und b-Sesampilze.

Der aus den genannten Pilzen gewonnene Farbstoff hat mancherlei Züge mit anderen organischen Farbstoffen gemeinsam. Zunächst wird an Orcein (s. Schmidt 89 pag. 1402) zu denken sein. Von diesem unterscheidet sich das Pilzpigment dadurch, dafs Orcein in Wasser etwas löslich ist und leicht löslich in wässerigen Lösungen der Ätzalkalien, einschliefslich Ammoniak. Von Lakmus unterscheidet es sich dadurch, dafs es leicht löslich in Alkohol ist und seine mit alkalischen Metallen gebildeten Salze in Wasser unlöslich sind. Ferner ist keiner der von Zopf studierten Farbstoffe (89 und 90 pag. 143—163) mit unserer Substanz identisch. Die Telephorsäure nähert sich am meisten, unterscheidet sich jedoch von ihr dadurch, dafs jene unlöslich in Äther, Chloroform, Benzol, konzentrierter Schwefel- und konzentrierter Salzsäure ist. Die Telephorsäure wird gelb durch die Wirkung von Ätzkali. — Der rote Farbstoff von *Fusarium hordei,* den van den Dries (97 pag. 442) untersuchte, wird rot mit Säuren und violett mit Alkalien; er ist aber sowohl in Alkohol wie in Chloroform unlöslich. Der Farbstoff von *Aspergillus purpurescens*, den derselbe Verfasser beschrieb (l. c. pag. 443), hat Ähnlichkeit mit unserem Farbstoff, ist aber in konzentrierter Schwefelsäure unlöslich. Die Pigmente von *Monascus purpureus,* namentlich α- und β-Oryzaerubin (Went 95, Uyeda 02, Boorsma 95 und Prinsen Geerligs 95), sind in Ammoniak resp. Natronlauge löslich. Sie geben keine Farbenveränderung mit Alkalien, aufser dafs die Ammoniaklösung des α-Oryzaerubin grün fluoresziert. Starke Schwefelsäure gibt eine rotbraune starke Salz- und Salpetersäure, eine orangenrote Lösung, aus der das rote Pigment sich allmählich unverändert ausfällt. Der Farbstoff von *Eurotiopsis Gayoni* (s. Laborde, 96) ist wenig löslich in Wasser; mit kohlensaurem Kalium oder Soda wird er gelb, wird aber bei Zusatz von Säure (auch Kohlensäure) wieder rot. Das Physomycin von Harz (90) wird gelb durch die Wirkung von Natron- und Kalilauge wie von Salz- und Schwefelsäure. Die rote alkoholische Lösung fluoresciert grün. Die rote Farbe, die auf Malzkörnern vorkommt

(s. Klein 92), unterscheidet sich von der der von mir untersuchten Pilze dadurch, dafs sie in Alkohol unlöslich ist, durch Säuren gelb und durch Alkalien dunkel rotblau, fast schwarz wird. Der von Matruchot (92) erwähnte Farbstoff von *Fusarium polymorphum* ist bläulich grün und wird bei Behandlung mit Säuren rot. Weiteres über den Farbstoff berichtet Matruchot nicht, so dafs sich ein sicheres Urteil über eine etwaige Identität mit dem Pigment der Sesampilze nicht abgeben läfst.

b) Das orangegelbe Pigment.

Wie oben erwähnt wurde, bilden die gleichen Pilze, von deren rotem Farbstoff bisher die Rede war, unter gewissen Bedingungen — unter dem Einflufs des Lichtes — ein orangefarbiges Pigment. Seine Eigenschaften werden kurz zu erörtern sein.

Der Farbstoff ist löslich in starkem Alkohol. Die Lösung bleibt bei Zusatz von Ammoniak, Natron- oder Kalilauge, Säuren oder essigsaurem Blei unverändert. Kocht man den alkoholischen Extrakt mit konzentrierter Natronlauge, so bleibt das Pigment unverseift. In dem Mycel erscheint schliefslich bei Anwendung von konzentrierter Schwefelsäure eine braunviolette Farbe, die verschwindet, wenn man das Mycel wieder in Wasser bringt. Der Prozefs kann mehrmals wiederholt werden, bis das Mycel zerstört wird. Jodjodkaliumlösung bräunt das Mycel nur, aber erzeugt keine grüne Farbe. Erwärmung mit Wasserstuperoxyd verursacht keine Veränderungen, ebensowenig Behandlung mit Salzsäure und Zinkstaub. Warme Salpetersäure zerstört die Farbe, die weder durch Behandlung mit Zinkstaub noch durch Formaldehyd sich wieder herstellen läfst. Offenbar ist das Pigment kein Lipochrom. Es entspricht keiner der Farben, die von Zopf (89 und 90) beschrieben sind.

c) Das Pigment von *Fusarium culmorum.*

Das von *Fusarium culmorum* gebildete Pigment ist gelb mit einem Stich ins Braune, wenn der Nährboden sauer ist, rötlich-violett, wenn das Medium eine neutrale oder alkalische Reaktion hat. Durch Behandlung mit Säuren wird die rotviolette Farbe in Gelb, durch Zusatz von Alkalien die gelbe in Rotviolett umgewandelt. Diese Reaktionen sprechen dafür, dafs auch hier wieder nicht zwei selbständige Farbstoffe vorliegen, sondern nur zwei Modifikationen des nämlichen Pigmentes. Die gelbe Form ist sehr leicht löslich in wässeriger Chloralhydratsolution, aus der sie durch KOH als violetter Niederschlag sich fällen läfst, leicht löslich ferner in Chloroform und starken Säuren, wenig löslich in Äther, Äthylalkohol und Xylol, und fast un-

löslich in Wasser und Amylalkohol. Die violette Form des Farbstoffes ist unlöslich in Äther und Bergamotöl, wenig löslich in Wasser (bedeutend leichter als die gelbe Modifikation), Xylol, Benzol, Chloroform und Amylalkohol, etwas leichter in Äthylalkohol. Ein gutes Lösungsmittel ist ferner alkoholische KOH-Lösung, minder gut löst sich der Farbstoff in wässeriger KOH-Solution. Aus der alkalischen alkoholischen Lösung wird der Farbstoff durch Zusatz von $Ba(OH)_2$ in fester Substanz als braunvioletter Niederschlag, durch MgO als rötlich-blaugrauer Niederschlag gefällt.

Wahrscheinlich ist die gelbe Form des Farbstoffs eine schwache organische Säure; die rot bis blau gefärbten Modifikationen sind vermutlich metallische Salze.

Der Farbstoff zeigt Ähnlichkeiten mit dem des „Malzschimmels" (Klein, s. o.), der ebenfalls durch Säuren gelb, durch Alkalien dunkelrot bis blau wird. Wie das Mycel des Malzschimmels nimmt auch das blafsviolette Mycel von *Fusarium culmorum* bei Erwärmung in Wasser stärkere Färbung an.

3. Bedingungen der Pigmentbildung.

A. die rote Farbe.

Als unsere Hauptaufgabe haben wir es bereits oben bezeichnet, die Bedingungen der Farbstoffbildung möglichst eingehend zu erforschen. Sowohl die in der Literatur vorliegenden Angaben als auch die soeben mitgeteilten chemischen Reaktionen legen es nahe, den Einflufs folgender Faktoren:

a) der chemischen Zusammensetzung des Nährbodens,
b) der Reaktion des Nährmediums (Alkaleszens resp. Acidität),
c) des osmotischen Druckes,
d) der Gegenwart von Luft (Sauerstoff),
e) der Temperatur und
f) die Wirkung giftiger Stoffe

zu prüfen.

a) Chemische Zusammensetzung des Nährbodens.

Die uns interessierenden Pilze sind hinsichtlich ihres Nährmaterials wenig wählerisch und können fast als omnivor bezeichnet werden. Als Stickstoffquellen können Nitrate wie organische Stickstoffverbindungen dienen. Bei der Merzahl meiner Versuche wurden die nötigen mineralischen Stoffe und Stickstoff in Form einer schwachen 0,2proz. Knop-Lösung geliefert.[1])

1) In 1 Liter Lösung 2 g Salze.

Bei Anwendung dieser mineralischen Lösung gediehen beide Pilze gut, wenn ihnen eins der folgenden genannten Kohlehydrate geboten wurde:

Monosacchariden
- Arabinose
- Glukose (Dextrose)
- Levulose
- Galactose

Disacchariden
- Rohrzucker

Trisacchariden
- Raffinose

Polysacchariden
- Gelose (in Agar enthalten)
- Stärke (sowohl löslich als unlöslich)
- Cellulose (Filterpapier).

Die Farbstoffproduktion fiel auf diesen Medien bei beiden Pilzen derart aus, dafs gewöhnlich nur an den Rändern der Flüssigkeit in Berührung mit der Luft rote Farbe entstand, die manchmal einen Stich ins Violette zeigte.

Der Grad der Färbung und die Nuancen wechseln bei den verschiedenen Zuckern:

Arabinose: Farbe gering, rosa.

Glukose: Farbe oft reichlich, besonders bei dem a-Pilz, zuerst gewöhnlich dunkelrot, bald violett oder blauschwarz.

Levulose: a-Pilz, carmoisinrote Flecke; b-Pilz, Experiment zufällig mifsglückt.

Galactose: a-Pilz, Experiment zufällig mifsglückt; b-Pilz, violettfarbige Streifen am Rande der Flüssigkeit.

Rohrzucker: ungefähr wie Glukose.

Raffinose: rosa bis violett gefärbte Streifen am Rande der Flüssigkeit.

Gelose: in salzhaltigem Agar zeigte der a-Pilz ein schwaches Wachstum und bildete schliefslich ein violettes Pigment, das in Blau überging, sobald der Nährboden alkalisch wurde.

Stärke: rosa gefärbte Flecke.

Cellulose: auf gewöhnlichem stärkefreiem, mit Knop'scher Lösung getränktem Filtrierpapier bildeten beide Pilze eine dichte Schicht von Mycel mit violettblauen Streifen. Auf schwedischem, in Wasser untergetauchtem Filtrierpapier gediehen die Pilze, bildeten aber keine Farbe.

In folgenden mehr- (3-, 4-, 5- und 6-) wertigen Alkoholen wuchsen beide Pilze: Glyzerin, Erythrit, Adonit, Mannit. Das Gedeihen in Erythrit war nur spärlich. In Glyzerin und Mannit erschien die rote Farbe bei beiden Pilzen, in Erythrit beim b-Pilz allein. Die Versuche mit Adonit wurden zufällig am 10. Tage zerstört; die Pilze waren darin noch farblos.

Bei den folgenden Säuren und Salzen der aliphatischen Reihe gediehen die Pilze gut:

Essigsaures Calcium	1 %	
Milchsaures „	1 %	
Bernsteinsaures Calcium . . .	1 %	
Saures apfelsaures Calcium . .	1 %	
„ „ Ammonium .	1 %	
Apfelsäure	10 %	normal
Zitronensäure	10 %	„
Zitronensaures Ammonium . .	1 %	
Weinsäure	10 %	normal
Weinsaures Calcium	1 %	
Saures weinsaures Kalium . .	1 %	
Palmitinsäure	2 %	(in Wasser nicht gelöst)

Auf ameisensaurem Calcium war das Wachstum nur spärlich. Alle Lösungen waren am Beginn der Versuche mehr oder weniger sauer, teils wegen der sauren Knop-Lösung, teils wegen der angewandten sauren Salze, sie wurden aber sehr bald alkalisch, da die Pilze die Säuren aufbrauchten.

Auf den mit den oben genannten Säuren hergestellten Nährböden entwickelten beide Pilze (a und b) ihren Farbstoff; die Salze liefsen fast durchweg keine Pigmentbildung aufkommen. Nur auf zwei von ihnen wurde der b-Pilz farbig:

Bernsteinsaures Calcium, violette Streifen am Rande der Flüssigkeit;

Essigsaures Calcium, ebenso wie das vorige.

Auf Säuren verhielten sich die Pilze wie folgt:

Apfelsäure, scharlachrot.

Zitronensäure, „

Weinsäure, „

Palmitinsäure, blauviolette Farbe bald blau werdend.

Palmitinsäure ist in Wasser unlöslich; das als Suspensionsmedium dienende Wasser erweist sich daher bei der Lakmusprobe neutral. Beide Pilze sind imstande die feinen suspendierten Teilchen der unlöslichen Säure anzugreifen.

Als Vertreter der cyclischen Reihe wurde Chinasäure versucht. Die angewandte 1-proz. Lösung war so sauer, dafs das Wachstum anfangs etwas gehemmt wurde, später bei abnehmender Acidität gewann das Wachstum an Intensität. Schliefslich wurde die Lösung

alkalisch. Noch vorher auf deutlich saurem Medium erzeugten beide Pilze scharlach- bis rosenrote Flecke.

Bei den bisher geschilderten Versuchen wurde der Stickstoff den Pilzen in Form von Nitraten oder Ammoniumsalzen geboten. Weiterhin wird zu prüfen sein, wie die Ernährung mit Amiden, Imiden und Eiweifskörpern auf die Pilze und ihre Farbstoffproduktion wirkt. Mit Pepton, Glykokoll und Asparagin wurden für beide (a und b) Pilze Versuche angestellt, mit Albumin (aus Eiern) Caseïn, Legumin, Fibrin, Nuclein, nucleinsaurem Natrium und Kreatin wurde nur der a-Pilz untersucht.

Es ergab sich dabei folgendes: Das Wachstum war auf nucleinsaurem Natrium und Kreatin sehr schwach, auf Asparagin etwas besser, in den andern gut. Auf Lecithin und asparaginsaurem Natrium liefs sich überhaupt kein Wachstum konstatieren.

Bei keinem dieser Stoffe wurde die rote Farbe erzeugt. Alle Nährböden wurden durch Abspaltungen von Aminen und Ammoniak stets alkalisch. Auch wenn man das Mycel dieser Kulturen auswäscht und es in einer feuchten Kammer oder in destilliertem Wasser beläfst, bleibt es farblos. Bringt man aber das ausgewaschene Mycel in eine Glukoselösung, so bildet es nach einigen Stunden (24—48) roten oder violetten Farbstoff. Bemerkenswert ist, dafs die Stoffe, in denen die Farbe sehr reichlich hervorgebracht wird, teils selbst schon sauer sind (Säuren) oder die Säureproduktion seitens des Pilzes fördern (Kohlehydrate und verwandte Stoffe). Doch mufs bemerkt werden, dafs auch diese Lösungen schliefslich sämtlich alkalisch werden — wahrscheinlich durch die Zersetzung der Salze in der Knop-Lösung und die Bildung von kohlensaurem oder doppeltkohlensaurem Kalium. Eine Ausnahme von dem gewöhnlichen Verhalten machten Kulturen mit ammoniakhaltigen Verbindungen oder ihren Ableitungen, in welchen die Pilze farblos blieben, obwohl bei saurem apfelsaurem Ammonium sich der Säuregehalt viele Tage lang anhielt.

Alle bisher geschilderten Kulturen wurden gewonnen mit einer Kombination von Knops Nährsalzen und einem der oben genannten Stoffe. Um nun die spezifische Wirkung der einzelnen Stoffe näher zu erkennen, und um zu finden ob beispielsweise das Ausbleiben der Farbstoffbildung auf gewissen Stoffen durch die chemischen Qualitäten des Stoffes selbst bedingt wird oder nur auf irgendwelche durch sie bedingte Nebenumstände in der Versuchsanstellung (Änderung in Reaktion etc.) zurückzuführen ist, wurde es nötig, Kulturen mit mehr

als einem der genannten Nährstoffe anzustellen und aus den Ergebnissen der geeigneten Kombinationen die Wirkungen der einzelnen Bestandteile zu erschliefsen.

Die Resultate dieser vergleichenden Versuchsserien sollen zunächst kurz angeführt werden, auf ihre Deutung kommen wir später zurück.

Wie oben erwähnt, wird die rote Farbe am reichlichsten auf gekochtem Reis hervorgebracht. Gekochter Weizen und Mais sind auch gute Medien, aber ihre natürlichen Farben sind bei Beurteilung der Pilzpigmente von Nachteil. Künstliche Medien, die Glukose oder Rohrzucker und als Stickstoffquelle Pepton oder Asparagin enthielten, erwiesen sich als sehr günstig für Farbenbildung. Pepton zeigte sich indes darum nicht vorteilhaft, weil bei reichlichem Zusatz das Medium alkalisch wird, bevor die Farbe auftritt. Aufserdem sind seine Zersetzungsprodukte braun, verbergen daher schwache Farbenwechsel und erschweren eine genaue Titration. Asparagin bildet eine farblose Lösung, die Medien bleiben länger sauer und die Titration ist leicht durchzuführen.

Zunächst wurden Nährlösungen[1]) gemacht mit Ausschlufs von Phosphor resp. Magnesium. In folgender Nährlösung, welche Phosphor nur in den nicht ausschliefsbaren Verunreinigungen der Chemikalien enthält, entwickelte sich die Farbe schneller als in irgend einer anderen der probierten Kombinationen.

Glukose	. . . . .	3,00 g
Asparagin	. . . . .	0,10 g
KNO_3 }	je	0,05 g
$MgSO_4$ }		

Zusatz von Wasser bis zu 100 g.

Diese Lösung ist nur sehr schwach sauer. Das Wachstum in ihr ist ziemlich langsam und das Mycel bleibt gewöhnlich locker und untergetaucht. Innerhalb 72 Stunden ist das Mycel (Temperatur 15—25 ° C.) dunkelscharlachrot. Eine ähnliche Lösung mit 0,1—0,2 % Knop-Lösung statt KNO_3 und $MgSO_4$ gibt ein viel kräftigeres Wachstum, entwickelt aber die rote Farbe erst nach 10 oder 14 Tagen und dann

1) Die von mir benutzten Chemikalien waren fast ausschliefslich Mercks Fabrikate. Von Grübler bezog ich Asparagin und Witte'sches Pepton, das bei einigen Experimenten verwandt wurde. Neben diesem wurden Mercks „Pepton ex carne“ und „Pepton ex albumine“ verwandt. Bei Glukose ergab sich beim Veraschen ein sehr kleiner Bruchteil eines Prozents an unverbrennlicher Substanz, der gleichwohl bei der Beurteilung der Resultate zu beachten sein wird.

nur an der Oberfläche, die mit einer dichten Schicht Mycel bedeckt erscheint. Um die Wirkung einer phosphorfreien Lösung weiter zu untersuchen, wurde folgende Nährlösung hergestellt:

Glukose	5 g
Untenstehende Lösung .	10 ccm
Destilliertes Wasser . .	90 ccm

Die angewandte Lösung hatte folgende Zusammensetzung:

KNO_3	0,5 g	a)
$MgSO_4$	0,5 g	a)
$CaNO_3$	2,0 g	b)

a) und b) für sich aufgelöst, dann gemischt und mit einem Zusatz von Wasser bis zu 175 ccm.

In dieser Lösung brachten beide Pilze die Farbe hervor, schneller als in einer ähnlichen phosphorhaltigen Lösung. Das Experiment wurde mehreremale mit wechselndem Erfolg wiederholt; manchmal versagte die Kultur und blieb farblos, doch in der Mehrzahl der Fälle entsprach das Resultat dem vorhin angeführten.

Um die Wirkung magnesiumfreier Lösungen kennen zu lernen, wurde folgende Lösung gemacht:

Glukose	5 g
Wasser	90 ccm

und 10 ccm von der folgenden Lösung:

$CaNO_3$	1,000 g
K_2SO_4	0,187 g
K_3PO_4	0,250 g
Wasser	87,5 ccm

In dieser Lösung wuchs der a-Pilz etwas weniger kräftig als mit Magnesium. Nach fünf Tagen war noch keine Farbe sichtbar; wenn man aber die ziemlich lockere Masse des Mycels auswusch und in eine feuchte Kammer brachte, wurde das Mycel in 3—4 Tagen dunkelviolettrot. Höchst wahrscheinlich sind wegen der Verunreinigungen der Glukose etc. die angewandten Lösungen nicht völlig phosphor- und magnesiumfrei, doch zeigten Versuche mit Glukoselösung, dafs die in ihr enthaltenen fremden Stoffe nur ein ganz dürftiges Wachstum des a- und b-Pilzes bewirken können.

Obschon Pepton- und Asparaginlösungen in kurzer Zeit stark alkalisch werden, werden sie doch sauer wenn Zucker vorhanden ist. In einer reinen Asparaginlösung, die etwas Schwefelsäure enthält, wird der rote Farbstoff hervorgebracht. Gleichwohl läfst sich in einer reinen Peptonlösung durch Zusatz von Säure die Bildung der roten

Farbe nicht erzielen. Um zu prüfen, ob in zuckerfreien, säurehaltigen Peptonlösungen die Hemmung der Farbstoffbildung als Wirkung der vom Pepton abgespaltenen Ammoniumsalze aufzufassen oder auf andere Faktoren zurückzuführen ist, wurde die auf Seite 318 erwähnte Lösung mit Zusatz von 1 % NH_4Cl in Anwendung gebracht. In dieser Lösung wurde die Farbe vom Pilz gebildet, war aber bedeutend schwächer als in der Kontrollösung, die keinen Zusatz von Ammoniumsalz enthielt, so dafs also den Ammoniumsalzen nicht eine unbedingt hemmende Wirkung auf die Farbstoffbildung zugesprochen werden kann.

Alle oben beschriebenen Ergebnisse führen zu dem Schlusse, dafs die Produktion der roten Farbe nicht streng gebunden ist an die Gegenwart und Wirkung begrenzter Gruppen von Nährstoffen, sondern dafs die Pilze die Farbe in jedem Nährmedium bilden können, wofern im übrigen — Temperatur, Sauerstoff, Reaktion des Nährbodens — die für Pigmentbildung günstigen Bedingungskombinationen den Pilzen geboten werden. Damit sind jedoch graduelle Unterschiede in der Wirkung verschiedener Nährmaterialien auf die Pigmentbildung selbstverständlich nicht ausgeschlossen, da manche Nährstoffe vom Pilze schneller verbraucht werden und schneller zur Farbstoffbildung führen als andere. Andererseits machen es die Versuche mit NH_4Cl und mit sauerer Peptonlösung wahrscheinlich, dafs die Anhäufung gewisser Produkte, wie z. B. Ammoniumsalze und Ammoniakderivate, die Bildung der Farbe verhindern kann, auch wenn die Lösung noch sauer ist und somit die anderweitigen Bedingungen für die Farbstoffbildung günstig sind.

b) Reaktion des Nährmediums (Alkaleszens resp. Acidität).

Obwohl die Reaktion des Nährmediums streng genommen eine Frage der Zusammensetzung ist, so schien es doch besser, diesen Punkt getrennt zu behandeln.

Aus der vorhergehenden Darstellung ist es zu ersehen, dafs diejenigen Stoffe, welche schnell alkalisch werden, für die Produktion des Farbstoffes besonders ungünstig sind.

Unsere Aufgabe wird dabei eine zweifache sein: erstens wird der Einfluss von Alkalizusatz, zweitens die Wirkung eines angesäuerten Nährbodens zu untersuchen sein.

I. Was die erste Frage betrifft, so dürfen wir an die früheren Versuche anknüpfen, durch welche gezeigt wurde, dafs auf alkalischen Nährböden keine Farbstoffbildung eintritt. Zu prüfen ist nunmehr, wie sich die Pilze verhalten, wenn Nährböden, die an sich

für die Pigmentbildung günstig sind, durch Zusatz von Ätzalkalien oder dergleichen alkalisch gemacht werden.

Die Versuche ergaben anscheinend widersprechende Resultate; während bei Reis- und Glukosekulturen, welche an sich beide die Farbstoffbildung fördern, der Zusatz von Alkali (KOH) ohne wesentlichen Einflufs auf die Pigmentbildung blieb, erwuchsen auf Rohrzucker farblose Kulturen, wenn das Nährmedium alkalisch gemacht wurde. Die Erklärung dafür fand ich darin, dafs beim Sterilisieren die Glukose und die im Reis enthaltenen Saccharide von den Ätzalkalien gespalten werden und durch die sauren Spaltungsprodukte die Lösung neutralisiert wird, so dafs in Wirklichkeit, trotz des KOH-Zusatzes, keine alkalische, sondern eine saure Lösung vorliegt.

Zur quantitativen Untersuchung des Einflusses der Alkalien war daher nur die unzersetzbare Rohrzuckernährlösung brauchbar, mit der folgende Versuche angestellt wurden.

Ich ging von folgender Stammlösung aus:

Rohrzucker	5,7 g
Asparagin	0,1 g
KNO_3 } je	0,05 g
$MgSO_4$ }	

Zusatz von Wasser bis auf 100 ccm.

Um die Wirkung von Alkalien zu prüfen, wurde statt eines Teils des Wassers N-Kalilaugelösung bei Herstellung der Lösungen verwandt. Die Lösungen enthielten dann 10, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 Prozent N. KOH. Nach Verlauf von 11 Tagen zeigte sich keine Farbenentwicklung in den Lösungen, die 0,2 % und mehr N. KOH enthalten hätten. Bei der Titrierung konnten in diesen Kulturen statt der ursprünglichen 0,2 % nur noch 0,05 % Normalalkali nachgewiesen werden; das übrige war durch die Säureproduktion des Pilzes neutralisiert worden.[1]) Die KOH-freie Kontrollkultur war schon

1) Bei dem gröfsten Teil der zahlreichen Titrationen wurde Rosolsäure als Indikator benutzt. Die Lösung wurde in Übereinstimmung mit der Formel von A. Meyer (03, pag. 96) hergestellt wie folgt:

Rosolsäure	0,25 g
96 % Alkohol	50 ccm

Zur Lösung werden hinzugefügt Wasser 50 ccm. Die angewandten Reagentien waren 1/10 und 1/100 Normallösungen von Kalilauge und Schwefelsäure. Bei der Titration alkalischer Lösungen wurden sie durch Zusatz einer genau abgemessenen Menge Säurelösung — etwa doppelt so viel als nötig ist, um die alkalische (rosa) Farbe der Rosolsäure zum Schwinden zu bringen — sauer gemacht. Die Lösung wurde dann mit der Kalilaugelösung titriert, bis die rosa Farbe wieder erschien.

am dritten Tage mit einem rotvioletten Mycel gefüllt. In der Lösung, die zu Anfang 0,1 % Normalalkali enthalten hatte, blieb das neue Mycel nach 11 Tagen ganz weifs, das kleine Stück Mycel, das zur Impfung der Kultur gedient hatte, war blau geworden. Die Lösung enthielt jetzt zwischen 0,02 und 0,05 % Normalalkali. Bei Kultur des b-Pilzes auf 0,05, 0,02 und 0,01 % N-Alkali wurden zwei verschiedene Versuchsreihen angestellt: das eine Mal wurde farbloses Impfmaterial einer alkalischen Kultur entnommen, das andere Mal wurden farblose Mycelteile aus einer Reiskultur benutzt. Beide Kulturen mit 0,01 % Normalalkali waren nach ungefähr 50 Stunden blafsviolett, sie enthielten dann ungefähr 0,015 % Normalsäure. Die zwei weiteren Kulturen mit dem Mycel aus der alkalischen Kultur blieben farblos, obschon auch sie etwas sauer waren (ungefähr 0,002—0,003 % Normalsäure). Die beiden letzten, die mit Mycel aus der Reiskultur geimpft waren, enthielten 0,005 % und 0,0025 % Normalsäure statt der ursprünglichen 0,02 % und 0,05 % Normalalkali; in der ersten war das ganze Mycel, in der zweiten nur das Impfmycel rosa gefärbt. Der Konzentrationsgrad, bei welchem die Produktion von rotvioletter Farbe seitens des neuen Mycels möglich ist, schwankt somit zwischen 0,005 % und ungefähr 0,002 % Normalsäure. Wenn Mycel von einer sauren (Reis-) Kultur genommen wird, so kann das violette Pigment in einer Nährflüssigkeit mit 0,02 % bis 0,05 % Normalalkali erzeugt werden. In einem auch nur schwach alkalischen Nährmedium kann das sich neu entwikkelnde Mycel die rote (oder violette) Farbe nicht bilden; dagegen kann das noch weifse, in einer säurehaltigen (z. B. Reis-) Kultur entwickelte Mycel in sehr schwach alkalischen Nährlösungen einen violetten Farbstoff erzeugen. Dabei mufs vielleicht die neutralisierende Wirkung der im Mycel enthaltenen, aus der Reiskultur stammenden Säure in Betracht gezogen werden oder an die Existenz eines auf Reis gebildeten Chromogens gedacht werden, das auch auf schwach alkalischen Medien noch Pigment liefert, ohne auf solchem selbst neu gebildet zu werden.[1])

II. Während die in Rede stehenden Pilze sehr empfindlich sind für Alkali, zeigen sie Säuren gegenüber geringere Empfindlichkeit. Das Wachstum wird gehindert oder zurückgehalten je nach dem Grad des Säuregehaltes. Für die Farbbildung wird dabei die Grenze

1) Mycel aus alkalischen Medien bildet in schwefelsäurehaltigem Wasser keinen Farbstoff. Es scheint also auf alkalischem Substrat kein Chromogen gebildet zu werden.

früher erreicht als für das Wachstum. Folgende Tabelle führt die für Farbstoffbildung und Wachstum giltigen maximalen Grenzkonzentrationen in Prozent der Normalsäure an. Die letzten vier Säuren werden von dem Pilz als Nahrung benutzt, während die ersten drei nur wenig verbraucht werden.

Maximale Säurekonzentrationen für Farbbildung und Wachstum.

Säure	a-Pilz, Maximum für		b-Pilz, Maximum für	
	Farbe	Wachstum	Farbe	Wachstum
Phosphor	zwischen 1,95—3,6 bis zu 5[1])	zwischen 3,6—6,9	bis zu 5	bis zu 5
Oxal . . .	zwischen 0,61—0,95	zwischen 1,95—3,6		
Schwefel .	zwischen 1,95—2,5	zwischen 2,5—3	zwisch. 2,28—2,5	zwischen 2,5—3
China . . .	etwas mehr als 1,82	5,16	3,18	5,16
Apfel . . .			weniger als 10	über 10[2])
Wein . . .			weniger als 10	über 10[2])
Zitronen .			weniger als 10	über 10[2])

Die zweite Tabelle zeigt, dafs durch zunehmende Konzentration der Säure (H_2SO_4) die Farbenbildung zeitlich stark verzögert wird. Die Konzentrationen werden in Prozenten der Normalsäure angegeben.

Verzögerung der Farbebildung bei zunemenden Konzentrationen normaler Schwefelsäure.

	0,5 %	1 %	1,5 %	- %	2,5 %
a-Pilz	nach 4 Tagen blafsrot	nach 9 Tagen blafsrot	nach 17 Tagen rot	nach 17 Tagen blafsrot	nach 27 Tagen noch nicht gefärbt
b-Pilz	nach 4 Tagen gefärbt, in einem 2. Versuch schon nach 3 Tagen	nach 4 Tagen blafsrot	nach 9 Tagen blafsrot	nach 17 Tagen intensiv rot	nach 23 Tagen blafsrot

Dafs die Intensität der Farbstoffbildung nicht proportional zu der des Wachstums ist, zeigt ein Vergleich der Schwefel- und Phosphorsäurewirkung. Zu der Nährlösung, die auf pag. 318 beschrieben ist, wurden bei zwei Kulturen des b-Pilzes je 0,5 % N-Schwefelsäure und Phosphorsäure zugesetzt. In der ersten bildete der Pilz

1) Eine zweite Reihe von Experimenten ergab diese auffallend hohen Werte.

2) Die maximalen Grenzwerte für das Wachstum wurden nicht näher bestimmt.

in drei Tagen auf dem Boden der Flasche eine ca. 1 mm Schicht Mycel, die aus unzähligen kleinen scharlachroten Kolonien bestand. In der Phosphorsäurekultur wurde die Flüssigkeit etwa zu einem Drittel mit kräftigem weifsem Mycel erfüllt. Am siebenten Tage hatte sich eine Schicht Mycel auch an der Oberfläche gebildet, aber erst am 12. Tage erschienen am Rande der oberen Mycelschicht einige rote Flecke. Das Wachstum in der Schwefelsäurekultur war dabei nicht weiter vorgeschritten als das der Phosphorsäurekultur am vierten Tage. Eine Kultur, die 2 % N-Phosphorsäure enthielt, glich nach drei Tagen der gleichalterigen Kultur mit 0,5 % N-Schwefelsäure — nur dafs die Farbe bei jener schwächer war. Das nachfolgende Wachstum der Phosphorsäurekultur war zwar viel kräftiger als das auf Schwefelsäure, aber erst nach weiteren sechs Tagen wurde bei ihr blafs- und stellenweise scharlachrote Färbung sichtbar. Die Kulturen, die 5 % N-Phosphorsäure enthielten, wuchsen langsam, erzeugten aber ihre Farbe schon innerhalb neun Tagen. Phosphorsäure unterscheidet sich also in ihrer Bedeutung für Farbstoffbildung und Wachstum des Pilzes nicht unwesentlich von der Schwefel- und anderen Säuren. Die Erklärung dafür liegt vielleicht darin, dafs die Schwefelsäure je nach den Konzentrationen das Wachstum stets mehr oder weniger verlangsamt, ohne die Farbenbildung zu unterdrücken. Bei schwächeren Konzentrationen von Phosphorsäure bewirkt der Phosphorgehalt kräftiges Wachstum. Dabei wird der Sauerstoff verbraucht, so dafs der Pilz nur an der Oberfläche Farbstoff produzieren kann. Bei den höheren Konzentrationen von Phosphorsäure wird das Wachstum wie bei Schwefelsäure durch die hohe Acidität gehemmt; da infolgedessen der Sauerstoffverbrauch gering ist, kann die Farbstoffbildung eher eintreten als in den kräftiger wachsenden Kulturen. Bei noch höherer Konzentration hemmt die Phosphorsäure das Wachstum gänzlich.

c) Einflufs des osmotischen Druckes.

Bei den soeben beschriebenen Versuchen wurde durch Zusatz bestimmter Stoffe in verschiedenen Quantitäten vor allem der Grad der Alkalescens und Acidität im Nährmedium beeinflufst und sein Einflufs auf das Wachstum der Pilze usw. zu ergründen gesucht. Es bleibt noch übrig, den Einflufs des osmotischen Druckes zu studieren, der bei Zusatz von osmotisch wirksamen Substanzen zur Wirkung kommt und der, wie bekannt, Wachstums- und Gestaltungsvorgänge bei Organismen stark zu beeinflussen vermag.

Zu diesem Zweck wurden Versuche mit NaCl angestellt derart, dafs der Salzgehalt der Kulturen zwischen 1 und 18 % schwankte. Es zeigte sich, dafs beide Pilze auch auf Nährböden von hohem osmotischen Druck wachsen können. Farbstoffbildung trat aber nur in Kulturen von 1—8 % auf; je höher die Konzentrationen, um so später färbte sich die Kultur.

Zeit der ersten Erscheinung der Farbe bei verschiedenen osmotischen Drucken.

	Prozentgehalt von NaCl					
	1 %	2 %	3 %	5 %	6 %	8 %
a-Pilz	nach 4 Tagen	nach 4 Tagen	nach 8 Tagen	nach 16 Tagen		
b-Pilz	zufällig mifsglückt	nach 4 Tagen	nach 8 Tagen	nach 8 Tagen	nach 12 Tagen	nach 12 Tagen

Bei 10 % Chlornatrium wurde auch nach 21 Tagen keine Farbe gebildet, das Wachstum war noch gut. Bei 12 % war das Wachstum langsam, bei 14 % sehr spärlich und bei 16 % und mehr wuchs der Pilz gar nicht. Die drei letzten Versuchsreihen wurden nur mit dem b-Pilz angestellt. — Die Farbe erschien bei beiden Pilzen zuerst in dem Mycel das nahe der Oberfläche war und entwickelte sich in dem untergetauchten Mycel einige Tage später. Beim a-Pilz blieb das untergetauchte Mycel in den Kulturen mit 3—5 % Salz farblos. Bei dem b-Pilz wurde in den Kulturen von 6 % Salz an kein oberflächliches Mycel mehr gebildet.

Allen Kulturen lag die auf pag. 318 genannte Lösung zugrunde.

Nach Abschlufs der Experimente wurden die Lösungen titriert. Es zeigte sich, dafs die von den Pilzen produzierten Säuremengen sehr gering waren (0,2—0,4 % N-Säure), so dafs sie für den beschriebenen Ausfall der Versuche nicht verantwortlich gemacht werden können.

d) Einflufs der Luft (des Sauerstoffs).

Wir haben schon darauf hinweisen müssen, dafs bei Kultur in flüssigen Medien die rote Farbe gewöhnlich zuerst in dem oberflächlichen Teil des Mycels erscheint; in dem untergetauchten Mycel erschien sie nur, wenn es locker war, und die Oberfläche nicht von einer dichten Masse Mycel bedeckt war. Legen sich die oberflächlichen Mycelschichten in Falten, so bleiben an ihnen die untergetauchten Teile weifs, die in die Luft hervorragenden werden farbig. Dem-

entsprechend wird die rote Farbe in einer Kultur auf festem (2 %) Agar, wo das Mycel imstande ist, sich über die Oberfläche des Agar zu verbreiten und Lufthyphen zu bilden, eher hervorgebracht als auf einem halbflüssigen (0,5 %), in dem alle Hyphen untergetaucht sind.

Diese Beobachtungen scheinen zu zeigen, dafs bei beiden Pilzen die Farbenproduktion im Gegensatz zum Wachstum vom Zutritt reichlicher Luftmengen abhängig ist.

Wir prüfen zunächst die Abhängigkeit des Wachstums vom Sauerstoff. Mycel von beiden Pilzen, das in einer Lösung von Glukose (5 %) + Knop (0,2 %) kräftig gedieh, wurde in eine frische Lösung von ähnlicher Zusammensetzung versetzt und bei 26—30° C. anaerob kultiviert; es setzte sein Wachstum fort, wobei sich viele CO_2-Blasen entwickelten. Das Mycel bildete viele Mikrokonidien, aber blieb farblos. Bei dem b-Pilz war Wachstum und Gasentwicklung kräftiger als bei dem a-Pilz. Nach 39 Tagen fand sich in den Lösungen beim a-Pilz ungefähr 0,3 % Alkohol und 0,78 % N-Säure, beim b-Pilz 0,9 % Alkohol und 0,91 % N-Säure.

Der Einflufs des Sauerstoffes auf die Pigmentbildung läfst sich auf verschiedene Weise feststellen. Wenn farbloses Mycel 4—5 Tage nach der Impfung seiner Nährlösung entnommen, ausgewaschen und in eine feuchte Kammer gebracht wird, so erscheint die rote oder violette Farbe oft innerhalb 24—48 Stunden, während in der Lösung die Farbe erst 3—5 Tage später erscheint.[1])

Um den Einflufs verminderten Druckes auf die Farbenbildung zu studieren, wurden Kulturen auf gekochtem Reis angelegt; nach 20 Stunden, wenn sich annehmen liefs, dafs das Mycel auf seinem neuen Substrat zu wachsen begonnen hatte, wurden die Kulturen evakuiert. Es stellte sich heraus, dafs bei einem Luftdruck von 160 mm Hg (einschliefslich des in der Luft enthaltenen Wasserdampfes) beide Pilze langsamer wuchsen als gewöhnlich, aber noch die rotviolette Farbe bilden konnten. Bei einem Druck von 65—72 mm entwickelte sich die Farbe nur noch sehr spärlich; das Wachstum war gering. Bei einem Druck von anfangs 13,2 mm, der im Laufe eines Monats auf 44,6 mm stieg, blieb das Mycel farblos. Auch in der auf pag. 318 beschriebenen Nährlösung wurde keine Farbe bei einem Druck von 23—27 mm gebildet; der Pilz wuchs langsam, blieb aber normal. Bei völliger Abwesenheit von Sauerstoff — z. B. in

1) Dieser Versuch versagt oft — besonders im Winter, wenn die Verbrennungsprodukte des Gases im Laboratorium sich anhäufen. — Man vergleiche die entsprechenden von Richter (03) an höheren Pflanzen gewonnenen Ergebnisse.

einem geschlossenen Gefäfs mit alkalischer Pyrogalluslösung — wachsen die Pilze auf Reis überhaupt nicht.

e) Einflufs der Temperatur.

Die von mir angestellten Experimente, durch welche die Temperaturgrenzen der Farbeproduktion ermittelt werden sollten, sind nicht zahlreich genug, um die Frage endgültig zu entscheiden. Bei einer Temperatur, die von 11° C. im Laufe mehrerer Wochen auf 7,1° C. sank, erschien nach 44 Tagen die rotviolette Farbe in einer Glukosekultur; eine entsprechende bei 15—22° C. gehaltene Kultur war schon nach 15 Tagen farbig. Bei Temperaturen zwischen 3° und 6° C. fiel das Wachstum sehr schwach aus, die Farbenproduktion blieb ganz aus. Bei noch tieferen Temperaturen hörte auch das Wachstum völlig auf. Die oberen Grenzen der Wachstum- und Farbenproduktion fallen beinahe zusammen und werden mit ungefähr 37° C. erreicht. Das Optimum für Wachstum und Farbbildung scheint zwischen 20° und 30° zu liegen.

f) Einflufs giftiger Stoffe.

Um den Einflufs giftiger Stoffe zu ermitteln, wurden — ausgehend von der üblichen Nährlösung — nur wenige Versuche angestellt.

Die angewandten Gifte waren: Koffeïn 0,1 %; $CuSO_4$ 0,2 %, 0,1 % 0,01 %; $HgCl_2$ 0,001 %, 0,002 % 0,004 %, 0,006 %, 0,008 % und 0,01 %; ferner von schwefelsaurem Chinin sehr schwache Lösungen und Strychnin in Solutionen von weniger als 0,1 %.[1])

Im Chininsulfat wuchsen beide Pilze und brachten ihre Farbe regelrecht hervor, desgleichen der b-Pilz in der Strychninlösung.[2]) Bei Koffein war das Wachstum normal, die Pigmentbildung blieb noch nach 19 Tagen aus. Der Säuregehalt der Kultur (0,56 % N-Säure) war zu schwach, als dafs ihre Farblosigkeit auf ihn sich zurückführen liefse.

Bei 0,001 % $HgCl_2$ war der a-Pilz deutlich afficiert, das Mycel bildete keine zusammenhängende Masse, sondern bestand, wie bei höherem Schwefelsäuregehalt, aus sehr zahlreichen Kolonien, die ihre Selbständigkeit lange beibehielten. Die rote Farbe wurde hervorgebracht. Bei dem b-Pilz war das Wachstum nahezu normal, sein Mycel rot. Bei 0,01 % wuchs keiner der beiden Pilze. Die da-

1) Schwefelsaures Chinin wurde in der Hitze gelöst. Beim Erkalten schied sich der weitaus gröfste Teil in Kristallform ab. — Auch die Strychninsolutionen waren konzentriert, ein ungelöster Teil der Substanz blieb als Bodensatz im Kulturgefäfs.

2) Mit dem a-Pilz wurden keine Versuche angestellt.

zwischenliegenden Konzentrationen wurden mit dem b-Pilz allein geprüft. Von 0,004 % an aufwärts war kein Wachstum mehr möglich. Bei 0,002 % entwickelten sich sehr viele kleine untergetauchte rote Kolonien. Auf $CuSO_4$ wuchs der b-Pilz gut bei 0,01 %, ziemlich gut noch bei 0,1 %; die Hyphen wurden besonders an den äufseren Enden nach fünf Tagen violettblau. In 0,2 % Lösungen war das Wachstum spärlich und lieferte gesonderte Kolonien, die einige Tage lang farblos blieben, schliefslich aber auch violett wurden. All diese Kulturen waren deutlich sauer (Lakmus). Beim Behandeln mit Salzsäure verschwindet ihre violette Farbe, das Mycel wird scharlachrot. Nach Auswaschen wird es in einer wässerigen Lösung von $CuSO_4$ von neuem blau. Dasselbe geschieht bei Behandlung des roten Mycels mit Kalilaugelösung. Die blaue Farbe scheint in diesem Fall von dem Kupfersalz des Farbstoffes verursacht zu sein.

Die vorigen Experimente waren nicht mannigfaltig, noch zahlreich genug, um allgemeine Schlüsse zu gestatten. Wir beschränken uns darauf, auf die hohe Widerstandsfähigkeit der Pilze gegen manche Metallgifte aufmerksam zu machen.

B. Die orangegelbe Farbe.

Die orangegelbe Farbe wird nur von den a- und b-Pilzen und von den Neocosmosporaarten gebildet; an dem *Fusarium culmorum* wurde sie nie beobachtet. Bei *Neocosmospora* begnügten wir uns mit dem Nachweis seines Auftretens, mit dem a- und b-Pilz wurden eingehende Versuche zur Erforschung der Bedingungen angestellt, unter welchen das Pigment gebildet wird, — besonders mit dem a-Pilz, der die Farbe viel reichlicher erzeugt als der b-Pilz.

a) Wirkung des Substrats.

Die Farbe wird auf allen untersuchten Substraten gebildet, wofern die Kultur dem Licht ausgesetzt blieb. Geprüft wurden: gekochte Kartoffeln und Mohrrüben mit und ohne Hinzufügung von Apfelsäure, Reis, Mais, Weizen, verschiedene Agarkombinationen, Lösungen von Rohrzucker, Glukose, Pepton, Asparagin, saurem apfelsaurem Ammonium, asparaginsaurem Natrium usw. Bei nucleinsaurem Natrium und bei Kreatin war kaum Wachstum nachweisbar und die Kultur nicht merkbar gefärbt.

Der Säure- oder Alkaligehalt des Kulturmediums ist ohne Einflufs auf die Entwicklung der Farbe; überhaupt ist die Bildung der orangegelben Farbe gänzlich unabhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums.

Altes in die trockene Luft hervorragendes Mycel bildet die Farbe viel weniger und von geringerer Intensität als neues auf einem nassen Substrat liegendes, aber nicht untergetauchtes Mycel.

b) Einflufs der Wellenlänge und Intensität des Lichtes.

Die zu den Versuchen bestimmten Reagenzgläser wurden mit Agar von folgender Zusammensetzung beschickt:

2 %	Agar	90 ccm
2 %	Knop	10 ccm
	Glukose	3 g

wurden sterilisiert und mit schräger Oberfläche zum Erstarren gebracht. Kulturen auf diesem Medium wurden unter einer mit ammoniakalischer Kupferoxydullösung angefüllten Senebier'schen Glocke schon innerhalb 24 Stunden intensiv orangegelb gefärbt, desgleichen hinter Lösungen von Chininsulfat in schwefelsäurehaltigem Wasser. Unter doppeltchromsaurem Kali blieb die Farbe aus oder erschien nach vier oder fünf Tagen in schwacher Nuance. Genaue Messungen der für die Farbenproduktion erforderlichen Lichtintensität liefsen sich aus technischen Gründen nicht durchführen. An einem trüben Märztage wurde eine Pilzkultur 12 Stunden lang dem Lichte ausgesetzt; die schwache Belichtung genügte bereits, um deutliche Färbung hervorzubringen. Bei längerem Aufenthalt in direktem Sonnenlicht verschwindet schliefslich die orangegelbe Farbe, wahrscheinlich weil nach dem Tode der Zellen der Farbstoff selbst durch das Licht zerstört wird.

c) Einflufs der Luft.

In Kulturen des a-Pilzes in Nährlösungen beschränkt sich die orange Farbe zunächst auf die oberflächlichen Schichten des Mycels, nur die oberen 2 oder 3 mm des Mycels erscheinen farbig. Tief untergetauchtes Mycel wird nur gefärbt, wenn es beständig durch einen Strom von Luftblasen mit dem nötigen Sauerstoff versehen wird. Taucht man ein mit Paraffin verschlossenes Reagenzglas mit kräftig wachsendem Mycel im Sonnenlicht unter Wasser, so bleibt die Kultur farblos, während in einem nicht versiegelten, nur bis zum oberen Rande in Wasser getauchten Glas das Mycel sich bald färbt.

Da diese Versuche es noch fraglich liefsen, ob die gesteigerte Transpirationstätigkeit oder der geförderte Luftzutritt den mafsgebenden Faktor abgibt, wurden noch folgende Experimente angestellt: Petrischalen mit Glukose + Knoplösung wurden geimpft und ins Dunkle gesetzt, bis die Oberfläche der Flüssigkeit mit einer dichten Schicht Mycel bedeckt war. Der Deckel wurde dann entfernt und die Schale in ein Gefäfs mit Chlorcalcium gesetzt. Trotz der starken Transpi-

ration bildete sich keine orange Farbe. Durch eine grofse Erlenmeyerflasche, die ein ähnliches Mycel enthielt, wurde ferner vermittelst eingeführter Glasröhren während des Tages ein ununterbrochener Luftstrom geleitet derart, dafs die trockene Laboratoriumsluft gerade auf die Oberfläche des Mycels hinabgeleitet wurde und dauernd auf sie wehte. Die Kultur blieb im Dunkeln. Selbst nach einer Woche erschien noch keine Farbe. Die durch die Belichtung erhöhte Transpiration scheint hiernach nicht die Ursache der Farbenbildung gewesen zu sein.

Inwieweit der Sauerstoff der Luft von Einflufs ist und welchen Einflufs andere Gase auf die Farbstoffbildung haben, wurde durch folgende Versuche zu ermitteln gesucht. Mit Agar beschickte Reagenzgläser wurden mit dem a-Pilz geimpft. Nachdem die Oberfläche sich mit Mycel bedeckt hatte, wurde eines zugeschmolzen, ein zweites mit CO_2, ein drittes mit H gefüllt. Die Gase wurden eine Stunde lang hindurchgeleitet, dann wurden die ab- und zuleitenden Röhren zugeschmolzen. Die Kulturen wurden ins Licht gestellt. Am nächsten Morgen zeigte sich in dem lufthaltigen Glas trotz des trüben vorangegangenen Nachmittags bereits intensiv orange Farbe, die beiden anderen waren farblos. Erst nach drei Tagen, nachdem der Wasserstoff etwas hinausdiffundiert war, zeigte die Wasserstoffkultur etwas Farbe, die CO_2-Kultur blieb viele Tage lang farblos. Die Versuche beweisen, dafs Sauerstoff und Licht für die Bildung der Orangefarbe nötig sind.

In den Kulturen mit vermindertem Luftdruck erschien im allgemeinen die orange Farbe langsamer und fiel blasser aus als unter normalen Verhältnissen. Erst bei einem Druck von 19—22 mm Hg blieb die Farbstoffbildung aus, auch das Wachstum war unter diesen Bedingungen sehr spärlich.

d) Einflufs des osmotischen Druckes.

Um die Wirkung gesteigerten osmotischen Druckes zu prüfen, wurden verschiedene Mengen von Chlornatrium zu der oben erwähnten Agarmischung (s. pag. 329) zugesetzt und die Kulturen dem Licht ausgesetzt. Bis zu 4 % NaCl war keine Wirkung erkennbar; bei höherem Prozentgehalt wurde das Wachstum des Pilzes sehr gehemmt; bei 12,5 % war das Wachstum aufserordentlich langsam, doch die Farbe erschien noch. Über diese Konzentration hinaus fand kein Wachstum mehr statt. Ähnliche Kulturen mit 8,7 % und 10,2 % NaCl entwickelten im Dunkeln keine Farbe. — Die Versuche wurden durchwegs nur mit dem a-Pilz angestellt.

C. Der Farbstoff von *Fusarium culmorum*.

Zum Schlufs sollen die an den Sesampilzen und Neocosmospora gewonnenen Resultate noch mit einigen an *Fusarium culmorum* gesammelten Erfahrungen verglichen werden. Die Untersuchungen an diesem sind noch keineswegs abgeschlossen; vielmehr sollen später an dieser wie an anderen farbstoffbildenden Fusariumarten die Studien wieder aufgenommen werden.

Auf gekochtem Reis wächst der Pilz schnell; die Hyphen werden gelb mit einem Stich ins Braune; nach einigen Wochen werden sie stellenweise rot. In der auf pag. 318 beschriebenen phosphorfreien Nährlösung, in welcher beide Sesampilze ihren roten Farbstoff sehr schnell bilden, wächst *Fusarium culmorum* etwas langsamer als diese und wird gelb. Beim Altern der Kultur verliert die Nährlösung ihre schwache Acidität und die Farbe geht in Rotviolett über. Auf Agar + Pepton, Glukose und Knoplösung entwickelt der Pilz innerhalb weniger Tage rosafarbiges Mycel, desgleichen auf Gelatine + Pepton und Glukose. In beiden Fällen bildet der Pilz im Gegensatz zu den Sesampilzen seine alkalische (rotviolette) Farbe direkt, d. h. ohne vorher seine saure Farbstoffmodifikation gebildet zu haben.

Ein weiterer Unterschied zeigt sich in dem Verhalten des *Fusarium culmorum* auf alkalisch reagierende Nährböden. Bei den Sesampilzen wird die Farbbildung durch die Alkaleszenz des Nährbodens gehemmt; *Fusarium culmorum* bildet dagegen die Farbe auf alkalischen wie auf sauren Medien. Zu der üblichen Nährlösung wurde so viel sterilisierter KOH-Lösung zugesetzt, dafs die Alkaleszens gleich 1 % normal war.[1]) In dieser Lösung wuchs der Pilz gut und zeigte (bei 26° C.) nach vier Tagen an der Oberfläche rotviolette Farbe im Mycel. Die Flüssigkeit erwies sich noch als alkalisch (Rosolsäure, Lakmoid). Der b-Sesampilz bleibt bei gleicher Behandlung farblos.

Dafs auch bei *Fusarium culmorum* die Farbbildung vom Luftzutritt abhängt, wird dadurch wahrscheinlich gemacht, dafs sich die Farbe (bei Kultur in Flüssigkeiten) zunächst in dem oberflächlichen Mycel entwickelt. In diesem Punkt scheinen alle bisher untersuchten pigmentbildenden Pilze mit einander übereinzustimmen. Ob dabei die Bildung des Farbstoffes wie bei manchen höheren Pilzen (z. B.

---

1) Die Kalilauge mufs besonders sterilisiert und nach dem Erkalten der sterilisierten Nährlösung zugesetzt werden, andernfalls wird die Glukose zersetzt und die Reaktion verändert.

Boletus) mit dem Auftreten irgend welcher Oxydasen sich in Beziehung bringen läfst, hoffe ich durch spätere Untersuchungen entscheiden zu können.

Meine eigenen Versuche wie die der früheren Autoren zeigen, dafs die Zusammensetzung des Nährbodens nicht in allen Fällen der entscheidende Faktor für die Farbbildung darstellt. Doch scheinen gewisse chemische Gruppen (wie Kohlehydrate) fördernd auf die Farbstoffproduktion zu wirken.

Starke Alkaleszens scheint allgemein hemmend zu wirken, starke Acidität ist weniger ungünstig für die Farbbildung.

Künftige Untersuchungen über die Physiologie der Farbstoffbildung werden zweifellos zur Aufstellung von Pilzgruppen führen, die sich von einander durch ungleichartiges Verhalten der Pilze äufseren Faktoren gegenüber unterscheiden werden. Als zusammengehörig erkannten wir bereits die Sesampilze und die Neocosmosporaarten, eine Gruppe, die sich wesentlich von *Fusarium culmorum* und dem Malzschimmel unterscheidet, die ihrerseits wieder in manchen Punkten übereinzustimmen scheinen. Einige Erfahrungen an unbestimmten Fusariumarten haben ferner gezeigt, dafs noch weitere „Gruppen“ existieren, deren Kenntnis später wohl auch auf die Systematik der morphologisch schwer unterscheidbaren Formen fördernd wirken wird.

Zusammenfassung.

Verschiedene Spezies von Pilzen, die nach ihrer Conidienbildung zu der Gattung *Fusarium* gehören, bringen bei verschiedenen Substraten unter verschiedenen Bedingungen rote, violette, blaue, orange und gelbe Farben hervor.

Das rote Pigment der vom *Sesamum* isolierten Fusarien (a und b-Pilz) und der *Neocosmospora* ist eine saure Verbindung, löslich in Alkohol und vielen andern Lösungsmitteln. Seine Salze sind meist violett gefärbt und unlöslich in den genannten Medien, löslich nur in den Salzen einiger organischer Säuren.

Die unter dem Einflufs der Lichtwirkung durch dieselben Pilze gebildete Orangefarbe ist kein Lipochrom. Ihre nähere chemische Natur konnte nicht festgestellt werden.

Der Farbstoff von *Fusarium culmorum* hat eine saure, gelbe und eine violette alkalische Modifikation. Die saure Form scheint eine schwache organische Säure zu sein, und ist wenig löslich in Alkohol oder Wasser; die alkalische löst sich in alkoholischen und und wässerigen Solutionen von Alkalien.

Die Bildung des roten oder violetten Pigments durch beide Sesampilze und *Neocosmospora* ist nicht von der Zusammensetzung der Kulturmedien abhängig. Farbloses Mycel aus einer sauren Kultur wird auch nach Übertragung in sehr schwach alkalische Nährflüssigkeit farbig; Mycel, das von Anfang an in alkalischem Nährmedium sich entwickelt hat, bleibt dauernd farblos. Durch sehr starke Acidität des Nährbodens wird die Farbbildung gehemmt. Sauerstoff ist für die Farbstoffbildung unerläfslich, doch wachsen die Pilze unter günstigen Bedingungen anaerob. Durch Steigerung des osmotischen Druckes des Nährmediums über die oben festgestellte Grenze hinaus wird die Bildung des roten Pigments unmöglich gemacht, desgleichen durch extrem hohe oder niedere Temperaturen. Die Temperaturgrenzen fallen für die Pigmentbildung mit den für das Wachstum fast zusammen. Gewisse giftige Stoffe hindern die Bildung des Pigments gänzlich, andere erst in Konzentrationen, welche das Wachstum des Pilzes stark zurückhalten.

Die orange Farbe wird von den Sesampilzen und Neocosmosporaarten unter dem Einflufs des Lichtes auf allen Nährmedien hervorgebracht. Die Reaktion des Mediums hat keinen Einflufs auf die Bildung der Farbe. Die wirksamen Strahlen sind die der blauen Spektrumhälfte. Freier Sauerstoff ist für die Farbbildung unerläfslich. Durch hohen osmotischen Druck läfst sich die Farbbildung nicht unterdrücken. Der Farbstoff von *Fusarium culmorum* wird auf verschiedenen Nährböden gebildet. Auf alkalischen Medien entsteht die rotviolette Modifikation, auf sauren die gelbe. Schwache Alkaleszens und schwache Acidität des Nährmediums hemmen die Farbbildung nicht. Gegenwart freien Sauerstoffs ist für die Erzeugung des Farbstoffs unerläfslich.

Die vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut zu Halle a. S. auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Klebs in der Zeit vom Oktober 1902 bis April 1904 ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Klebs für die liebenswürdige Leitung meiner Studien meinen besten Dank auszusprechen, desgleichen bin ich Herrn Dr. E. Küster für seine vielfache Unterstützung aufrichtig dankbar.

Zum Schlusse verweise ich noch auf die Arbeit von T. Milburn „Über Farbenänderungen bei Pilzen und Bakterien“, die gleichzeitig mit der vorliegenden im Botanischen Institut zu Halle entstanden ist und demnächst zum Abdruck kommen wird.

Literaturübersicht.

(95) Boorsma, W. G., Bydrage tot de kennis van ang khak. Geneeskundig Tijdschrift vor Nederlandsch-Indie Deel XXXV, pag. 415—435. Batavia 1895.

(04) Coupin, Henri et Friedel, Jean, Sur la Biologie du Sterimatocystis versicolor. C. R. Acad. d. Sc. Paris. T. CXXXVIII, pag. 1118, 1904.

(93) Costantin, J., Eurotiopsis, nouveau genre d'Ascomycètes. Bulletin de la Société Botanique de France. Tome 15, pag. 236 ff., 1893.

(97) van den Dries, R. Matières colorantes azotées chez les Champignons. La Cellule. Tom. 13, fasc. 2, pag. 415—446. 1897.

(90) Harz, C. O., Physomyces heterosporus n. sp. Sitzungsber. des Bot. Ver. in München. IV. Monatssitzung. Bot. Centralbl. Bd. 41, pag. 378—379, 405—411, Taf. 1. 1890.

(03) von Jaczewski, A., Über das Vorkommen von *Neocosmospora vasinfecta* E. Smith auf Sesamum orientale. Annales Mycologici Vol. 1, Nr. 1, pag. 31—32 mit Abb. Jan. 1903.

(92) Klein, Karl, Beitrag zur Kenntnis des roten Malzschimmels. Mitteilungen der österreichischen Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei in Wien. Heft 5, pag. 38—44, Taf. 1. Wien 1892.

(96) Laborde, J., Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle, l'Eurotiopsis Gayoni. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de Paris. 1896.

(92) Matruchot, L., Recherches sur le développement de quelques Mucédinées. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de Paris. 1892.

(03) Meyer, Arthur, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Einführung in die Methode der botanischen Untersuchung und Bestimmung der Bakterienspezies. Mit einer farbigen Tafel und 31 Abbildungen im Text. Jena 1903. Gustav Fischer.

(95) Prinsen Geerligs, H. C., Ang-Khak, ein chinesischer Pilzfarbstoff zum Färben von Efswaren. Chemiker Zeitung XIX, Nr. 57, pag. 1311—1312, 17. Juli 1895.

(03) Richter, Oswald, Pflanzenwachstum und Laboratoriumsluft. Ber. d. D. Bot. Ges., Bd. 21, Heft 3, pag. 180—194, Taf. 10—12. 1903.

(56) Schacht, H., Bericht an das Kgl. Landes-Ökonomie-Kollegium über die Kartoffelpflanze und deren Krankheiten. Berlin 1856.

(63) Schacht, H., Über die Veränderungen durch Pilze in abgestorbenen Pflanzenzellen. Pringsh. Jahrb. f. w. Bot., Bd. 3. 1863.

(89) Schmidt, Ernst, Ausführliches Lehrbuch der pharmaceutischen Chemie. Bd. II: Organische Chemie. Zweite vermehrte Auflage. Braunschweig 1889—1890.

(99) Smith, E. F., Wilt Disease of Cotton, Watermelon, and Cowpea. (*Neocosmospora* nov. gen.). Bulletin Nr. 17. Division of Vegetable Physiology and Pathology. U. S. Department of Agriculture. 72 Seiten, 10 Tafeln. Washington 1899.

(04) Smith, E. F. and Swingle D. B., The Dry Rot of Potatoes due to *Fusarium oxysporum*. Bulletin Nr. 55, Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture. 64 Seiten, 8 Tafeln. 1904.

(02) Uyeda, Y., Über den Benikoje-Pilz aus Formosa. Bot. Magazine. Vol. 15, Nr. 178, 1901; Vol. 16, Nr. 179, 1902. 7 Seiten, 1 Tafel.

(95) Went, F. A. F. C., *Monascus purpureus*, le champignon de l'Ang-Quac, une nouvelle Thélebolée. Ann. d. Sci. Nat. Bot. Sér. 8, T. 1, pag. 1—18, pl. 1 et 2. 1895.

(89) Zopf, W., Über Pilzfarbstoffe. Botanische Zeitung 1889, Nr. 4—6.

(90) Zopf, W., Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung. Mit 163 Abb. Breslau 1890.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung

Jahr/Year: 1904

Band/Volume: 93

Autor(en)/Author(s): Bessey Ernst Athearn

Artikel/Article: Über die Bedingungen der Farbbildung bei Fusarium. 301-334