

# Untersuchungen über die Physiologie eisenspeichernder Hyphomyceten.

Von  
Rudolf Lieske.

Mit 3 Textfiguren.

## Einleitung.

Bei meinen Untersuchungen über das Vorkommen der Eisenbakterien in der Natur fiel mir wiederholt in eisenhaltigen Gewässern eine üppige Vegetation von Pilzhyphen auf. Ähnliche Pilzhyphen beobachtete ich oft in Rohkulturen von Eisenbakterien. Die einzelnen Pilzfäden gaben mit Ferrocyankalium und Salzsäure behandelt ähnlich wie die Eisenbakterien eine starke Eisenreaktion, zuweilen zeigten sie sogar eine beträchtliche Inkrustation mit Eisenoxydhydrat.

Da die untersuchten Gewässer meist einen sehr geringen Gehalt an organischer Substanz aufwiesen, war in ihnen die üppige Pilzvegetation außerordentlich auffällig, zumal die Zahl anderer Mikroorganismen verhältnismäßig klein war. — Ich machte es daher zu meiner Aufgabe, die Ursachen dieser Erscheinung näher zu untersuchen.

Die in der Natur in eisenhaltigen Wässern vorkommenden Pilzarten, deren Hyphen eine Eiseninkrustation erkennen lassen, oder die eine deutliche Eisenreaktion geben, bezeichne ich in nachstehender Arbeit als „Eisenpilze“.

## Das Vorkommen der Eisenpilze in der Natur.

Über das Vorkommen von eisenspeichernden Pilzen habe ich in der mir vorliegenden Literatur nur beiläufige Andeutungen gefunden [vergl. Peklo (1) und Adler (1)]. Adler gibt an, daß

er eiseninkrustierte Pilzhyphen in einer ganzen Anzahl von medizinisch verwerteten Eisenwässern gefunden hat.

Zum ersten Male und am auffälligsten bemerkte ich das Auftreten der Eisenpilze in einer stark eisenhaltigen Quelle in der Nähe des Völkerschlachtendenkmals bei Leipzig. Die Quelle befindet sich auf freiem Felde und fließt durch einen ungefähr 50 cm breiten Graben ab. Der Boden des Grabens ist mehrere Zentimeter hoch mit einer rostbraunen Masse bedeckt, die, wie die mikroskopische Untersuchung ergibt, aus mechanisch ausgefallenem Eisenoxydhydrat und zum großen Teile aus einem dichten Gewirr von Pilzhyphen besteht. An hervorragenden Steinen, Holzstückchen, ins Wasser ragenden Grashalmen usw. sieht man im Wasser in großer Zahl mehrere Zentimeter lange flutende Zotten von rostbrauner Farbe, die fast ganz aus Pilzhyphen bestehen.

In geringerer Menge fand ich Eisenpilze in einer großen Anzahl von mir untersuchter Eisenwässer. Eigentümlich ist, daß ich in Eisenwässern, die größere Massen von Eisenbakterien (z. B. *Spirophyllum* oder *Leptothrix*) enthielten, Eisenpilze nur sehr spärlich oder gar nicht gefunden habe.

### Herstellung von Reinkulturen.

Bei genauer mikroskopischer Betrachtung der Pilzhyphen bemerkte ich, daß bei weitem die Hauptmasse anscheinend einer Art angehörte, daneben konnte ich vereinzelt einige andere Formen feststellen. Ich bemühte mich nun, die Pilze in Reinkultur zu erhalten. Die Versuche mißglückten zunächst, da in den Kulturen immer eine bestimmte Art säurefester Bakterien auftrat. Schließlich gelang die Reinkultur sehr leicht in einer Nährlösung, die neben den üblichen Salzen 0,5 %  $\text{Fe SO}_4$  enthielt. Füllt man mit dieser Nährlösung Glaskolben ungefähr 5 mm hoch und gibt eine kleine Flocke von den Pilzhyphen hinein, so wachsen die Pilze sehr bald an die Oberfläche und bilden Conidien, aus denen man ohne weiteres Reinkulturen herstellen kann.

Mehr als 0,5 %  $\text{Fe SO}_4$  zuzugeben, ist nicht ratsam, da zwar dann die Eisenpilze noch ebenso gut wachsen, aber weniger leicht Conidien bilden. Für viele im Wasser vorkommende, nicht eisenspeichernde Pilzarten wirkt das Eisensulfat in dieser Konzentration zwar nicht abtötend, aber doch so stark hemmend auf das Wachstum, daß man die Eisenpilze ohne jede Schwierigkeit isolieren kann.

Es gelang mir auf diese Weise drei Pilze zu isolieren, einen *Citromyces* und zwei *Mucor*-ähnliche Arten. Bei einigen Bemühungen dürfte es aber leicht gelingen, noch eine ganze Reihe anderer Eisenpilze zu finden.

Die isolierte *Citromyces*-Art ist außerordentlich verbreitet, ich konnte sie in fast allen Eisenquellen finden. Die anderen Formen treten nur seltener und in weit geringerer Menge auf. Da sich außerdem zeigte, daß der *Citromyces* sich für physiologische Versuche besser eignete, weil er besser wuchs und auf Nährlösungen gute Decken bildete, wurde diese Art allein für die im folgenden beschriebenen Versuche verwendet. Mit den anderen Arten nachträglich angestellte Versuche ergaben, daß sie ähnliche physiologische Eigenschaften besitzen.

Die Nährlösung hatte in allen zunächst beschriebenen Versuchen folgende Zusammensetzung:

500 g	H <sub>2</sub> O	dest.
25 g	Rohrzucker	
2,5 g	N H <sub>4</sub> Cl	
0,25 g	Mg SO <sub>4</sub>	
0,25 g	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

Nur Abweichungen von dieser Zusammensetzung und besondere Zusätze sind bei jedem einzelnen Versuch angegeben.

Die Lösung enthält einen relativ großen Prozentsatz von Nährsalzen, und zwar deshalb, weil die Gewichte der getrockneten Ernte von 100 ccm Nährlösung oft über 2 g betragen, und die hohe Konzentration, wie Versuche ergaben, in keiner Weise nachteilig war.

Je 100 ccm der Nährlösung wurde in flache, möglichst gleich große Glaskolben von 10 cm Durchmesser gegeben. Die Nährlösung hatte also eine geringe Tiefe, aber eine große Oberfläche. Die Kolben wurden mit Watte verschlossen und im Dampfsterilisator sterilisiert. Enthält die Nährlösung Eisen zugesetzt, so fällt hierbei stets ein Niederschlag von phosphorsaurem Eisen aus, der sich aber beim Wachstum des Pilzes durch die gebildete organische Säure wieder löst. Nach dem Impfen wurden die Kulturen im Wärmezimmer auf einer Temperatur von 25 ° Celsius gehalten. Die Versuchsdauer betrug, wo nicht anders angegeben, immer 10 Tage.

Hierauf wurde die Pilzdecke abgehoben und sorgfältig auf einem vorher getrockneten und abgewogenem Filter mit destilliertem

Wasser ausgewaschen und dann bei ungefähr 105° getrocknet. Nach dem Erkalten im Exsiccator wurde das Trockengewicht der Pilzdecke festgestellt. Die für das Trockengewicht angegebene Zahl ist meist das Mittel aus zwei oder drei Vergleichskulturen.

Im ganzen Verlaufe dieser Arbeit habe ich nie eine wesentliche Differenz der Erntegewichte gleich angesetzter und unter gleichen äußeren Bedingungen gehaltener Kulturen feststellen können. [Vergl. hierzu Kunstmann (1), bei dem die Abweichungen das 2 bis 5fache des Trockengewichtes erreichten].

### *Citromyces siderophilus*. n. spec.

Der Pilz, mit dem die folgenden Versuche angestellt worden sind, ist wegen seiner morphologischen und physiologischen Eigenschaften als eine *Citromyces*-Art anzusehen. Er ist morphologisch von *C. Pfefferianus* schwer zu unterscheiden, besitzt aber wesentlich andere physiologische Eigenschaften. Für Aufklärungen über die systematische Stellung des Pilzes bin ich Herrn Prof. P. Magnus-Berlin zu Dank verpflichtet.

Im Folgenden gebe ich eine Beschreibung der charakteristischen Merkmale des Pilzes, den ich wegen seiner Fähigkeit, Eisen zu speichern *Citromyces siderophilus* nenne. In der Natur findet er sich in eisenhaltigen Wässern, bildet hier auf dem Boden oder an hervorragenden Gegenständen festgeheftete, mehrere Zentimeter lange, flutende Zotten von rostbrauner Farbe. Die Hyphen sind stets im Wasser untergetaucht und haben einen Durchmesser von ungefähr 3  $\mu$ . Die einzelnen Pilzfäden sind meist mit einer dicken, die Stärke des Fadens oft übertreffenden Eisenkruste überzogen, aber auch wenn eine Eiseninkrustation nicht direkt zu erkennen ist, geben sie eine deutliche Eisenreaktion. Irgend welche Fruktifikationsorgane habe ich an natürlichem Material nicht feststellen können.

In Nährlösung mit 5% Rohrzucker und den üblichen anorganischen Salzen kultiviert zeigt der Pilz ein wesentlich anderes Aussehen. Das Mycel bildet an der Oberfläche eine feste zusammenhängende Decke von schneeweißer Farbe. Nach einigen Tagen treten Conidien auf, die Decke erhält hierdurch eine grüne Farbe, die nach mehreren Wochen in Grau übergeht. Am Ende der unverzweigten Conidienträger, die manchmal bei älteren, auf festem Substrat gewachsenen Kulturen, wie bei *C. Pfefferianus* und *C. glaber* blasig verdickt sind, befindet sich eine geringe Anzahl,

meist 4—8 Sterigmen, die eine lange Reihe von Conidien abschneiden. Der Durchmesser der Conidien beträgt ungefähr 3  $\mu$ . Ascusfrüchte konnten bisher nicht beobachtet werden.

Auf gewöhnlicher 10% Nährgelatine ist der Pilz von *C. Pfefferianus* und *C. glaber* leicht zu unterscheiden. Er bildet ein dichtes Mycel von schneeweißer Farbe, die grünen Conidien treten erst relativ spät auf. *C. Pfefferianus* und *C. glaber* entwickeln ein weniger dichtes Mycel, die Farbe ist nicht so weiß, die Conidien werden früher gebildet. *C. siderophilus* verflüssigt 10% Gelatine nicht.

*C. siderophilus* bildet wie die anderen bisher bekannten *Citromyces*-Arten aus dem Rohrzucker der Nährlösung Zitronensäure, unterscheidet sich aber von diesen wesentlich dadurch, daß er imstande ist, unter gewissen Umständen Eisen zu speichern und durch sein Verhalten gegen Eisensalze, das im Folgenden näher beschrieben wird.

Der Pilz scheint, wie schon erwähnt wurde, weit verbreitet zu sein. Ich konnte ihn aus fast allen untersuchten eisenhaltigen Wässern isolieren.

#### Kulturen ohne Zusatz von Eisen.

*Citromyces siderophilus* findet sich in der Natur in eisenhaltigen Wässern. Die Pilzhyphen enthalten immer größere Mengen von Eisen. Es wurde nun versucht, den Pilz in der angegebenen Nährlösung ohne Eisenzusatz zu kultivieren. (So geringe Spuren von Eisen, die jeder Organismus zu seinem Gedeihen braucht, sind erfahrungsgemäß in jeder Nährlösung enthalten, die aus als chemisch rein bezeichneten Salzen und destilliertem Wasser hergestellt ist.)

Es zeigte sich ein normales Wachstum, wie wir es bei ähnlichen Schimmelpilzen finden. Auch auf einer Reihe anderer fester und flüssiger Substrate wuchs der Pilz ohne Eisenzusatz ganz normal.

Das Erntegewicht der Pilzdecke betrug in der angegebenen Nährlösung nach 10 Tagen bei 25° C 0,747 g.

Aus dem Versuch geht hervor, daß *C. siderophilus*, der in der Natur in Eisenwässern vorkommt, den Überschuß von Eisen zu seinem Gedeihen nicht nötig hat, sondern in organischer Nährlösung, die nur ganz geringe Spuren von Eisen enthält, wie viele andere Pilze gedeiht.

#### Kulturen mit Zusatz von Eisensalzen.

Es wurde nun versucht, festzustellen, ob das Eisen überhaupt einen Einfluß auf das Wachstum von *C. siderophilus* ausübt. Daß

geringe Mengen von Eisensulfat und anderen Metallsalzen auf das Wachstum gewisser Schimmelpilze fördernd wirkt, ist bereits durch die Untersuchungen von Raulin (1), Richards (1) und Gößl (2) bekannt.

Zu der angegebenen Nährlösung wurden je 0,5 g Eisenoxydulsulfat und schwefelsaures Eisenoxydulammon gegeben. (Die Nährlösung enthielt also, da immer 100 ccm angewendet wurden, 0,5 % des betreffenden Salzes.) Das Gewicht der getrockneten Ernte betrug mit

Eisenoxydulsulfat . . . .	1,534 g,
Eisenamonsulfat . . . .	1,698 g.

Da das Erntegewicht unter sonst gleichen Bedingungen ohne Eisen 0,747 g betrug, so ergibt sich, daß durch Zusatz der erwähnten Salze eine beträchtliche Vermehrung der Ernte verursacht wird.

Zum Vergleich wurde festgestellt, wie sich andere Schimmelpilze in der 0,5-proz. Eisensulfat-haltigen Nährlösung verhalten. Die Versuche werden angestellt mit *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *Citromyces glaber* und *C. Pfefferianus*. Nach 10 Tagen war bei *Aspergillus* und *Penicillium* ein Wachstum noch nicht zu bemerken, bei *C. glaber* und *Pfefferianus* war eine ganz geringe Entwicklung eingetreten. Nach einigen Wochen wurde schließlich in allen Kulturen eine dünne Pilzdecke gebildet, die aber nicht den zehnten Teil des Erntegewichtes von *C. siderophilus* erreichte und auch weit geringer war als das Erntegewicht der betreffenden Pilze in derselben Nährlösung ohne Eisenzusatz.

Es ergibt sich also, daß ein Zusatz von 0,5 %  $\text{FeSO}_4$ , der bei den Eisenpilzen eine beträchtliche Vermehrung des Trockengewichtes herbeiführt, bei den anderen untersuchten Schimmelpilzen stark hemmend wirkt. Die Eisenpilze stellen mithin eine Gruppe von Schimmelpilzen dar, die sich physiologisch durch ihre Anpassung an für andere Arten giftig wirkende Mengen von Eisenoxydulsulfat auszeichnen.

### Salze anderer Metalle.

Durch die Versuche von Richards (1) ist bekannt, daß eine ganze Reihe anderer Metallsalze in meist sehr geringen Quantitäten zur Nährlösung gegeben, bei gewissen Schimmelpilzen eine Vermehrung des Erntegewichtes verursacht. Um festzustellen, wie größere Mengen dieser Salze auf den Eisenpilz wirken, wurde zu

der angegebenen Nährlösung je 0,5 g des betreffenden Metallsalzes zugesetzt.

Für die untersuchten Metalle ergaben sich folgende Erntegewichte:

MnSO <sub>4</sub> . . .	1,909	
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . . .	1,596	
ZnSO <sub>4</sub> . . .	1,309	
CaSO <sub>4</sub> . . .	0,671	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . .	0,518	
CuSO <sub>4</sub> . . .	} Geringe Mycelentwicklung Trockengewicht kleiner als 1 mg	
Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . . .		
CoSO <sub>4</sub> . . .		
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . .	Geringe Mycelentwicklung, Trockengewicht kleiner als 1 mg	
CdSO <sub>4</sub> . . .	} Kein Wachstum.	
NiSO <sub>4</sub> . . .		

Von MnSO<sub>4</sub> ist durch die Untersuchungen von Göbl (1) bekannt, daß es wachstumfördernd auf Schimmelpilze wirkt und auch in größeren Quantitäten nicht giftig ist. Interessant sind die Kulturen Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> und ZnSO<sub>4</sub>. Aluminiumsulfat hat nach den Untersuchungen von Richards (2) keinen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Schimmelpilze, während Zinksulfat nach seinen Untersuchungen [Richards (3)] in mehr als 0,05-proz. Lösung entschieden giftig wirkt. Auf der Zinklösung wuchs das Mycel von *Citromyces siderophilus* in Form von runden Körnern von ungefähr 1 mm Durchmesser, eine Conidienbildung trat nicht ein.

Der Zusatz von 0,5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und CaSO<sub>4</sub> hat auf das Erntegewicht keinen merklichen Einfluß, es entspricht ungefähr dem Gewicht, das auf der Nährlösung ohne Zusatz von Metallsalz erzielt wurde.

Der Versuch zeigt, daß *Citromyces siderophilus* nicht nur gegen die chemische Giftwirkung der Eisensalze, sondern auch vor allem gegen Zinksulfat weit resistenter ist als die meisten anderen Schimmelpilze.

### Eisenoxyd und Oxydulsalze.

Um zu untersuchen, welche Oxydationsstufe der Eisensalze für die Förderung des Wachstums geeigneter ist, wurden Kulturen mit je 0,5 % von verschiedenen Eisenoxyd- und Oxydulsalzen angesetzt. Es ergeben sich folgende Erntegewichte:

Schwefels. Eisenoxydul . . .	1,527 g
„ Eisenoxyd . . .	1,555 g
„ Eisenoxydulammon .	1,557 g
„ Eisenoxydammon .	1,538 g
Eisenchlorür . . . . .	1,386 g
Eisenchlorid . . . . .	1,231 g

Die Trockengewichte der auf Oxyd und Oxydulsalzen gewachsenen Pilzdecken zeigen keinen beträchtlichen Unterschied. Die Differenzen liegen innerhalb der Abweichungsgrenzen, die bei unter gleichen Verhältnissen gewachsenen Kulturen beobachtet werden. Es liegt also der Schluß nahe, daß Eisenoxyd- und Oxydulsalze in gleicher Weise wachstumsfördernd wirken. Weitere Versuche ergaben jedoch, daß dieser Schluß durchaus nicht zutreffend ist.

Um festzustellen, bei welcher Konzentration der Eisensalze der Pilz das höchste Erntegewicht ergibt, wurden der angegebenen Nährlösung verschiedene Mengen von Eisenoxyd- und Oxydulsalzen zugesetzt. Es wurden folgende Erntegewichte erzielt:

%	Fe SO <sub>4</sub>	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
0,01	1,223 g	0,712 g
0,1	1,309 g	0,737 g
0,5	1,439 g	1,497 g
1	1,569 g	1,386 g
2,5	1,680 g	—
5	1,719 g	—
10	1,756 g	—
20	0,956 g	—

Die Dauer des vorstehenden Versuches betrug 14 Tage. Die Erntegewichte der Kulturen mit Zusatz von Eisenoxydsulfat zeigen ein gleichmäßiges Ansteigen mit der Konzentration des Eisensalzes. Bei 20 % Fe SO<sub>4</sub> ist eine Abnahme des Gewichtes zu bemerken, die aber wohl wesentlich nicht auf einer chemischen Giftwirkung des Eisensulfats beruht, sondern eine Folge der hohen Konzentration ist. — Bei 10 und 20 % Fe SO<sub>4</sub> war eine Conidienbildung nicht zu beobachten.

Aus dem gleichmäßigen Ansteigen des Erntegewichtes mit der Konzentration kann jedoch nicht gefolgert werden, daß die stärkeren Konzentrationen des Eisensalzes das Wachstum mehr begünstigen als die schwächeren. Da Schimmelpilze auf stärkeren Konzentrationen langsamer wachsen als auf schwächeren, war die Versuchs-

dauer auf 14 Tage verlängert worden. Die Pilzdecken auf den niederen Konzentrationen hatten in dieser Zeit ihr Höchstgewicht bereits überschritten, das Gewicht war wieder geringer geworden [vergl. Kunstmann (2)].

Anßerdem ist noch ein anderer Faktor zu berücksichtigen. Es wurden mit Hilfe von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  oder  $\text{KNO}_3$ , die, wie Versuche ergeben hatten, keinen merklichen Einfluß auf das Wachstum des Pilzes ausüben, isotonische Lösungen zur Konzentrationsreihe des Eisensulfats hergestellt. Es zeigte sich, daß auch hierin innerhalb gewisser Grenzen mit steigender Konzentration eine Steigerung des Erntegewichtes eintrat. Dies beruht offenbar darauf, daß die Pilzhypphen, um sich auf einen höheren Turgorwert einzustellen, Salze aus der Nährlösung aufnehmen, die dann bei der getrockneten Ernte eine entsprechende Gewichtsvermehrung verursachen. Auf die Menge des Kohlenstoffgehaltes der Pilzernte dürfte diese Gewichtsvermehrung kaum einen Einfluß haben. Mit  $\text{KNO}_3$  isotonisch gemachte Nährlösungen mit 0,1 %, 1 %, 10 % und 20 % Ferrosulfatgehalt ergeben wenig abweichende Erntegewichte. Das Optimum der Wirkung des Eisensulfates liegt ungefähr bei 1 %.

Die Erntegewichte, die auf eisenoxydsulfathaltigen Kulturen erzielt wurden, weichen beträchtlich von den bisher beschriebenen Resultaten ab. Mengen bis ungefähr 1 % zeigen eine deutliche Wachstumsförderung des Pilzes, bei 2 % wird das Wachstum bereits eingestellt. (Zu beobachten ist hierbei noch, daß 1 g Oxydsulfat osmotisch gleichwertig ist mit 0,695 g Oxydulsulfat).

Daß geringe Mengen von Eisensalzen auf das Wachstum von Schimmelpilzen fördernd wirken, größere dagegen giftig, ist bereits für Eisenoxydulsulfat durch die Untersuchungen Richards bekannt. *Citromyces siderophilus* reagiert also auf Eisenoxydsalze ähnlich, wie andere Schimmelpilze auf Oxyd- und Oxydulsalze reagieren. Die Eisenpilze besitzen demnach eine hohe Anpassung an die Giftwirkung der Eisensalze nur für Oxydulverbindungen.

Ein ganz ähnliches Resultat wurde erzielt mit schwefelsaurem Eisenammonoxyd- und Oxydul.

Die Chlorverbindungen des Eisens wirken im allgemeinen weit giftiger auf Schimmelpilze als die schwefelsauren Verbindungen, anscheinend wegen der Giftigkeit des Chlorions. Die Erntegewichte sind daher mit diesen Salzen auch bei *Citromyces siderophilus* im Durchschnitt ein wenig geringer. Eine Conidienbildung trat nur bei niederen Konzentrationen des Chlorürs ein.

Zu der üblichen Nährlösung wurden molekular gleiche Mengen von Eisenchlorür und Eisenchlorid zugesetzt (Mol.-Gew.  $\text{Fe Cl}_2 = 127$ ,  $\text{Fe}_2 \text{Cl}_6 = 325$ ). Das Resultat war ähnlich wie bei den vorher untersuchten Salzen.

Mol	$\text{Fe Cl}_2$	$\text{Fe}_2 \text{Cl}_6$
$\frac{1}{1000}$	0,452 g	0,384
$\frac{1}{100}$	0,502 g	1,481
$\frac{1}{10}$	1,471 g	—
$\frac{1}{2}$	1,358 g	—
1	1,261 g	—

Wir sehen aus dieser Versuchsreihe wieder die Anpassung des Eisenpilzes an Eisenoxydulsalze und erkennen die Giftwirkung der Oxydsalze.

Es ist nun eigentümlich, daß die Oxydsalze, die entschieden eine chemische Giftwirkung auf *Citromyces siderophilus* ausüben, in geringer Konzentration fast in derselben Weise wachstumsfördernd wirken wie die Oxydulsalze. Diese Erscheinung erklärte sich im Verlaufe der Untersuchungen auf sehr einfache Weise dadurch, daß in der angewendeten Nährlösung stets ein kleiner Teil des zugesetzten Oxydsalzes durch einen rein chemischen Prozeß reduziert wird, also auch dann, wenn die Nährlösung nicht geimpft ist. Bei stärkeren Konzentrationen überwiegt die Giftwirkung des Oxydsalzes so sehr, daß ein Wachstum überhaupt nicht eintritt.

So einfach es erscheint, eine Nährlösung herzustellen, die nur Eisen in Oxydform enthält, ohne Spuren von Oxydulsalz, so ist mir dies trotz vieler Bemühungen nicht gelungen. Organische Eisenverbindungen, z. B. Saccharate, in denen das Eisen nicht in Form von Ionen vorhanden ist, kommen für die Untersuchung nicht in Betracht, da hierbei Ferro- und Ferrisalze in geringen Mengen nicht als solche erkannt werden können. Außerdem zeigte sich später, daß nicht dissociierte Eisensalze fast keinen Einfluß auf das Wachstum haben. Versuche, das Eisenoxydul in den Kulturen durch Einleiten von Sauerstoff oder auf andere Weise zu oxydieren, mißlangen. Schließlich zeigte sich, daß alle diese Bemühungen überhaupt zwecklos waren, da mit dem Wachstum des Pilzes stets eine Reduktion des Eisenoxydes verbunden ist, was später ausführlich beschrieben wird.

Der vorstehende Versuch zeigte also, daß Ferrosalze eine chemische Giftwirkung auf *Citromyces siderophilus* in keiner Weise ausüben, daß dagegen Ferrisalze bereits in verhältnis-

mäßig geringer Konzentration so giftig sind, daß das Wachstum unterbleibt. Die Oxydulsalze haben außerdem innerhalb gewisser Grenzen anscheinend unabhängig von der Konzentration einen wachstumsfördernden Einfluß. Ob die Oxydsalze in geringer Konzentration wachstumsfördernd wirken, konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist dies aber nicht ausgeschlossen, da ja auch von anderen giftigen Metallsalzen nachgewiesen ist, daß sie in starker Verdünnung das Erntegewicht von Schimmelpilzen erheblich vermehren können.

### Verschiedene Stickstoffquellen.

In den beschriebenen Kulturen wurde dem Pilz als Stickstoffquelle Chlorammonium geboten. Um zu untersuchen, ob anstatt des Chlorammoniums auch Nitrate verarbeitet werden, wurde der Nährlösung Kalisalpeter zugesetzt. Das Erntegewicht betrug mit

0,5 % K NO <sub>3</sub> + 0,5 % Fe SO <sub>4</sub>	. 1,275 g
0,5 % K NO <sub>3</sub>	. . . . . 0,693 g

Es ist also in der Kultur mit Eisensulfat etwas geringer als das Erntegewicht in derselben Nährlösung mit NH<sub>4</sub> Cl als Stickstoffquelle. In den Kulturen ohne Eisenzusatz war ein merklicher Unterschied der Ernten mit Salmiak oder Salpeter als Stickstoffquelle nicht festzustellen. Nitrate sind also geeignet, dem Pilz als gute Stickstoffquelle zu dienen. Mit Pepton als Stickstoffquelle wurden folgende Resultate erzielt:

0,5 % Pepton + 0,5 % Fe SO <sub>4</sub>	. 1,050 g
0,5 % Pepton	. . . . . 0,625 g

Aus Pepton kann *Citromyces siderophilus* demnach etwas weniger gut seinen Stickstoffbedarf decken. Mit Asparagin als Stickstoffquelle zeigten die Kulturen ohne Eisen ein noch geringeres Wachstum. In Kulturen mit Eisen unterblieb das Wachstum vollständig, da das Asparagin mit dem Eisen reagiert und einen unlöslichen Niederschlag bildet. Die Kulturen mit Harnstoff als Stickstoffquelle werden später beschrieben.

*Citromyces siderophilus* kann demnach seinen Stickstoff am besten aus Ammonsalzen gewinnen, Nitrate und organische Stickstoffverbindungen können ebenfalls, aber etwas weniger gut, als Stickstoffquelle dienen.

### Verschiedene Kohlenstoffquellen.

Alle bisher beschriebenen Kulturen enthielten als Kohlenstoffquelle 5 % Rohrzucker. Um die Reizwirkung des Eisenoxyduls bei Gegenwart anderer organischer Kohlenstoffquellen festzustellen, wurden zu der üblichen Nährlösung verschiedene organische Substanzen zugesetzt, die mit und ohne Eisenzusatz (0,5 % Fe SO<sub>4</sub>) folgende Ernte ergaben:

5 g Traubenzucker + Fe . . . . .	1,522
5 g Traubenzucker . . . . .	0,839
5 g Glycerin + Fe . . . . .	1,009
5 g Glycerin . . . . .	0,143
3 g Chinasäure + Fe . . . . .	0,975
3 g Chinasäure . . . . .	0,841
3 g Bernsteinsäure + Fe . . . . .	0,788
3 g Bernsteinsäure . . . . .	0,460
0,2 ccm Alkohol + Fe . . . . .	0,122
0,2 ccm Alkohol . . . . .	0,009

Chinasäure und Bernsteinsäure wurden als freie Säuren zugegeben, da es sich zeigte, daß bei Neutralisation derselben die Ernte geringer war.

Essigsäure, Zitronensäure und Milchsäure ergaben, in Form von Salzen zugesetzt, ein sehr geringes Wachstum. Die Erntegewichte betragen nur wenige Milligramme. Die Kulturen mit Eisenzusatz zeigten aber in allen Fällen eine deutliche Wachstumsförderung.

Eine Reihe anderer organischer Substanzen konnte für die Untersuchungen nicht verwendet werden, da sie sich mit der Eisensulfatlösung zersetzten, auch wenn die Substanzen getrennt sterilisiert wurden.

Der Versuch zeigt, daß die Reizwirkung des Eisens nicht bei allen organischen Nährlösungen gleich groß ist. Bei Chinasäure als Kohlenstoffquelle ist die Ernte mit Eisenzusatz nur ein wenig größer als ohne Eisen, bei Glycerin beträgt sie ungefähr das siebenfache, bei Alkohol das zwölfwache.

Daß die Größe der Reizwirkung der Metallgifte abhängig ist von der Zusammensetzung der Nährlösung wurde von (Gößl (1) für Mangansalze nachgewiesen.

### Organische Eisensalze.

Die Wirkung organischer Eisensalze als Kohlenstoffquelle wurde ebenfalls näher untersucht. Zu der Nährlösung wurden je 0,5 % des betreffenden Eisensalzes gegeben. Angewendet wurden essigsaures Eisen, zitronensaures Eisen, Eisenammoncitrat und milchsaures Eisen. Die Erntegewichte betragen wenige Milligramm und kamen ungefähr denen gleich, die in Kulturen erhalten wurden, welche die betreffende organische Säure mit 0,5 % Eisenoxydulsulfat in der Nährlösung enthielten.

### Der Einfluß des Eisenoxyduls bei Gegenwart geringer Mengen organischer Substanz in der Nährlösung.

Um die Wirkung des Eisenoxyduls bei Anwesenheit geringerer Mengen organischer Substanz in den Kulturen zu untersuchen, wurden zu der üblichen Nährlösung mit und ohne 0,5 % Eisenoxydulsulfat, Rohrzucker, Traubenzucker und Glycerin in Mengen von je 0,5—0,01 % zugesetzt. Die eisenfreien Kulturen wurden mit den entsprechenden Kulturen von gleichem Gehalt an organischer Substanz mit  $\text{KNO}_3$  isotonisch gemacht, um Erntegewichtsunterschiede, die eventuell auf den verschiedenen osmotischen Druck der Lösungen zurückzuführen sein könnten, zu vermeiden.

Für die Kulturen mit Rohrzucker als Kohlenstoffquelle ergaben sich folgende Erntegewichte.

Rohrzucker %	Ernte
0,5 + Fe . . . . .	0,223
0,5 . . . . .	0,097
0,1 + Fe . . . . .	0,078
0,1 . . . . .	0,022
0,01 + Fe . . . . .	0,008
0,01 . . . . .	0,001

Von 0,1 % organischer Substanz an abwärts wuchsen die Hyphen submers und bildeten keine Conidien.

Bei 0,5 % Rohrzucker wird das Erntegewicht durch Eisenzusatz auf mehr als das doppelte gesteigert, bei 0,1 % auf das dreifache und bei 0,01 % auf mehr als das fünffache. Mit Traubenzucker und Glycerin wurden ähnliche Resultate erzielt.

Es geht aus dem Versuch hervor, daß die Wachstumsförderung durch das Eisensulfat mit der Abnahme der Nährlösung an organischer Substanz zunimmt. Das ist wichtig für die Erklärung

des Vorkommens der Eisenpilze in natürlichen Eisenwässern, die nur geringe Spuren organischer Substanz enthalten.

### Die Eiseninkrustation der Pilzhyphen.

In natürlichen Gewässern wächst *Citromyces siderophilus* immer untergetaucht, die Hyphen sind sehr lang und weisen verhältnismäßig wenige Verzweigungen auf. Die Membran der Pilzfäden ist wie bei den Eisenbakterien (*Crenothrix*, *Clonothrix* usw.) durch starke Eiseneinlagerung rostbraun gefärbt und stark verdickt. Conidien oder andere Fortpflanzungsorgane konnte ich an natürlichem Material nie feststellen.

In den bisher beschriebenen Kulturen wuchs der Pilz meist auf der Oberfläche der Nährlösung, das Mycel war von schneeweißer Farbe und bildete auf nicht zu stark eisenhaltigen Nährlösungen nach kurzer Zeit reichlich blaugrüne Conidien. Im allgemeinen war er wenig von den üblichen Flüssigkeitskulturen von *Penicillium glaucum* zu unterscheiden. Das Aussehen des Pilzes in natürlichen Gewässern und in Kulturen war so verschieden, daß es einige Mühe kostete, festzustellen, daß der kultivierte Pilz wirklich der in Betracht kommende Eisenpilz war. Daß beim sorgfältigen Impfen mit unter dem Mikroskop genau untersuchtem Rohrmaterial immer wieder dieselbe Pilzform erhalten wurde, war natürlich kein Beweis für die Identität der Arten.

Versuche, aus den erhaltenen Conidien die eisenhaltige Hyphenform zu kultivieren, waren lange Zeit ohne Erfolg, sie gelangen erst im späteren Verlaufe der Arbeit, womit nun zweifellos feststand, daß die beiden Hyphenformen derselben Pilzart angehörten.

Die inkrustierten Pilzhyphen wurden zuerst auf folgende Weise erhalten. In ein Becherglas von 500 ccm Inhalt wurden ungefähr 300 ccm destilliertes Wasser und geringe Mengen anorganischer Nährsalze gegeben. Außerdem wurden noch 1,5 g mit Alkohol ausgefälltes Eisenoxydulsulfat zugesetzt. (Zu den meisten anderen Versuchen wurde umkristallisiertes Eisensulfat verwendet.) Das Glas wurde hierauf unter eine Glocke mit kohlenensäurehaltiger Luft gesetzt, nachdem die Lösung mit Sporen von *Citromyces siderophilus* geimpft worden war. Nach einigen Tagen bildeten sich auf dem Boden und an den Wänden des Gefäßes große Flocken von Pilzhyphen, die dem in der Natur vorkommenden Eisenpilz vollkommen gleich waren. Nach längerem Stehen zeigten die Fäden

eine starke Eiseninkrustation, die Hyphen erreichten hierdurch mehr als das Dreifache ihrer ursprünglichen Dicke.

Der Versuch war eine Voruntersuchung zur Entscheidung der Frage, ob *Citromyces siderophilus* fähig ist, wie *Spirophyllum ferrugineum* CO<sub>2</sub> zu assimilieren [vgl. Lieske (1)]. Die Resultate dieser Untersuchungen werden später mitgeteilt, hier sei nur erwähnt, daß bei diesem Versuch der Pilz offenbar seinen Kohlenstoff aus den Spuren organischer Substanz nahm, die in dem ausgefüllten Eisenoxydulsulfat enthalten waren.

Später gelang es auf andere Weise noch besser, die inkrustierte Hyphenform in Reinkultur zu erhalten. In einer Nährlösung, welche

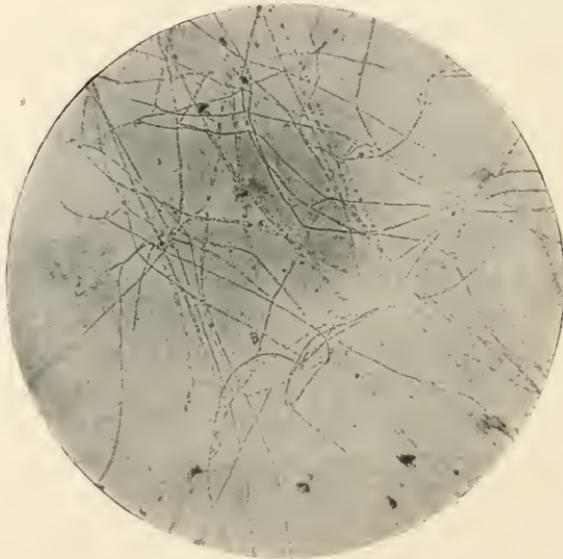


Fig. 1.

Hyphen von *Citromyces siderophilus* aus Reinkultur ohne Inkrustation.

die angegebenen anorganischen Salze enthält, und als Kohlenstoffquelle 1 % Harnstoff und 0,01 % Rohrzucker, wachsen die Hyphen submers und nehmen nach kurzer Zeit eine starke Eiseninkrustation an. Wesentlich für die Inkrustation ist hierbei anscheinend der Harnstoff.

Es tritt aber nicht in allen Kulturen, die Harnstoff enthalten, eine Inkrustation ein. Bei höherem Gehalt an Zucker oder anderen, gut nährenden organischen Substanzen wächst der Pilz ganz normal an der Oberfläche, ohne Eisen zu speichern. Gibt man dem Pilz Harnstoff als Stickstoffquelle, so wächst er ebenfalls ganz normal

ohne Inkrustation, der Harnstoff bietet eine ziemlich gute Stickstoffquelle. Harnstoff allein ohne geringe Mengen anderer organischer Substanzen ergibt nur Spuren von Wachstum, so daß sich nicht sicher entscheiden läßt, ob dieses Wachstum auf Kosten des Harnstoffes oder schwer vermeidbarer Verunreinigungen erfolgt.

Gibt man als Kohlenstoffquelle sehr geringe Mengen organischer Substanz und ungefähr 1% Harnstoff, so entsteht auf dem Boden des Kulturgefäßes ein dichtes Gewebe von inkrustierten Hyphen. In einer Kultur, die 0,01 g Rohrzucker und 1 g Harnstoff enthielt, betrug das Trockengewicht einer solchen Pilzernte,



Fig. 2.

Schwach inkrustierte Hyphen aus Reinkultur mit Harnstoff.

die vorher zur Beseitigung des Eisenoxyhydrates mit verdünnter Salzsäure behandelt worden war, 0,0126 g. Der Harnstoff ist also anscheinend mit als Kohlenstoffquelle verwertet worden, denn es wurde im Verlaufe der Untersuchungen niemals ein Erntegewicht erzielt, das größer gewesen wäre als die zugesetzte Menge organischer Substanz.

Es liegt nun die Erklärung nahe, daß die Inkrustation dadurch verursacht wird, daß der Pilz dem Harnstoff Kohlenstoff entzieht und das freiwerdende Ammoniak das Eisen als Hydrat ausfällt. Das ist aber sicher nicht der Fall; denn in Kulturen, die anstatt

Eisensulfat Mangansulfat oder Calciumsulfat enthielten, war eine Inkrustation mit Mangan oder Calcium nicht zu beobachten. In den Ca-haltigen Kulturen bildeten sich Kristalle von zitronensaurem Calcium. Außerdem trat in den zuerst beschriebenen Kulturen, die keinen Harnstoff enthielten, ebenfalls eine Inkrustation ein. Später wurden die inkrustierten Hyphen noch erhalten in Kulturen, die essigsäures Natrium oder Blätterdekokt als Kohlenstoffquelle enthielten.

In allen Fällen, in denen eine deutliche Inkrustation erzielt wurde, stand dem Pilz nur eine schlechte Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Mit 0,01 % Rohrzucker und Harnstoff, essigsäurem Natrium oder Blätterdekokt als Kohlenstoffquelle zeigte der Pilz ohne Eisenzusatz nur ein ganz minimales Wachstum, während bei Eisenzusatz unter Inkrustationserscheinungen eine relativ große Masse Hyphen erzielt wurde.

Die Inkrustation tritt also ein, wenn der Pilz auf eine schlechte Kohlenstoffquelle angewiesen ist. Die Annahme, daß sie auf Bildung von Alkali aus der als Kohlenstoffquelle zugesetzten organischen Substanz der Nährlösung beruht, ist durch die beschriebenen Untersuchungen nicht begründet. Alle Kulturen, in denen die Hyphen Eisen gespeichert hatten, zeigten saure oder neutrale, niemals alkalische Reaktion. Die Kulturen, in denen die inkrustierten Hyphen erhalten wurden, kommen den Lebensbedingungen der Eisenpilze in der Natur nahe, da sie wie die Eisenwässer sehr wenig und schlecht verwertbare organische Substanz enthielten.

### Sind die Eisenpilze fähig, Kohlensäure zu assimilieren?

Die Eisenpilze sind in der Natur makroskopisch von Eisenbakterien schwer zu unterscheiden. Sie leben wie diese in Eisenwässern, die nur sehr geringe Mengen organischer Substanz enthalten. Da es gelungen war nachzuweisen, daß es Eisenbakterien gibt, die ihren Kohlenstoff aus organischer Kohlensäure gewinnen können, lag der Gedanke nahe, daß dies bei den Eisenpilzen auch der Fall sei. [Vergl. Lieske (1)]. Die Versuche wurden ähnlich wie mit *Spirophyllum ferrugineum* angesetzt. Es trat jedoch kein Wachstum ein. Bei grob angestellten Versuchen, zu denen mit Alkohol ausgefälltes Eisensulfat verwendet worden war, entwickelten sich inkrustierte Pilzhypen, bei Anwendung von unkristallisiertem Eisensulfat unterblieb jedoch die Entwicklung. Der Pilz hatte

offenbar die Spuren organischer Substanz, die in dem Eisen enthalten waren, als Kohlenstoffquelle verwertet. Eine Reihe weiterer Versuche blieb ebenfalls ohne Erfolg.

Nach verschiedenen analytischen Methoden wurde der Gehalt des Wassers an organischer Substanz in der erwähnten Eisenquelle, in der *Citromyces siderophilus* in großen Massen auftritt, genau untersucht. (Untersuchungsmethoden von Schulze-Trommsdorff und von Kabel.) Das Wasser enthält nur so geringe Spuren von organischer Substanz, daß dieselbe auf chemischem Wege nur schwer nachzuweisen ist. Da die Untersuchungen wiederholt zu verschiedenen Jahreszeiten mit demselben Erfolge ausgeführt wurden, so ist auch nicht anzunehmen, daß der Gehalt des Wassers an organischer Substanz wesentlichen Schwankungen unterworfen ist.

Daß die Pilze ihren ganzen Kohlenstoffbedarf aus diesen minimalen Spuren von organischer Substanz decken können, ist sehr wohl möglich. Der Nachweis der Kohlensäureassimilation durch Eisenpilze ist jedenfalls nicht gelungen.

### Die Reduktion der Eisensalze.

In den bisher beschriebenen Versuchen hatte es sich gezeigt, daß ein Zusatz von Eisenoxydulsalzen zur Nährlösung eine bedeutende Förderung des Wachstums verursacht; geringe Mengen von Eisenoxydsalzen hatten dieselbe Wirkung, größere dagegen waren stark giftig. Es fragt sich nun, ob und in welcher Weise die Oxydationsstufe dieser Salze durch das Wachstum des Pilzes verändert wird.

Eisenoxydsalze wurden qualitativ nachgewiesen mit Rhodankalium, Eisenoxydulsalze mit frisch gelöstem Ferricyankalium. Beide Reaktionen sind außerordentlich empfindlich und gestatten kolorimetrisch auch brauchbare quantitative Vergleichswerte.

Die Nährlösung aller Kulturen, zu denen Eisenoxydulsalze zugesetzt worden waren, zeigte, nachdem ein gutes Wachstum eingetreten war, eine reine Oxydulreaktion. Oxydionen ließen sich in der Lösung nicht nachweisen. Nachdem die Pilzdecke entfernt worden war, gab die Nährlösung nach längerem Stehen an der Luft oder auch sofort beim Schütteln mit Luft im Reagenzglas eine deutliche Oxydreaktion. Mit gleicher Nährlösung angesetzte Kulturen von *Aspergillus niger*, *Citromyces Pfefferianus* und *Penicillium glaucum* gaben, nachdem ein Wachstum eingetreten war, neben der Oxydulreaktion eine deutliche Oxydreaktion. Dasselbe war an der

erwähnten Nährlösung zu konstatieren, die unter gleichen Verhältnissen steril aufbewahrt worden war.

Es ergibt sich also, daß durch das Wachstum von *Citromyces siderophilus* das Eisenoxydul in der Nährlösung verhindert wird, sich zu oxydieren, was unter normalen Verhältnissen teilweise der Fall ist.

Enthält die Nährlösung einen Zusatz von Eisenoxydsalzen (Chlorid, Sulfat, Eisenammonsulfat), so tritt bis zu einer Konzentration von ungefähr 1 % des Eisensalzes wie mit Oxydulsalzen ein gutes Wachstum ein. Nach einiger Zeit zeigt dann die Nährlösung ebenso wie bei den vorher beschriebenen Kulturen eine reine Oxydulreaktion. Das Eisenoxyd ist also vollständig zu Oxydul reduziert worden. Dieselbe steril gehaltene Nährlösung mit Oxydzusatz zeigt nach einiger Zeit auch eine schwache Oxydulreaktion. Die gelösten Stoffe, wahrscheinlich die organische Substanz der Nährlösung, reduzieren einen geringen Teil des Eisenoxyds. Die Hauptmasse des Eisens bleibt jedoch als Oxydsalz erhalten.

In gut gewachsenen Kulturen wird das zugesetzte Eisenoxyd so weit reduziert, daß nach Zusatz von Rhodankalium nicht die mindeste Rotfärbung zu beobachten ist, während mit Ferricyankalium sofort ein voluminöser, tiefblauer Niederschlag auftritt. Nimmt man einige ccm von der reduzierten Nährlösung in ein Reagenzglas und schüttelt sie mit Luft, so tritt nach Zusatz von Rhodankalium eine deutliche Rotfärbung ein.

Trägt man in die übliche Nährlösung mit 5 % Rohrzucker frisch gefälltes Eisenoxydhydrat ein, so löst sich dieses in ziemlich beträchtlicher Menge, da es sich mit dem Zucker zu wasserlöslichem Eisensaccharat verbindet. Die sterile Nährlösung gibt mit Rhodankalium oder Ferricyankalium keine Reaktion, da das Eisen nicht in Form von Ionen in der Lösung enthalten ist. Nachdem sich *Citromyces siderophilus* auf dieser Nährlösung einige Zeit entwickelt hat, tritt dissoziiertes Oxydulsalz auf, dessen Menge mit fortschreitendem Wachstum zunimmt. Der Vorgang ist leicht erklärlich; da der Pilz nur den organischen Bestandteil des Saccharats verbraucht, bleibt das Eisen als anorganisches Salz zurück, wird wie in den vorher beschriebenen Kulturen reduziert und gibt nun, da es ionisiert ist, die Oxydulreaktion.

Es wurde nun versucht, die Ursachen dieses Reduktionsprozesses näher zu untersuchen. Es fragt sich, ob die Reduktion in den Pilzhypphen selbst vor sich geht, oder ob der Pilz die Nährlösung so verändert, daß in dieser die Reduktion stattfindet.

Zur Entscheidung der Frage, ob das Eisen innerhalb der Pilzhypen reduziert wird, wurde eine Pilzdecke im Frischgewicht von ungefähr 35 g, die auf einer 1% Eisensulfat-haltigen Nährlösung gewachsen war, sorgfältig durch Auswaschen mit destilliertem Wasser von der anhaftenden Nährlösung befreit. Hierauf wurde die Pilzdecke unter Zusatz von wenig Wasser in einem Porzellanmörser zu einem feinen Brei zerrieben und auf ein Filter gebracht. Sowohl das Filtrat als auch der Rückstand gaben nach dem Ansäuern mit Salzsäure nur eine sehr schwache Eisenreaktion.

Hieraus konnte noch nicht gefolgert werden, daß die Hypen nicht größere Mengen von Eisen enthielten, da dasselbe in Form von organischen Verbindungen in nicht dissoziiertem Zustande darin enthalten sein konnte. Es wurde daher eine andere Pilzdecke nach dem Zerreiben nach Art der toxikologischen Untersuchungen in einen Zerstörungskolben gebracht, die organische Substanz wurde mit Chlor zerstört und das Filtrat der Analyse unterworfen. Es ließen sich hierbei nur ganz geringe Spuren von Eisen nachweisen. Wenn das Eisen also innerhalb der Hypen reduziert wird, so könnte das Oxydsalz nur in sehr geringer Menge eintreten, und das Oxydulsalz müßte schnell wieder ausgeschieden werden.

Es liegt nun die Annahme nahe, daß die Pilzhypen ein Enzym ausscheiden, das die Eisensalze in der Nährlösung reduziert. Man müßte dann dieses Enzym dadurch erhalten können, daß man es aus frischen Hypen auspreßt. Eine starke Pilzdecke wurde zu diesem Zwecke zu einem feinen Brei zerrieben und mit Wasser oder mit Alkohol ausgezogen. Sowohl der alkoholische als auch der wässrige Auszug gaben zu einer Lösung von Ferrisalz und Ferricyankalium zugesetzt nach einiger Zeit einen starken blauen Niederschlag. Es ist aber nicht anzunehmen, daß es sich hierbei um eine sogenannte Reduktase handelt, da der Pilzsaft keine der Reaktionen gibt, die für die Reduktasen charakteristisch sind.

Das Reduktionsvermögen des Pilzsaftes wird durch Kochen nicht zerstört, organische Farbstoffe werden nicht reduziert, auch nicht andere Stoffe, wie z. B. Pikrinsäure, Arsensäure usw. In größerer Menge ist dagegen in dem Preßsaft eine Peroxydase nachweisbar, eine wasserstoffsuroxydhaltige Lösung von Guajakharz wird durch ihn intensiv blau gefärbt. Die Reduktion durch den Preßsaft beruht daher wohl hauptsächlich auf einer Reduktionswirkung verschiedenartiger organischer Substanzen. Die Preßsäfte

anderer Schimmelpilze zeigen dieselbe Reduktionswirkung, aber in weit geringerem Maße.

Die Reduktion des Eisens in der Nährlösung kann noch eine andere Ursache haben. Sie kann dadurch herbeigeführt werden, daß der Pilz durch seinen Stoffwechsel die Bestandteile der Nährlösung so verändert, daß diese dann unabhängig von der Lebendigkeit des Pilzes das Eisen reduziert. Nährlösung ohne Eisenzusatz, auf der *Citromyces siderophilus* gewachsen war, reduzierte tatsächlich Eisenoxydsalz. Von anderen in bezug auf diese Eigenschaft untersuchten Pilzen zeigten eine ähnliche, aber schwächere Reduktionswirkung die Nährlösung von *Citromyces Pfefferianus* und *Aspergillus niger*, gar nicht reduzierte die Nährlösung von *Penicillium glaucum*.

Ob die Reduktion des der Nährlösung zugesetzten Eisenoxyds innerhalb der Pilzhyphen oder außerhalb derselben in der umgebenden Nährlösung stattfindet, läßt sich also nicht mit Sicherheit entscheiden. Die Reduktion der Eisensalze ist für *Citromyces siderophilus* durch ihre Intensität charakteristisch, findet sich aber auch in schwächerem Maße bei anderen Schimmelpilzen. Nach gutem Wachstum ergibt eine mit Eisenoxyd- oder Oxydulsalz versehene Nährlösung in Kulturen von *Citromyces siderophilus* immer eine reine Oxydulreaktion, während bei anderen Schimmelpilzen stets Oxydsalz in größeren Mengen nachweisbar ist.

### Bildung von Raseneisenstein durch Eisenpilze.

Durch die Untersuchungen von Molisch (1) und anderen Autoren ist bekannt, daß die Eisenbakterien einen wesentlichen Anteil an der Bildung von Raseneisenstein haben. Die Frage, ob auch die Eisenpilze hierbei beteiligt sein können, habe ich einer eingehenden Prüfung unterzogen. Es hat sich gezeigt, daß sich in der Natur tatsächlich große Eisenoxydmassen vorfinden, deren Entstehung hauptsächlich der physiologischen Tätigkeit der Eisenpilze zuzuschreiben ist.

Von der bereits mehrfach erwähnten Eisenquelle am Völkerschlachtendenkmal in Leipzig werden große Mengen von Eisenoxydhydrat abgeschieden. Die mikroskopische Untersuchung des rostbraunen Schlammes ergibt, daß ein beträchtlicher Teil desselben aus meist toten, stark eiseninkrustierten Pilzhyphen besteht.

Im Stahlbad Lausigk bei Geithain in Sa. sind die Wassergräben im Kurgarten dicht mit Eisenpilzen bewachsen. Im Frühjahr 1910 beobachtete ich, daß dort beim Ausschachten eines neuen Grabens große Mengen von Eisenocker zu tage befördert wurden. Der Ocker bildete poröse, lockere Massen, die im Erdboden in einer Schicht von 20 bis 30 cm Dicke abgelagert waren. Bei mikroskopischer Betrachtung dieses Eisenockers zeigte es sich, daß derselbe fast ganz aus inkrustierten Pilzhyphen bestand. Aus der Lagerung der Ockermassen im Boden ging hervor, daß seit der Abscheidung schon eine längere Reihe von Jahren vergangen war.

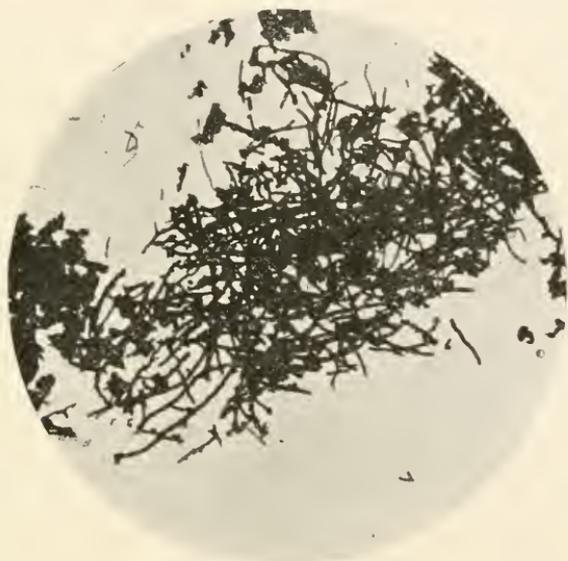


Fig. 3.

Raseneisenstein aus Lausigk in Sa. aus inkrustierten Pilzhyphen bestehend.

Es steht also zweifellos fest, daß die Eisenpilze in der Natur ebenso wie die Eisenbakterien sich wesentlich an der Bildung von Raseneisenstein beteiligen.

### Allgemeine Betrachtungen über die Physiologie der Eisenpilze.

Der untersuchte Pilz nimmt physiologisch in vieler Beziehung eine Sonderstellung unter den Schimmelpilzen ein. Es ist eine typische *Citromyces*-Art, die morphologisch von *C. Pfefferianus* kaum zu unterscheiden ist. Es liegt nun die Vermutung nahe, daß *C. siderophilus* überhaupt nur ein *C. Pfefferianus* ist, der

durch seinen viele Generationen andauernden Aufenthalt in Eisenwässern eine spezielle Anpassung an Eisensalze erlangt hat, sodaß man von einer besonderen Art überhaupt nicht sprechen könnte.

Es wurden während der mehr als einjährigen Versuchsdauer vorliegender Arbeit fortwährend Kulturen auf verschiedenen Substraten mit und ohne Eisenzusatz gezogen, in der Weise, daß die Kulturen mit eisenhaltigem Substrat immer mit Sporen geimpft wurden, die auf eisenhaltigen Kulturen entstanden waren und umgekehrt. Ein merklicher Unterschied im physiologischen Verhalten war am Ende der Versuchszeit zwischen den Pilzen beider Kulturreihen nicht zu beobachten.

Die Frage, wie weit Schimmelpilze sich an Metallgifte anpassen können, wurde bereits von Pulst (1) näher untersucht. Es zeigte sich, daß *Penicillium glaucum* sehr wohl schon nach einigen Generationen eine Anpassung erkennen ließ, daß diese Anpassung aber nur vorübergehend war, denn die erworbene Eigenschaft verlor sich sehr bald wieder [Pulst (2)]. Speziell bei Eisensalzen konnte Pulst (3) eine Anpassung von *Penicillium glaucum* nicht konstatieren.

*Citromyces siderophilus* ist also wegen seiner physiologischen Eigenschaften als eine besondere, von anderen bekannten *Citromyces*-Arten verschiedene Spezies anzusehen. Es gelang mir, aus Eisenwässern noch andere inkrustierende Pilzarten zu isolieren. Diese zeigten die physiologischen Eigenschaften von *C. siderophilus* in geringerem Maße und wurden aus bereits besprochenen Gründen nicht näher untersucht.

Besonders auffällig ist bei *C. siderophilus* die Anpassung an Eisenoxydulsalze, während Eisenoxydsalze wie bei anderen Schimmelpilzen giftig wirken. Geringe Oxydmengen werden beim Wachstum des Pilzes reduziert, und haben daher dieselbe wachstumsfördernde Wirkung wie die Oxydulsalze. Bei den Untersuchungen wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Eisenoxyd- und Oxydulsalzen derselben Säure und mit Eisensalzen derselben Oxydationsstufe aber von verschiedenen Säuren angestellt. Es ging daraus hervor, daß der wachstumsfördernde Einfluß dem Ferro-Ion, eine entschiedene Giftwirkung dagegen dem Ferri-Ion zuzuschreiben ist.

Nicht dissoziierte Eisensalze haben daher fast keinen Einfluß auf das Wachstum. Ferri-Saccharat z. B. wirkt auch in starker Konzentration nicht giftig. — Durch Zusatz einer größeren Menge von Rohrzucker, Traubenzucker, Glycerin oder anderen organischen

Substanzen zu einer Nährlösung, die Eisenchlorid oder Oxydsulfat enthält, wird die Dissoziation dieser Salze geringer. Die Giftwirkung wird daher bedeutend abgeschwächt oder ganz aufgehoben. In einer Nährlösung mit 5 % Rohrzucker und 2 % Eisenoxydsulfat wächst *C. siderophilus* z. B. überhaupt nicht, in derselben Nährlösung mit 30 % Rohrzucker tritt ein gutes Wachstum ein und das Oxydsulfat wird reduziert.

Der wachstumsfördernde Einfluß des Ferro-Ions kann zunächst als eine Reizwirkung aufgefaßt werden, wie sie auch von geringen Mengen anderer Metallgifte auf Schimmelpilze ausgeübt wird. Das Eisen dient also nicht als eigentlicher Nährstoff, sondern wirkt nur als „chemischer Reiz“ bei der Aufnahme dieser Stoffe [vergl. Pfeffer (1)]. Es wurde versucht, den Einfluß des Eisens auf den Stoffwechsel näher zu untersuchen. Zunächst wurde der Atmungskoeffizient, d. h. das Verhältnis des verbrauchten Sauerstoffes zur ausgeatmeten Kohlensäure untersucht. Die Untersuchungen wurden nach der gasanalytischen Methode von Hempel durchgeführt. Die Kulturen mit und ohne Eisenzusatz ließen keinen merklichen Unterschied der Atmungskoeffizienten erkennen.

Weiter wurde versucht, das Verhältnis des Erntegewichtes zum verbrauchten Zucker genau festzustellen. Die Versuche durchzuführen erwies sich jedoch als sehr schwierig, da gleich beim Beginn des Wachstums fast aller Zucker in Säuren, hauptsächlich in Zitronensäure umgewandelt wird und andere von dem Pilz in der Nährlösung gebildete Stoffwechselprodukte bei der Analyse störend wirkten. Es ließ sich jedoch in allen Fällen genau feststellen, daß von einem bestimmten Quantum organischer Substanz in Kulturen mit Eisenzusatz immer ein bedeutend größeres Erntegewicht erzielt wurde als in Kulturen ohne Eisenzusatz. Bei Alkohol als Kohlenstoffquelle betrug das Verhältnis der Erntegewichte von Kulturen mit und ohne Eisenzusatz 12:1.

Bei der chemosynthetischen Assimilation der Kohlensäure durch *Spirophyllum ferrugineum* wurde es als wahrscheinlich angesehen, daß die Oxydation des Eisenoxydulkarbonates zu Eisenoxydhydrat dem Organismus als Energiequelle dient. [Vergl. Lieske (2)]. Daß das Eisen bei *Citromyces siderophilus* in Nährlösung mit organischer Substanz nicht in diesem Sinne wirkt, ist klar. Der Pilz reduziert Eisensalze, es liegt also ein endothermer Prozeß vor, der Energie absorbiert. Es ist dagegen anzunehmen, daß das Eisen vielleicht als Sauerstoffüberträger wirkt. Beim Wachstum

der Eisenpilze findet in den Kulturen, folgende umkehrbare Reaktion statt.



Eisenoxydulsalze nehmen in wässriger Lösung sehr leicht Luft-sauerstoff auf. Durch Stoffwechselprodukte des Pilzes oder innerhalb der Hyphen wird das Eisenoxyd wieder zu Oxydul reduziert. Der Sauerstoff des Oxyds kann nun entweder durch reduzierende Stoffwechselprodukte des Pilzes gebunden oder innerhalb der Hyphen absorbiert werden. Im ersteren Falle könnte man annehmen, daß durch den Sauerstoff schädliche Stoffwechselprodukte des Pilzes aus der Nährlösung beseitigt würden, was eine Wachstumsförderung verursachen könnte. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, da verbrauchte Nährlösung ohne Eisenzusatz nach Entfernung der alten Pilzdecke und Zusatz von neuen Nährstoffen ein gleich gutes Wachstum ergibt wie frische Nährlösung. Wahrscheinlicher ist, daß der Pilz sich den innerhalb der Hyphen abgespaltenen Sauerstoff zu Nutze macht.

Die Oxydreaktion der reduzierten Nährlösung tritt nach Entfernung der Pilzdecke beim Stehen an der Luft in kurzer Zeit auf. Beim Schütteln der Nährlösung mit Luft im Reagenzglas ist Oxydsalz sofort deutlich nachzuweisen.

Die Eisenpilze werden durch die Eisensalze befähigt, schlechte Kohlenstoffquellen weit besser auszunützen. Ob diese Wirkung des Eisens mit der Reizwirkung geringer Mengen von anderen Metallgiften auf Schimmelpilze identisch ist, geht aus den beschriebenen Untersuchungen nicht hervor, daß dieselben ähnlich wirken, ist jedoch nicht ausgeschlossen.

In der Natur steht den Eisenpilzen wohl ausschließlich Eisenoxydulkarbonat zur Verfügung. Für Versuchszwecke eignet sich dieses Salz wenig, da es sehr unbeständig ist. Ein Sterilisieren desselben ist nicht möglich. Beim Wachstum des Pilzes würde es auch sofort durch die gebildeten Säuren zerstört werden. Aus demselben Grunde kann man den Kulturen auch nicht metallisches Eisen zugeben wie bei *Spirophyllum*-Kulturen, bei denen das Eisen durch die im Wasser gelöste Luftkohlensäure allmählich in Karbonat übergeführt wird. Übrigens zeigte sich, daß ein Zusatz von metallischem Eisen zur Nährlösung bei allen untersuchten Schimmelpilzen eine starke Hemmung des Wachstums herbeiführt.

Die Eisenpilze besitzen eine große Ähnlichkeit mit den Eisenbakterien insofern, daß sie fähig sind, wie diese beträchtliche

Mengen von Eisenoxydhydrat in ihrer Membran zu speichern. Die beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, daß bei den Eisenpilzen die Speicherung von dem wachstumsfördernden Einfluß des Eisens nicht abhängig ist. Die Inkrustation ist vielmehr abhängig von der Beschaffenheit der Kohlenstoffquelle der Nährlösung. Bei *Spirophyllum ferrugineum* ist mit der Ernährung aus Kohlensäure immer eine Eiseninkrustation verbunden [vgl. Lieske (3)]. Daß bei *Citromyces siderophilus* in der Natur ein ähnlicher Vorgang stattfindet, konnte nicht nachgewiesen werden, ist aber auf Grund der beschriebenen Beobachtungen nicht ausgeschlossen. Von *Lepthothrix ochracea* ist durch die Untersuchungen von Molisch (2) nachgewiesen worden, daß diese Art von Eisenbakterien sich heterotroph ernähren kann. Die Ernährungsbedingungen von *Crenothrix polyspora* und *Clonothrix fusca* sind trotz vieler Bemühungen bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß bei manchen dieser Eisenbakterien das Eisen eine ähnliche Rolle spielt wie bei den Eisenpilzen. Jedenfalls zeigt die vorliegende Untersuchung, daß die verschiedenen eiseninkrustierenden Organismen, die in der Natur vorkommen, nicht alle dasselbe ernährungsphysiologische Verhalten aufweisen.

Die vorstehende Arbeit wurde im botanischen Institut der Universität Leipzig ausgeführt.

### Zusammenstellung der Hauptresultate.

In der Natur finden sich weit verbreitet in eisenhaltigen Wässern Pilzhyphen, die in ihrer Membran wie die Eisenbakterien eine beträchtliche Menge von Eisenoxydhydrat gespeichert haben.

Die Hauptmasse dieser Pilzhyphen gehört einer *Citromyces*-Art an, die morphologisch von *Citromyces Pfefferianus* kaum zu unterscheiden ist, physiologisch dagegen in mancher Hinsicht eine Sonderstellung unter den Schimmelpilzen einnimmt.

*Citromyces siderophilus* gedeiht in Nährlösungen ohne Eisenzusatz wie andere Schimmelpilze.

Ein Zusatz von 0,5 % Ferrosulfat zur Nährlösung bewirkt bei *C. siderophilus* eine beträchtliche Vermehrung des Erntegewichtes, während das Wachstum anderer Schimmelpilze hierdurch stark gehemmt wird.

*C. siderophilus* zeigt eine besondere Resistenz gegen die Giftwirkung von Zinksulfat.

Eisenoxydulsalze üben 'auf *C. siderophilus* in keiner Konzentration eine chemische Giftwirkung aus, sondern verursachen eine bedeutende Förderung des Wachstums.

Eisenoxydsalze sind für *C. siderophilus* ebenso giftig wie für andere Schimmelpilze.

Die wachstumsfördernde Wirkung ist dem Ferro-Ion, die Giftwirkung dem Ferri-Ion zuzuschreiben. Nicht dissoziierte Eisensalze haben keinen merklichen Einfluß auf das Wachstum.

Durch Anwesenheit des Eisenoxyduls in der Nährlösung wird dem Pilz eine wesentlich bessere Ausnützung der gebotenen Kohlenstoffquelle, namentlich bei schlechteren Nährstoffen, ermöglicht.

Die Eiseninkrustation der Pilzhypen ist nicht abhängig von der wachstumsfördernden Wirkung des Eisenoxyduls, sondern von der Beschaffenheit der Kohlenstoffquelle.

Die der Nährlösung zugesetzten Eisensalze werden beim Wachstum des Pilzes reduziert beziehentlich verhindert, sich zu oxydieren.

Die Eisenpilze nehmen in der Natur einen wesentlichen Anteil an der Bildung von Raseneisenstein.

### Literatur-Verzeichnis.

- Adler (1), Centralbl. f. Bakteriol., II. Abt., 1904, Bd. 11, S. 284.  
 Gößl (1), Beihefte zum Botan. Centralbl., 1905, Bd. 18, S. 127.  
 Kunstmann (1), Über das Verhältnis zwischen Pilzernte und verbrauchter Nahrung. Leipzig. Diss. 1895.  
 — (2), A. a. O., S. 16.  
 Lieske (1), Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, Bd. XLIX, S. 91.  
 — (2), A. a. O., S. 120.  
 — (3), A. a. O., S. 116.  
 Molisch (1), Die Eisenbakterien, Jena 1910.  
 — (2), A. a. O., S. 32.  
 Peklo (1), Österreich. Botan. Zeitschr., 1909, Nr. 8, S. 6.  
 Pfeffer (1), Jahrb. f. wiss. Bot., 1895, Bd. XXVIII, S. 238.  
 Pulst (1), Jahrb. f. wiss. Bot., 1902, Bd. XXXVII, S. 226.  
 — (2), A. a. O., S. 243.  
 — (3), A. a. O., S. 231.  
 Raulin, (1), Annales d. sciences nat. Bot., Ser. V, Tome XI, 1869, S. 91.  
 Richards (1), Jahrb. f. wiss. Bot., 1897, Bd. XXX, S. 665.  
 — (2), A. a. O., S. 675.  
 — (6), A. a. O., S. 672.
-

## Über Cytochorismus.

Bemerkung zu H. Fittings Abhandlung: Untersuchungen  
über die vorzeitige Entblätterung von Blüten.

Von

Wilhelm Roux.

Fitting berichtet in seiner interessanten Abhandlung<sup>1)</sup> unter anderem, ich hätte den Ausdruck Cytochorismus für das Tier geprägt, um damit „Trennung von Zellen innerhalb des intakt bleibenden Organismus ohne Rücksicht auf die Mechanik der Trennung und ohne daß die Trennung gerade durch einen Lebensvorgang vermittelt zu werden brauchte“, zu bezeichnen. Das ist indes nicht zutreffend; das von ihm benutzte Referat hat ihn unrichtig informiert.

Eine solche rein deskriptive und außerdem gemeinsame Bezeichnung für aktives und passives Trennungsgeschehen würde ich nicht für zweckmäßig erachten. Ich habe dagegen an isolierten und in ein indifferentes Medium übertragenen Furchungszellen des Froscheies Anziehungswirkungen gegeneinander, flächenhafte Vereinigung, langdauernde Umordnung sowie danach Wiederaustritt von Zellen aus dem durch die drei anderen Arten des Geschehens hergestellten Zellverbände beobachtet. Wiedertrennung kam auch schon an bloß zwei Zellen vor, sogar nachdem sie sich zu „vollkommenem“, das heißt keine Furche am Rande mehr lassenden Zusammenschluß vereinigt hatten<sup>2)</sup>. Diese Selbsttrennung von Zellen bezeichnete ich kurz als Cytochorismus; vollständiger müßte es heißen: Cytoautochorismus. Für alle diese in analytischen Ver-

1) Diese Jahrbücher, Bd. XLIV, 1911, S. 248.

2) Archiv f. Entwicklungsmechanik, Bd. I, S. 44, 1894, Bd. III, S. 381, Bd. IV, S. 480, Bd. V, S. 327.

suchen erwiesenen verschiedenen „Selbsteleistungen“<sup>1)</sup>, Autoergien von Zellen erachtete und erachte ich besondere Benennungen für nötig, ließ aber das „Auto-“ der Kürze halber weg; dies war deshalb möglich, weil es sich bei den Vorgängen an Zellen für gewöhnlich um Selbsteleistungen derselben handelt. Von außen her „determinierte“ Vorgänge an Zellen müssen dagegen in einer diese Besonderheit bezeichnenden Weise benannt werden. Fittings Vorschlag, „ganz allgemein als Chorismus einen Reizvorgang zu bezeichnen, durch welchen lebende Zellen ‚infolge der Aktivität eben dieser Zellen‘ voneinander isoliert werden“, enthält also, nachdem ich solche Selbsteistung ermittelt und entsprechend benannt habe, nichts Neues außer der Weglassung des Zusatzes Cyto-. Der Terminus Cytochorismus braucht in meinem Sinne nur allgemeiner in Gebrauch genommen zu werden, was wohl keines besonderen Vorschlages bedarf. Das „Selbst“, „Auto“ bedeutet nach meiner vor 30 Jahren gegebenen Definition, daß die die spezifische Art des bezüglichen Geschehens „bestimmenden“ Faktoren in dem betreffenden Gebilde selber gelegen sind (so z. B. bei der Selbstdifferenzierung, Autodifferentiatio), während dagegen die „auslösenden“ und sonstigen „realisierenden“ sowie die das typische Geschehen „alterierenden“ Faktoren von außen zugeführt werden können. Dagegen möchte ich nicht empfehlen, wenn es sich um Zellen handelt, Fittings Vorschlag zu folgen und das bezeichnende Wort Cyto- wegzulassen, weil damit die Anwendung des Wortes Chorismus auf größere Komplexe, sowie umgekehrt vielleicht auch auf später erkannte Selbsttrennung niederer lebensfähiger Gebilde (der Autokineonten, Automerizonten und Idioplassonten meiner Klassifikation) unmöglich würde.

---

1) W. Roux, Der Kampf der Teile im Organismus, 1881, S. 226 oder Gesammelte Abhandl. über Entwicklungsmechanik, Bd. I, S. 405 u. f., sowie Bd. II, S. 78—84.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik](#)

Jahr/Year: 1912

Band/Volume: [50](#)

Autor(en)/Author(s): Lieske Rudolf

Artikel/Article: [Untersuchungen über die Physiologie eisenspeichernder Hyphomyceten, 328-356](#)