

Epicoccum purpurascens

und die Bedingungen für seine Pigmentbildung.

Von Carl W. Naumann.

(Mit 3 Abbildungen im Text.)

Über die biochemischen Bedingungen der Farbstoffbildung durch Pflanzen ist im allgemeinen sehr wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit soll in der Hauptsache feststellen, welche äußeren Einflüsse chemischer und physikalischer Art notwendig sind, um nach Belieben einen Schimmelpilz, *Epicoccum purpurascens* (Ehrenberg), zur Bildung seines Pigmentes zu veranlassen. Wenn es auch auf diese Weise nicht gelingen kann, Schlüsse auf die chemische Zusammensetzung des Farbstoffes zu ziehen, so wird dabei doch die Möglichkeit geschaffen, einen tieferen Blick in den Chemismus dieses Pilzes zu werfen. Für chemische Untersuchungen über die Natur des Farbstoffes sind mit der Kenntnis der für die Pigmentbildung erforderlichen Bedingungen die Grundlagen gegeben, da dann der Farbstoff bildende Pilz in beliebiger Menge gezüchtet werden kann.

Frühere Untersuchungen.

Epicoccum purpurascens ist fast schon ein Jahrhundert lang den Mykologen bekannt. 1818 fand Christian Gottfried Ehrenberg (1) diesen Schimmelpilz im Berliner Tiergarten auf abgefallenen Pappelzweigen und beschrieb ihn als nova species einer von Link (2) 1816 entdeckten Gattung Eppicoccum.

Den Namen Epicoccum hat der Pilz von seinen aufsitzenden Sporn erhalten.

Vorkommen des Pilzes: Auf Blättern, trockenem und totem Kräuterstengeln, Holz, z. B. Abies, Allium, Arundo, Asparagus, Bryonia, Carex, Desmodium, Dianthus, Erythrina, Gladiolus, Glyceria, Hedera, Juglans, Larix, Lycopodium, Nicotiana, Pinus, Populus, Quercus, Robinia, Saccharum, Sambucus, Saponaria, Sorghum, Spiraea, Umbelliferen, Zea, Zizania, an Früchten von Opuntia, an Tricholoma und an Schleimflüssen von Birken (G. Lindau 3), vornehmlich in Begleitung von *Cladosporium herbarum* und *Alternaria tenuis* (Saccardo 4). Der Pilz kommt weiter vor auf dem Kleister

abgerissener Plakate an Anschlagssäulen, auf Pappstücken, die auf Schuttplätzen einige Tage feucht gelegen hatten, im Gebirge und in Holzhandlungen auf abgeschälten Baumstämmen und Brettern in Form braunroter punktgroßer Polster (P. Lindner 5). K. Saito (6) fand bei zahlreichen Luftanalysen in Tokio *Epicoccum purpurascens*, ebenso isolierte van Iterson (7) den Pilz aus der Luft. Die geographische Verbreitung ist außerordentlich groß: Lindau (3) gibt für sie zu jeder Jahreszeit Deutschland, die österreichischen Alpenländer, Ungarn, Schweiz, Dänemark, Holland, Belgien, Italien, Frankreich, Portugal an, dazu kommt noch nach Saito (6) Japan.

Das Sporenlager stellt ein kleines kugliges Polster dar, 120 bis 150 μ im Durchmesser, zu länglichen, 2—3 mm langen Räschen vereinigt, die auf länglichen purpurnen Flecken aufsitzen. Die Konidien sind fast kugelig, zuerst gelblich, dann braun, netzig, deutlich warzigwabig und entstehen als kleine kugelige Anschwellungen auf dicht gedrängt stehenden, kurzen, brüchigen, sich nach der Basis verjüngenden hyalinen Stielchen. Die Konidien haben einen Durchmesser von 15—22 μ (G. Lindau 3). Das Innere der Spore teilt sich nachträglich durch eine Anzahl Querwände. Jede Teilzelle kann für sich auskeimen, die Teilungen sind zum Teil ziemlich regelmäßig (P. Lindner 8). Bei künstlichen Reinkulturen des Pilzes erhielt Kny und später auch P. Lindner (8) Sporenbildung auf Pflaumendekoktgelatine, während der Pilz auf Würzelgelatine steril bleibt. Saito (6) fand, daß der Pilz auf zuckerhaltigem Fleischpeptonagar Konidien bildet, dagegen nicht auf Soyagelatine. (Soya ist ein aus Soyabohnen mit Hilfe von *Aspergillus Wentii* hergestellter Pflanzenextrakt mit starkem Kochsalzgehalt.) In Knopscher Nährlösung mit Rohrzucker kultiviert bildet der Pilz eine farblose, verdickte Dematium ähnliche Zellform (Saito 6). Bei eingehender Untersuchung mit stärkerer Vergrößerung trifft man häufig die Erscheinung an, daß im Innern der Fäden sich manchmal durch lange Strecken hindurch andere Fäden zeigen, welche ihre Entstehung von den Querwänden genommen haben (Lindner 9).

Über die Physiologie des Pilzes ist fast nichts bekannt. G. van Iterson jun. (7) wies nach, daß *Epicoccum purpurascens* zu jenen Schimmelpilzen gehört, die bei aeroben Wachstum Cellulose lösen. In einer Arbeit von Saida (10) „über die Assimilation von Stickstoff aus der Luft durch Schimmelpilze“ kommt ein *Endococcus purpurascens* vor. Da es sich hier augenscheinlich um einen Druckfehler handelt, der in der einschlägigen Literatur (so auch im Lafar 11) aufgenommen ist, so ist es notwendig, an dieser Stelle darauf hinzuweisen, daß erstens kein Schimmelpilz *Endococcus purpurascens*

existiert (Saccardo, Engler-Prantl), und daß zweitens unter den zahlreichen Flechtenparasiten mit der Bezeichnung *Endococcus* ein Speziez *purpurascens* nicht zu finden ist (vgl. Flora 1874). Es ist deshalb in der Saida'schen Arbeit für *Endococcus purpurascens* offenbar *Epicoccum purpurascens* zu setzen. Saida fand bei Rohruckerlösung + Zugabe von Spuren Stickstoffnahrung eine Zunahme von 1 mg Stickstoff.

Die üppige Farbstoffproduktion veranlaßte P. Lindner (5) sich eingehend damit zu befassen. Lindner stapelte zur Gewinnung von möglichst viel Farbstoff Plattenkultur auf Plattenkultur in einer geräumigen feuchten Kammer. Auf diesen Plattenkulturen, die in der Mitte der Pflaumendekoktgelatinefläche geimpft wurden, stellte sich immer an der Glasseite des Gelatinekuohens eine intensive Färbung ein, während die Lufthyphen meist rein weiß, mitunter gelb bis gelblichrot gefärbt waren. Ein alkoholischer Auszug der Kulturen wurde von Prof. Tschirsch, Bern, spektroskopisch untersucht. Nach dem Angström'schen Normalspektrum in Milliontel Wellenlängen lag bei 468—448 ein Bandmaximum der Dunkelheit mit Endabsorbition des Blau und Violett. Das Band ist nur in mittlerer Schichtendicke sichtbar. Alte alkoholische Extrakte von Plattenkulturen gaben Bandspuren zwischen 494—461 und Endabsorbition. Der Wechsel in der Färbung von weiß zu rot und gelb wird von Lindner so gedeutet, daß die einzelnen Zellen des Pilzfadens sich in ihrer chemischen Arbeit ebenso verschieden verhalten können, wie die Zellen gefärbter Blumenblätter. Weiter beobachtete Lindner (5), daß die Pigmentbildung auf Würzegeatine nachläßt. Van Iterson (7) berichtet von purpurroter Färbung auf Filtrierpapierkulturen.

Eigene Untersuchungen.

Das Material.

Im August 1909 fand P. Lindner in Schöneck bei Beckenried, am Südufer des Vierwaldstätter Sees, auf abgeschälten Baumstämmen Sporenpolster von *Epicoccum purpurascens*. Diese sandte er unter einer Briefmarke auf einer Postkarte an das Institut für Gärungsgewerbe, wo die Sporen auf Pflaumendekokt- und Würzegeatine ausgesät und dann der Pilz in Reinkultur erhalten wurde. Bei meinen Arbeiten mit verschiedenen Schimmelpilzen fiel es mir auf, daß *Epicoccum purpurascens* in seiner Pigmentbildung sehr wechselte, auf Pflaumendekoktgeatine war die Färbung wundervoll rot, auf Würzegeatine trat diese Färbung nur selten auf und in manchen Nährlösungen wuchs der Pilz auch an der Oberfläche

farblos. Um exaktes Ausgangsmaterial zu erhalten, erschien es notwendig, von einer rein gezüchteten Spore aus alle Versuche anzustellen. Die von mir isolierte Spore erhielt ich aus folgender Kultur: Ein steriler Gipsblock wurde mit einer sterilen Lösung, die auf 10 ccm Leitungswasser 1 g Asparagin und 0,1 g K_2HPO_4 enthielt, in einer Doppelschale übergossen, so daß die überschüssige Flüssigkeit beständig den Gipsblock benetzte, und dieser durch Überspülen feucht gehalten werden konnte. Nach 4—6 Wochen zeigten sich auf dem roten Myzel braunrote Punkte, die sich als Sporenlager von *Epicoccum purpurascens* erwiesen. Die Größe der Einzelspore wurde gemessen und zu durchschnittlich 16—20 μ bestimmt, was der bei Lindau und Saccardo für *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg angegebenen Sporengröße entspricht. Mit Hilfe der Lindnerschen Tröpfchenkultur wurde aus einem Sporenhäufchen eine Einzelspore isoliert. Da mir nur wenig, also sehr wertvolles Sporenmateriale von *Epicoccum purpurascens* zur Verfügung stand, modifizierte ich die Lindnersche Methode wie folgt: Mit steriler Bierwürze wurde auf einem Deckgläschen eine Federstrichkultur angelegt. Dann wurde mit einer trockenen sterilen Feder von einem Sporenhäufchen Material entnommen und mit dieser Feder auf die einzelnen schon vorher angelegten Würzefederstriche getupft. Durch unmittelbar folgende mikroskopische Untersuchung überzeugte ich mich, daß es mir bei einem Tröpfchen (unter etwa sechs derartigen Versuchen) gelungen war, eine Einzelspore zu isolieren. Das Auskeimen der Spore wurde nach 24 Stunden festgestellt und nach 48 Stunden wurde mit einer sterilen Feder Myzel von der isolierten Spore auf Nährlüssigkeit in Erlenmeyer-Kölbchen übergeimpft. Von den Erlenmeyer-Kölbchen aus wurden dann Lindnersche Pilzgläser geimpft und mit minimalen in diesen gewachsenen Myzelstückchen alle weiteren Versuche angestellt.

Kulturgefäße.

Es kamen neben 50 und 100 ccm Erlenmeyer-Kölbchen, Reagensgläsern, Petrischalen, vor allen Dingen Lindnersche Pilzgläser zur Verwendung. Diese, eine Erfindung von Prof. Paul Lindner, DRP. Nr. 211 037, sind oben geschlossene, rund gewölbte, unten mit einer Rinne versehene Zylinder, bei denen der Hals unten erweitert als Fuß dient, von folgender Form (vgl. auch

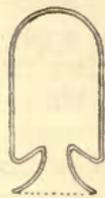


Fig. 1. nebenstehende Fig. 1).*)

*) Diese Gläser sind zu beziehen von Warmbrunn & Quielitz, Berlin NW. 40, Heidestr. 55—57. Preis 1 M pro Stück.

Diese Gläser werden durch einen Wattepfropfen verschlossen und sterilisiert. Die sterile, flüssige Nährgelatine wird unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln hineingegossen und durch Rollen auf einem Eisblock zum Erstarren gebracht. Der Gebrauch der Lindnerschen Pilzgläser bietet folgende große Vorteile für die Kultur der Schimmelpilze:

1. Bequemes Impfen durch den Hals bei möglichst geringer Infektionsmöglichkeit;
2. die Möglichkeit, beliebig von allen Seiten das Wachstum des Pilzes zu kontrollieren;
3. der Pilz kann sich unter guten Ernährungsbedingungen zu einer Riesenkolonie entwickeln und ist dann häufig im wahrsten Sinne des Wortes eine Prachtkultur.

Es wird bei jeder Versuchsanordnung die Form des Kulturgefäßes und die Art der Ernährung angegeben werden.

A r b e i t s p l a n.

Als Hauptaufgabe dieser Arbeit wurde schon oben die Untersuchung der Bedingungen für die Pigmentbildung bei *Epicoccum purpurascens* bezeichnet. Es lag nahe, den Einfluß folgender Faktoren einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen:

1. der Nährsalze,
2. der Kohlehydrate,
3. der Stickstoffquellen,
4. der Reaktion der Nährlösung,
5. des osmotischen Druckes,
6. der Temperatur,
7. des Lichtes,
8. verschiedener Gase,
9. der Reizwirkung von Bakterien.

1. Der Einfluß der Nährsalze.

Zu exakten Untersuchungen über den Einfluß von Nährsalzen auf die Entwicklung von Mikroorganismen, wie Bakterien und niederen Pilzen, ist es seit den klassisch zu nennenden Arbeiten von W. B e n e c k e (12) notwendig, derartige Versuche unter äußersten Vorsichtsmaßregeln anzustellen, weil man sonst ungenaue, sich widersprechende Resultate erhält. Gefäße aus Quarz, unter besonderen Kautelen dreifach überdestilliertes Wasser und durch mehrmaliges Umkristallisieren aufs sorgfältigste gereinigte Mineral-salze sind für derartige Versuche unerlässlich. Da es sich bei meinen

Versuchen nicht um das Mineralsalzbedürfnis des Pilzes, sondern, wie sich bald zeigte, mehr um eine Frage der Konzentration gewisser Stoffe handelte, wurde von einer Versuchsanstellung in erwähnter Richtung abgesehen. Rohversuche ergaben, daß Kalium und auch Phosphorsäure ohne Einfluß auf die Farbstoffbildung sind, dagegen Magnesium in einer gewissen Konzentration notwendig zur Pigmentbildung ist. Weiter zeigte sich bei diesen ersten Versuchsreihen, daß die Art der Stickstoffnahrung von Einfluß auf die Farbstoffbildung sein muß, da Ammonsulfatkulturen keine, dagegen Kaliumnitratkulturen beträchtliche Pigmentbildung zeigten. Diese Versuche gaben also das eigentliche Leitmotiv zu der Arbeit.

Versuchsanstellung:

Das erste Erfordernis zur Anstellung derartiger Versuche ist eine möglichst einfache Nährlösung. Von der Benutzung komplizierter Nährlösungen, wie der *Raulin*schen oder *Knops*chen wurde abgesehen. Diese werden zwar zur Kultur höherer Pflanzen häufig angewandt, sind aber für niedere Pilze und Bakterien unterschieden zu umständlich. *Benecke* (12) verwandte zur Feststellung des Mineralsalzbedarfes bei verschiedenen Bakterien eine Nährlösung, die

Asparagin	0,25 %
Magnesiumphosphat	0,05 %
Kaliumsulfat	0,02 %

enthielt.

H. Pringsheim (13) brachte für Schimmelpilze mit Erfolg folgende Nährlösung zur Anwendung:

Zucker +	{	Ammonsulfat	0,3 %
		Mono Kaliumphosphat	0,05 %
		Magnesiumsulfat	0,01 %.

Dieser Lösung wurden noch Spuren von NaCl und FeSO_4 zugesetzt. Von diesen beiden Lösungen, die im Stickstoff- und Nährsalzgehalt fast übereinstimmen, wurde die von *Pringsheim* gegebene gewählt unter Weglassung der Zugabe von Spuren Eisensulfat und Chlornatrium, da Vorversuche die Zugabe dieser Salze als unnötig zur Pigmentbildung gezeigt hatten. Als Kohlehydratquelle wurde 2 % Dextrose beigegeben. Die Versuche wurden in 100 ccm Erlenmeyerkölbchen mit 50 ccm Nährlösung angestellt, die Lösung durch kurzes Aufkochen sterilisiert. Die Reaktion war bei den KH_2PO_4 enthaltenden Nährlösungen schwach sauer.

a) Prüfung durch Weglassen von Kationen aus der Nährlösung. Kohlehydrat = 2 % Glukose:

1. 0,3 % $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ + 0,05 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ + 0,01 % Mg SO_4 .
Vollständige Lösung mit $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ als N Quelle.
2. 0,3 % $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ + 0,05 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$. Ohne Magnesium.
3. 0,3 % $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ + 0,01 % Mg SO_4 . Ohne Kalium.
4. 0,05 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ + 0,01 % Mg SO_4 . Ohne Ammonium.
5. 0,3 % KNO_3 + 0,05 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ + 0,01 % Mg SO_4 . Vollständige Lösung mit KNO_3 als N Quelle.
6. 0,3 % KNO_3 + 0,05 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ + 0,01 % $\text{K}_2 \text{SO}_4$. Ohne Magnesium (s. u.).
7. 0,3 % Mg NO_3 + 0,05 % Mg HPO_4 + 0,01 % Mg SO_4 . Ohne Kalium.

b) Prüfung durch Weglassen von Anionen:

Bei diesen Versuchen wurde außer den PO_4 , SO_4 , NO_3 noch der Cl Säurerest geprüft. Kohlehydrat = 2 % Glukose.

1. 0,3 % $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ + 0,05 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ + 0,01 % Mg SO_4 + 0,01 % K Cl. Lösung mit allen Säureresten.
2. 0,03 % $\text{NH}_4 \text{Cl}$ + 0,05 % KCl + 0,01 % Mg Cl_2 . Ohne PO_4 , SO_4 , NO_3 .
3. 0,3 % $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % Mg HPO_4 . Ohne Cl, SO_4 , NO_3 .
4. 0,3 % $(\text{NH}_4) \text{NO}_3$ + 0,05 % KNO_3 + 0,01 % Mg NO_3 . Ohne PO_4 , SO_4 , Cl.
5. 0,3 % $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ + 0,05 % K_2SO_4 + 0,01 % Mg SO_4 . Ohne PO_4 , NO_3 , Cl.

Nach 15 Tagen ergab: bestes Wachstum a 5; gutes Wachstum a 1; a 2; a 3; a 6; a 7; b 1; b 3; schlechtes Wachstum b 2; b 4; b 5; fast gänzlich Ausbleiben a 4; Pigmentbildung trat ein bei a 5; a 7; b 4; Spurenhaf bei b 1. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Pigment ausschließlich auf Nährlösungen, die das NO_3 Jon und Mg Jon enthielten, hervorgebracht wird. Daß Magnesium für die Bildung von Pigmenten bei Bakterien und Pilzen notwendig sei, wiesen viele Forscher nach. Interessant in dieser Richtung ist eine Arbeit von Samkow (14) über die Physiologie des *Bazillus prodigiosus*. Samkow zeigte, daß in Nährlösungen ohne Magnesium kein Pigment gebildet wurde. Weiter wies er nach, daß in dem durch Alkohol extrahierten Pigment, das man durch mehrmaliges Abdunsten der ätherischen Lösung reinigen kann, nach Veraschen kein Magnesium nachzuweisen sei. Das Magnesium bildet

für den *B. prodigiosus* keinen Bestandteil des Pigmentes, ist aber notwendig für die physiologische Funktion des Protoplasmas, welches das Pigment bildet. Weiter sei hier auf eine grundlegende Arbeit von W. Benecke (12) verwiesen, in welcher gezeigt wird, daß bishernoch kein Pilz, überhaupt keine Pflanze gefunden ist, die ohne Magnesium wachsen kann. Ebendort macht Benecke auf den Einfluß des Magnesiumgehaltes verschiedener Glassorten aufmerksam. Ich möchte mich hier zu der Annahme erklären, daß dort, wo ein Einfluß von Magnesium auf Änderungen in der Pigmentbildung von Bakterien und Pilzen beobachtet wurde, dies lediglich eine Folge der Konzentration der gelösten Magnesiumverbindung ist. Es wäre demnach in allen Versuchen früherer Forscher, die nicht in Quarzkölbchen und unter sorgfältigster Beobachtung aller Vorsichtsmaßregeln angestellt wurden, für Magnesiumfrei Magnesiumarm zu setzen. Coupin und Friedel (15) wiesen nach, daß *Aspergillus versicolor* in einer magnesiumfreien Raulinschen Nährlösung graurotsfarbige Konidien statt der sonst normalen grünfarbigen bildete. Kossowisz (16) fand, daß Magnesiumsalze von tiefgreifendem Einfluß auf die Farbstoffbildung durch gewisse Saccharomyceten sind. In einer Nährlösung, die 5 % Rohrzucker, 0,4 % KCl, 0,4 % Mg SO₄, 0,04 % Ca₂H₂ (PO₄)₂ und 0,4 % (NH₄)₂ H PO₄ enthielt, bilden *Saccharomyces ellipsoideus I* und *Saccharomyces cerevisiae I* einen fleischroten und die Spiritushefe Rasse II der Berliner Station einen rötlichgelben Farbstoff, während *S. Pastorianus I, II* und *III*, *S. ellipsoideus II*, *S. exiguus*, *S. anomalus*, *S. membranaefaciens*, Carlsberg Unterhefe Nr. 2 und Froberghefe keinen Farbstoff bilden. Kossowisz fand weiter, daß die Pigmentbildung bei 0,04 % eintritt, mit steigendem Gehalt an Magnesiumsulfat wächst und am schönsten wird, wenn die Nährlösung gesättigt ist. Auf die Arbeit von Kossowisz hin erschien es zweckmäßig, den Einfluß von Mg SO₄ in verschiedenen Konzentrationen auf die Pigmentbildung von *Epicoccum purpurascens* zu prüfen.

Es wurde die Zusammensetzung der Nährlösung gewählt, die im Vorversuch für die Pigmentbildung am günstigsten gefunden wurde: 5 % Dextrose, 0,3 % K NO₃, 0,05 % K H₂ PO₄, 50 ccm Nährlösung in 100 ccm fassenden Erlenmeyern.

Konzentration des Mg.	0,2	0,4	0,6	0,8	1	5	10 %	Magnesiumsulfat + 7 aqua
Eintreten von Färbung nach Tagen	6	6	5	8	10	Spuren nach 14 Tagen		

Die absolute Grenze der für die Farbstoffbildung notwendigen Konzentration an $Mg\ SO_4$ wurde nicht festgestellt, da schon der Zusatz von 0,01 % $Mg\ SO_4 + 7\ aqua$ ausreichte, um reichlich Pigment zu bilden, andererseits es schon genügte, mit einer Platinnadel, die nicht sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült war, genügende Mengen Magnesium in magnesiumfreie Kulturen zu bringen, um Pigment zu erzeugen. Der Einfluß des Magnesiums auf die Pigmentbildung bei *Epicoccum purpurascens* ist also lediglich eine Frage der Konzentration. Über den Einfluß der Nitrate und Ammonsalze wird unter dem Kapitel „Einfluß der Stickstoffnahrung“ näher einzugehen sein.

2. Die Kohlehydrate.

Wenn es sich in diesem Kapitel darum handelt, den Einfluß von Kohlehydraten auf die Pigmentbildung zu untersuchen, so sei auf die Notwendigkeit aufmerksam gemacht, bei diesen Versuchen von einer Nährsalzlösung auszugehen, die das Wachstum und die Pigmentbildung optimal beeinflusst. Wie aus obigem Versuche hervorging, wurde am besten Farbstoff erhalten in einer Lösung mit 0,3 % KNO_3 , 0,05 % $K\ H_2\ PO_4$ und 0,01 % $Mg\ SO_4$. Ich behielt deshalb für die folgenden Versuche diese Grundnährlösung mit Nitrat als Stickstoffquelle bei. Ich möchte erwähnen, daß ich mit Ammonsulfat als Stickstoffquelle denselben Versuch durchführte, daß es jedoch unmöglich war, durch Änderung der Kohlehydrate Farbstoffbildung zu erhalten.

Versuchs anordnung.

Die Lösungen enthielten 2 % des Kohlehydrates, 0,03 % $K\ NO_3$, 0,05 % $K\ H_2\ PO_4$, 0,01 % $Mg\ SO_4$ und wurden in Reagensgläsern angesetzt. Die Farbstoffbildung zeigt sich nur, wenn das zuerst submers wachsende Pilzmyzel die Oberfläche erreicht.

Kohlenstoffquelle:	Eintreten des Farbstoffes:
Pentosen:	
Xylose	nach 20 Tagen Pigment
Arabinose	„ 18 „ „
Hexosen:	
Dextrose	„ 18 „ „
Laevulose	„ 18 „ „
Galaktose	„ 18 „ „
Disaccharide:	
Rohrzucker	nach 4 Wochen keine Pigmentbildung
Maltose	nach 4 Tagen Pigment
Milchzucker	„ 20 „ „

Trisaccharid:

Raffinose	nach 18 Tagen	Pigment
-----------	---------------	---------

Polysaccharide:

Stärke	„ 3 „ „	
Inulin	nach 4 Wochen	keine Pigmentbildung
Cellulose (Petrischale)	nach 5 Tagen	Pigment
Dextrin	nach 4 Wochen	kein Pigment

Diverse:

Amygdalin	nach 4 Tagen	Pigment
α Methylglukosid	„ 18 „ „	
β Methylglukosid	„ 8 „ „	

Mehrwertige Alkohole:

Glyzerin	nach 4 Wochen	kein Pigment
Erythrit	„ 4 „ „	
Dulzit	„ 4 „ „	
Mannit	„ 4 „ „	

Es ist zu betonen, daß bei allen Versuchen Wachstum eintrat. Dies war sehr schwach bei Rohrzucker, Dextrin und Inulin. Auch alle sonstigen Versuche, die auf Wachstum mit Rohrzucker angestellt wurden, fielen sehr schwach im Wachstum aus. Vermutlich besitzt *Epicoccum purpurascens* keine Invertase, da sowohl auf Dextrose wie Laevulose, den Bestandteilen des Invertzuckers, Pigment gebildet wird und üppiges Wachstum eintritt. Maltose und Stärke sind bei weitem die günstigsten Kohlehydrate für die Pigmentbildung, ebenso Cellulose, was, wie ich oben anführte, schon van I t e r s o n (7) fand, indem er ebenfalls dem Pilz Nitrat als Stickstoffnahrung zuführte. Auffallend ist, daß durch keinen der angewandten mehrwertigen Alkohole: Glyzerin (driewertig), Erythrit (vierwertig), Dulzit und Mannit (sechswertig), Pigmentbildung erreicht werden konnte. Da diese mehrwertigen Alkohole auf einer tieferen Oxydationsstufe als die Aldosen und Ketosen stehen und die charakteristische Gruppe der Zuckerarten — C.HOH.CO — nicht haben, so ist zu vermuten, daß diese auf die Pigmentbildung von Einfluß ist. Daß auf Inulin, Rohrzucker, Dextrin kein Farbstoff gebildet wird, könnte darin seine Erklärung finden, daß dem Pilz die zur Spaltung dieser Polyosen in Monosen notwendigen Enzyme fehlen. Da bei diesen drei Versuchen spurenhaftes Wachstum eintrat, so ist es nur den geringen Verunreinigungen dieser Polyosen, beim Rohrzucker etwa einer in kleinem Maßstabe eingetretenen Inversion zuzuschreiben. Interessant ist das Auftreten von Pigment bei den beiden Methyl-Glukosiden und Amygdalin. Der Pilz spaltet also die Gluko-

side = α und β Methylglukosid*) und das Amygdalin und gewinnt durch das dann erhaltene Monosaccharid die Fähigkeit, Pigment zu bilden. Es steht weiterhin zu vermuten, daß *Epicoccum* sowohl Emulsin wie Maltase bildet, da Emulsin die Fähigkeit hat, von den beiden Methylglukosiden nur das β -Methylglukosid zu spalten und das durch Emulsin in Dextrose, Benzaldehyd und Blausäure spaltbare Amygdalin ebenso dem Pilz als pigmentbildendes Kohlehydrat dienen kann, wie Glukose und andere. Es sei darauf hingewiesen, daß es sich in diesen Versuchen nicht um eine definitive Feststellung der Bildung von den erwähnten Enzymen bei *Epicoccum purpurascens* handeln kann. Ihre Anwesenheit ist aber durch das Eintreten von Pigmentbildung höchst wahrscheinlich, so daß wir in der Farbstoffbildung des Pilzes eine Art Enzymreagens erhalten haben. Zur definitiven Feststellung dieser Enzyme wäre es notwendig, quantitative Versuche vermitteltst E. Fischers Oszonprobe (17) zu machen.

Es schien weiter wissenschaftlich zu untersuchen, ob durch Änderung der Lösung an Zuckerkonzentration eine zeitliche Änderung im Eintreten des Pigmentes herbeigeführt wird. Der Versuch zeigt, daß in Dextroselösung das Optimum der Pigmentbildung bei einem Gehalt von 5—10 % Glukose liegt. Bei einer Konzentration von 50 % bis 60 % Glukose unterblieb die Farbstoffbildung vollständig, eine Erscheinung, die, wie später rechnerisch nachgewiesen wird, auf den hohen osmotischen Druck zurückzuführen ist.

Versuchsordnung:

0,3 % KNO_3 + 0,05 % KH_2PO_4 + 0,01 % Mg SO_4 .

Zeit des ersten Erscheinens von Pigment bei verschiedener Konzentration des Dextrosegehaltes.

Dextrose %	2	5	10	15	20	30	40	50	60
nach Tagen	18	5	5	8	9	19	20	Wachstum ohne Pigmentbildung	

Mit organischen Säuren (neutralisiert) und ihren Salzen wurden ebenfalls bei verschiedener Stickstoffnahrung, wie KNO_3 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Versuche angestellt, die aber nur negative Resultate lieferten.

*) Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. O. Emmerling meinen ergebensten Dank für das mir lebenswürdigerweise zur Verfügung gestellte β -Methylglukosid zu sagen.

Geprüft wurde Natriumacetat, Calciumlactat, saures apfelsaures Calcium, Weinsäure, Bernsteinsäure (letztere beide durch Soda neutralisiert) in 2 % iger Konzentration. Das Wachstum war bei allen Versuchen schlecht und ohne Pigmentbildung. Spurenhaftrat diese einmal bei dem apfelsauren Salz auf.

Der Nachweis der Diastase.

Das gute Wachstum auf Stärkelösung ließ vermuten, daß *Epicoecum purpurascens* reichlich Diastase produziert. Während andere Enzyme, worauf oben hingewiesen wurde, nur mit E. Fischers (17) Osazonprobe exakt nachzuweisen sind, gelingt es relativ ohne Schwierigkeit, die Diastasebildung sicher festzustellen. Der Nachweis der anderen Enzyme war in dieser Arbeit von geringerem Interesse, der der Diastase insofern von Wichtigkeit, als der zur Farbstoffgewinnung später angegebene Weg darauf beruht, den Pilz auf Reis zu züchten. Die Diastasebildung konnte, wie folgender Versuch zeigt, einwandfrei nachgewiesen werden

Versuchsordnung:

Der Pilz wurde auf einer mit sterilem Reis gefüllten Glasschale mit Glasdeckel vom Durchmesser = 25 ccm gezüchtet. Nach zwei Monaten hatte er eine dicke Myzeldecke gebildet, die den Reis fast vollkommen aufgezehrt hatte. Das Myzel wurde mit Sand fein zerrieben und 24 Stunden mit destilliertem Wasser unter Zusatz von Toluol extrahiert. Der abfiltrierte, schwach bräunlich gefärbte Auszug wurde mit 98 % igem Alkohol versetzt, worauf ein weißlicher Niederschlag entstand. Nachdem der Niederschlag sich abgesetzt hatte, wurde dekantiert und noch einmal mit Wasser gelöst und durch Alkohol gefällt. Die wässrige Lösung des zweiten Niederschlages wurde mit 10 ccm Stärkelösung, 2 % lösliche Stärke enthaltend, versetzt und in zwei gleichen Portionen in zwei Reagensgläser gegeben.

Reagensglas a wurde aufgekocht (Kontrolle), Reagensglas b nicht; beide wurden unter Zusatz von viel Toluol während 24 Stunden im Thermostaten bei 45° C. gehalten. Nach 24 Stunden war das äußere Bild, daß die Flüssigkeit in b klarer war als in der aufgekochten Probe a. Zunächst wurden a und b kleine Proben entnommen und mit Jodjodkaliumlösung zusammengebracht. a zeigte die blaue Stärkereaktion, b die schwach rote Färbung von Erythro-dextrin. Mit Fehlingscher Lösung versetzt, ergab a keine, b eine starke Reaktion von reduziertem Kupfer. Die Bildung von Diastase

durch *Epicoccum purpurascens* ist somit einwandfrei nachgewiesen.

3. Der Einfluß der Stickstoffnahrung.

Um den Einfluß der Stickstoffnahrung auf die Entwicklung eines Pilzes zu studieren, ist es wohl zweckmäßig, in Anlehnung an Beijerinck (18) und Jost (19) so zu verfahren, daß man die verschiedenartigen Ansprüche an die Stickstoffnahrung in getrennten Gruppen betrachtet. Dies sind die Gruppen der 1. Nitrogenpilze, welche freien Stickstoff aufnehmen und binden = Stickstoff-Prototrophie. 2. Ammon-Nitrit-Nitratpilze, die den Stickstoff anorganischen Nährquellen entnehmen und bei denen die Mehrzahl ihn sowohl aus anorganischen wie organischen Stickstoffverbindungen benutzen kann = obligate und fakultative Stickstoff-Autotrophie. 3. Amid- und Peptonpilze, die auf organische Stickstoffquellen, wie Aminverbindungen, Pepton, Albumosen angewiesen sind = Stickstoff-Heterotrophie bzw. Stickstoff-Paratrophie bei Parasiten.

Der Luftstickstoff.

Bei meinen Beobachtungen über den Einfluß der Ernährungsbedingungen auf die Pigmentbildung bei *Epicoccum purpurascens* lag infolge der in der Einleitung erwähnten Saïda'schen Arbeit (10) die Notwendigkeit vor, nachzuprüfen, ob der Pilz ohne jede Stickstoffnahrung imstande ist, Pigment zu bilden. Es war Saïda nicht gelungen, den Pilz in einer Rohrzuckerlösung mit Nährsalzen zum Wachstum zu bringen. Erst nach Zugabe von Spuren Pepton wuchs der Pilz, wobei durch die Kjeldahl-Methode eine Zunahme von 1 mg Stickstoff ermittelt wurde. Zunächst sei darauf hingewiesen, daß *Epicoccum purpurascens* auf Rohrzucker sehr schlecht gedeiht, vermutlich, da es keine Invertase bildet, worauf ich bei meinen obigen Untersuchungen hinwies. Trotzdem wurde der Versuch auch mit Rohrzuckerlösung angestellt, um die Saïda'schen Beobachtungen nachzuprüfen.

Es kamen folgende Nährlösungen zur Anwendung: Lösungen, die 10 % Zucker a) Dextrose, b) Rohrzucker + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % $MgSO_3$ in destilliertem Wasser enthielten. Die beiden reinsten Zucker, reinster Traubenzucker von Kahlbaum und Rohrzucker aus dem Institut für Zuckerindustrie*), erwiesen sich bei der

*) Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Herzfeld meinen ergebensten Dank für den mir gütigst zur Verfügung gestellten reinen Rohrzucker zu sagen.

Lassaigneschen Probe als stickstofffrei. Da schon bei den Versuchen über den Einfluß der Nährsalze auf die Pigmentbildung beobachtet wurde, daß *Epicoccum purpurascens* ohne Stickstoffquelle sehr wenig wächst, wurde bei diesem Versuch, um dem Pilz vielleicht durch aerobe Bedingungen das Wachstum zu ermöglichen, wie folgt verfahren. In Lindner'sche Pilzgläser wurden zwei Scheiben schwedischen Filtrierpapiers gebracht und mit diesen zusammen wurden die Zylinder sterilisiert.

In diese wurde die sterile Nährlösung gegossen und dann eine Spur Pilzmyzel auf das Papier geimpft. Diese Versuchsanordnung bietet deshalb Vorteile, weil dem Pilz durch kapillares Aufsteigen der Lösung im Filtrierpapier beständig Nahrung zugeführt wird, er also nicht gezwungen wird, submers zu wachsen, sondern reichliche Zufuhr von Luft erhält. Die Pilzgläser wurden sofort nach der Impfung in einen Apparat folgender Anordnung eingereiht unter Beobachtung der sorgfältigsten Sterilhaltung.

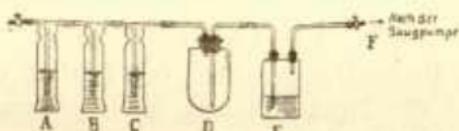


Fig. 2.

A, B, C sind Waschflaschen, A mit Wasser, B mit Kalilauge (1:1) und C mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllt, um die Luft von den in ihr vorhandenen Stickstoffverbindungen zu reinigen. D ist das Lindner'sche Pilzglas, E eine Sicherheitsflasche und F die Wasserstrahlsaugpumpe, die einen langsamen Luftstrom durch den Apparat reguliert. Nach einem Monat zeigte sich bei minimalem Wachstum keine Pigmentbildung. Ob der Pilz tatsächlich imstande ist, den Luftstickstoff zu verarbeiten, wagt Verfasser nicht zu entscheiden. Da es sich hier nur um den Versuch handelte, ob auf die Pigmentbildung der Luftstickstoff von Einfluß sei, konnte naturgemäß der von Saida (10) beschriebene Weg „eine Spur Pepton beizugeben“ nicht eingeschlagen werden!

Erwähnenswert ist, daß über die Luft-Stickstoffassimilation durch Schimmelpilze durchaus keine Übereinstimmung herrscht, was aus den Angaben von Koch (20) im „Kreislauf des Stickstoffes“ und bei der reichlich angeführten Literatur von H. Zikes (21) in seiner Arbeit über die Luftstickstoff assimilierende Hefe: *Torula Wiesneri* zu ersehen ist.

Der Stickstoff in Ammon, Nitrit und Nitratverbindungen.

Da bei *Epicoccum purpurascens* zweifellos fakultative Stickstoffautotrophie vorhanden ist, der Pilz also fähig ist, seine Stickstoffnahrung sowohl anorganischen wie organischen Stickstoffverbindungen zu entnehmen, so seien zunächst die anorganischen Stickstoffverbindungen und ihr Einfluß auf die Pigmentbildung besprochen. Allerdings hat besonders die anorganische Stickstoffnahrung einen wesentlichen ernährungs-physiologischen Faktor im Gefolge: die Reaktion. Es erscheint deshalb zweckmäßig, diese bei den einzelnen Nährstoffen gleichzeitig zu besprechen und dann nur nochmals kurz den Einfluß der Reaktion auf die Pigmentbildung zusammenfassend zu behandeln. Es ist eine vielerörterte Frage, ob unter den anorganischen Stickstoffquellen Ammon oder Nitrat vorgezogen wird. Daß dieselben von tief eingreifender und stark unterschiedlicher Bedeutung für die Biochemie eines Pilzes sein können, soll versucht werden im folgenden bei *Epicoccum purpurascens* nachzuweisen. W. Benecke (22) schreibt im Lafar im Kapitel über die Stickstoffquellen für Eumyceten (S. 402): „Es bleibt wohl noch zu untersuchen, inwieweit die allmählich eintretende Änderung der Reaktion der Nährlösung hierbei mitwirkt. Denn größtenteils hängt die Eignung der einen oder der anderen Verbindungsform gar nicht mit der Oxydationsstufe des Stickstoffes, sondern mit der Tatsache zusammen, daß bei Darbietung von Nitraten im allgemeinen die Nährlösung allmählich alkalisch, bei Darbietung von Ammoniumsalsen, etwa dem Sulfat oder Chlorid, aber sauer wird, und daß es im ersten Falle davon abhängt, ob der Pilz durch regulatorische Bildung von Säure der Alkalescenz entgegenzuarbeiten vermag, und im letzteren Falle davon, wieviel Säure es verträgt.“ Aus diesen Zeilen ist ersichtlich, daß man schlechterdings bei Betrachtungen der anorganischen Stickstoffnahrung die Reaktion nicht unbeachtet lassen darf. Von den Ammoniumsalsen wurde das Sulfat gewählt. In einer Arbeit von G. Ritter (23) wurde gezeigt, daß Ammoniumphosphat als N-Quelle für Schimmelpilze bei weitem höhere Myzelernten liefert als das schwefelsaure und salzsaure Salz. Mir erschien das Phosphat nicht als geeignet, da so die physiologisch wertvolle Phosphorsäure in größeren Mengen in die Nährlösung eingeführt wird, die eventuell auch eine höhere Myzelausbeute verursachen könnte. Das Sulfatsalz wiederum wurde dem Chloridsalz vorgezogen, da letzteres nach G. Ritter (23) das Wachstum mehr hindert als die Sulfate. Wie der Versuch über den Einfluß der Nährsalze auf die Pigmentbildung gezeigt hatte,

war Ammon weder als Chlorid, Sulfat, Phosphat, noch als Nitratsalz imstande gewesen, Färbung herbeizuführen. Auffallend ist, daß auch Ammonnitrat nicht die Pigmentbildung hervorrufen kann, eine Erscheinung, auf die unten noch zurückzukommen ist. Bei Ammonsulfat wurde auch unter Wechsel der Kohlehydratquelle kein Pigment gebildet. Dies ist in der Hauptsache dem Umstande zuzuschreiben, daß das Salz physiologisch sauren Charakter hat, dadurch, daß der Stickstoff in Form des Ammoniaks assimiliert wird und die freiwerdende Schwefelsäure ein Wachstum und eine Pigmentbildung verhindert. Bei Kaliumnitrat (ebenso verhalten sich NaNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) hingegen wird der Stickstoff in der Nitratform assimiliert. Das Kalium muß zum größten Teil als KOH, falls der Pilz nicht selbst Säure zu dessen Neutralisation produziert, in der Lösung bleiben.

Epicoccum purpurascens ist nun, wie folgender Versuch zeigt, außerordentlich empfindlich gegen freie Säure, sehr wenig empfindlich dafür gegen Alkali. Die Pigmentbildung erfolgt in Gegenwart von Kaliumnitrat als Stickstoffquelle üppig selbst bei Zusatz von freier Schwefelsäure und wird durch Zusatz von freier Kalilauge nicht gehemmt. Bei Ammonsulfat als N-Quelle dagegen tritt die Pigmentbildung nur bei schwach alkalischer Reaktion auf und nur in ganz geringem Maße. Der Stickstoff in seiner höheren Oxydationsform ist also unzweifelhaft in der Biochemie des Pilzes ein integrierender Bestandteil für die Bildung des Pigmentmoleküls.

Die Farbstoffbildung bei der Ernährung mit Ammonsulfat in Gegenwart von freiem Alkali scheint nur sekundär zu sein, da sie nur minimal auftritt, eine Erscheinung, der wir bei den Aminosäuren als Stickstoffquelle wieder begegnen werden.

Versuchs anordnung:

Die Nährlösung enthielt bei Versuch

- a) 0,3 % KNO_3 + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % MgSO_4 5 % Dextrose (dest. Wasser)
- b) 0,3 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % MgSO_4 + 5 % Dextrose (dest. Wasser)

50 ccm dieser Lösungen wurden in 100 ccm Erlenmeyerkölbchen sterilisiert, die freie $n/10$ Schwefelsäure und $n/10$ Kalilauge wurde für sich sterilisiert und nach dem Erkalten vermittels steriler Pipetten zugesetzt.

Versuch a): KNO_3 als Stickstoffquelle.

Zugabe von ccm	Wachstum nach Tagen	Pigment nach Tagen	Reaktion bei Eintritt des Pigmentes
10 ccm $\frac{n}{10}$ KOH	1	2	alkalisch
5 " $\frac{n}{10}$ KOH	1	3	"
2 " $\frac{n}{10}$ KOH	1	3	"
1 " $\frac{n}{10}$ KOH	1	5	"
Neutral	1	5	"
1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	1	9	sauer
2 " "	1	31	"
5 " "	nach 14 Tagen	—	—
10 " "	—	—	—

Intensive
Pigment-
bildungVersuch b): $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ als Stickstoffquelle.

Zugabe von ccm	Wachstum nach Tagen	Pigment nach Tagen	Reaktion bei Eintritt des Pigmentes
10 ccm $\frac{n}{10}$ KOH	Kein Wachstum	—	—
5 " "	"	—	—
2 " "	1	9	alkalisch
1 " "	1	11	neutral
Neutral	1	—	—
1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	1	—	—
2 " "	Schwaches Wachstum	—	—
5 " "	"	—	—
10 " "	—	—	—

wenig
Pigment
farbl. Wachstum

Wie schon oben erwähnt, konnte selbst durch Ammonnitrat der Pilz nicht zur Farbstoffbildung veranlaßt werden. Dies ist insofern von Wichtigkeit, als man daraus ersehen kann, daß Epicoccum, wenn ihm Ammon und Nitrat in äquivalenten Mengen geboten wird, den Stickstoff aus der Ammonform zur Assimilation vorzieht. Man konnte ja annehmen, daß ein Nitratpilz, d. h. ein Pilz, der auf Kaliumnitrat bessere Myzelernten liefert als aus Ammonsulfat, bei Darbietung von Ammon und Nitrat nur das Nitrat assimiliert. Wie nachfolgender Versuch zeigt, ist dies nicht der Fall.

Auf KNO_3 wird Pigment gebildet, auf NH_4NO_3 tritt es nur in Spuren auf und in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bleibt die Farbstoffbildung vollkommen aus. Die Reaktion ist im ersten Falle alkalisch, in den beiden anderen Versuchen sauer (nach 14 Tagen).

Diese Beobachtung bestätigt eine von G. Ritter (23) gemachte Angabe, daß sich die als „Nitratpilze“ bezeichneten *Aspergillus glaucus*, *Mucor racemosus* und *Cladosporium herbarum* sich auf Kosten des Ammonstickstoffes mindestens ebensogut entwickeln, wie auf Kosten des Nitratstickstoffes. *Epicoccum purpurascens* zieht es also vor, den Ammonstickstoff ohne Pigmentbildung zu assimilieren, wenn ihm Nitrat und Ammon gleichzeitig geboten werden. Ob es sich bei der Pigmentbildung um die Wirkung eines Enzyms (Hydrogenase?), das den Nitratstickstoff reduziert, handelt, wagt Verfasser nicht zu entscheiden.

Versuchs anordnung:

- a) 0,3 % KNO_3 , 0,05 % KH_2PO_4 , 0,01 % MgSO_4 + 5 % Dextrose (dest. Wasser)
 b) 0,3 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, „ „ „ „ „ „
 c) 0,3 % $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, „ „ „ „ „ „

- a) Pigment nach 5 Tagen, intensivstes Wachstum,
 b) Spur von Pigment nach 8 Tagen, gutes Wachstum,
 c) kein Pigment nach 14 Tagen, schlechtes Wachstum.

Weiterhin erschien es von Wichtigkeit, die günstigste Konzentration für die Pigmentbildung bei der Zugabe von Kaliumnitrat festzustellen. Das Optimum liegt ziemlich niedrig und ist absolut kaum festzustellen. Kulturen, die auf 1000 ccm Flüssigkeit 3 g KNO_3 enthalten, was einem Stickstoffgehalt von 0,4154 g = 0,04 % entspricht, zeigen schon nach 5 Tagen Pigmentbildung, Spuren von Nitrat bei Abwesenheit anderer N-Quellen fördern die Pigmentbildung wesentlich. Der folgende Versuch zeigt, daß das Auftreten des Pigmentes durch Zusatz von N als KNO_3 in höherer Konzentration verzögert wird und die Pigmentbildung schließlich ausbleibt. Es scheint demnach in höherer Konzentration das Salz als Gift zu wirken.

Einfluß von N in verschiedenen hoher Konzentration.

Konzentration des Stickstoffs im KNO_3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1 % N.
Eintreten des Pigments nach Tagen	8	10	10	12	13	15	15	—	—	—

Die dritte Gruppe der anorganischen Stickstoffverbindungen, die Nitrite, können von *Epicoccum purpurascens* nicht als Stickstoff-

nahrung benutzt werden, es scheint sogar, als ob die Anwesenheit von Nitrit in einer 0,08 % N entsprechenden Menge giftig wirkt und das Wachstum vollkommen verhindert. W. Benecke (22) bezeichnet Nitrite für Eumyceten als gänzlich minderwertige oder vielleicht sogar als gänzlich ungeeignete Nahrung, was meine Beobachtungen für *Epicoccum* bestätigen.

Die organischen Stickstoffverbindungen.

Bei der Stickstoff-Heterotrophie ist es von hoher Wichtigkeit, ob man dem Pilz die organische Stickstoffverbindung, etwa Asparagin, als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle gleichzeitig, oder ob man ihm außer ihr noch ein Kohlehydrat als Kohlenstoffquelle zuführt. Die Betrachtungen derartiger physiologischer Vorgänge sind weit komplizierter als die verhältnismäßig einfache Ernährung durch Kohlehydrate mit anorganischen N-Quellen. Es seien zuerst Versuche besprochen, bei denen außer der N-Quelle noch Kohlehydrate (Traubenzucker) als Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurden. Schon Nägeli (24) wies für *Penicillium* nach, daß Pepton und Zucker ein bei weitem besseres Nährmittel ist, als Pepton allein. Bei nachfolgenden Versuchen wurde von Pepton, auf dem der Pilz wenig Pigment bildete, und von anderen komplizierten Eiweißverbindungen abgesehen. Es schien für eine Aufklärung, wenn sie irgend möglich war, zweckmäßiger, von den Bausteinen des so komplizierten Eiweißes auszugehen. Auch bei diesen Versuchen ist es von Wichtigkeit, die Reaktion zu beachten, da man sonst sich widersprechende Resultate erhält. Selbst die schwache Azidität der Aminosäuren bewirkt zuweilen ein Ausbleiben der Pigmentbildung. Es zeigte sich nach Neutralisation der Verbindungen, daß *Epicoccum* auf allen angewandten Aminosäuren, wie Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure (ebenso Asparagin), Glutaminsäure, Pigment bildet, ebenso auf Tyrosin, Lysin, Arginin, Harnsäure, Hypoxanthin, allerdings nicht so intensiv wie auf Nitratnahrung, keine Farbstoffbildung fand statt auf Acetamid und Guanidin. Eine Erklärung dafür zu geben, wäre etwas gewagt. Man könnte fast geneigt sein, anzunehmen, daß die von H. Pringsheim (25) bezeichnete Aminosäurerestgruppe — NH.CH.CO — auch bei der Pigmentbildung durch *Epicoccum* von Wichtigkeit wäre. Pringsheim wies nach, daß die Stickstoffnahrung die Protoplasmfunktion der Hefe und gewisser Schimmelpilze insofern beeinflusst, als sie nur dann gärfähig sind, wenn sie mit einer die Aminosäurerestgruppe — NH.CH.CO — enthaltenden Stickstoffquelle genährt werden, wobei Harnsäure sich wie Aminosäuren verhält. Acetamid und Guanidin

dagegen, welche für den Pilz ebenfalls reiche Myzelernten liefern, also als geeignete N-Quellen fungieren können, tragen nicht zur Pigmentbildung bei. Es kann sich hier jedoch nur um eine feststellende Beobachtung, daß bei bestimmten organischen Stickstoffquellen in neutraler Lösung Pigment gebildet wird, handeln. Ob tatsächlich die Pringsheimsche Gruppe von eingreifender Bedeutung für den chemischen Aufbau des Pigmentes ist, kann nicht entschieden werden, zumal bei dem Einfluß von Nitrat als N-Quelle ganz andere physiologische Momente als die hohe Oxydationsstufe des Stickstoffes in Betracht kommen. Ebenso wurde oben die Vermutung ausgesprochen, daß vielleicht die Pigmentbildung bei Ammonsulfat, wo sie nur in schwach alkalischer Lösung vorkommt, eine sekundäre sein könnte; eine Annahme, die bei den Aminosäuren eventuell auch am Platze wäre.

Versuchsordnung:

Die Lösungen enthielten in dest. Wasser 10 % Traubenzucker, 0,075 % KH_2PO_4 , 0,01 % MgSO_4 und die Stickstoffverbindung in einer 0,08 % N entsprechender Konzentration. Die Lösungen wurden sorgfältig mit Soda neutralisiert.

1. Glykokoll	Pigmentbildung
2. Alanin	„
3. Leucin	„
4. Asparaginsäure	„
5. Asparagin	„
6. Glutaminsäure	„
7. Arginin	„
8. Lysin	„
9. Tyrosin	„
10. Harnsäure	„
11. Hypoxanthin	„
12. Pepton	„
13. Acetamid	keine Pigmentbildung
14. Guanidin	„ „

Wie aus obigen Versuchen hervorging, wird bei Gegenwart von Ammon + Nitrat in der Nährlösung das Ammon zur Assimilation bevorzugt, die Pigmentbildung bleibt fast vollkommen aus. Um festzustellen, ob etwa Asparagin als Vertreter der organischen Stickstoffverbindungen imstande sei, die Pigmentbildung bei gleichzeitiger Gegenwart von KNO_3 zu verhindern, wurden nachfolgende Versuche angestellt. Das Ergebnis zeigt auch hier eine Bevorzugung

des organisch gebundenen Stickstoffes unter nur geringer Farbstoffbildung, die man, wie schon oben erwähnt, etwa als sekundäre Pigmentbildung bezeichnen könnte. Die Kontrollkultur mit Kaliumnitrat als alleiniger Stickstoffquelle war intensiv rot.

Versuch: 5 % Traubenzucker, 0,05 % KH_2PO_4 , 0,01 % MgSO_4 + a) 0,3 % KNO_3 ; b) 0,15 % KNO_3 + 0,15 % Asparagin. a) zeigte die übliche reichliche Pigmentbildung nach mehreren Tagen; b) ein besseres Wachstum als a), aber nur schwache Pigmentbildung.

Bei allen diesen Versuchen wurden außer den Stickstoffquellen verschiedener Natur noch Kohlehydrate als Kohlenstoffquellen hinzugegeben. Es wurden zur Untersuchung, ob organische Stickstoffquellen allein imstande wären, Pigmentbildung zu veranlassen, Versuche in verschiedener Richtung angestellt. Pigmentbildung trat in Nährlösungen, die 2—10 % Glykokoll, Asparagin, Alanin (+ 0,05 % KH_2PO_4 + 0,01 % MgSO_4 , neutralisiert durch Soda) enthielten, nicht ein, wohl aber bei sehr schwachem Wachstum auf Gipsblöcken, wenn diese mit der eben erwähnten Nährlösung getränkt wurden, wie schon oben im Kapitel „das Material“ erwähnt wurde. Jedenfalls befindet sich bei dieser Ernährung der Pilz in einer Art Hungerzustand, worauf sein schwaches Wachstum hinzeigt, da er auf Gipsblöcken, die gleichzeitig mit Kohlehydrat + Nährlösung getränkt wurden, reichlich und üppig Myzel bildete. Vermutlich hat der Gips durch seine Verunreinigungen mit CaO und der damit verbundenen schwach alkalischen Reaktion einen gewissen Einfluß auf die Pigmentbildung.

Myzelernte und Bildung von Alkohol unter Zugabe verschiedener Stickstoffquellen.

Die Myzelernte läßt leicht den Nährwert der verschiedenen Stickstoffquellen erkennen. In dieser Richtung haben Czapek (26) und H. Pringsheim (25) Untersuchungen mit Schimmelpilzen angestellt. Czapek stellt für *Aspergillus niger* das Gesetz auf, daß Aminosäuren für Myzelernten die förderlichsten Stickstoffquellen sind. Pringsheim bestätigte diese Beobachtung bei anderen Pilzen, wie *Rhizopus tonkinensis*, *Mucor racemosus* und *Torula V.* Als nicht diesem Gesetz folgende Ausnahme bezeichnet er *Allescheria Gayonii*, die auf anderen Stickstoffquellen ebensogut gedeiht. Für *Epicoccum purpurascens* wurde der Versuch außer mit verschiedenen organischen Stickstoffquellen auch mit Kaliumnitrat und Ammonsulfat durchgeführt, und gleichzeitig der gebildete Alkohol in der Nährlösung bestimmt. Auf Kaliumnitrat

wurde erheblich mehr Myzel gebildet als auf Ammonsulfat, weshalb wir den Pilz wohl mit Recht als „Nitratpilz“ bezeichnen können. In der Myzelausbeute auf organischen Stickstoffverbindungen erwies sich Asparagin bei weitem als beste Stickstoffnahrung, dann folgten Asparaginsäure, Harnsäure, Glykokoll, Acetamid und Alanin. Aus der Pringsheim'schen Arbeit wurden zum Vergleich mit den bei *Epicoccum* gefundenen Resultaten die Befunde für *Rhizopus tonkinensis* herangezogen, die eine auffallende Ähnlichkeit in dem Verhältnis der Myzelernten wie in dem des gebildeten Alkohols aufweisen. Für *Rhizopus tonkinensis* ist die Reihenfolge: Asparagin (optimal), Asparaginsäure, Glykokoll, Acetamid, Alanin, Harnsäure. Ebenso auffallend ist, daß durch *Epicoccum purpurascens* wie durch *Rhizopus tonkinensis* auf Glykokoll und Asparagin die größte, und zwar bei beiden N-Quellen die gleiche Menge Alkohol gebildet wurde. Dann folgen bei *Rhizopus* Asparaginsäure, Alanin, Harnsäure, bei *Epicoccum* Asparaginsäure und Alanin (gleiche Mengen), weiter Harnsäure. Auf den beiden anorganischen N-Quellen wurde durch *Epicoccum* ebensowenig Alkohol gebildet wie auf Acetamid. Aus diesen Betrachtungen geht hervor, daß sich *Epicoccum* der von Pringsheim angeführten Gruppe von Pilzen anschließt, die auf N-Quellen mit der Aminosäurerestgruppe — NH.CH.CO — die beste Ausbeute an Alkohol liefern. Der Versuch bezweckte neben diesen Feststellungen noch die Beantwortung der Frage, ob etwa die Alkoholbildung mit der Pigmentbildung in Zusammenhang zu bringen sei. Diese Frage ist unbedingt, wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, zu verneinen, da bei Ammonnahrung ebensowenig Alkohol gebildet wurde, wie bei Nitratnahrung. Dabei ist die Myzelernte von der Menge des gebildeten Alkohols unabhängig, was Pringsheim ebenfalls für mehrere Pilze nachwies.

Versuchs-anordnung:

Stickstofffreie Nährlösung, 10 % Dextrose + 0,075 KH_2PO_4 + 0,01 % MgSO_4 (dest. Wasser) wurde nach Zugabe der N-Quellen, die in einer 0,08 % N äquivalenten Menge erfolgte, durch Soda neutralisiert. Versuchsdauer 30 Tage bei ca. 20° C. 200 ccm Nährlösung in 1 l Erlenmeyerkolben.

Das Gewicht der Pilzernte wurde nach Wägungen auf getrocknetem Filter festgestellt. Zum Vergleich mit den für *Epicoccum* gefundenen Resultaten werden die für *Rhizopus tonkinensis* von H. Pringsheim (39 c) gegebenen Werte angeführt. Zu be-

merken dabei ist, daß die Pringsheimsche Kultur auf entsprechenden Nährlösungen 8 Monate alt war, was starke Verluste durch Autolyse und Atmung im Gefolge haben muß, während das überaus schnelle Wachstum von *Epicoccum* ein Resultat binnen einem Monat ermöglichte. Die Alkoholbildung durch *Epicoccum purpurascens* war in einem Vorversuch durch Destillation vermittels der Jodoformreaktion im Destillat qualitativ nachgewiesen worden.

Zur quantitativen Bestimmung wurde die äußerst scharfe Bestimmungsmethode durch Pyknometer angewandt und der Alkoholgehalt aus der Tabelle von K. Windisch (27) bestimmt.

Die Bildung von Alkohol und die Myzelernte bei verschiedenen Stickstoffquellen.

(Die Werte für *Rhizopus tonkinensis* sind der Arbeit von H. Pringsheim (25 c) entnommen.)

Art der Stickstoffquelle = 0,08 % N.	Epicoccum purpurascens		Rhizopus tonkinensis	
	g Myzel- ernte	% Alkohol	g Myzel- ernte	% Alkohol
Glykokoll	1,92	0,42	1,636	1,90
Alanin	1,54	0,26	0,801	1,29
Asparaginsäure	2,26	0,26	2,401	1,55
Asparagin	3,68	0,42	2,993	1,92
Harnsäure	1,32	0,16	0,666	1,17
Acetamid	1,45	0,11	1,187	0,10
Kaliumnitrat	2,75	0,11	—	—
Ammonsulfat	0,37	0,11	—	—

4. Der Einfluß der Reaktion.

Es ist bei Ausführungen über den Einfluß der Reaktion auf die Pigmentbildung auf das bei dem Einfluß der Stickstoffnahrung Gesagte zurückzukommen. Hier soll nur nochmals in zusammenfassender Form der Einfluß der Reaktion besprochen werden. Die Reaktion ist durch die Zusammensetzung der Nährlösung bestimmt. Ihr Einfluß kann sich auch dann äußern und von tiefgreifender Bedeutung sein, wenn von einer Nährlösung ausgegangen wird, deren Reaktion von vornherein neutral ist. Aus allen angestellten Versuchen geht hervor, daß freie Säure die Pigmentbildung verhindert, wenn *Epicoccum* auf Ammonverbindungen wie dem Sulfat,

Chlorid, Phosphat und selbst dem Nitrat kultiviert wird (vergl. das Kapitel über Einfluß der Nährsalze). Es gelingt zwar, wie oben (S. 15) gezeigt wurde, durch Gegenwart von freiem Alkali, etwa Kalilauge, eine schwache Pigmentbildung bei Ammonsulfat als Stickstoffquelle hervorzurufen. Bei Aminosäuren als Stickstoffnahrung ist das Eintreten der Pigmentbildung ohne vorherige Neutralisation der doch immerhin sehr schwachen Säuren zweifelhaft, und ist sie vorhanden, nur minimal. Sie wird deutlicher, wenn auch lange nicht so intensiv, wie bei Anwesenheit von Kaliumnitrat, wenn die Nährlösung durch Soda neutralisiert oder schwach alkalisch wird. Auf die physiologische Reaktion des Kaliumnitrats wurde schon wiederholt hingewiesen. Wichtig dabei ist, daß (wie aus obigem Versuche [S. 151] hervorgeht) bei KNO_3 als N-Quelle auch in Gegenwart freier Säure Pigment gebildet wird. Eine gewisse Bedeutung hat die Säurekonzentration sowohl für die Pigmentbildung, wie für das Wachstum. Es wird, wie die beiden Versuche auf S. 151 zeigen, das Wachstum durch die Anwesenheit von 5 ccm $n/10$ Schwefelsäure auf 50 ccm Nährlösung sowohl bei Ammon- wie Nitratnahrung fast vollkommen verhindert. Dies würde im Liter-Nährlösung einem Säuregehalt von 90,909 ccm $n/10$ $\text{H}_2\text{SO}_4 = 9,0909$ ccm n H_2SO_4 entsprechen, was sehr gering wäre. Auffallend andererseits ist es, daß der Pilz bei Nitratnahrung bei Zugabe von 10 ccm $n/10$ KOH auf 50 ccm Nährlösung noch Wachstum und intensive Pigmentbildung zeigt, während bei Ammonsulfat als N-Quelle schon bei 5 ccm $n/10$ KOH das Wachstum ausbleibt. Es ist also bei Untersuchungen auf das Verhalten von Pilzen gegen die Reaktion wohl zu unterscheiden, welche Stickstoffquelle ihnen dargeboten wird.

5. Der Einfluß des osmotischen Druckes.

Der Einfluß osmotisch wirksamer Substanzen auf die Pigmentbildung und das Wachstum von *Epicoccum purpurascens* wurde durch prozentuale Zugabe von Chlornatrium untersucht. Nach der von P f e f f e r (28) angegebenen Tabelle zur Umrechnung osmotisch wirksamer Stoffe in Atmosphären wurde für den aus untenstehender Tabelle hervorgehenden Grenzgehalt an Kochsalz für die Pigmentbildung der Wert des osmotischen Druckes bestimmt, und mit einem ebenfalls nach P f e f f e r s Tabelle ermittelten Wert, der aus einem oben (S. 145) erwähnten Versuche über den Einfluß von Dextroselösungen verschiedener Konzentration auf Pigmentbildung verglichen. Die beiden auf verschiedene Art ermittelten Werte decken sich fast vollkommen und geben bei 61,06 bis 62,50 Atmosphären die Grenze für die Pigmentbildung an.

Versuchsordnung:

5 % Dextrose, 0,3 % KNO_3 , 0,05 % KH_2PO_4 , 0,01 % MgSO_4 .

Zeit des ersten Erscheinens von Pigment bei verschiedenen osmotischen Drucken.

% NaCl nach Tagen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15
	6	8	8	9	12	14	15	18	30	,		—	—
	reichlich Pigment						wenig Pig- ment	Spur Pig- ment	kein Pig- ment	Spuren von Wachstum			

Die Tabelle zeigt, daß bei zu hohem osmotischen Druck die Pigmentbildung ausbleibt, und daß sie sich durch Steigerung desselben verzögern läßt. Wie oben festgestellt wurde, blieb bei einem Versuch mit einem Gehalt an 50 % Dextrose die Farbstoffbildung aus. Nach der in Pfeffers Pflanzenphysiologie befindlichen Tabelle ist der osmotische Druck einer Lösung, die

auf 100 ccm 1 g NaCl enthält = 6,09 Atmosphären

auf 100 ccm 1 g Dextrose enthält = 1,25 „

Die Farbstoffbildung blieb aus:

1. bei 9 % NaCl = $9 \times 6,09$ = 54,81 „+ 5 % Dextrose = $5 \times 1,25$ = 6,25 „

Sa. 61,06 Atmosphären.

2. bei 50 % Dextrose = $50 \times 1,25$ = 62,50 „

Die Grenze des osmotischen Druckes für die Pigmentbildung liegt also bei 61—62 Atmosphären.

6. Der Einfluß der Temperatur.

Der Versuch wurde im Erlenmeyerkolben (100 ccm) mit 50 ccm Nährflüssigkeit (5 % Glukose + 0,3 % KNO_3 + 0,05 % KH_2PO_4 + 0,01 % MgSO_4) in 20 Thermostaten, die Temperaturen zwischen 7 und 60°C. hielten, angestellt. Oberhalb 30°C. unterblieb jegliches Wachstum. Bei 21—26° trat nach 5 Tagen Pigmentbildung auf, bei 19—17° nach 9 Tagen, bei 16° nach 11 Tagen, bei 13° nach 15 Tagen, bei 11° nach 16 Tagen und bei 8° nach 18 Tagen bei schwachem Wachstum. Bei 30° war Wachstum eingetreten, aber Pigmentbildung konnte nicht festgestellt werden. Dieser Versuch ergibt für Kultur und Pigmentbildung von *Epicoccum purpurascens* ein Optimum zwischen 21—26°C. Durch niedrigere Temperatur kann man die Pigmentbildung, wie das Wachstum verlangsamen, mit der oberen Temperaturgrenze korrespondiert das Ausbleiben der Pigmentbildung bei 30°.

7. Der Einfluß des Lichtes.

Zu diesem Versuche kamen Lindnersche Pilzgläser, die mit Pflaumendekoktgelatine beschickt waren, zur Anwendung. Diese Gefäße erschienen mir deshalb als die geeignetsten, weil sie gestatten, das Licht von allen Seiten an die Pilzkultur gelangen zu lassen, während bei Petrischalen und anderen Gefäßen die Beleuchtung der Kultur immer einseitig ist. Als besonders die Pigmentbildung befördernd wurde schon öfters Pflaumendekoktgelatine angegeben. Diese wurde auf folgende Weise hergestellt: 500 g frische Pflaumen wurden in 1 Liter Wasser bis zum Mus gekocht, abfiltriert und zum Liter aufgefüllt, nach Zusatz von 12 % Gelatine mit Soda neutralisiert. Vier mit dieser Nährgelatine beschickte Lindnersche Pilzgläser wurden gleichzeitig geimpft. Sofort nach der Impfung wurde ein Glas in eine dicht schließende Blechbüchse, die in einen schwarzen Papierkasten gestellt wurde, gebracht. Je ein Pilzglas wurde in die blaue bzw. gelbe Sachssche Glocke und ein Glas wurde dem diffusen Tageslicht ca. 3 m vom Fenster entfernt ausgesetzt. Die Sachsschen Glocken sind doppelwandige Glasglocken, die mit farbigen Flüssigkeiten gefüllt werden und so als Lichtfilter wirken. Die blaue Glocke ist mit Kupferoxyd-Ammoniaklösung gefüllt, die gelbe mit einer Lösung von doppelchromsaurem Kali. Nach vier Tagen wurde der Versuch unterbrochen. Alle vier Kulturen zeigten gleichmäßiges Wachstum. Die Pigmentbildung war bei allen vier Versuchen gleichmäßig, bei der Kultur, die in vollkommener Dunkelheit gewachsen war, erschien sie sogar intensiver zu sein als bei den anderen. Der Versuch beweist, daß auf die Pigmentbildung bei *Epicoccum purpurascens* das Licht ohne Einfluß ist.

8. Der Einfluß verschiedener Gase.

Die wichtigste Frage hierbei ist wohl die, ob der Luftsauerstoff notwendig zur Pigmentbildung bei *Epicoccum* ist. Sie ist unbedingt zu bejahen, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Der Pilz bildet bei submersem Wachstum nie Pigment; 2. durch quantitatives Ausschalten des Sauerstoffs gelingt es, die Farbstoffbildung wie das Wachstum zu unterdrücken, ohne den Pilz dadurch zu töten, z. B. in Kohlensäureatmosphäre; 3. durch Anwesenheit von Spuren von Sauerstoff tritt sowohl Wachstum wie Pigmentbildung ein in Wasserstoff- und durch Pyrogallol möglichst von Sauerstoff befreiter Stickstoff-Atmosphäre. Für den ersten angeführten Punkt bedurfte es keiner besonderen Versuche. Auf Nährlösungen, die sonst vollkommen

zur Farbstoffbildung befähigen, wächst *Epicoccum* zunächst submers, und zwar farblos, wie zahlreiche Untersuchungen unter vielseitig wechselnden Bedingungen zeigten. Erreicht das Myzel die Oberfläche der Nährlüssigkeit, so tritt allmählich die Pigmentbildung ein. Um den Einfluß verschiedener Gase zu prüfen, wurden Lindnersche Pilzgläser, die mit Pflaumendekotgelatine beschickt waren, geimpft. Zur Untersuchung kamen Wasserstoff und Kohlensäure; weiter wurde versucht, eine sauerstoff- und kohlendensäurefreie Stickstoffatmosphäre herzustellen.

a) Der Einfluß der Kohlensäure. Die in einem Kippchen Apparat aus durch Kochen luftfrei gemachten Marmor + Salzsäure entwickelte CO_2 wurde nach Trocknen durch konzentrierte Schwefelsäure in ein wie oben beschrieben, geimpftes Pilzglas geleitet.

Nach mehrere Stunden andauerndem Durchleiten von CO_2 wurden die zu Capillaren ausgezogenen Zuleitungsrohre zugeschmolzen.

Nach acht Tagen war kein Wachstum zu bemerken. Um zu kontrollieren, ob der Pilz noch lebensfähig war, wurde der Gummistopfen kurz gelüftet, worauf binnen zwei Tagen Wachstum und Pigmentbildung eintrat. Daß CO_2 die Pigmentbildung verhindern kann, wird bei dem Einfluß von Bakterien noch zu erwähnen sein. Ein weiterer Versuch dieser Richtung

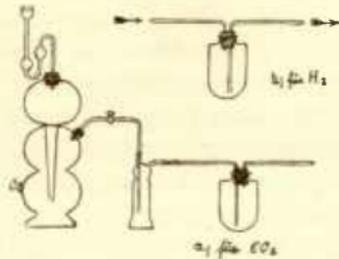


Fig. 3.

wurde mit Wasserstoffgas angestellt. Der Wasserstoff wurde im Kippchen Apparat aus Zink und Salzsäure entwickelt und durch CuSO_4 -Lösung und H_2SO_4 geleitet. Sobald die Luft vertrieben war, wurden die Zuleitungsrohre zugeschmolzen. Bei diesem Versuche zeigte sich nach fünf Tagen schwaches Wachstum und Farbstoffbildung, was wohl auf minimale Anwesenheit von Sauerstoff schließen läßt. Um eine sauerstoff- und kohlendensäurefreie Stickstoffatmosphäre zu erzeugen, bediente ich mich des auf S. 148 beschriebenen Apparates. Hierbei war die Waschflasche A mit Kalilauge (1:1) zur Absorption des CO_2 , B mit konzentrierter Schwefelsäure und C mit alkalischer Pyrogalllösung zur Absorption des O_2 angefüllt. Hinter dem Pilzglas war wiederum eine Waschflasche mit Pyrogalllösung angebracht. Eine Wasserstrahlpumpe saugte einen langsamen Luftstrom durch den Apparat. Das Pilzglas wurde sofort nach der Impfung mit CO_2 , wie oben angegeben, gefüllt und dann sofort die CO_2 vermittelst der Wasserstrahlpumpe durch einen von CO_2 und O befreiten

Luftstrom verdrängt. Darauf wurden die Zuführungsrohre zugeschmolzen.

Bei diesem Versuch trat nach mehreren Tagen Wachstum und Pigmentbildung ein, wie bei dem Versuch unter H_2 -Gas. Es ist bekannt, daß es nur schwer gelingt, bei derartigen Versuchen den Sauerstoff absolut fernzuhalten. Das Resultat der CO_2 -Atmosphäre zeigt also, daß in CO_2 -Atmosphäre das Wachstum unterbleibt, die beiden anderen Versuche können dartun, daß in einer H_2 - und N_2 -Atmosphäre selbst bei Spuren von Sauerstoff Wachstum und Pigmentbildung eintritt.

9. Die Reizwirkung durch Bakterien.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß Bakterien durch chemische oder vitale Reize auf die Lebensfunktionen anderer Pilze von Einfluß sein können. Die Erscheinung, daß Nährböden, die sonst nicht ausreichend zur Pigmentbildung eines Schimmelpilzes sind, durch die Anwesenheit anderer Pilze oder Bakterien für die Farbstoffbildung geeignet werden, wurde von D ö p e l t (29) in seiner Arbeit über Pigmentbildung bei einer nicht näher bestimmten *Penicillium*art, welche einen roten Farbstoff produziert, beobachtet. Bei meinen Untersuchungen zeigte sich, daß zahlreiche Schimmelpilze, die daraufhin geprüft wurden, auf die Pigmentbildung von *Epicoccum purpurascens* ohne Einfluß waren. Dagegen konnte bei einer spontan durch kurze Stäbchen infizierten Reiskultur (ohne besondere Zusätze) eine Farbstoffbildung beobachtet werden, wie sie sonst nur auf nitrathaltigem Reis gefunden wurde. Einer eingehenden Untersuchung in dieser Richtung stellen sich ziemliche Schwierigkeiten entgegen, da nicht ohne weiteres entschieden werden kann, ob die Ausscheidungsprodukte der Bakterien einen so integrierenden Bestandteil in der Ernährung wie das Nitrat ersetzen können, oder ob sie bloß einen vitalen Reiz ausübend, *Epicoccum purpurascens* zu einer intensiven Pigmentbildung etwa als Schutzmittel veranlassen. Es seien also nur kurz die Beobachtungen aufgeführt, ohne ihre biologische Bedeutung feststellen zu wollen. Es wurde der Einfluß folgender Bakterien in Reinkultur geprüft: Milchsäurebakterien (techn. aus dem Institut für Gärungsgewerbe), *Granulobacter polymxa* (Beijerinck), Buttersäurebakterien (4 B dickes Stäbchen), *Bacterium acetosum* (Essigsäurebakterium), *Bacillus subtilis*.

Als Nährboden diente Reis, der mit Leitungswasser im Dampftopf sterilisiert worden war. Auf die Kulturen wurde zunächst *Epicoccum* geimpft, welches auf diesem Nährboden üppig, aber nur mit sehr schwacher Pigmentbildung wächst. Nach einem Tage

wurden die Kulturen mit den verschiedenen Bakterienreinkulturen geimpft. Üppig rote Pigmentbildung veranlassen *Bacterium acetosum* und das Buttersäurebakterium (4 B dickes Stäbchen der Berliner Sammlung). Die mit Milchsäurebakterien geimpfte Kultur wurde bald gelbbraun. Auf den mit dem Heubazillus und *Granulobacter polymyxa* infizierten Kulturen wurde *Epicoccum* farblos und stellte bald sein Wachstum ein. Auf den anderen Kulturen dagegen wuchs der Pilz üppig. Die Verhinderung des Wachstums durch letztere läßt sich leicht erklären. Die Granulobakterkultur zeigte eine sehr starke Gasentwicklung. Nach W. Henneberg (30) bildet dieses Bakterium gewaltige Mengen Kohlensäure auf Getreidemaismen, neben geringen Mengen Butylalkohol (nur bei Luftabschluß), ohne Wasserstoff und Buttersäure zu entwickeln. Bei diesem Versuche ist es, wie der oben erwähnte „über den Einfluß der Kohlensäure“ beweist, nur diese, welche das Wachstum und Pigmentbildung verhindert. Der Heubazillus ruft nach Henneberg keine Gasbildung hervor, ist aber im Konkurrenzkampf mit anderen Pilzen, welche keine Säure produzieren, was bei *Epicoccum* der Fall ist, der Stärkere und pflügt auch Hefekolonien zu überwachsen. Die Versuche zeigen also, daß durch die Anwesenheit gewisser Bakterien, wie des betreffenden Buttersäurebakterium und *B. acetosum*, *Epicoccum purpurascens* zu besonders starker Pigmentbildung veranlaßt werden kann.

Versuche mit Nährgelatinen von bekannter Zusammensetzung.

Es war das Bestreben des Verfassers gewesen, festzustellen, welche Ursachen notwendig sind, *Epicoccum purpurascens* zu möglichst intensiver Pigmentbildung zu zwingen. Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um eine Nährgelatine von bekannter Zusammensetzung darzustellen, die an Stelle der sonst angewandten Pflaumendekogelatine treten könnte. Dies konnte naturgemäß erst gelingen, nachdem die ernährungsphysiologischen Bedingungen für die Pigmentbildung in jeder Beziehung klargelegt waren. Die obigen Versuche hatten einerseits gezeigt, daß die Anwesenheit von Magnesium in gewisser Konzentration und weiterhin Nitratsalze bei Abwesenheit von Ammonium und organischen N-Quellen die Pigmentbildung optimal beeinflussen. Auf der anderen Seite lag es nahe, chemische Analysen über Pflaumen heranzuziehen. Bei den Analysen organischer Stoffe fehlen meist Angaben über die Anwesenheit und den Charakter der anorganischen Stickstoffverbindungen. Ist die

zu analysierende organische Substanz, wie etwa Früchte, nitrat-haltig, so kommt dies in den quantitativen Analysen aus chemischen Gründen, die hier nicht weiter erörtert werden können, nicht zum Ausdruck. Weiter bietet es gewisse Schwierigkeiten, Nitrate in so komplizierten Gemischen organischer Substanzen, die selbst eine Färbung zeigen, wie Pflaumen, auch nur qualitativ nachzuweisen. Wie aus folgendem ersichtlich ist, konnte durch Zugabe von KNO_3 + Nährsalz + Kohlehydrat eine Nährgelatine hergestellt werden, die in jeder Beziehung dieselbe Pigmentbildung lieferte, wie die Pflaumendekoktgelatine. Gelatinen, die aus folgenden Stoffen zusammengesetzt waren:

Ammonsulfat + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten keine Färbung.

Kaliumnitrat + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten intensive Purpurfärbung.

Asparagin + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten Spuren von Färbung.

Asparagin + Kaliumnitrat + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten schwach rosa Färbung.

Es wurden also durch diese synthetischen Gelatinen die Resultate der oben angeführten Versuche, die meistens in Flüssigkeiten angestellt waren, experimentell auf festem Nährboden bestätigt. Von der Zusammensetzung der Gelatine sei nur die der nitrat-haltigen genauer angegeben. Die Synthese der anderen Gelatinen erfolgte nach demselben Rezept unter Änderung der N-Quellen.

100 g Pflaumendekoktlösung wurde verascht und ergab 0,1966 g Asche, also ca. 0,2 g, was 2,0 g für 1000 g Pflaumendekokt = etwa 1 l entspricht.

Nach K ö n i g *) enthält die Asche des Pflaumenfruchtfleisch

auf 2 g Asche
gerechnet

K_2O	69,36 % =	1,3872 g K_2O
Na_2O	2,3 % =	—
CaO	4,05 % =	—
MgO	4,86 % =	0,0972 g MgO
FeO	1,02 % =	—
P_2O_5	12,95 % =	0,2590 g P_2O_5
SO_3	2,46 % =	—
SiO_2	2,73 % =	—
Cl	0,3 % =	—

*) Vgl. K ö n i g, Chemie der menschl. Nahrungs- und Genußmittel Bd. II, S. 956.

Diese Werte wurden für ihre Verbindungen umgerechnet, und zwar das Kalium auf Mono-Kaliumphosphat, das Magnesium auf Magnesiumsulfat (+ 7 aqua). Da in der Analyse sich die Werte für Kali und Phosphorsäure nicht decken, wurde nach der vorliegenden Arbeit angenommen, daß das übrige Kali als Nitrat im Pflaumenfruchtfleisch vorhanden ist, was folgende Werte ergab: Die oben angegebene Menge Kali = 1,3872 g entspricht 1,127 g Kalium. 0,2590 g P_2O_5 entsprechen 0,4966 g KH_2PO_4 = 0,1428 g Kalium. Die Analyse hatte einen viel höheren Kaliumgehalt = 1,127 g ergeben.

Die Differenz muß also aus obigen Gründen auf KNO_3 berechnet werden:

1,127 g K — 0,1428 g K = 0,9842 g Kalium; 0,9842 g K entsprechen 2,543 g KNO_3 .

Das Magnesium wurde auf $Mg SO_4 + 7 aqua$ umgerechnet. Die berechnete Zusammenstellung ergibt an Nährsalzen pro Liter:

$$\begin{aligned} 2,5430 \text{ g} &= 0,250 \% KNO_3 \\ 0,4966 \text{ g} &= 0,049 \% KH_2PO_4 \\ 0,5937 \text{ g} &= 0,059 \% Mg SO_4 + 7 aqua. \end{aligned}$$

Zu erwähnen ist, daß diese berechnete Konzentration der Nährsalze mit der in der Arbeit gewählten, bei fast allen Nährlösungen durchgeführten Konzentration nahezu übereinstimmt.

Sie war dort: 0,3 % KNO_3 , 0,05 % KH_2PO_4 und 0,01 % $Mg SO_4 + 7 aqua$. Die berechnete Menge Nährsalze = 0,25 % KNO_3 + 0,05 % KH_2PO_4 + 0,06 % $Mg SO_4 (+ 7 aqua)$ + 5 % Kohlehydrat (2,5 % Traubenzucker + 2,5 % Maltose) + 12 % Gelatine, dest. Wasser mit Soda neutralisiert, ist ein farbloser, die Pigmentbildung von *Epicoccum purpurascens* optimal beeinflussender, fester Nährboden, der sich auch für Demonstrationskulturen des Pilzes in Lindnerschen Pilzgläsern vorzüglich eignet.

Der Farbstoff.

a) Die Gewinnung.

Epicoccum purpurascens bildet sein purpurrotes Pigment innerhalb derjenigen Hyphen, die ein gewisses Alter erreicht haben, sich in direkter Berührung mit dem Nährboden befinden und nur in Gegenwart von Luftsauerstoff. Das Lindnersche Pilzglas leistet auch hier vorzügliche Aufklärungsdienste. Betrachten wir nun eine frische Kultur in einem mit Pflaumendekoktgelatine beschickten Rollzylinder:

Die sich binnen 24 Stunden bildenden Hyphen sind zunächst farblos. Nach weiteren 24 Stunden, in denen ein neuer konzentrischer, weißer, der Gelatine anliegender Myzelring gebildet wurde, färbt sich das in den ersten 24 Stunden gebildete Myzel von der Mitte aus nach den Randzonen hin tief purpur und so geht es fort: An jedem Tage wird ein neuer weißer Myzelring außen gebildet und eine Zunahme der gefärbten Zone im Innern tritt ein. Vermutlich wird das weiße Myzel am Rande erst dann rot, wenn es beginnt, selbst für weitere Ernährung zu sorgen und die für seine Pigmentbildung notwendigen Stoffe assimiliert. Die Lufthyphen sind in Pilzglas-kulturen immer farblos. Man sieht aus diesen Beobachtungen, wie leicht es ist, mit Hilfe eines Lindnerschen Pilzglases einen tiefen Blick in die Biologie eines Schimmelpilzes zu werfen.— Es galt nun einen Nährboden zu finden, der einerseits farblos ist, andererseits die Farbstoffbildung optimal beeinflusst. Die von Lindner angewandte Methode auf möglichst vielen Plattenkulturen Pigment zu gewinnen, führt zu minimaler Ausbeute. Ein billiges, für die Pigmentbildung äußerst günstiges Material ist Zuckermelasse, die aber wegen ihrer natürlichen Farbe nicht in Betracht kommen konnte. Aus denselben Gründen wurde von der Benutzung von Pflaumendekokt abgesehen. Als vorzügliches Ausgangsmaterial erwies sich der Reis, der, durch Kochen leicht sterilisierbar, hervorragende Ausbeuten an Myzel liefert. Bei meinen ersten Versuchen erhielt ich meist nur bei ganz jungen Kulturen wenig rotes Pigment, während die alten gelb bis braun gefärbt waren. Es ist dies eine Erscheinung, auf die bei der Besprechung der chemischen Eigenschaften des Pigmentes näher einzugehen ist. Durch zufällige Infektion mit einer kurzen Stäbchenbakterie erhielt ich auf Reiskultur einmal besonders intensive Pigmentbildung. Es wurde deshalb versucht, durch Infektion mit bestimmten Reinzuchtbakterien Farbstoff zu gewinnen. Dieser Weg, der ja in der Technik der Gärungsgewerbe, wie beim Ansäuern der Brenneimaische durch Milchsäurebakterien, häufig beschritten wird, wurde aus folgenden Gründen bald wieder verlassen: Das Wachstum des Pilzes wird durch die Reizwirkungen der Bakterien stark gehemmt und nach einmaligem Abernten einer Myzeldecke gewinnen die Bakterien so die Oberhand, daß ein weiteres Wachstum von *Epicoccum purpurascens* unmöglich wird. Wie meine Versuche ergeben hatten, war Nitratnahrung sowohl durch seine physiologisch alkalische Wirkung als auch durch die chemische Beschaffenheit seines Stickstoffgehaltes besonders geeignet, die Pigmentbildung zu fördern. Weiter zeigte sich, daß Zusatz von 3 % Kochsalz wohl das Wachstum etwas hemmte, für die Pigmentbildung aber insofern von

Vorteil war, daß der rote Farbstoff sich länger hielt und sich nicht so leicht in den braungelben verwandelte. Außerdem leistet Kochsalz als Desinficiens gegen gewisse Bakterien gute Dienste.

Es wurde deshalb folgendermaßen verfahren: Reis wurde mit Leitungswasser, welchem drei Gewichtsprocente Kochsalz zugesetzt wurden, durch Kochen sterilisiert, wobei er vollkommen aufquellen muß. Naturgemäß kann es sich hierbei nur um eine praktische Sterilität handeln. Zur Anwendung kamen größere eiserne Gefäße. Sobald die Reiskörner aufgequollen waren und eine reichliche Dampfentwicklung auf Sterilität des Gefäßes schließen ließ, wurden die Behälter mit Pergamentpapier bedeckt. Nachdem Erkalten des Reises eingetreten war, wurde geimpft. Als Impfmateriale diente Myzel, das, wie bei allen anderen Versuchen, von der reingezüchteten Spore stammte. Dieses Myzel wurde in großen Jenenser Kolben (2—4 Liter fassend) in einer Nährlösung, die 10 % Dextrose 0,3 % KNO_3 , 0,05 % KH_2PO_4 und 0,01 % Mg SO_4 enthielt, gezüchtet. Das Nitrat wird dabei den Reiskulturen also nur durch das Impfmateriale zugeführt.

Das submers wachsende Myzel wurde häufig durchgeschüttelt, um eine möglichst feine Verteilung und größere Ausbeute zu erzielen. Binnen acht Tagen erhält man soviel auf diese Weise gezüchtetes Myzel, um einige Gefäße mit etwa 3600 qcm großer Oberfläche reichlich impfen zu können, indem man die Flüssigkeit mit dem Myzel über den Reis gießt. Bei vorsichtigem Impfen ist eine Infektion der Kultur so gut wie ausgeschlossen, da das Myzel geradezu rapide wächst und den Reis durch eine dichte Decke von der Infektion anderer Mikroorganismen bewahrt. Dies Verfahren gestattet es, mehrere Male die an der der Kultur zugewandten Seite intensiv purpur gefärbte Myzeldecke abzuheben und zur chemischen Untersuchung heranzuziehen.

b) Der Farbstoff.

Schon die Beobachtungen der Pilzglaskulturen hatten vermuten lassen, daß der wunderbar intensiv purpurrote Farbstoff von *Epicoccum purpurascens* von kurzer Dauer ist. Sei es, daß der Farbstoff biochemisch verändert wird, oder sei es, daß der Sauerstoff der Luft auf ihn einwirkt: Das zuerst strahlend dunkelrot erscheinende Pigment wird beim Absterben der Kultur gelbbraun und mißfarben. Die angestellten Versuche, die lediglich als Vorarbeit zu einer umfassenden Untersuchung über die chemische Natur des Pigmentes angesehen werden können, zeigten bald, daß das rote Pigment tatsächlich sich auch chemisch leicht verändert und in einen gelbbraunen

Farbstoff übergeht, der in konzentrierter Lösung bei durchfallendem Lichte allerdings auch tiefrot erscheint. Es sei zur Beschreibung des Pigmentes folgender Weg einzuschlagen: 1. das purpurrote Pigment, 2. das daraus entstehende rotgelbe Pigment und 3. der Versuch zu einem Vergleich mit anderen durch Schimmelpilze gebildeten Farbstoffen.

1. Das purpurrote Pigment.

Bei älteren Kulturen des Pilzes ist häufig zu beobachten, daß sich oberhalb der Myzeldecke kleine gelbe bis dunkelrot gefärbte Tröpfchen bilden. Diese Tröpfchen kann man mittels einer Capillare sammeln. Die gesammelte Flüssigkeit ist gelb gefärbt, selbst wenn sie auf der Myzeldecke als rot erschien. Setzt man zu dieser Flüssigkeit eine Spur Ammoniakwasser, so färbt sich diese Lösung deutlich rot.

Durch Extraktion des Myzels von möglichst jungen Kulturen mit Alkohol, Alkoholäther, Methylalkohol erhält man nach dem Filtrieren eine schön rot gefärbte Lösung, welche Fließpapier und Watte rot färbt. Durch Betupfen mit verdünnten Säuren, HCl, H₂SO₄, HNO₃, CH₃COOH, geht die rote Färbung in gelb über und diese gelbe Färbung wird durch Alkali oder Ammoniak wieder rot. Setzt man zu dem Alkoholätherauszug eine Spur konzentrierter H₂SO₄, so färbt sich die Flüssigkeit orange-gelb. Durch Zusatz von NH₃-Wasser tritt die rote Färbung wieder auf, und zwar in der über der (NH₄)₂SO₄-Lösung stehenden Alkoholätherschicht. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß es sich bei dem Farbstoff von *Epicoccum purpurascens* um eine Art Indikator handelt, der sich mit Säuren gelb, mit Alkali rot färbt. Lösungsmittel für das Pigment aus dem Myzel sind Alkohol, Methylalkohol, Alkoholäther. In Wasser ist es sehr wenig löslich, unlöslich ist es in verdünnten und konzentrierten Säuren HCl, H₂SO₄, HNO₃, CH₃-COOH, NaOH, KOH, Soda, NH₃ Wasser, in Äther, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Ligroin, und Petroläther. Die Lösungen in den erwähnten Lösungsmitteln hinterlassen nach Abdunsten derselben eine braunrote amorphe Masse, die sich zum Teil wieder in den Lösungsmitteln, aber in braunrotgelber Farbe lösen. Eine Reinigung des Farbstoffes wurde durch Kapillarisation nach Goppelsröder (31) versucht. Diese Methode beruht auf verschieden schnellem, kapillaren Emporsteigen von chemisch verschiedenen Stoffen und wurde zur Untersuchung derartiger Farbstoffe mit Erfolg angewandt. Es gelingt so durch wiederholtes Lösen und Kapillarisieren eine rein rote Lösung zu erzielen, mit der aller-

dings, da zu wenig Material vorlag, noch keine chemischen Untersuchungen vorgenommen werden konnten. Verfasser wird dieser Arbeit eine weitere über den chemischen Charakter des Pigmentes von *Epicoccum purpurascens* folgen lassen. Das Spektrum des alkalischen Auszuges des purpurroten Pigmentes wurde geprüft und mit der Angabe von Herrn Tschirch als übereinstimmend gefunden (vergl. S. 137).

2. Das braunrote Pigment.

Die purpurrote alkoholische Lösung nimmt binnen kurzer Zeit eine braunrote Färbung an, die durch Alkoholätherauszug gewonnene Lösung erst nach einigen Wochen. Diese Lösungen färben nicht mehr rot auf Watte und Fließpapier, sondern braungelb, zeigen vor allem auch den Farbenschlag mit Säuren und Alkali nicht mehr. Sie erscheinen in konzentrierter Lösung bei durchscheinendem Licht tiefrot. Dies läßt darauf schließen, daß der rote Farbstoff sich leicht chemisch verändert und in einen braunroten übergeht. Alte Kulturen des Pilzes ergeben bei Extraktion nur diese braunrote Lösung. Die Lösungsmittel sind dieselben, wie für das purpurrote Pigment. Vielleicht ließe sich auf Umwegen über den braunroten Farbstoff die Natur des purpurroten feststellen. Versuche in dieser Richtung wurden zahlreich unternommen, aber bisher ohne eigentlichen Erfolg. Zu erwähnen ist, daß der braunrote Farbstoff in alkohol-ätherischer Lösung in etwas alkalischen, gesättigten H_2O Salzlösungen ($(NH_4)_2SO_4$ + Spur NH_3) unlöslich ist und im Scheidetrichter leicht von der Salzlösung getrennt werden kann. Dabei scheiden sich Verunreinigungen (etwa Eiweiß) aus. Die nun konzentrierte Lösung kann durch Zusatz von sehr viel Äther, in dem das Pigment, wie oben erwähnt, unlöslich ist, weiter eingengt werden. Diese Lösung ergibt beim Eindampfen auf dem Wasserbad eine amorphe, braunrote Masse, die fast unlöslich ist in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Toluol, Ligroin und Petroläther. Leicht löslich ist dieser Rückstand in Äthyl- und Methylalkohol, in Eisessig, schwerer in Amylalkohol und Aceton, und zwar bei durchscheinendem Licht mit tieferer Farbe, die auf Filtrierpapier und Watte braungelb färbt. Das Spektrum dieser Lösung zeigt sich übereinstimmend mit dem durch Prof. Tschirch (s. a. S. 137) untersuchten alkoholischen Lösungen aus alten Kulturen des Pilzes. Kristalle konnten trotz vorsichtigem Verdunstenlassen dieser Lösungen nicht erhalten werden.

Zusammenfassend wäre über das Pigment von *Epicoccum purpurascens* also folgendes zu sagen: Der rote Farbstoff ist an der

Vergleichende Tabelle der bisher bearbeiteten roten Farbstoffe von Schimmelpilzen.

Zeichenerklärung: L = löslich; U = unlöslich, S = schwer löslich, — keine näheren Angaben.

Die Namen der Pilze in alphabetischer Folge	Die Farbstoffbildung wurde bearbeitet von	Die Wirkung der Reaktion auf den Farbstoff		Die Löslichkeit des Farbstoffes:							Andere Lösungsmittel und sonstige Bemerkungen
		Sauer	Alkal.	Wasser	Äther	Alkohol	Methylalkohol	Chloroform	Säure	Alkali	
1. Aspergillus purpurascens	Van den Dries (32)	rot	violett	—	—	—	—	—	—	—	unlöslich in konzent. H ₂ SO ₄ .
2. Erregerdes „Cowpea“	Smith (33)	„	farbl.	—	—	L	—	—	—	—	wahrscheinlich identisch mit 11.
3. Epicoccum purpurascens	Verfasser	gelb	rot	S	U	L	L	U	U	U	Der rote Farbstoff geht leicht in einen braunroten über, der einen Farbumschlag nicht mehr zeigt.
4. Eurotiosis Gayonii	Laborde (34)	—	„	—	—	—	—	—	—	—	Bei schwach saurer Reaktion rot. Bei alten Kulturen geht das Rot in Orange über.
5. Fusarium a und b	Bessey (35)	rot	blau	U	L	L	—	L	L	U	Der rote Farbstoff ist löslich in Benzol, Chloralhydrat, geschmolzenem Paraffin, seine blaue Form nur in sauren Lösungsmitteln.

Die Namen der Pilze in alphabetischer Folge	Die Farbstoffbildung wurde bearbeitet von	Die Wirkung der Reaktion auf den Farbstoff		Die Löslichkeit des Farbstoffes:							
		Sauer	Alkal.	Wasser	Äther	Alkohol	Methyl-alkohol	Chloroform	Säure	Alkali	Andere Lösungsmittel und sonstige Bemerkungen
6. <i>Fusarium Culmorum</i>	Bessey (35)	gelb	rotviolett	S	U	L	—	S	—	S	Löslich in alkoholischem Kali, wenig in H ₂ O Kalilösung.
7. <i>Fusarium hordei</i>	Van den Dries (32)	rot	violett	—	—	U	—	U	—	—	
8. <i>Fusarium von Malz</i>	Klein (36)	gelb	rot	S	—	U	—	—	—	—	Etwas löslich in warmem Wasser.
9. <i>Fusarium polymorphium</i>	Matruchot (37)	rot	„	—	—	—	—	—	—	—	Der Farbstoff ist bläulich grün und wird durch Säure rot.
10. <i>Monascus purpureus</i>	Went(38), Ueda(39), Boorsma (40), Prinsen Geerlings (41)	orange rot	„	—	—	—	—	—	—	L	«-Oryzaerubin fluoresziert grün in NH ₃ -Lösung. Konzentriertes H ₂ SO ₄ gibt rotbraune, starke HCl und HNO ₃ orangerote Färbung.
11. <i>Neocosmospora vasinfecta</i>	Bessey (35)	rot	violett	U	L	L	—	L	L	U	S. Bemerkungen für <i>Fusarium a</i> und b. S. Bemerkungen für 2.
12. <i>Penicillium rot</i>	Döpelt (29)	„	—	—	—	—	—	—	—	—	
13. <i>Physomyces heterosporus</i>	Harz (42)	gelb(?)	gelb(?)	—	—	L	—	—	—	—	Die rote alkoholische Lösung fluoresziert grün.
14. <i>Sterigmatocystis versicolor</i>	Coupin und Friedel (15)	„	rot	—	—	L	—	—	—	—	

Luft sehr wenig haltbar und geht leicht in einen braunroten über. Das rote Pigment wird durch Säure gelb und durch Alkali wieder rot, welche Eigenschaft das aus ihm entstandene braunrote Pigment nicht mehr zeigt. Die Lösungsmittel für beide Pigmente sind dieselben. Es scheint als ob der Übergang des roten Farbstoffes in den braunroten auch im Inneren der Pilzhyphen vor sich geht, da alkoholische Auszüge von jungen Kulturen ein anderes Spektrum geben als diejenigen von alten.

3. Versuch zu einem Vergleich mit den Pigmenten anderer Schimmelpilze.

Da uns die Kenntnis der chemischen Natur dieser Pflanzenfarbstoffe so gut wie ganz abgeht, so fordern doch gewisse Ähnlichkeiten, besonders die des Farbenumschlages bei vielen Pigmenten von Schimmelpilzen, zu einem Vergleich heraus. Der besseren Übersichtlichkeit halber wird die Tabellenform gewählt, in welche die Namen der Bearbeiter der Pigmentbildung aufgenommen sind, weiter die wichtigsten Lösungsmittel und die Färbung unter dem Einfluß von Säure und Alkali.

Ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß die meisten Farbstoffe der niederen Pilze durch die Reaktion beeinflußt werden. Damit ist allerdings kaum eine Erklärung ihres chemischen Charakters gegeben. Es ist aber zu hoffen, daß bei genauem Studium nur eines dieser Pigmente das der anderen erleichtert wird. Den Farbenwechsel von rot in gelb durch Säure und von gelb in rot durch Alkali ist vorhanden bei *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium* von Malz (roter Malzschimmel), *Sterigmatocystis versicolor*. Einen Farbenumschlag von rot in violett-blau durch Alkali und von violett-blau in rot durch Säure zeigen *Aspergillus purpurascens*, *Fusarium* a und b (Bessey), *Fusarium hordei*, *Neocosmospora vasinfecta*. Andere Pigmente, wie die der Monascusarten, *Monascus purpureus* und *Physomyces heterosporus*, haben gewisse Ähnlichkeiten miteinander, falls die beiden Pilze nicht identisch sein sollten. Es soll also hiermit nicht behauptet werden, daß diese Farbenwechsel auf eine gleiche chemische Natur der Pigmente schließen lassen, sondern es soll nur eine offensichtliche Analogie festgestellt werden, die weiteren Bearbeitungen etwa als Grundlage dienen könnte.

Zusammenfassung.

Die Bildung des roten Pigments von *Epicoccum purpurascens* Ehrenberg läßt sich durch seine Ernährungsphysiologie beliebig regeln.

1. Notwendig für die Farbstoffbildung ist die Anwesenheit von Magnesium in gewisser Konzentration.
2. Die Anwesenheit von bestimmten Kohlehydraten, Monosen, oder gewisser Polyosen befördert die Pigmentbildung bei anorganischer Stickstoffnahrung, wie Nitraten, nicht bei Ammonnitrat. Die Bildung von Diastase wurde nachgewiesen.
3. Von tiefgreifendem Einfluß ist die Stickstoffnahrung. Vor allem ist es die Zugabe von Nitratsalzen wie KNO_3 , $Mg(NO_3)_2$, $Ca(NO_3)_2$, mit Ausnahme von NH_4NO_3 , welche die Pigmentbildung optimal beeinflusst. Es ist dabei sowohl der Einfluß der physiologisch alkalischen Wirkung der genannten Nitratsalze, wie der Einfluß der hohen Oxydationsstufe der Stickstoffverbindung, wie experimentell bewiesen wurde.
4. Es gelingt auch auf anderen Stickstoffquellen, wie Ammon-sulfat, und organischen Stickstoffverbindungen (Aminosäuren), eine Pigmentbildung des Pilzes hervorzurufen, die allerdings nur sehr schwach ist und als sekundär bezeichnet werden kann, vorausgesetzt, daß die Reaktion neutral ist. Die intensive, durch Nitrat veranlaßte Pigmentbildung bleibt in Gegenwart anderer, leichter assimilierbarer Stickstoffquellen, wie Ammonsalzen oder Aminosäuren, aus.
5. Die Reaktion ist durch den Charakter der Ernährung bestimmt. Sie verhindert bei Acidität die Pigmentbildung und fördert sie bei Alkalität. Es gelingt auf Kaliumnitrat als N-Quelle enthaltendem Nährboden auch bei saurer Reaktion Pigmentbildung hervorzurufen.
6. Durch hohen osmotischen Druck wird Pigmentbildung wie Wachstum unterbunden, ebenso fallen die Temperaturgrenzen für das Wachstum mit denen der Pigmentbildung zusammen. Der Farbstoff wird unabhängig vom Tageslicht gebildet. In CO_2 Atmosphäre wird Wachstum und Pigmentbildung unterdrückt, während beides in fast sauerstoffreier Wasserstoff- und Stickstoffatmosphäre eintritt. Gewisse Bakterien können die Farbstoffbildung befördern und für die Pigmentbildung unzureichende Nährböden zu genügenden machen.

7. Die Resultate der meist in Nährlösungen ausgeführten Versuche wurden durch Nährgelatinen bestimmter Zusammensetzung in jeder Beziehung bestätigt.
8. Die chemische Natur des Pigmentes konnte nicht festgestellt werden. Das rote Pigment wird durch Säure gelb und durch Alkali wieder rot, es ist löslich in Methyl- und Äthylalkohol. Der rote Farbstoff geht leicht in ein rotbraunes Pigment über. Eine beigegefügte Tabelle zeigt gewisse Ähnlichkeiten des Pigmentes mit anderen früher untersuchten Farbstoffen von niederen Pilzen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der biologischen Abteilung des Institutes für Gärungsgewerbe, Berlin, unter Leitung des Herrn Professor Dr. Paul Lindner ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Lindner meinen besten Dank für die lebenswürdige Leitung meiner Studien und die Überlassung zahlreicher einschlägiger Literatur zu sagen.

Literaturverzeichnis.

1. Ehrenberg, Sylvae Mycol. Berolinenses. 1818 p. 12.
2. Link, Mag., Ges. Naturf. Fr. Berlin VII 1816. p. 32.
3. Lindau, G., Rabenhorsts Kryptog. Flora. Leipzig 1909. Abt. IX p. 595.
4. Saccardo, Syll. IV 736.
5. Lindner, P., Die bisher. Schimmelpilzforschung am Institut. f. Gärungsgewerbe. Wochenschr. f. Brauerei 1908, Nr. 12 und 13.
6. Saito, K., Journal of the College of Science, Tokyo Vol. VIII. 1904 p. 1 ff.
7. van Iterson jr., Verslagen der Koninklyke Akademie van Wetenschappen 1903. Deel XI p. 699 ff.
8. Lindner, P., Mikroskop. Betriebskontrolle i. d. Gärungsgewerben. 5. Aufl. 1909 p. 380.
9. — Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1887. Bd. 5 Heft IV p. 155.
10. Saida, K., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1901. Bd. 19 p. 107.
11. Lafar, techn. Mykologie. Bd. III p. 12.
12. Benecke, W., Unters. über den Bedarf der Bakterien an Mineralstoffen. Botan. Ztg. 1907. Heft 1.
13. Pringsheim, H., und Góza Zemplén. Hoppe-Seylers Zeitschrift 1909. Bd. 62 Heft 5 und 6.
14. Samkow, S., Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 1903. Bd. 11 p. 305.
15. Coupin et Friedel, C. R., Acad. d. Sc. Paris T. CXXXVIII. p. 1118. 1904.
16. Kossowicz, Alex, Zeitschr. f. d. Landw. Versuchswesen Österreichs 1903. Bd. 6 p. 27.

17. Fischer, E., Kohlehydrate und Fermente. Berlin 1909.
18. Beijerinck, Bot. Ztg. 1890. Bd. 48. S. 725.
19. Jost, L., Biolog. Zentralbl. 1900 Bd. 20 S. 625.
20. Koch, Lafar, Kreislauf des Stickstoffs, Lafar. Bd. III p. 11.
21. Zikes, H., Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Wien mathem. naturw. Klasse. Bd. CXVIII. Abt. I. Juli 1909.
22. Benecke, W., in Lafars Handbuch. Bd. I. p. 402.
23. Ritter, G., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. XXVII 1909, Heft 10.
24. Nägeli, C. von, Untersuchungen über niedere Pilze. München-Leipzig 1882, p. 67.
25. a) Pringsheim, H., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39 p. 4048. 1906.
b) — Biochem. Zeitschrift. Bd. 3 p. 121. 1907.
c) — Biochem. Zeitschrift. Bd. VIII p. 119. 1908.
26. Czapek, Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 1, 538; 2, 557; 3, 47; 1902/03.
27. Windisch, K., in W. Windisch, das chem. Laboratorium des Brauers.
28. Pfeffer, W., Pflanzenphysiologie. II. Aufl. p. 128.
29. Döpel, Annal. Mycol. Vol. 7. 1909 p. 315—338.
30. Henneberg, W., Gärungsbakteriell. Praktikum. Berlin 1909.
31. Goppelsröder, Fr., Capillaranalyse. Basel 1901.
32. van den Dries, La Cellule. Tome 13, fasc. 2 p. 415—446. 1897.
33. Smith, E. F. Bulletin Nr. 17. Division of Vegetable Physiology and Pathology. U. S. Department of Agriculture. Washington 1899.
34. Laborde, J., Thèse présentée à la Faculté de Sciences de Paris. 1896.
35. Bessey, Flora od. Allgem. Bot. Ztg. 1904. Bd. 93 Heft IV p. 301 ff.
36. Klein, Mitteilungen der österreichischen Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei in Wien, Heft 5 p. 38—44. Wien 1892.
37. Matruchot, L., Recherches sur le développement de quelques Mucédinées. Thèse prés. à la Faculté d. Sciences de Paris 1892.
38. Went, Ann. d. Sci. Nat. Bot. Sér. 8. T. I p. 1 ff. 1895.
39. Uyeda, Bot. Magazine. Vol. 15 Nr. 178, 1901, Vol. 16 Nr. 179. 1902.
40. Boorsma, W. G., Bydrage tot de Kennis van ang Khak. Geneeskundig Tydschrift vor Nederlandsch-Indie Deel XXXV p. 415—435. Batavia 1895.
41. Prinsen Geerlings, H. C., Ang-Khak, ein chinesis. Pilzfarbstoff, Chemiker-Ztg. XIX Nr. 57 p. 1311. 1895.
42. Harz, Botanisches Centralblatt, Bd. 41 p. 378—379, 405—411. 1890.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Hedwigia](#)

Jahr/Year: 1912

Band/Volume: [51 1912](#)

Autor(en)/Author(s): Naumann Carl W.

Artikel/Article: [Epicoccum purpurascens und die Bedingungen für seine Pigmentbildung. 135-175](#)