

Über geschlechtsbedingte Unterschiede in Wachstum und Fumarsäure-Stoffwechsel von Rhizopus-Arten

Autor(en): **Schoch, Helmut**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **69 (1959)**

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-48672>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Über geschlechtsbedingte Unterschiede in Wachstum und Fumarsäure-Stoffwechsel von Rhizopus-Arten

Von Helmut Schoch

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 5. Juni 1959

Inhalt

I. Einleitung.....	112
1. Morphologische und cytologische Untersuchungen.....	113
2. Physiologische Untersuchungen.....	113
II. Die Ausführung der Stoffwechselversuche	117
1. Die Schüttelkultur	117
2. Das Nährmedium	118
3. Die Fortzüchtung der Reinkulturen und die Impfung der Versuche	119
4. Die Temperatur	119
5. Die Aufarbeitung der Versuche	119
a) Probeentnahme	119
b) Die Fumarsäurebestimmung	120
c) Die Bestimmung des Trockengewichts	120
d) Die Bestimmung des zurückgebliebenen Zuckers	121
6. Die statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse	121
III. Einfluß der Temperatur auf den Stoffwechsel von <i>Rhizopus microsporus</i> (+) und (—) und von <i>Rhizopus circinans</i> Z (+) und (—)	122
1. Wachstum und Aussehen des Mycels	122
2. Das Trockengewicht des Mycels	126
3. Die absolute Fumarsäurebildung	131
4. Die relative Fumarsäurebildung	135
5. Der Glukoseverbrauch	141
IV. Diskussion	143
V. Zusammenfassung	150
VI. Literatur	151

I. Einleitung

Die Existenz von Sexualvorgängen bei Mucoraceen konnte Blakeslee (1904a und b) zu Beginn dieses Jahrhunderts eindeutig beweisen, nachdem schon früher mehrere andere Autoren Vermutungen darüber geäußert hatten (Ehrenberg 1820, de Bary 1864, Tulasne 1866, van Tieghem 1876 und Bainier 1883). Er nannte die beiden Geschlechter gemäß der Üppigkeit des Wachstums auf seinen Nährmedien (+) und (—). Die

morphologische Gleichheit der Pilzhyphen, Sporen usw. der beiden Geschlechter ließ jedoch ihre Unterscheidung nach äußeren Merkmalen immer wieder scheitern; einzig die Kopulation mit einem Stamm bekannten Geschlechts kann über das Geschlecht des in Frage stehenden Stammes eindeutig Auskunft geben. Wohl wurden viele morphologische, cytologische und physiologische Merkmale als geschlechtsgebunden angenommen und auch entsprechend untersucht; es wurden auch Unterschiede zwischen den Pilzgeschlechtern gefunden, doch gelang es nicht klar zu beweisen, daß diese Unterschiede wirklich geschlechtsbedingt und nicht nur den Rassen eigen sind.

1. Morphologische und cytologische Untersuchungen

Lendner (1918) sah in Größendifferenzen bei Sporen von *Mucor hiemalis* Geschlechtsunterschiede, die jedoch Ling-Young (1930) als Rassenunterschiede deutete, was von Zycha (1935) unterstützt wurde. Auch Schopfer (1933a und b) lehnt die Benutzung der Größe der Sporangienträger oder Sporen zur Identifizierung der Geschlechter von *Phycomyces* ab. Zycha (1935) zeigte auch, daß Verschiedenheiten der Suspensoren und Gametangien bei *Mucor hiemalis* und *Rhizopus nigricans* rassen- und nicht geschlechtsbedingt sind.

Untersuchungen von Sjöwall (1945) über die Sporengröße von *Mucor hiemalis* zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Pilzgeschlechtern.

2. Physiologische Untersuchungen

In vielen Arbeiten wurde auch der Stoffwechsel zur Unterscheidung der Geschlechter herangezogen. So stellte Korpatschewska (1909) fest, daß das (+) Mycel von *Mucor hiemalis* auf Raulin-Nährlösung mit Maltose diese besser assimiliere als das (—) Mycel, und daß auf einem saccharosehaltigen Substrat die Geschlechter sich gerade umgekehrt verhielten. Im gleichen Sinne fand Breslauer (1912) eine bessere Kohlenstoffassimilation durch *Mucor hiemalis* (+) auf Raulin-Medium mit Maltose. Sie glaubt, dem (—) Stamm fehlten die entsprechenden Enzyme und spricht von einer chemischen Heterogamie der Mucoraceen. Diese Ergebnisse wurden 1918 von Lendner bestätigt. Demgegenüber fand Lindner (1912, 1916) bei *Phycomyces nitens*, daß der (—) Stamm Zucker besser assimiliere, während Orban (1919) in Experimenten mit der gleichen Art wieder genau das Gegenteil beobachtete. Andererseits fand Wesendonck (1930) mit *Phycomyces* auf Malzagar eine bessere Entwicklung des (+) Mycels, welche Beobachtung Sjöwall (1945) mit *Mucor hiemalis* nicht bestätigen konnte, da er keinen deutlichen Geschlechtsunterschied sah.

Orban (1919) untersuchte die Keimfähigkeit von Sporangiosporen und das Wachstum der beiden Geschlechter von *Phycomyces*, bemerkte aber nur unwesentliche Unterschiede. Im allgemeinen stellte er auf verschiedenen Nährböden ein kräftigeres Wachstum des (+) Stammes fest.

Lendner (1918) beobachtete, daß *Mucor hiemalis* (+) mehr Pigment enthielt als (—). Diese Beobachtung wurde von Chodat und Schopfer (1927) bestätigt, von Ling-Young (1930) und Zycha (1935) aber wieder bestritten. Auch Sjöwall (1945) zweifelt auf Grund seiner Versuche die Resultate von Chodat und Schopfer (1927) und Schopfer (1928) an, indem er feststellen konnte, daß die Färbung der Pilzhyphen sehr stark von der Belichtung abhängig ist. Chodat und Schopfer (1927) fanden aber auch noch beim (+) Stamm einer Anzahl anderer Mucoraceen einen höheren Gehalt an Karotinoiden und folglich eine gelbere Färbung. Schopfer (1943) vermutet, das gelte auch für (+) und (—) Typen von *Phycomyces Blakesleeanus*, aber Garton, Goodwin und Lijinsky (1950, 1951) fanden, daß ihr (—) Stamm regelmäßig etwa zweimal mehr Karotin bildete als der (+) Stamm, unabhängig von einem Wechsel der Kulturbedingungen. Ganz allgemein schrieben Chodat und Schopfer (1927) den (+) Stämmen einen intensiveren Stoffwechsel zu als den (—) Stämmen, was sich unter anderem auch im größeren Fettgehalt der (+) Stämme ausdrücke.

Kostytchew und Eliasberg (1919) arbeiteten mit *Mucor racemosus* und gelangten zur Ansicht, Oxydationsprozesse verliefen beim (+) Mycel aktiver als beim (—) Mycel, aber nur das (—) Mycel enthalte Invertase und könne Rohrzucker vergären. Sie glauben auch, nur der (+) Stamm enthalte Sucrase. Ihre Annahme, die Rassen eines gegebenen Geschlechts differierten in ihren physiologischen Reaktionen nicht, scheint nach der Erfahrung mehrerer Autoren nicht berechtigt zu sein. Foster und Waksman (1939b) sprechen sogar von einer Stammspezifität der Rhizopus-Arten in bezug auf die Fumarsäurebildung.

1925 postulierten Satina und Blakeslee, der sexuelle Dimorphismus müsse auf biochemischen Unterschieden der sexuell verschiedenen Protoplasmen beruhen. Sie untersuchten an einer großen Zahl Mucoraceen die Reduktionsfähigkeit für Tellursalze, fanden jedoch keine deutlichen Unterschiede; im Durchschnitt zeigte der (+) Stamm eine stärkere Reduktionsfähigkeit als der (—) Stamm. Hingegen stellten sie (1926a) wesentliche Unterschiede der Geschlechter fest in der Manoiloff-Reaktion mit alkoholischen und wäßrigen Zellextrakten, im Katalasegehalt und im Peroxydasegehalt, bei der Reduktion von KMnO_4 durch wäßrige Zellextrakte, in der Azidität des Wasserextraktes und bei der Reduktion von Tellursalzen durch lebende Zellen. Die Autoren haben auch die Ausnützung verschiedener Kohlehydratquellen durch zwölf verschiedene Mucoraceenpaare untersucht (1928a), indem sie diese auf elf verschiedenen Kohlehydratquellen wachsen ließen, um festzustellen, ob

eventuell gewisse beim einen Geschlecht vorhandene Fermente beim anderen fehlten, konnten aber keine qualitativen, sondern nur quantitative Geschlechtsunterschiede bemerken. Dagegen stellten sie an 60 Mucoraceenstämmen fest (1928b), daß der Gehalt an reduzierendem Zucker und der totale Zuckergehalt des (+) Stammes signifikant größer sei.

Auf Grund von Vergleichen der mit Mucoraceen erhaltenen Resultate mit solchen zweihäusiger höherer Pflanzen kamen Satina und Blakeslee (1926b, 1927) zur Ansicht, in biochemischer Hinsicht entsprechen die (+) Stämme der Pilze den weiblichen höheren Pflanzen und Tieren und dürften somit als weiblich angesprochen werden und die (—) Stämme der Pilze seien als Männchen anzusehen, woran Blakeslee schon 1913 gedacht hatte. Hybridisierungsversuche mit Formen mit verschiedenen großen Gameten (z. B. *Absidia*) stützten diese Hypothese (1929). Am Schlusse ihrer Arbeit schreiben die Autoren (1929):

“A rather extensive series of qualitative and quantitative tests indicates that the (+) races of Mucors react biochemically in a similar manner to the females of higher plants and the (—) races like males. The evidence from these tests suggests that our (+) sex is female and our (—) sex male and is in line with the evidence from imperfect hybridization reactions with all except one species of the heterogamic hermaphrodites.”

Aus diesen einander oft widersprechenden Resultaten geht die Schwierigkeit und sogar Fragwürdigkeit der Geschlechtererkennung bei Mucorineen auf Grund der bis heute bekannten oder doch behaupteten Unterschiede deutlich hervor. Wesentlich scheint auch bei der Interpretierung zu sein, daß die Resultate oft an verschiedenen Species oder doch Rassen gewonnen wurden, weshalb sie sich nicht unbedingt vergleichen lassen (Sjöwall 1945, S. 12). Andererseits besteht das Postulat von Satina und Blakeslee (1925) auch heute noch zu Recht, obwohl die biochemische Gesamtheit eines Protoplasmas auch heute noch nicht erfaßt werden kann und daher vorläufig die Ziele näher zu stecken sind.

Die vorliegende Arbeit will daher anhand der Bildung der Fumarsäure, die als *typisches* Stoffwechselprodukt bei *Rhizopus* auftritt, untersuchen, ob nicht im zellphysiologischen Geschehen der beiden Geschlechter Unterschiede bestehen. Um die Möglichkeit der Auffindung von solchen Unterschieden zu vergrößern, soll nicht nur ein einfacher Vergleich zu einem bestimmten Zeitpunkt (also *einem* bestimmten Entwicklungsstadium entsprechend) ausgeführt, sondern der gesamte zeitliche Verlauf und die Temperaturabhängigkeit der Fumarsäurebildung und des Wachstums verfolgt werden. Eine Andeutung für Unterschiede findet sich bei Meder (1952), der beim (+) Stamm von *Rhizopus circinans* einen bedeutend höheren Fumarsäureanfall als beim (—) Stamm sowohl in Decken- wie in Schüttelkultur fand.

Es wurden untersucht (+) und (—) Stamm von *Rhizopus microsporus van Tieghem* und *Rhizopus circinans Z van Tieghem*, die alle aus dem Centralbureau für Pilzkulturen in Baarn (Niederlande) stammten.

Über die Fumarsäure als Stoffwechselprodukt bei *Rhizopus* sind schon viele Arbeiten veröffentlicht worden, die den Weg von der Glukose zur Fumarsäure über die Thunberg-Wieland-Reaktion und die Wood-Werkman-Kondensation klarlegten (s. auch Bernhauer 1932 und Meder 1952). Die Frage, warum *Rhizopus* die Glukose nur bis zur Fumarsäure abbaut und diese als Stoffwechselprodukt ausscheidet, kann heute noch nicht befriedigend beantwortet werden. Foster (1947) meint dazu, die in den Versuchen dargebotenen Zuckerkonzentrationen seien im allgemeinen viel zu hoch, weshalb der Zucker in einem fehlerhaften Stoffwechsel nur teilweise ausgenutzt werden könne und sich unvollständig oxydierte Produkte anhäuferten. Daneben seien aber die Enzymsysteme vollständig vorhanden. Später könnten auch die organischen Säuren weiter verbraucht werden; zuerst jedenfalls würden immer die leichter aufschließbaren Energiequellen verwendet (Foster und Waksman 1939b). Butkewitsch und Fedoroff (1929a) war es gelungen, *Rhizopus nigricans* auch auf Fumarsäure selbst zum Wachsen zu bringen, womit erwiesen ist, daß die Fumarsäure weiter verwendet werden kann. Sie betrachten die Säure als eine Zwischenstufe des Zuckerabbaus.

Hawker (1950) gibt für eine große Zahl von *Rhizopus*-Arten die Kardinalpunkte der Temperatur für das Mycelwachstum an, z. B. für *Rhizopus microsporus* ein Temperaturminimum von $+2^{\circ}\text{C}$, ein Optimum von 25°C und ein Maximum von 32°C . Über *Rhizopus circinans Z* macht sie keine Angaben. Allgemein lassen sich mit Hilfe der Angaben von Hawker (1950) die *Rhizopus*-Arten nach den Temperaturgrenzen in zwei Gruppen einteilen, wobei die Temperaturminima für alle angeführten Stämme um 7° bis 11°C liegen, mit Ausnahme von *Rhizopus microsporus* ($+2^{\circ}\text{C}$): eine Gruppe mit einem Optimum von 25° bis 27°C und einem Maximum um 31° bis 34°C (*Rhizopus nigricans*, *Rh. arto-carpi*, *Rh. reflexus*, *Rh. microsporus*), eine andere mit einem Optimum um 32° bis 34°C und einem Maximum von 44° bis 46°C (*Rh. tritici*, *Rh. delemar*, *Rh. nodosus*, *Rh. oryzae* usw.). Als sehr wärmeliebend wird *Rhizopus chinensis* mit einem Optimum von 40°C und einem Maximum bei $42\text{--}44^{\circ}\text{C}$ bezeichnet (Schaub 1958).

Es scheint allerdings, daß die Temperaturgrenzen für das Wachstum nicht starr sind, sondern je nach den Ernährungsbedingungen variieren, worauf schon Nägeli (1891) hinwies. Thiele (1896) fand, daß sich unter entsprechenden Bedingungen das Wachstumsmaximum von *Penicillium glaucum* und *Asperillus niger* bis um 5°C heraufsetzen läßt. Einfluß der Ernährung auf die Lage der Kardinalpunkte bei *Rhizopus chinensis* beobachtete Schaub (1958).

Lendner (1908) gibt für *Rhizopus nigricans* ein Temperaturmaximum von 39° C an (Hawker [1950] für den gleichen Pilz 31° C), für *Rhizopus japonicus* ein Optimum von 30° C und ein Maximum von 40° C.

II. Die Ausführung der Stoffwechselversuche

1. Die Schüttelkultur

Sämtliche Stoffwechselversuche wurden als Schüttelkulturen ausgeführt, die gegenüber den Standkulturen gewisse Vorteile in bezug auf die Ernährung und Belüftung der Kulturen aufweisen, über welche Kluyver und Perquin (1933) eingehend berichteten. Die beiden Autoren stellten damals bei morphologisch identischen Stämmen unzweifelhafte Verschiedenheiten im Stoffwechsel fest, die sie auf ungenügende Ernährungsverhältnisse, bedingt durch die Kultivierungsart als Standkulturen, zurückführten. Deshalb forderten sie für Stoffwechseluntersuchungen ein homogenes Zellmaterial und echt homogene Versuchsbedingungen, deren Verwirklichung mit Hilfe der Schüttelkultur möglich ist. Dazu kommt noch, wie Cochrane (1948) und Meder (1952) feststellten, daß in untergetauchten Kulturen rascher Säure entsteht als in Deckenkulturen (s. auch Bernhauer und Rauch 1950b).

Auf Grund dieser Erfahrungen wurden alle Versuche in einer Schüttleinrichtung durchgeführt, die es gestattete, die Versuchskolben mittels eines in einem Wasserbad schwingenden Korbes aus Drahtgeflecht bei konstanter Frequenz zu schütteln; die Temperatur des Wasserbades wurde mit Hilfe eines Kontaktthermometers und einer über ein Relais gesteuerten elektrischen Heizung konstant gehalten (Schaub 1958, Figur 2).

Als günstigste Schüttelfrequenz wurden 58 bis 60 Schwingungen pro Minute bei einer Amplitude von 5 cm gewählt. Versuche von Meder (1952) mit *Rhizopus* hatten gezeigt, daß der Pilz bei einer Frequenz von über 100 Schwingungen pro Minute nicht mehr zu wachsen vermag, und frühere eigene Versuche mit anderen Pilzen zeigten, daß bei Frequenzen unter 30 Schwingungen pro Minute noch deckenähnliche Bildungen wie in Standkulturen auftreten konnten.

Um den von Meder (1952) beobachteten Effekt der Platzierung der Kolben im Drahtkorb auf die Menge der gebildeten Fumarsäure zu vermeiden, wurden die Kolben täglich nach dem Prinzip des lateinischen Quadrates (System der idealen Unordnung) umgestellt, so daß ein Kolben nicht zweimal während des Versuches am gleichen Platz stand.

2. Das Nährmedium

Die Stoffwechselversuche wurden in einer Nährlösung durchgeführt, die sich folgendermaßen zusammensetzte:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,08 %
KH ₂ PO ₄	0,09 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10 %
FeCl ₃	0,15 %
AZ-Lösung nach Hoagland	0,10 %
Glukose	10,0 %

Das Wasser wurde nach dem Ionenaustauschverfahren aufbereitet (spezif. Widerstand $4 \cdot 10^{-6}$ Ohm).

Die Angaben von Foster und Waksman (1939a) über die auf die Fumarsäurebildung stimulierend wirkende Eigenschaft von Eisenionen ließen eine Zugabe von Eisen günstig erscheinen. Hingegen glaubte ich auf eine Zugabe von mehr Zink als die AZ-Lösung bereits enthielt, verzichten zu können, da Zink vor allem das vegetative Wachstum fördern soll (Foster und Waksman 1939a, Waksman und Foster 1938). Eine Glukosekonzentration von 10 % wird von ihnen sowie von mehreren anderen Autoren als optimal für Stoffwechselversuche angesehen (Foster 1947).

Zur Neutralisierung der gebildeten Fumarsäure wurden zu Beginn der Versuche bei einer Versuchsserie 10 g CaCO₃ als erbsengroße Marmorstückchen zugesetzt, was sich aber nicht bewährte, da der Pilz im Laufe des Versuches anfang, sich besonders an den Marmorstückchen festzusetzen und so eine gleichmäßige Pufferung der Nährlösung verhinderte. Deshalb wurde in späteren Versuchen ein m/10 Zitratpuffer nach Sörensen gewählt, bestehend aus 21 g Zitronensäure und 8 g NaOH pro Liter Nährlösung, bei dem die beobachteten unangenehmen Nebenerscheinungen nicht mehr auftreten konnten. Die Wasserstoffionenkonzentration stellte sich mit CaCO₃ auf pH 4,5 (bei Meder pH 4) ein. Der Zitratpuffer war so gewählt, daß er eine Wasserstoffionenkonzentration von pH 4,9 bewirkte.

Der Zitratpuffer vermochte in den ersten sieben Versuchstagen die Wasserstoffionenkonzentration von pH 4,9 aufrecht zu erhalten, danach aber begann er nachzugeben und ließ die pH-Werte bis zum Versuchsende auf pH 3,8 bei *Rhizopus microsporus* und auf pH 4,0 bei *Rhizopus circinans* Z absinken. Auf Marmor zeigte sich in den ersten Versuchstagen ein Ansteigen der pH-Werte von 4,5 auf 6 bei *Rhizopus microsporus* (bis zum achtzehnten Tag) und anschließend wieder ein geringes Absinken, während *Rhizopus circinans* Z nach elf Tagen eine Steigerung auf pH 5 hervorrief, welches bis zum Versuchsende konstant blieb.

Die Versuche wurden in Erlenmeyerkolben (Pyrex) von 500 ml Inhalt durchgeführt, die mit 150 ml Nährlösung beschickt waren. Die Sterilisation geschah mit beiden Puffersystemen im Dampftopf an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine halbe Stunde.

3. Die Fortzüchtung der Reinkulturen und die Impfung der Versuche

Die Pilzreinkulturen wurden abwechslungsweise auf Bierwürzeagar (30 % Würze, 1,5 % Agar) und Hefewasser-Glukose-Kreide-Agar (20 % Hefe in Leitungswasser, 5 % Glukose, 1 % Kreide, 2 % Agar) gehalten, wobei zur Sporenzüchtung für die Versuche jeweils vom letzteren auf einen Hefewasser-Mannit-Agar (10 % Hefe in Leitungswasser, 5 % Mannit, 2,5 % Agar) abgeimpft wurde. Von diesen Kulturen wurden zur Impfung der Versuche Sporensuspensionen in 0,1 % Tween 80 hergestellt. Bei der Impfung wurde darauf geachtet, daß sämtliche Kolben aller Versuche immer mit der gleichen Anzahl Sporen beimpft wurden, nämlich mit 5 Millionen (Auszählung der Sporen mit Hilfe eines Blutkörperchenzählapparates Modell Carl Zeiß 1909, Jena), wobei ein Alter der Sporenkulturen auf Hefewasser-Mannit-Agar zwischen 25 und 30 Tagen eingehalten wurde.

4. Die Temperatur

Die Versuche wurden bei Temperaturen von 10° bis 40° C ausgeführt.

5. Die Aufarbeitung der Versuche

a) Probeentnahme

In den anfänglichen Versuchen wurden jeweils Proben der Nährlösung steril aus den Kolben entnommen, um zur Wahrung größtmöglicher Homogenität des Untersuchungsmateriales die gleichen «Pilzindividuen» weiter im Versuch behalten zu können. Zu diesem Zweck waren in die die Kolben verschließenden Wattezapfen Glasrohre eingewickelt, die mit einem umgekehrten Reagenzglas verschlossen wurden. Mit Hilfe einer sterilen Pipette ließ sich durch das Glasrohr die zur Analyse nötige Nährlösungsmenge bei geringster Infektionsgefahr aseptisch aus dem Kolben entnehmen. So wäre es möglich gewesen, dieselben «Pilzindividuen» über längere Zeit in bezug auf ihre Fumarsäurebildung zu untersuchen, was vom statistischen Standpunkt aus erwünscht gewesen wäre. Mit dieser Methode war es jedoch nicht möglich, Anhaltspunkte über die gebildete Mycelmenge zu bekommen, weshalb davon abgegangen werden mußte. In den späteren Versuchen wurde jeweils die ganze im Kolben enthaltene Pilzkultur zur Analyse abgebrochen und

aus dem Versuch genommen, um neben der produzierten Fumarsäuremenge auch das gebildete Mycel bestimmen zu können. Der dadurch bedingte Nachteil der größeren Ungleichheit des Untersuchungsmaterials mußte in Kauf genommen werden.

b) Die Fumarsäurebestimmung

Mit Hilfe der polarographischen Technik nach Heyrovský (1925) ließ sich die vom Pilz gebildete und in die Nährlösung abgeschiedene Fumarsäure ohne große Schwierigkeiten und vor allem ohne komplizierte Vorbehandlung der Nährlösungsproben einwandfrei bestimmen (Herasymenko 1928, Meder 1952). Die Methode erlaubte, noch eine Konzentration von 0,0001% Fumarsäure genau zu messen.

Zur Verfügung stand ein Modell des Heyrovský-Shikata-Polarographen (Heyrovský und Shikata 1925) der Firma Československá Zbrojovka, Brno (s. auch Meder 1952). Da die polarographische Technik an vielen Stellen eingehend beschrieben worden ist, kann hier auf eine ausführlichere Darstellung dieser Methodik verzichtet werden (Brdicka 1941, Březina und Zuman 1956, Heyrovský 1941, 1948, Kolthoff und Lingane 1946, Schwaer 1935, Stackelberg 1950, Vopička 1936).

Analysiert wurde jeweilen 1 ml Nährlösung, der je nach der Menge der gebildeten Fumarsäure auf 1:10 oder 1:100 mit n HCl verdünnt wurde, um in einem optimalen Empfindlichkeitsbereich der Apparatur messen zu können. Aus den mit Hilfe eines Lichtstrahlgalvanometers automatisch auf photographisches Papier aufgezeichneten Stromspannungskurven ließ sich nach Eichung der Apparatur die Fumarsäure in der Probe berechnen.

Störungen durch andere ebenfalls in der Nährlösung enthaltene organische Säuren, die polarographisch reagieren, wurden nicht beobachtet, wie das schon bei Meder (1952) der Fall gewesen war.

c) Die Bestimmung des Trockengewichtes

Um das Trockengewicht des gebildeten Mycels bestimmen zu können, wurden die Mycelien auf ein Filter bekannten Trockengewichtes abgesaugt, mit warmem Wasser zur Entfernung des Zuckers kräftig nachgewaschen und dann im Trockenschrank bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

In den Versuchen mit Marmorstückchen als Puffersubstanz wurden diese vor dem Absaugen entfernt und eventuell im Mycel vorhandene Reste durch Waschen auf dem Filter mit Salzsäure aufgelöst. Die Wägung erfolgte auf einer Analysen- resp. Torsionswaage.

Die abgesaugte Menge restlicher Nährlösung wurde zur Korrektur der Resultate, die infolge des Verdunstungsverlustes nötig werden konnte, bestimmt.

d) Die Bestimmung des zurückgebliebenen Zuckers

Um sich ein Bild vom Zuckerverbrauch des Pilzes während der Versuchszeit machen zu können, wurde in jeder Probe der verbliebenen Nährlösung die Restglukose nach Bertrand (1906) bestimmt (Bamann und Myrbäck 1941, Klein 1932).

6. Die statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse

Die Stoffwechselversuche wurden im Hinblick auf eine statistische Bearbeitung der Ergebnisse wie folgt angelegt: Ein Schüttelkorb bot Platz für sechzehn Versuchskolben, wovon je acht mit dem (+) resp. (—) Stamm beimpft wurden (s. Schaub 1958, S. 71, Figur 2). Es standen vier solcher Körbe zur Verfügung. Bei jeder Probenahme wurde pro Geschlecht ein Kolben aus jedem Schüttelkorb herausgenommen (s. auch S. 117). Aus den je vier Analysen pro Pilzgeschlecht wurden die Einzel- und Mittelwerte für die statistischen Berechnungen gewonnen.

Die statistische Auswertung zielte darauf ab, festzustellen, ob die von den beiden Pilzgeschlechtern gelieferten Werte für Myceltrockengewicht und Fumarsäure wirklich oder nur zufällig voneinander verschieden seien, und wie groß die Wahrscheinlichkeit für eine Signifikanz sei.

Als Grundlage zu dieser Berechnung wurde der F-Test herangezogen (Fisher 1954, S. 212–246, Linder 1951, S. 92–99)¹. Es wurde dabei so verfahren, daß nach Abschluß der Versuche die Summe der mittleren quadratischen Abweichungen der Einzelmeßwerte von ihrem Mittelwert (s_1^2) mit den mittleren quadratischen Abweichungen der beiden Mittelwerte von einem hypothetischen Generalmittel (s_2^2), beide über die ganze Kurve summiert, verglichen wurden.

$$s_1^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(m_x - a)} + \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{(m_y - a)}$$
$$s_2^2 = \frac{1}{2a} \cdot [\sum (\bar{x} - \bar{z})^2 + \sum (\bar{y} - \bar{z})^2]$$

Es bedeuten:

- \bar{x} = Mittel aus den vier Einzelwerten x_i .
 \bar{y} = Mittel aus den vier Einzelwerten y_i .
 \bar{z} = Generalmittel (Mittel aus den Einzelwerten x_i und y_i).
 m_x und m_y = Zahl der Einzelmeßwerte der Kurve.
 a = Zahl der Mittelwerte einer Kurve.

Freiheitsgrade:

für $s_1^2 = (m_x - a) + (m_y - a)$

für $s_2^2 = a$.

¹ Für Hinweise auf die statistische Methode bin ich dem damaligen ersten Assistenten des Institutes, Herrn Dr. H. Huber, zu Dank verpflichtet.

Wird bei dieser Berechnung s_2^2 größer als s_1^2 , das heißt wird die mittlere quadratische Abweichung der beiden Mittelwerte vom Generalmittel größer als die Streuungen der Einzelmeßwerte um ihren individuellen Mittelwert, und ist dazu noch das Verhältnis s_2^2/s_1^2 größer als der aus einer F-Tafel bei den entsprechenden Freiheitsgraden und Werten für P abgelesene kritische Wert, so darf man die beiden Kurven als signifikant verschieden ansprechen. (Fisher und Yates 1948, S. 35–43, Table V, Points of e^{2z} ; Linder 1951, S. 226–228, F-Tafel.)

Zur Interpretation der statistischen Berechnungen gilt:

Sind die Werte für P gleich oder kleiner als 0,05, so wurden die Meßwerte für den (+) und den (—) Stamm als «signifikant different» interpretiert.

Ist s_1^2 größer als s_2^2 , so fehlt eine statistisch gesicherte, signifikante Differenz von vorneherein.

In den Figuren ist auch ein Maß für die Signifikanz eingetragen. Es bedeuten: $20^\circ/30^\circ$ = Vergleich der Werte bei 20° C und 30° C. Und weiter bedeutet $0,01 > P > 0,001$, der berechnete Wert für P liegt zwischen den aus der Tafel abgelesenen Werten für $P = 0,01$ und $P = 0,001$.

III. Einfluß der Temperatur auf den Stoffwechsel von *Rhizopus microsporus* (+) und (—) und von *Rhizopus circinans* Z (+) und (—)

1. Wachstum und Aussehen des Mycels

Kluyver und Perquin (1933) erhielten auf Grund ihrer Versuchsbedingungen in Schüttelkultur mit m/8 Phosphatpuffer (pH 2,2) mit *Aspergillus niger* ein Kugelmycel. Auch Meder (1952) berichtet für *Rhizopus japonicus* von einem Kugelmycel mit Kugeln von 1 bis 7 mm Durchmesser, wenn die Nährlösung Puffergemische (Phosphat- und Zitratpuffer) enthielt. Er weist aber auf eine Wirkung der Natur der Puffersubstanz auf das Wachstum des Mycels hin, da er mit Marmorstückchen als Puffersubstanz ein zu einem Faserbrei zerfließendes Mycel und nur ausnahmsweise Kornmycel erhielt.

In den eigenen Versuchen kamen diese Wirkungen der Natur der Puffersubstanz deutlich zum Ausdruck. Bei Versuchen mit Marmorstückchen konnte weder mit *Rhizopus microsporus* noch mit *Rhizopus circinans* Z ein Kugelmycel erhalten werden, aber auch keine Deckenbildung. Die Pilzfäden bildeten vielmehr eine ungeformte Masse, z.T. leberlappenartig und glatt, teilweise einen Faserbrei, welcher die ganze Nährlösung ausfüllte. Unterschiede im Aussehen des Mycels der beiden Geschlechter einer Pilzart konnten bei dieser Art der Pufferung nicht

festgestellt werden. Mit m/10 Zitratpuffer (pH 4,9) konnte mit *Rhizopus microsporus* ein geformtes Kugelmycel erhalten werden, wie es schon die beiden obengenannten Autoren erwähnen, während *Rhizopus circinans* Z auch damit nicht zur Bildung von Kugeln zu bringen war. Vielmehr wuchsen die beiden Stämme dieses Pilzes in großen, unförmigen, kompakten Massen, die keine Regelmäßigkeiten erkennen ließen. Je nach der Temperatur waren die Mycelmengen größer oder geringer, dichter oder lockerer gepackt. Obwohl die Wasserstoffionenkonzentration nach den beiden Pufferungsmethoden nicht so wesentlich verschieden zu sein schien, traten doch deutliche Unterschiede in der Ausbildung der Mycelien auf, die wahrscheinlich nicht auf die Wasserstoffionenkonzentration selbst, sondern auf die Natur der Puffersubstanzen zurückzuführen sind. Meder (1952) beobachtete ähnliche Verschiedenheiten des Mycelwachstums von *Rhizopus japonicus* bei gleicher Wasserstoffionenkonzentration, aber verschiedener Puffersubstanz (Phosphat- und Zitratpuffer).

Bei Pufferung mit Marmorstückchen konnte nach einigen Tagen beobachtet werden, wie sich das Mycel in einem dichten Mantel um die Marmorstückchen legte, wodurch eine gleichmäßige Pufferung der Nährlösung verhindert wurde. Die Durchführung der Kulturen als Schüttelkulturen, mit deren Hilfe uniforme Umweltsbedingungen geschaffen werden sollten, wurde aus diesem Grunde illusorisch.

Auf mit Natriumzitat gepufferter Nährlösung zeigte es sich im Laufe der Versuche, daß das Mycel der beiden Geschlechter verschieden aussah, auf mit CaCO_3 gepufferter Nährlösung konnten dagegen keine Geschlechtsverschiedenheiten im Aspekt beobachtet werden.

Auch die Außentemperatur blieb nicht ohne Einfluß auf das Aussehen des Mycels. Bei einer Außentemperatur von 10°C entwickelten weder *Rhizopus microsporus* (+) noch (—) ein gut sichtbares Mycel, es bildeten sich nur ganz feine weiße Schleier in der Nährlösung, deren Trockengewichte anfänglich zu gering waren, um gewogen werden zu können. Erst nach vierzehn Tagen waren die Mycelmengen so groß, daß sie als Trockenmasse gewogen werden konnten; ihre Gewichte lagen jedoch immer unter 10 mg. *Rhizopus circinans* Z bildete bei dieser Temperatur ein zuerst feines, watteartiges, später wolkenartiges Mycel aus, das sich im Laufe des Versuches zu einer kompakten Masse verdichtete.

Bei 20°C entstanden bei *Rhizopus microsporus* (+) auf Nährlösung mit Zitratpuffer nach zwei Tagen pro Kolben 2 bis 6 weiße Kugeln von 5 bis 7 mm Durchmesser, deren Zahl bis zum neunten Tag auf etwa 8 bis 12 mit einer Größe von 10 bis 16 mm Durchmesser anstieg. Das (—) Mycel bildete bei dieser Temperatur keine regelmäßigen runden Kugeln, sondern anfangs ein feines Mycel von watteartigem Aussehen, das sich nach neun Tagen zu eher ovalen Klumpen verwandelt hatte, deren Zahl

mit 1 bis 4 pro Kolben gering blieb und deren beide Durchmesser zwischen 10 bis 20 und 30 bis 50 mm schwankten. Beide Mycelien behielten über die ganze Versuchsdauer von 22 Tagen ihre weiße Färbung bei.

Rhizopus circinans Z (+) entwickelte unter den gleichen Bedingungen feine Mycelstückchen, die sich im Laufe der Zeit zu ring- oder hufeisenförmigen kompakten Mycelmassen ausbildeten. Beim (—) Stamm entwickelten sich nur feste, formlose Mycelmassen. Die Farbe des anfänglich weißen Mycels beider Geschlechter wurde nach vier Tagen beige, und beim Mycel des (—) Stammes wurde sie immer dunkler, bis dieses nach vierzehn Tagen graubraun gefärbt war; die goldgelbe Nährlösung behielt beim (+) Stamm ihre Färbung bei, während sie beim (—) Stamm einen intensiv dunkelgelben Farbton annahm.

Die Mycelien der beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus microsporus* zeigten bei 30° C Kugelgestalt. Die Anzahl der Kugeln war aber beim (—) Stamm im Gegensatz zu den Verhältnissen bei 20° C viel größer als beim (+) Stamm; die Kugelgröße war bei beiden Geschlechtern ungefähr gleich. Bei dieser Temperatur wächst der (—) Stamm etwas schneller als der (+) Stamm, indem er die endgültige Kugelgröße fünf Tage früher erreicht als der (+) Stamm (Tabelle 1). Aus der Tabelle 1 geht auch hervor, daß bei einer großen Kugelzahl die Kugeln im Durchschnitt kleiner sind; werden nur wenige Kugeln gebildet, so sind diese meist größer.

Tabelle 1

Mycelentwicklung bei *Rhizopus microsporus* (+) und (—) auf Nährlösung mit Natriumzitrattropfen

	Vers. tag	10° C		20° C		30° C		40° C	
		Zahl	mm ø	Zahl	mm ø	Zahl	mm ø	Zahl	mm ø
<i>Rhizopus microsporus</i> (+)	1.	a		a		2-6	5-10	1-3	9-10
	2.	a		2-6	5-7	4-7	7-11	2-4	13-16
	4.	a		3-11	9-11	3-12	15-21	1-3	16-25
	7.	a		6-8	12-15	4-9	13-19	2-3	14-30
	9.	a		8-12	10-16	4-12	12-20	2-5	10-30
	14.	a		8-12	10-16	3-9	15-25	2-9	10-29
<i>Rhizopus microsporus</i> (—)	1.	a		a		20-25	5-8	1-2	5-9
	2.	a		a		16-40	8-14	1-2	10-13
	4.	a		a		18-40	10-20	2-4	16-22
	7.	a		c		22-40	10-19	2-3	25-28
	9.	a		1-4b	10-20 x30-50	40-50	11-20	1-2	35-50
	14.	a		7-8b	11-23 x34-55	36-37	12-21	2-5	12-25

a. feines watteartiges Mycel

b. ovale Klumpen

c. größere und kleinere Mycelklumpen

Unterschiede im Aussehen des Mycels der beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus microsporus* machten sich bei der zuletzt erwähnten Temperatur deutlich bemerkbar. Vom zweiten Tag an bildeten sich auf der Oberfläche der Kugeln des (—) Mycels regelmäßig feine, nadelförmige Auswüchse, welche die Oberfläche wie rauh aussehen ließen, während beim (+) Mycel die Kugeloberflächen völlig glatt blieben. Hingegen färbte sich das anfangs weiße (+) Mycel nach sieben Tagen gelblich, das (—) Mycel blieb während der ganzen Versuchsdauer weiß.

Das Mycel der beiden Sexualstämme von *Rhizopus circinans* Z füllte bei 30° C die ganze Nährlösung als breiige Masse aus, wobei sich die Geschlechter nicht unterschieden, wie das bei *Rhizopus microsporus* der Fall gewesen war. Einzig in den Färbungen ihrer etwas älteren Mycelien unterschieden sich die beiden Geschlechtsstämme deutlich. In den ersten Tagen nach der Impfung waren beide Mycelien weiß gefärbt; nach etwa vier bis sieben Tagen ging die Färbung in ein Beige über. Dann ging aber die Verfärbung beim (—) Stamm weiter, indem sich das Mycel zuerst braun, dann nach und nach grau und in wenigen Fällen fast schwarz färbte, was nach etwa zwei Wochen erreicht war. Auch die Nährlösung machte diese Farbänderung mit, sie erreichte zuletzt eine graue, etwas gelblich scheinende Tönung. In den mit dem (+) Stamm beimpften Kolben blieb über die ganze Versuchsdauer hin die goldgelbe Nährlösungsfarbe erhalten.

Die für 30° C beschriebenen Erscheinungen wiederholten sich bei *Rhizopus microsporus* im Prinzip auch bei 40° C. Die Zahl der Kugeln des (—) Mycels war nur wenig größer als die des (+) Mycels. Die Kugelgrößen entwickelten sich bei beiden Mycelien ungefähr in gleicher Weise (Tabelle 1). Auch bei dieser Temperatur traten auf den Kugeln des (—) Mycels die schon bei 30° C beobachteten feinen Auswüchse auf, wogegen die Kugeln des (+) Stammes glatt blieben.

An besonders großen Kugeln des (+) Stammes konnte aber gelegentlich nach zehn Tagen beobachtet werden, wie sich in einem Streifen rund um die Kugeln herum ein wolliges, sekundäres Mycel bildete, ähnlich einer Halskrause, wobei die Enden der ursprünglichen glatten Kugel auf beiden Seiten herausschauten.

Die schon bekannte Verfärbung des anfänglich weißen Mycels gegen gelbbeige trat beim (+) Mycel bereits am zweiten Tag, beim (—) Mycel am vierten Tag ein. Die goldgelb gefärbte Nährlösung änderte ihr Aussehen nicht.

Beide Geschlechter von *Rhizopus circinans* Z wuchsen bei 40° C nicht mehr, weder auf mit CaCO₃ noch auf mit Natriumzitrat gepufferter Nährlösung. Versuche haben gezeigt, daß das Temperaturmaximum für die Mycelentwicklung unter den gewählten Versuchsbedingungen bei 35° C liegen muß. Bei dieser Temperatur entwickelten sich in mit Zitrat gepufferter Nährlösung noch kleine, etwa 1 mm Durchmesser aufweisende

schleimige Kügelchen, und zwar beim (—) Stamm in viel größerer Anzahl als beim (+) Stamm. Die Nährlösung hatte sich dabei in allen Versuchskolben in eine dunkelgelbbraune, schleimige Masse verwandelt.

2. Das Trockengewicht des Mycels

Die Bildung der Trockenmasse des Mycels ergab in Nährlösung mit Zitratpuffer bei den Geschlechtsstämmen von *Rhizopus microsporus* und *Rhizopus circinans* Z gute Übereinstimmung der Einzelwerte der Parallelkolben eines Geschlechts, obwohl *Rhizopus circinans* Z auch auf solcher Nährlösung nicht in der erwarteten Form als Kugelmycel gewachsen war, sondern mehr wie im vorhergehenden Kapitel geschildert als Faserbrei resp. Mycelklumpen (s. S. 122). Das ist deshalb erwähnenswert, weil im Gegensatz dazu mit CaCO_3 als Puffersubstanz die Erfahrung gemacht werden mußte, daß in solchen Kulturen große Streuungen der Parallelwerte auftreten konnten, insbesondere mit *Rhizopus microsporus* bei höheren Temperaturen. So konnten in einem Kolben am Ende eines Versuches die doppelten bis dreifachen Mengen an Trockenmasse gegenüber dem gleich behandelten Parallelkolben gemessen werden. Es fanden sich zum Beispiel bei *Rhizopus microsporus* (+) bei 40° C in einem Kolben 0,885 g Myceltrockensubstanz. im Parallelkolben dagegen nur 0,205 g; der erste Kolben enthielt somit sogar mehr als das Vierfache der Myceltrockenmenge des anderen Kolbens. Ähnliches ergab sich auch bei 35° C, wo *Rhizopus microsporus* (—) in einem Kolben 0,490 g Mycel bildete und im Parallelkolben nur 0,191 g. Die Gründe dafür dürften bei ungleichen Ernährungsbedingungen zu suchen sein, wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde.

Der Aufbau von Mycel durch die Stämme der beiden untersuchten Pilzarten in mit Natriumzitrat gepufferter Nährlösung ging bei 30° C am raschesten vor sich. Bis zum vierten Tag war der Zuwachs an Mycel groß, dann nahm er aber allmählich ab und war bei den Stämmen von *Rhizopus circinans* Z nach sieben Tagen, bei denen von *Rhizopus microsporus* nach neun bis vierzehn Tagen praktisch beendet. Bei 20° C lief die Mycelbildung von *Rhizopus microsporus* (+) und (—) zuerst nur langsam an, wurde nach 24 bis 48 Stunden intensiver, überstieg nach vier bis sechs Tagen die bei 30° C erzeugte Menge und erreichte nach neun bis elf Tagen die volle Ausbildung, die von *Rhizopus circinans* Z (+) und (—) bereits nach vier Tagen erreicht worden war. Die Mycelbildung bei 40° C ging etwa parallel derjenigen bei 30° C, wobei jedoch beim (—) Stamm bedeutend geringere Werte festgestellt wurden. Weder *Rhizopus circinans* Z (+) noch (—) sind bei 40° C in mit Zitrat gepufferter Nährlösung gewachsen.

Die Trockengewichtskurven von *Rhizopus microsporus* (+) für 20°, 30° und 40° C auf Nährlösung mit Zitratpuffer zeigten keine nennens-

werten Differenzen der bis zum Versuchsabschluß gebildeten Mycelmengen; auch während der Entwicklung traten solche nicht auf (0,25 bis 0,35 g). Die Mycelbildung schien nach vierzehn Tagen ihr Ende gefunden zu haben, später war die Mycelvermehrung nur noch unwesentlich. Bei 10° C ist der Pilz kaum noch gewachsen, es entstanden erst nach vierzehn Tagen geringe Mengen Mycel, deren Trockengewichte unter 10 mg lagen (vgl. auch Figur 1, Tabelle 2).

Bei *Rhizopus microsporus* (—) war die Mycelbildung für 20° und 30° C und 20° und 40° C signifikant verschieden; zwischen 30° und 40° C konnte keine signifikante Differenz erkannt werden. (20°/30° C: $0,01 > P > 0,05$; 20°/40° C: $P < 0,01$; 30°/40° C : $P > 0,2$.) Die Hauptmycelbildung bei diesen drei Temperaturen dauerte bis zum neunten Tag, der spätere Zuwachs war nur noch unbedeutend. Bei 10° C waren die nach vierzehn Tagen gebildeten Mycelien so gering wie beim (+) Stamm (vgl. Figur 1, Tabelle 2).

Auf Nährlösung mit Zugabe von Marmorstückchen bildeten *Rhizopus microsporus* (+) und (—) das Mycel bei allen Temperaturen rascher und in größeren Mengen als in Nährlösung mit Zitratpuffer. Bei 30° C war die Mycelproduktion in den ersten Tagen sehr groß und erreichte nach elf Tagen Werte von 1,08 g beim (+) Stamm und 1,06 g beim (—) Stamm. Auch bei 20° C vermehrte sich das Mycel sehr rasch, seine Menge betrug nach elf Tagen beim (+) Stamm 0,72 g und beim (—) Stamm 1,18 g. Bis zum Versuchsende stieg die Mycelmenge noch bis auf 0,92 g resp. 1,28 g. Bei 40° C betrugen die nach elf Tagen erreichten Trockengewichtshöchstwerte für den (+) Stamm 0,43 g, für den (—) Stamm 0,48 g (Tabelle 2). Die Temperaturkurven der Mycelbildung durch die beiden Geschlechtsstämme sind teilweise signifikant verschieden: (+) Stamm: 10°/20° C: $0,05 > P > 0,01$; 10°/30° C: $P < 0,001$; 10°/40° C: $P > 0,05$; 20°/30° C: $0,1 < P < 0,2$; 20°/40° C: $0,05 > P > 0,01$; 30°/40° C: $P < 0,001$. (—) Stamm: 10°/20° C: $P < 0,001$; 10°/30° C: $P < 0,001$; 10°/40° C: $P > 0,2$; 20°/30° C: $s_1^2 > s_2^2$; 20°/40° C: $0,05 < P < 0,1$; 30°/40° C: $0,05 > P > 0,01$.

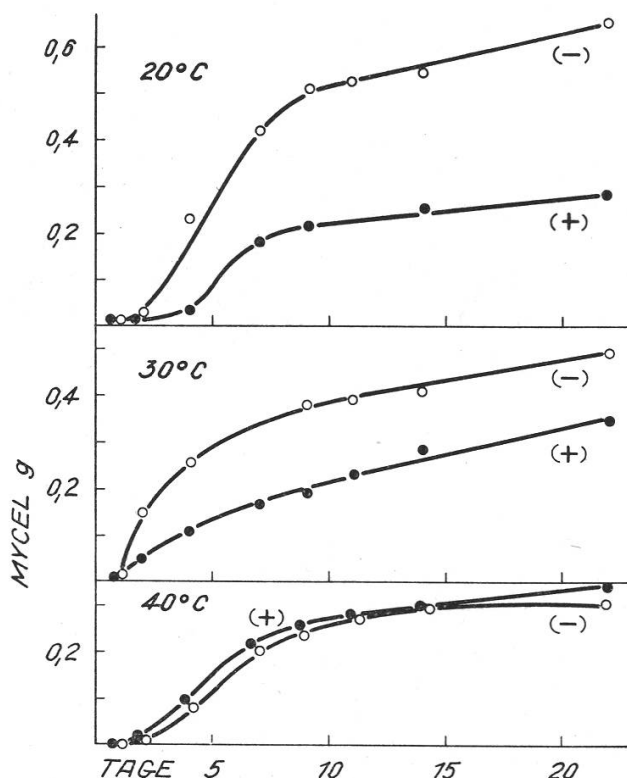
Tabelle 2

Rhizopus microsporus. Höchste Werte des Myceltrockengewichtes auf mit Natriumzitrat, resp. CaCO₃ gepufferter Nährlösung

Temp. °C	(+) Stamm				(—) Stamm			
	Zitrat		Marmor		Zitrat		Marmor	
	Tag	mg	Tag	mg	Tag	mg	Tag	mg
10	22	0,005	2	170	22	0,008	4	202
20	11	320	22	920	9	520	15	1280
30	14	340	11	1080	9	380	11	1060
40	14	290	11	430	9	240	8	480

Es ist schon erwähnt worden, daß die Natur der Puffersubstanz einen wesentlichen Einfluß auf die Wachstumsmöglichkeiten ausüben muß. Nur mit Hilfe dieser Annahme kann erklärt werden, daß die beiden Stämme von *Rhizopus microsporus* auf mit Marmorstückchen gepufferter Nährlösung auch bei 10° C noch wuchsen, wo sie doch auf Nährlösung mit Zitratpuffer bei 10° C nur noch ein kümmerliches Mycel entwickelt hatten. Innert zwei Tagen war vom (+) Stamm die maximale Mycelmasse von 0,17 g und vom (—) Stamm nach vier Tagen von 0,20 g produziert worden (Tabelle 2).

Betrachtet man die Trockengewichtsmengen der beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus microsporus* bei gleicher Temperatur, so läßt sich auf Nährlösung mit Zitratpuffer bei den Temperaturen im Bereiche des Optimums (20° und 30° C) ein signifikanter Unterschied des vom (—) Stamm gebildeten Mycels gegenüber den Mengen des (+) Stammes beobachten. Die Differenzen sind bei 20° C am größten, wo der (—) Stamm etwa doppelt soviel Myceltrockenmasse wie der (+) Stamm bildet. Je höher die Temperatur ansteigt, um so geringer wird der Unterschied. Bei 40° C liegen die beiden Kurven ganz nahe beieinander, wobei der (+) Stamm ein wenig mehr Mycel entwickelt hatte als der (—) Stamm. Eine Geschlechtsverschiedenheit war hier statistisch nicht mehr zu erfassen (Figur 1).



Figur 1
Rhizopus microsporus. Mycelbildung
des (+) und des (—) Stammes bei
verschiedenen Temperaturen in Nähr-
lösung mit Zitratpuffer

Signifikanzen: 20° C: $P < 0,001$;

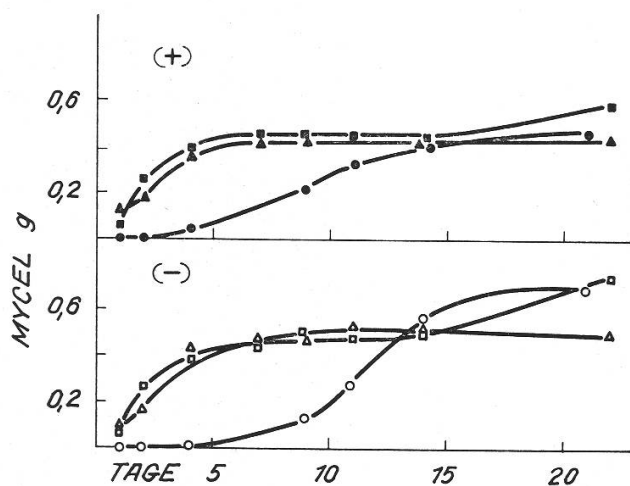
30° C: $0,01 > P > 0,05$; 40° C:

$$s_1^2 > s_2^2$$

Ein Vergleich der Mycelentwicklung des (+) und des (—) Stammes von *Rhizopus microsporus* in Nährlösung mit Marmor zeigt, daß das (—) Mycel bei allen Temperaturen mehr Trockenmasse bildete als das (+)

Mycel, wobei aber außer bei 20° C keine signifikanten Unterschiede errechnet werden konnten, was auf die großen Schwankungen der Einzelwerte in den Parallelkolben zurückgeführt werden muß, deren Gründe schon erwähnt wurden (20° C: $0,05 > P > 0,01$; 10°, 30° und 40° C: $s_1^2 > s_2^2$).

Die Mycelbildung der beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus circinans* Z glich auf Nährlösung mit Natriumzitrat im großen ganzen derjenigen von *Rhizopus microsporus*, wobei festgehalten werden muß, daß sie wesentlich schneller vor sich ging als bei der letztgenannten Pilzart. Das Mycel des *Rhizopus circinans* Z (+) war bei den verschiedenen Temperaturen bereits nach vier bis sieben Tagen voll ausgebildet, das des (—) Stammes nach sieben bis neun Tagen. Die gebildeten Mycelmengen waren durchwegs etwas größer als die der Stämme von *Rhizopus microsporus*. Erwähnenswert ist noch, daß beide Stämme von *Rhizopus circinans* Z auch bei 10° C noch gut gewachsen sind und nach vierzehn Tagen Mycelien produziert hatten, die in der Größenordnung der bei 20° und 30° C gebildeten Mycelien lagen (Figur 2, Tabelle 3).



Figur 2

Rhizopus circinans Z. Mycelbildung der beiden Geschlechtsstämme bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer

10° C: ○—○ 20° C: △—△
30° C: □—□

Signifikanzen: (+) Stamm: 20°/30° C:

$s_1^2 > s_2^2$; 10°/20° C: $P < 0,001$;
10°/30° C: $0,01 > P > 0,001$.

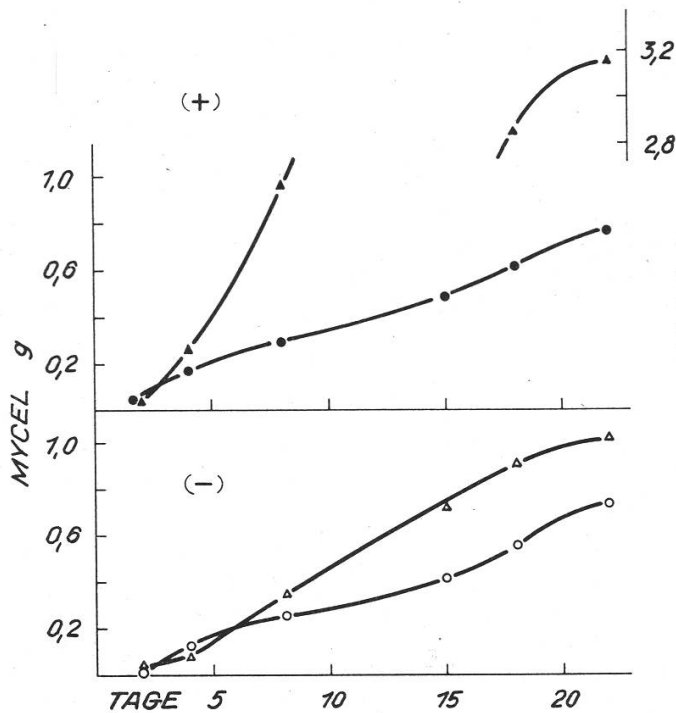
(—) Stamm: 20°/30° C: $s_1^2 > s_2^2$;
10°/20° C: $0,05 > P > 0,01$;
10°/30° C: $P < 0,001$.

Tabelle 3

Rhizopus circinans Z. Höchste Werte des Myceltrockengewichtes auf mit Natriumzitrat resp. CaCO₃ gepufferter Nährlösung

Temp. °C	(+) Stamm				(—) Stamm			
	Zitrat		Marmor		Zitrat		Marmor	
	Tag	mg	Tag	mg	Tag	mg	Tag	mg
10	14	450			14	630		
20	5	420	20	3140	7	450	20	1016
30	7	440	20	754	7	460	22	727

Mit *Rhizopus circinans* Z ließ sich in Nährlösung mit Marmor als Puffersubstanz deutlich feststellen, daß die Mycelmengen mit steigender Temperatur rapid abnahmen. Waren am Versuchsende bei *Rhizopus circinans* Z (+) bei 20° C 3,14 g Mycel gebildet worden, so waren es bei 30° C nur noch 0,754 g. Bei 35° und 40° C ist der Pilz nicht mehr gewachsen. In gleicher Weise reagierte auch der (—) Stamm auf die Temperatur, indem eine Mycelmenge von 1,01 g bei 20° C auf 0,727 g bei 30° C abnahm (Figur 3, Tabelle 3).



Figur 3
Rhizopus circinans Z. Mycelbildung der beiden Geschlechtsstämme bei verschiedenen Temperaturen in mit Marmorstückchen gepufferter Nährlösung
 20° C: △—△ 30° C: ○—○
 Signifikanzen: (+) Stamm: 20°/30° C: $P < 0,001$; (—) Stamm: 20°/30° C: $0,05 > P > 0,01$

Ein Vergleich der Mycelbildung der beiden Sexualstämme von *Rhizopus circinans* Z in mit Zitrat gepufferter Nährlösung bei gleicher Temperatur zeigte eigenartige Verhältnisse. In den ersten vier Tagen ging die Mycelbildung des (+) Stammes bei allen drei Temperaturen rascher vor sich, so daß er in dieser Zeit etwas mehr Mycel als der (—) Stamm bildete. Nach vier bis sieben Tagen hörte das Wachstum des (+) Stammes auf, während das (—) Mycel sich noch ein bis zwei Tage weiter vermehrte, so daß nach zwölf Tagen der (—) Stamm für den weiteren Versuchsverlauf dauernd etwas höhere Trockengewichtswerte aufwies als der (+) Stamm. Eine signifikante Differenz konnte nur bei 10° C ermittelt werden (10° C: $0,01 > P > 0,001$; 20° C: $s_1^2 > s_2^2$; 30° C: $P > 0,2$).

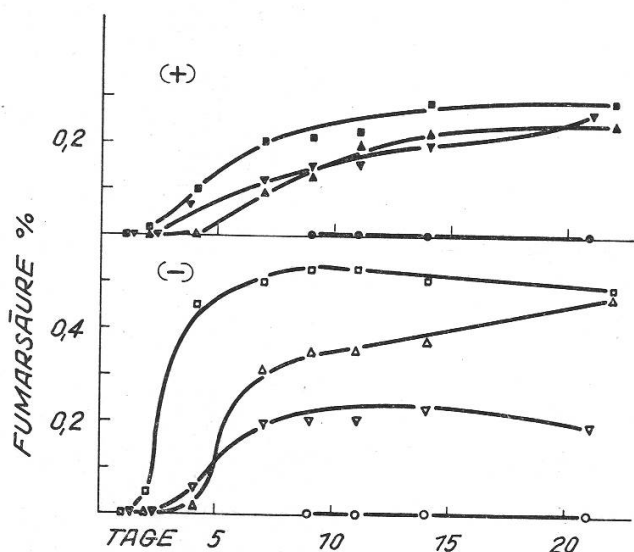
Auf Nährlösung mit Marmorstückchen bildete *Rhizopus circinans* Z (+) bei allen Temperaturen mehr Mycel als der (—) Stamm, wobei der Unterschied nur bei 20° C signifikant war (vgl. auch Figur 3). (20° C: $P < 0,001$; 30° C: $s_1^2 > s_2^2$).

Der Einfluß der Temperatur auf das Mycelwachstum drückt sich für die beiden Stämme von *Rhizopus microsporus* so aus, daß sich bei beiden Geschlechtern zu Beginn der Entwicklung in Nährlösung mit Zitratpuffer das Optimum bei 30° C befindet, sich aber für den (—) Stamm zwischen dem vierten und sechsten Tag gegen 20° C verschiebt, wohingegen es sich beim (+) Stamm gegen 40° C bewegt. In Nährlösung mit CaCO₃ liegt das Optimum für den (+) Stamm bei 30° C, für den (—) Stamm bis zum vierten Tag bei 30° C, später bei 20° C.

Das Temperaturoptimum für die Mycelbildung von *Rhizopus circinans* Z (+) und (—) liegt auf Marmor gepufferter Nährlösung für beide Geschlechter bei 20° C; mit Zitratpuffer liegt es anfangs bei 30° C, verschiebt sich bei älteren Mycelien gegen 20° C und beim (—) Stamm noch gegen 10° C.

3. Die absolute Fumarsäurebildung

Die Fumarsäurebildung durch *Rhizopus microsporus* setzte in Nährlösung mit Zitratpuffer zwei bis vier Tage nach der Impfung der Kolben ein. Während der ersten paar Tage wurde nur Mycel gebildet, Fumarsäure konnte nur in ganz geringen Mengen nachgewiesen werden (unter 0,001 %). In den darauffolgenden Tagen wurde eine lebhaftere Fumarsäureproduktion beobachtet. Sobald ihre Menge eine gewisse Stufe der unter den Umweltsbedingungen produzierbaren Fumarsäure erreicht hatte (nach acht Tagen), ging die weitere Produktion bis zum maximal Möglichen immer langsamer vor sich und zwischen dem elften und vierzehnten Tag wurden die Höchstwerte erreicht (Figur 4, Tabelle 4).



Figur 4

Rhizopus microsporus. Absolute Fumarsäurebildung durch die beiden Geschlechtsstämme bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer

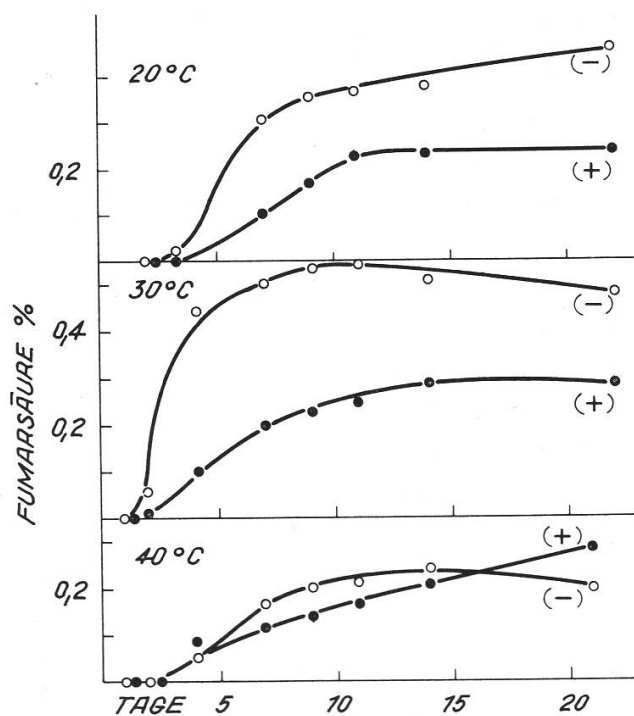
10° C: ○ — ○ 20° C: △ — △
30° C: □ — □ 40° C: ▽ — ▽

Signifikanzen: (+) Stamm: keine signifikanten Unterschiede, überall $s_1^2 > s_2^2$
(—) Stamm: 20°/30° C: $0,01 > P > 0,001$; 20°/40° C: $P < 0,001$;
30°/40° C: $P < 0,001$

Die Bearbeitung der Fumarsäurekurven nach der eingangs beschriebenen Methode (s. S. 121–122) ergab, daß die Fumarsäureentwicklung des (—) Stammes bei den untersuchten Temperaturen signifikant verschieden war, beim (+) Stamm jedoch nicht.

Auf einer Nährlösung, die mit CaCO_3 gepuffert wurde, begannen die beiden Stämme von *Rhizopus microsporus* bei 20°, 30° und 40° C ebenfalls nach zwei Tagen mit der Fumarsäurebildung. Die in der Nährlösung enthaltene Fumarsäuremenge stieg gleich rasch an und erreichte nach zehn bis vierzehn Tagen die höchsten Werte. Bei 10° C wurden die ersten Spuren Fumarsäure nach acht Tagen festgestellt, doch überschritten sie 0,002% während des ganzen Versuches nicht (Tabelle 4). Die von den beiden Stämmen bei den verschiedenen Temperaturen gebildeten Fumarsäuremengen waren teilweise signifikant verschieden. ([+] Stamm: 20°/30° C: $s_1^2 > s_2^2$; 20°/40° C: $0,01 > P > 0,001$; 30°/40° C: $P < 0,001$. [—] Stamm: 20°/30° C: $P < 0,001$; 20°/40° C: $s_1^2 > s_2^2$; 30°/40° C: $P < 0,001$).

Vergleicht man die Fumarsäurebildung der beiden Geschlechter bei gleicher Temperatur, so fällt sofort auf, daß in Nährlösung mit Zitratpuffer die vom (—) Mycel gebildeten Fumarsäuremengen beim Temperaturoptimum bedeutend höher waren als die des (+) Stammes. Bei 40° C bildete der (+) Stamm zu Beginn der Entwicklung etwas mehr Fumarsäure, wurde aber nach vier bis fünf Tagen vom (—) Stamm übertroffen (Figur 5). Bei 10° C bildete der (+) Stamm signifikant mehr Fumarsäure als der (—) Stamm.



Figur 5
Rhizopus microsporus. Absolute Fumarsäurebildung des (+) und des (—) Stammes bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer

Signifikanzen: 20° C: $P > 0,2$;
30° C: $P < 0,001$; 40° C: $s_1^2 > s_2^2$

Auf mit Marmorstückchen gepufferter Nährlösung bildete der (+) Stamm bei allen Temperaturen mehr Fumarsäure als der (—) Stamm.

Die Differenzen in der Fumarsäurebildung ließen jedoch nur bei 20° C eine statistisch gesicherte Verschiedenheit errechnen. (10° und 40° C: $s_1^2 > s_2^2$; 20° C: $P < 0,001$; 30° C: $P > 0,2$).

Optimale Temperatur für die Fumarsäurebildung war für beide Stämme von *Rhizopus microsporus* in mit Marmorstückchen und in mit Natriumzitat gepufferter Nährlösung 30° C.

Tabelle 4

Rhizopus microsporus. Maximalwerte der Bildung von Fumarsäure auf mit Natriumzitat, resp. CaCO₃ gepufferter Nährlösung

Temp. °C	(+)				(-)			
	Zitrat		Marmor		Zitrat		Marmor	
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	Tag	%
10	21	0,009	8	0,006	21	0,0007	11	0,001
20	14	0,23	14	0,81	9	0,32	15	0,21
30	14	0,30	14	0,96	9	0,54	18	1,07
40	14	0,21	18	0,27	7	0,20	15	0,053

Die Fumarsäureproduktion der Sexualstämme von *Rhizopus circinans* Z verlief auf mit Zitrat gepufferter Nährlösung ganz ähnlich der bereits beschriebenen von *Rhizopus microsporus*. Bei 20° C wurde nach zwölf bis vierzehn Tagen ein Rückgang der Fumarsäuremenge in der Nährlösung festgestellt, was bei den beiden Stämmen von *Rhizopus microsporus* nicht eingetreten war. Besondere Verhältnisse lagen bei 10° C vor, wo die Fumarsäure erst nach acht bis neun Tagen auftrat; dann wurden aber in kurzer Zeit große Fumarsäuremengen gebildet (vgl. auch Figur 6, Tabelle 5). ([+] Stamm: 10°/20° C: $0,01 > P > 0,001$; 10°/30° C: $0,05 > P > 0,01$; 20°/30° C: $P = 0,2$. [—] Stamm: 10°/20° C: $P < 0,001$; 10°/30° C: $0,1 < P < 0,2$; 20°/30° C: $0,001 < P < 0,01$.)

Die bei 10°, 20° und 30° C sich im Laufe der Zeit entwickelnden Fumarsäuremengen waren beim (+) und beim (—) Stamm teilweise signifikant verschieden.

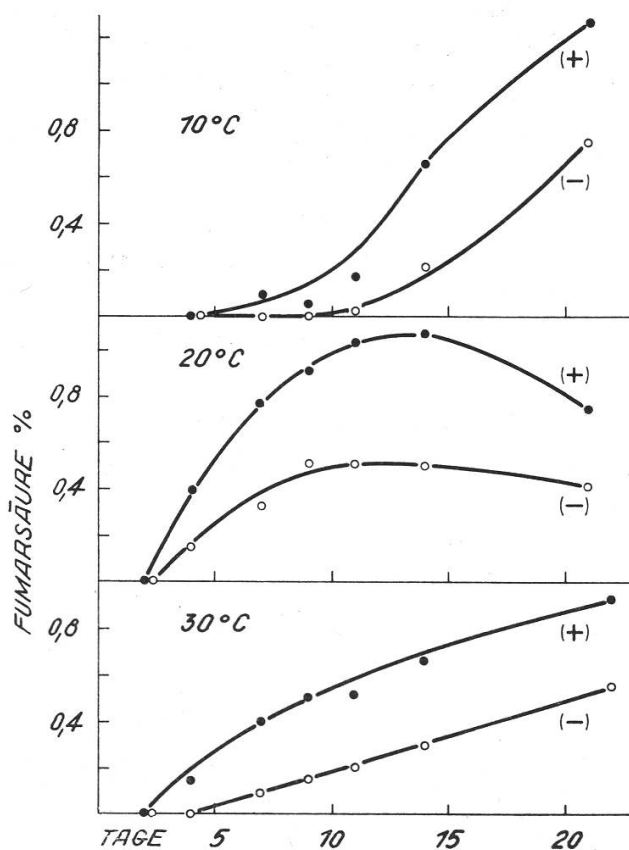
Die Fumarsäurebildung bei *Rhizopus circinans* Z verhielt sich auf Nährlösung mit CaCO₃ im allgemeinen wie die der Stämme von *Rhizopus microsporus* auf der entsprechenden Nährlösung. Nach einem stetigen Ansteigen von Beginn der Fumarsäurebildung nach zwei Tagen an erreicht der (+) Stamm seine Höchstwerte bei 30° C nach fünfzehn bis sechzehn Tagen und bei 20° C nach achtzehn Tagen. Der (—) Stamm produzierte bis zum Versuchsabschluß nach zweiundzwanzig Tagen keine so großen Fumarsäuremengen. Ein Verschwinden der Fumarsäure aus der Nährlösung, wie es in Nährlösung mit Zitratpuffer beobachtet wurde, konnte hier nicht bemerkt werden (Tabelle 5). ([+] Stamm: 20°/30° C: $P > 0,2$; [—] Stamm: 20°/30° C: $P > 0,2$.)

Tabelle 5

Rhizopus circinans Z. Maximalwerte der Bildung von Fumarsäure auf mit Natriumzitat, resp. CaCO₃ gepufferter Nährlösung

Temp. °C	(+) Zitrat				(+) Marmor				(-) Zitrat				(-) Marmor			
	Zitrat		Marmor		Zitrat		Marmor		Zitrat		Marmor		Zitrat		Marmor	
	Tag	%	Tag	%	Tag	%	Tag	%	Tag	%	Tag	%	Tag	%	Tag	%
10	22	1,24							22	0,64						
20	11	1,07	18	1,6					9	0,51	22	0,66				
30	22	0,95	15	1,15					22	0,57	22	1,0				

Im Gegensatz zu *Rhizopus microsporus*, wo der (—) Stamm in Nährlösung mit Zitratpuffer mehr Fumarsäure bildete als der (+) Stamm, ergab sich bei *Rhizopus circinans* Z, daß der (+) Stamm bei allen Temperaturen signifikant mehr Fumarsäure produzierte als der (—) Stamm, wie das schon Meder (1952) mit dem gleichen Pilz in Schüttel- und Deckenkultur festgestellt hatte. Die Fumarsäuremenge des (+) Stammes konnte im Laufe des Versuches bis zum Doppelten der vom (—) Stamm produzierten Fumarsäure betragen, wobei daran zu denken ist, daß beide Stämme etwa gleichviel Mycel entwickelt hatten, das heißt keine signifikant verschiedenen Mengen, der (—) Stamm aber meist etwas mehr als der (+) Stamm, gemessen an der Trockenmasse (Figur 6).



Figur 6

Rhizopus circinans Z. Absolute Fumarsäurebildung des (+) und des (—) Stammes bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer
Signifikanzen: 10° C: $0,01 > P > 0,001$;
20° C: $P < 0,001$; 30° C: $P < 0,001$

Die Fumarsäureproduktion der beiden Sexualstämme bei gleicher Temperatur in mit Marmorstückchen gepufferter Nährlösung zeigt eine deutlich größere Fumarsäurebildung durch den (+) Stamm, die jedoch nicht signifikant war (bei 20° C: $0,1 < P < 0,2$; bei 30° C: $s_1^2 > s_2^2$).

Die optimalen Temperaturen für die Fumarsäurebildung der beiden Stämme unterschieden sich auf Nährlösung mit Marmorstückchen deutlich, indem der (+) Stamm bei 20° C und der (—) Stamm bei 30° C am meisten Fumarsäure aufwies. Auf Nährlösung mit Zitratpuffer lag das Optimum beider Sexualstämme bei 20° C. Aus den Kurvenbildern ist klar ersichtlich, daß die Fumarsäurebildung auf Nährlösung mit Marmor bedeutend höher ist als in solcher mit Zitratpuffer.

Bei den vorstehend beschriebenen Versuchen zeigte es sich, daß die Fumarsäureproduktion immer erst dann begann, wenn bereits eine bestimmte Menge Mycel gebildet worden war. Diese Erscheinung war bei den Versuchen auf Nährlösung mit Zitratpuffer ausgeprägter als bei denjenigen mit Marmorzusatz. Im allgemeinen waren bei unteroptimalen Temperaturen die nötigen Mycelmengen groß, im Bereich der optimalen Temperaturen kleiner, und bei überoptimalen Temperaturen nahmen sie wieder zu (Tabelle 6).

Tabelle 6

Myceltrockengewichte bis zum Beginn der Fumarsäureproduktion in Prozent des Maximaltrockengewichtes bei gleicher Temperatur

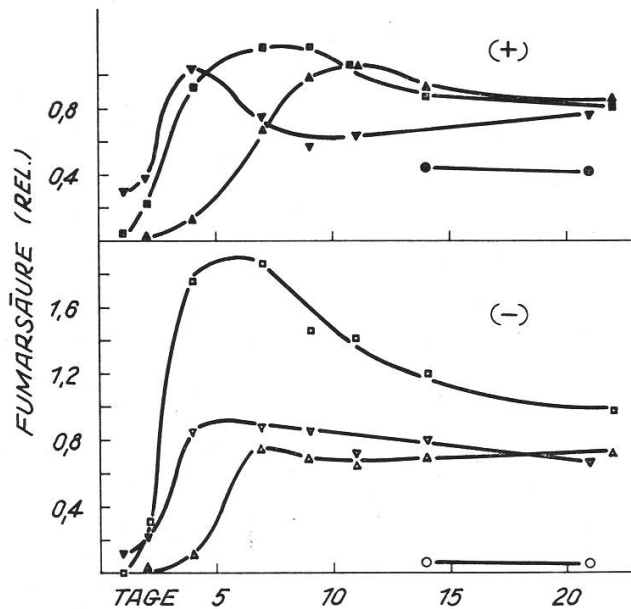
Temp. °C	<i>Rhizopus microsporus</i>				<i>Rhizopus circinans</i> Z			
	(+)		(—)		(+)		(—)	
	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor
10	0	86,0	0	100,0	42,0		41,3	
20	58,2	31,7	44,1	33,6	43,1	7,8	33,3	12,9
30	13,2	61,5	41,1	50,0	62,8	43,4	74,8	72,2
40	7,9	79,1	3,8	74,1	0	0	0	0

4. Die relative Fumarsäurebildung

Um die Zusammenhänge zwischen produzierter Fumarsäure und der sie produzierenden Mycelmenge, gemessen am Trockengewicht, deuten zu können, wurden die erzielten Fumarsäuremengen auf die entsprechenden Mycelmengen bezogen. So ergab sich die von einer Myceleinheit produzierte Fumarsäure. Das interessierte besonders deshalb, weil sowohl von den beiden Sexualstämmen beider Pilzarten bei gleicher Temperatur, als auch vom gleichen Sexualstamm, aber bei verschiedenen Temperaturen ähnliche Mengen Trockenmassen erhalten wurden; trotzdem wurden aber von diesen nicht wesentlich verschiedenen Mycelmengen signifikant verschiedene Fumarsäuremengen gebildet.

Die für die beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus microsporus* erhaltenen Kurven der relativen Fumarsäurebildung zeigten auf Nährlösung mit Zitratpuffer einen charakteristischen Verlauf. Es erfolgte nämlich nach einem raschen und steilen Ansteigen bis zu einem Maximum wieder ein leichter Rückgang auf im weiteren konstant bleibende Werte, die ungefähr um einen Viertel niedriger als der Höchstwert lagen.

Für *Rhizopus microsporus* (+) ergaben sich für die drei Temperaturen 20°, 30° und 40° C drei zeitlich hintereinander liegende Gipfel, von denen der für 40° C sein Maximum zuerst erreichte. Mit einem zeitlichen Abstand von drei Tagen folgte der Gipfel der 30° C-Kurve als höchster von allen und nochmals etwa drei Tage später erreichte auch die Kurve für 20° C ihr Maximum (Figur 7, Tabelle 7).



Figur 7

Rhizopus microsporus. Relative Fumarsäurebildung der beiden Geschlechtsstämme bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer

10° C: ○—○ 20° C: △—△
30° C: □—□ 40° C: ▽—▽

Signifikanzen: (+) Stamm: 20°/30° C: 0,1 > P > 0,05; 20°/40° C: P < 0,001; 30°/40° C: P < 0,001

(-) Stamm: 20°/30° C: 0,01 > P > 0,001; 20°/40° C: 0,1 > P > 0,05; 30°/40° C: 0,01 > P > 0,001

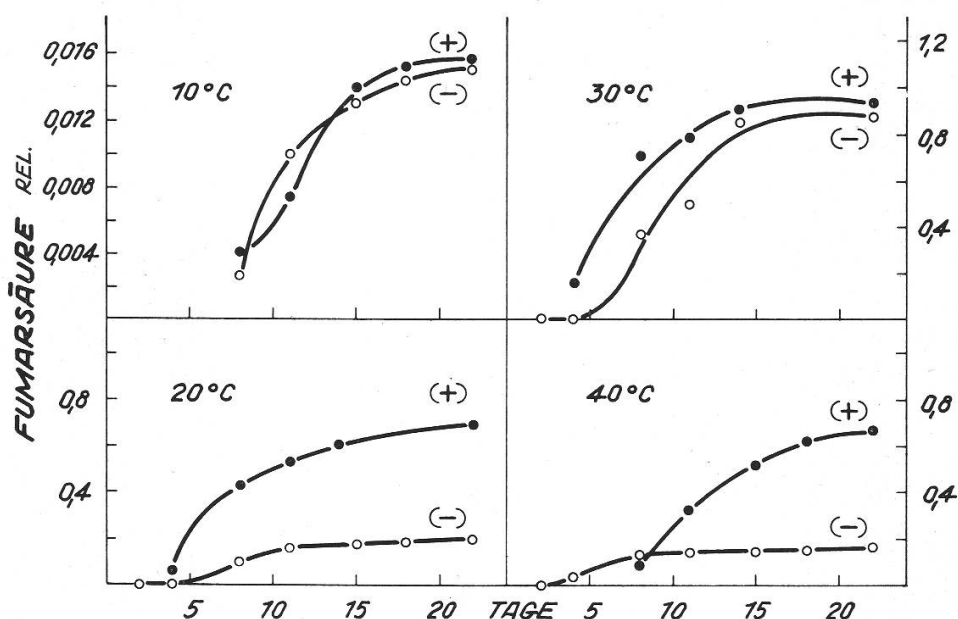
Beim (-) Stamm von *Rhizopus microsporus* fällt auf, daß alle drei Kurven ihre Maxima am gleichen Tag aufweisen und im Gegensatz zum (+) Stamm keine zeitliche Staffelung auftritt (Figur 7, Tabelle 7).

Auf mit Marmorstückchen gepufferter Nährlösung zeigten die Kurven für die relative Fumarsäurebildung der Sexualstämme von *Rhizopus microsporus* die in Nährlösung mit Zitratpuffer beobachteten Gipfelwerte nicht mehr. Nach einem zehn bis vierzehn Tage dauernden Anstieg blieben die Werte auf konstanter Höhe (Tabelle 7). ([+] Stamm: 20°/30° C: P > 0,05; 20°/40° C: 0,05 > P > 0,01; 30°/40° C: 0,05 > P > 0,01. [-] Stamm: 20°/30° C: P < 0,001; 20°/40° C: $s_1^2 > s_2^2$; 30°/40° C: P < 0,001.)

Lagen bei der Fumarsäure- und Mycelbildung von *Rhizopus microsporus* in Nährlösung mit Zitratpuffer die Werte des (-) Stammes fast regelmäßig höher als die des (+) Stammes, so traten in bezug auf die

relative Fumarsäurebildung Änderungen ein (vgl. auch Fig. 7). Die statistische Auswertung ergab: 20° C: $s_1^2 > s_2^2$; 30° C: $0,05 > P > 0,01$; 40° C: $s_1^2 > s_2^2$.

Die statistische Auswertung der Resultate zeigt bei 20° C und 40° C keinen signifikanten Unterschied der beiden Kurven für die relative Fumarsäurebildung des *Rhizopus microsporus* (+) und (–) in Nährlösung mit Zitratpuffer, wohl aber ließ sich ein solcher bei 30° C (Optimum der absoluten Fumarsäurebildung) ermitteln. Auf Nährlösung mit CaCO₃ waren bei allen Temperaturen die Verhältniszahlen des *Rhizopus microsporus* (+) bis dreimal größer als die des (–) Mycels. Wegen der großen Streuungen der Einzelmeßwerte waren die Kurven aber nur bei 20° C signifikant verschieden (Figur 8).

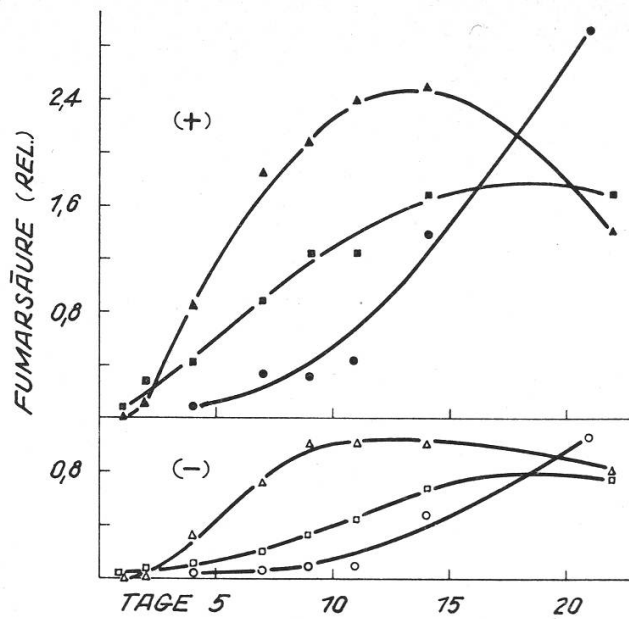


Figur 8

Rhizopus microsporus. Relative Fumarsäurebildung des (+) und des (–) Stammes bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Marmorstückchen

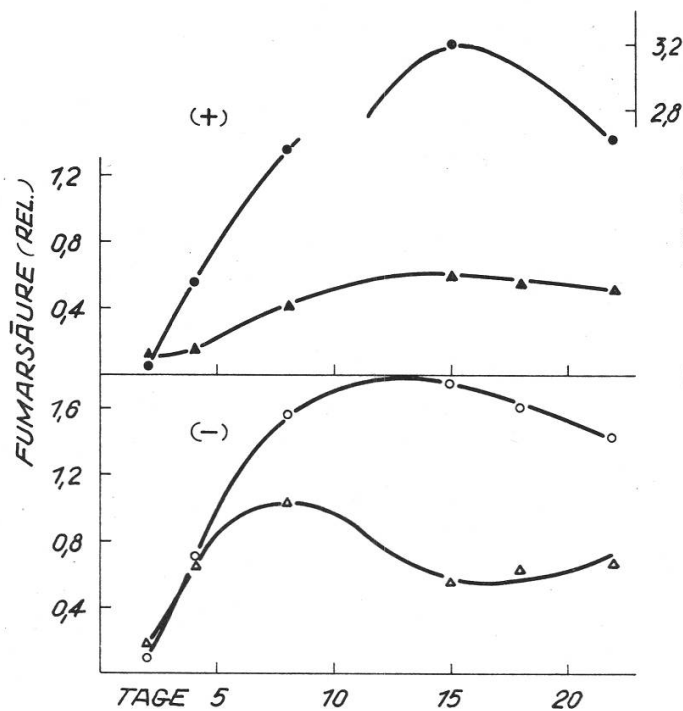
Signifikanzen: 10° C: $s_1^2 > s_2^2$; 20° C: $P < 0,001$; 30° C: $P > 0,2$; 40° C: $P > 0,2$

Bei der relativen Fumarsäurebildung durch *Rhizopus circinans* Z wurden Kurven erhalten, die den auffälligen Gipfel und die nachfolgende Reduktion auf ein konstantes Niveau nicht mehr deutlich zeigten. Die Kurven für 20° und 30° C stiegen auf Nährlösung mit Zitratpuffer bis zu ihrem Maximalwert am zehnten bis vierzehnten Tag steil an, wonach die Werte für 30° C dann konstant blieben, während die für 20° C gegen Versuchsende hin wieder abnahmen. Bei 10° C begann die Kurve erst nach vier Tagen zu steigen, zuerst flacher, vom neunten Tag an steil bis zum Versuchsende (Figur 9, Tabelle 8).



Figur 9
Rhizopus circinans Z. Relative Fumarsäurebildung der beiden Geschlechtsstämme bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer
 10° C: ○—○ 20° C: △—△
 30° C: □—□
 Signifikanzen: (+) Stamm: 10°/20° C: P<0,001; 10°/30° C: P<0,001; 20°/30° C: 0,2>P>0,1
 (-) Stamm: 10°/20° C: P<0,001; 10°/30° C: P=0,001; 20°/30° C: P<0,001

In mit Marmor gepufferter Nährlösung zeigte vor allem *Rhizopus circinans* Z (-) in seinen Kurven für die relative Fumarsäurebildung wieder die Gipfelwerte, und zwar bei 20° C am sechsten bis achten Tag und bei 30° C nach zehn bis vierzehn Tagen. Der (+) Stamm wies einen solchen Gipfel nur bei 30° C auf (Figur 10, Tabelle 8).



Figur 10
Rhizopus circinans Z. Relative Fumarsäurebildung der beiden Geschlechtsstämme bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Marmorstückchen
 20° C: △—△ 30° C: ○—○
 Signifikanzen: (+) Stamm: 20°/30° C: P<0,001; (-) Stamm: 20°/30° C: P<0,001

Tabelle 7

Rhizopus microsporus. Gipfelwerte der relativen Fumarsäurebildung in mit Natriumziträt, resp. CaCO₃ gepufferter Nährlösung

Temp. °C	(+)				(-)			
	Ziträt		Marmor		Ziträt		Marmor	
	Tag	Verhältnis	Tag	Verhältnis	Tag	Verhältnis	Tag	Verhältnis
10	14	0,45	15	0,016	14	0,07	14	0,013
20	11	1,05	14	1,12	7	0,74	10	0,12
30	9	1,18	10	0,91	7	1,78	14	0,89
40	4	1,0	16	0,64	7	0,91	8	0,10

Tabelle 8

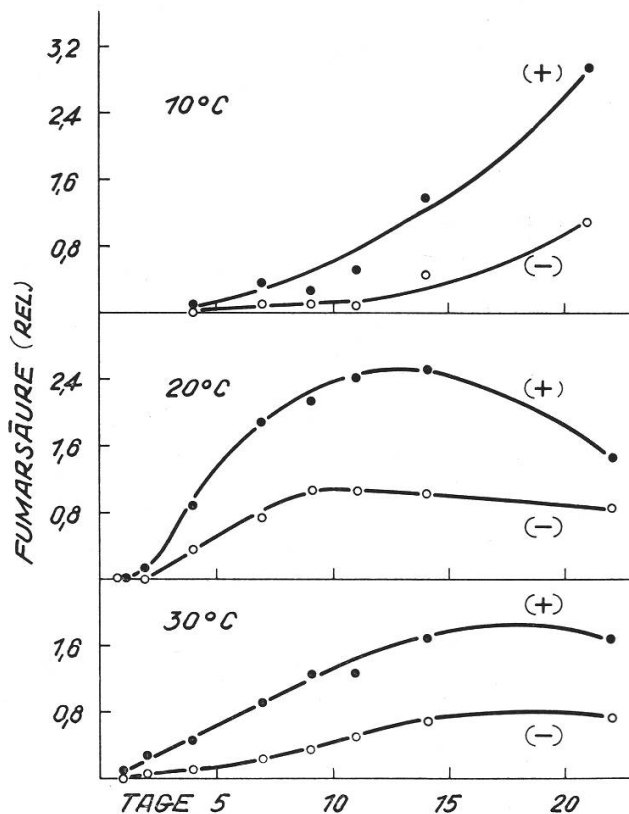
Rhizopus circinans Z. Gipfelwerte der relativen Fumarsäurebildung in mit Natriumziträt, resp. CaCO₃ gepufferten Nährlösung

Temp. °C	(+)				(-)			
	Ziträt		Marmor		Ziträt		Marmor	
	Tage	Verhältnis	Tag	Verhältnis	Tag	Verhältnis	Tag	Verhältnis
10	22	3,0			22	1,1		
20	14	2,54	15	0,59	9	1,08	8	1,05
30	14	1,7	15	3,2	14	0,68	15	1,82

Wie aus dem über Fumarsäure- und Mycelbildung Gesagten hervorgeht, waren auf Nährlösung mit Zitratpuffer bei etwa gleicher Mycelbildung der beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus circinans* Z die Unterschiede in der absoluten Fumarsäurebildung sehr groß. Das wirkte sich dahin aus, daß bei allen Temperaturen der (+) Stamm wesentlich größere Werte der relativen Fumarsäurebildung lieferte als der (—) Stamm. Die Werte des (+) Stammes konnten dabei zweieinhalb bis dreimal größer werden als die des (—) Stammes, und es ergab sich bei allen drei untersuchten Temperaturen, daß die Kurven für die relative Fumarsäurebildung für die beiden Geschlechter bei gleicher Temperatur signifikant verschieden waren (Figur 11). In Nährlösung mit Marmorstückchen konnte nur bei 20° C ein signifikanter Geschlechtsunterschied berechnet werden (20° C: $0,05 > P > 0,01$; 30° C: $0,2 > P > 0,1$).

Die Temperaturoptima für die relative Fumarsäurebildung lagen nach dem soeben Gesagten für *Rhizopus microsporus* (+) in Nährlösung mit Zitratpuffer bei 30° C und in solcher mit Marmorstückchen bei 20° C, während sich die Optima des (—) Stammes mit beiden Puffersystemen bei 30° C befanden. *Rhizopus circinans* Z wies in den Anfangsstadien

der Entwicklung auf mit Zitrat gepufferter Nährlösung ein Temperatur-optimum von 30° C auf, wie auch für die absolute Fumarsäurebildung. Nach drei bis vier Tagen verschob sich das Optimum nach 20° hin und gegen Abschluß der Versuche nach drei Wochen traten auch bei 10° C sehr günstige Werte auf, welche an die von 20° C und 30° C herankamen oder sie zum Teil noch übertrafen. Demgegenüber zeigten die beiden Stämme auf mit CaCO₃ gepufferter Nährlösung beide ein Temperatur-optimum von 30° C.



Figur 11

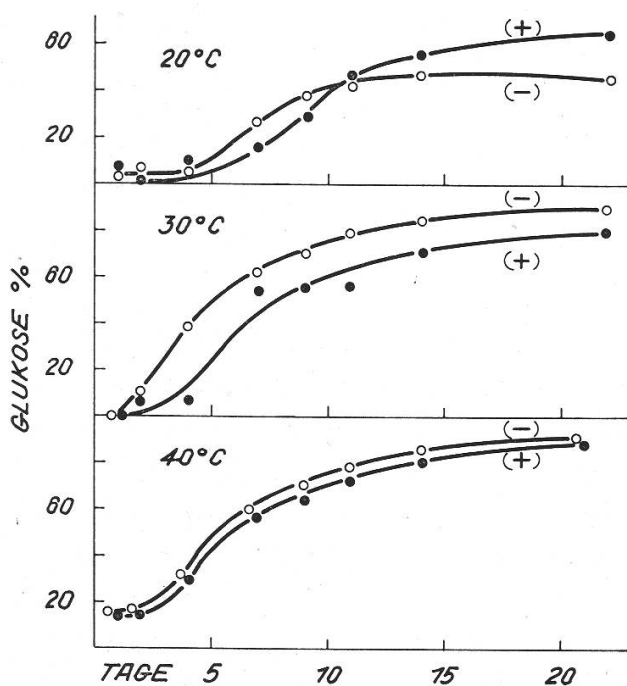
Rhizopus circinans Z. Relative Fumarsäurebildung des (+) und des (-) Stammes bei verschiedenen Temperaturen in Nährlösung mit Zitratpuffer
Signifikanzen: 10° C: $P < 0,001$; 20° C: $P < 0,001$; 30° C: $0,01 > P > 0,001$

Die in den Kurven der relativen Fumarsäurebildung von *Rhizopus microsporus* und zum Teil auch von *Rhizopus circinans* Z beobachteten auffälligen Gipfel lassen sich folgendermaßen erklären: sie lagen genau an den Stellen, wo sich die absolute Fumarsäurebildung zu verlangsamen begann, das heißt wo 75 bis 80% der unter den Versuchsbedingungen maximal möglichen Fumarsäuremenge gebildet worden sind. Das Mycel hat zu dieser Zeit seine volle Ausbildung noch nicht erreicht, sondern vermehrt sich noch einige Tage weiter. Bei der Berechnung der relativen Fumarsäuremenge mußte das so lange zu kleiner werdenden Werten führen, bis die Mycelbildung ebenfalls ihren Endpunkt erreicht hatte. Von da an blieb die relative Fumarsäurebildung konstant.

5. Der Glukoseverbrauch

Durch Bestimmung der Restglukose in der Nährlösung nach Bertrand wurde der Zuckerverbrauch der Pilze während des Versuches festgestellt. Ein Zuckergehalt der Ausgangsnährlösung von 10% erwies sich als reichlich, denn in keinem Fall wurde in Nährlösung mit Zitratpuffer der zur Verfügung gestellte Zucker im Laufe des Versuches vom Mycel völlig verbraucht; in Nährlösung mit CaCO_3 war der Verbrauch nur bei *Rhizopus microsporus* (+) bei 30° C vollständig.

Der Zuckerverbrauch beider Sexualstämme von *Rhizopus microsporus* war in den ersten Tagen, also während der reinen Mycelbildung, in Zitratpuffer enthaltender Nährlösung gering, stieg dann zwischen dem vierten und siebenten Tag in der Zeit der größten Fumarsäurebildung an und nahm etwa vier Tage später wieder langsam ab. Bis zum Versuchsende verbrauchte *Rhizopus microsporus* (+) bei 40° C etwa 88%, bei 30° C 80% und bei 20° C 63%, *Rhizopus microsporus* (—) konsumierte bei 20° C 54%, bei 30° C 90% und bei 40° C 89% des anfänglich vorgegebenen Zuckers. Dabei fällt auf, daß der Zuckerverbrauch bei 40° C am höchsten ist, obwohl die Fumarsäure- und Mycelbildung bei dieser Temperatur nicht so groß sind wie bei 20° und 30° C. Diese Erscheinung läßt sich aber durch die bei hohen Temperaturen erhöhte Atmung erklären (Tabelle 9). ([+] Stamm: 20°/30° C: $P < 0,001$; 20°/40° C: $P < 0,001$; 30°/40° C: $s_1^2 > s_2^2$. [—] Stamm: 20°/30° C: $0,1 > P > 0,05$; 20°/40° C: $P = 0,1$; 30°/40° C: $0,05 > P > 0,01$.)



Figur 12

Rhizopus microsporus. Zucker-
verbrauch des (+) und des (—) Stam-
mes bei verschiedenen Temperaturen
in Nährlösung mit Zitratpuffer
Signifikanzen: 20° C: $s_1^2 > s_2^2$; 30° C:
 $P < 0,001$; 40° C: $P > 0,2$

Vergleicht man den Zuckerverbrauch des (+) und des (—) Stammes bei den drei Temperaturen, so lassen sich außer bei 30° C keine Unterschiede im Glukoseverbrauch der beiden Stämme erkennen. Bemerkenswert ist einzig, daß der Zuckerverbrauch des (—) Stammes fast regelmäßig – außer in den letzten Tagen bei 20° C – wenig über dem des (+) Stammes liegt, was der größeren Menge an Mycel und Fumarsäure entsprechen dürfte (Figur 12).

Auf mit CaCO₃ gepufferter Nährlösung war bei 20° und 30° C der Zuckerverbrauch von *Rhizopus microsporus* (+) sehr hoch, bei 30° C war der Zucker nach vierzehn Tagen aufgebraucht, während bei 20° C der Verbrauch bis zum Versuchsabschluß 82%, bei 10° C nur 30% und bei 40° C 46% betrug. Wie beim (+) Mycel, so war auch der Zuckerverbrauch des (—) Mycels von *Rhizopus microsporus* bei 30° C am größten, am Versuchsende wurden noch 11% Restglukose gefunden; bei 20° C betrug der Verbrauch bis zum Versuchsende 60%, bei 10° C 9% und bei 40° C 43% (Tabelle 9).

Im Gegensatz zum Verhalten des Pilzes auf Nährlösung mit Zitratpuffer war der Zuckerverbrauch des (+) Stammes bei allen Temperaturen höher als der des (—) Stammes, was vor allem auf die größere Fumarsäureproduktion zurückzuführen sein dürfte (10° C: 0,05 > P > 0,01; 20° C: 0,05 > P > 0,01; 30° C: 0,1 > P > 0,05; 40° C: s₁² > s₂²).

Tabelle 9

Zuckerverbrauch in mit Natriumzitrat, resp. CaCO₃ gepufferter Nährlösung. Angaben in Prozenten

Temperatur °C	<i>Rhizopus microsporus</i>				<i>Rhizopus circinans</i> Z	
	(+)		(—)		(+)	(—)
	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Zitrat
10	8	15	12	8	52	48
20	63	82	54	62	90	69
30	80	100	90	89	82	57
40	88	46	89	51	0	0

Die Mycelien beider Geschlechter von *Rhizopus circinans* Z bauten den Zucker am schnellsten bei 20° C ab, bis zum Versuchsabbruch hatte *Rhizopus circinans* Z (+) in Nährlösung mit Zitratpuffer 90% und (—) 69% des vorgegebenen Zuckers verbraucht. Bei den anderen Temperaturen wurde der Zucker langsamer konsumiert, bei Versuchsabbruch wurden bei 30° C für den (+) Stamm ein Verbrauch von 82% und für den (—) Stamm ein solcher von 57% gemessen; bei 10° C wurde ein Gesamtverbrauch von 52% für den (+) Stamm und 48% für den (—) Stamm festgestellt. Bei 10° C war der Zuckerverbrauch im Gegensatz

zu den höheren Temperaturen gering, obwohl gerade gegen Versuchsende hin die Fumarsäureproduktion rapid anstieg (Tabelle 9). ([+] Stamm: $10^{\circ}/20^{\circ}$ C: $P < 0,001$; $10^{\circ}/30^{\circ}$ C: $P < 0,001$; $20^{\circ}/30^{\circ}$ C: $s_1^2 > s_2^2$. [—] Stamm: $10^{\circ}/20^{\circ}$ C: $0,1 > P > 0,05$; $10^{\circ}/30^{\circ}$ C: $P = 0,05$; $20^{\circ}/30^{\circ}$ C: $s_1^2 > s_2^2$.)

Bei allen Temperaturen war der Zuckerverbrauch des *Rhizopus circinans* Z (+) von Anfang an höher als der des (—) Stammes, was durch die größere Fumarsäuremenge bedingt sein dürfte. Die Differenzen zwischen den beiden Geschlechtern waren nur klein bei 10° C und wurden über 20° zu 30° C größer, aber nicht signifikant verschieden. (10° C: $s^2 > s_2^2$; 20° C: $0,1 < P < 0,2$; 30° C: $P > 0,2$.)

IV. Diskussion

Blakeslee (1904a) nannte die Pilzgeschlechter mangels anderer Unterscheidungsmerkmale nach der Üppigkeit des vegetativen Wachstums (+) und (—). Meine eigenen Wachstumsversuche mit *Rhizopus microsporus* (+) und (—) und *Rhizopus circinans* Z (+) und (—) auf natürlichen und synthetischen Nährböden haben gezeigt, wie die Geschlechter der beiden Pilzarten sich im äußeren Habitus verschieden ausbilden können, wobei Unterschiede in der Masse des gebildeten Mycels wie auch in der Sporangienbildung festgestellt wurden. Im Gegensatz zur Meinung von Blakeslee (1904a) war es in den eigenen Versuchen aber nicht unbedingt der (+) Stamm, der die luxuriösere Mycelentwicklung oder die größere Sporangienzahl aufwies. Auch der (—) Stamm konnte bisweilen ein recht kräftiges Mycel neben einem eher kümmerlichen (+) Mycel entwickeln.

Geschlechtsverschiedenes Wachstum ergab sich auch in der Nährlösung der Stoffwechselversuche, wobei sich ein enger Zusammenhang zwischen dem Aussehen des Mycels und der Art und Weise der Pufferung der Nährlösung bemerkbar machte. Foster und Waksman (1939b) erhielten mit *Rhizopus nigricans* auf einem flüssigen synthetischen Nährmedium mit Glukose ein üppiges, dichtes und tiefgraues (+) Mycel neben einem schleimigen, weißen und sporenlosen (—) Mycel.

Aus den Stoffwechselversuchen geht hervor, daß bei einer Pufferung der Nährlösung mit Marmorstückchen beide Pilzarten bei allen Temperaturen wesentlich höhere Mengen an Myceltrockengewicht und Fumarsäure hervorbringen als auf einer Nährlösung mit Zitratpuffer (Tabellen 2–5). Die auf der mit Marmor gepufferten Nährlösung erzeugten Mengen können etwa das Doppelte bis in einzelnen Fällen das Dreifache dessen betragen, was in Nährlösung mit Zitratpuffer produziert wurde.

Auffallend war, daß *Rhizopus microsporus* in Nährlösung mit CaCO_3 auch bei 10° C noch ganz gut wuchs – nach zwei Tagen waren 0,15 bis

0,2 g Trockenmasse entstanden –, wobei sich die Geschlechter nicht unterschieden, während der gleiche Pilz in mit Natriumzitat gepufferter Nährlösung nach längerer Zeit nur ein spärliches Mycel ausgebildet hatte. Parallel dazu konnte mit *Rhizopus circinans* Z beobachtet werden, daß er in Nährlösung mit Zitat bei 35° C noch wuchs, in solcher mit CaCO₃ aber kein Mycel mehr entwickelte. Das beweist, daß Temperaturgrenzen nicht eindeutig festgelegt werden können, sondern sich nach den Umweltrbedingungen, die der Pilz vorfindet, verschieben.

Darauf ist es wohl auch zurückzuführen, daß die Kardinalpunkte des Temperatur, die Hawker (1950) für *Rhizopus microsporus* angibt, nämlich als Minimum + 2° C, als Optimum 25,0° C und als Maximum 32,0° C, nicht bestätigt werden können, da der Pilz, wie erwähnt, in Nährlösung mit Zitratpuffer bei 40° C und in solcher mit CaCO₃ auch noch bei 45° C wuchs und Fumarsäure bildete, bei 10° C mit Zitratpuffer jedoch kaum mehr. Als Erklärung kann eventuell ein Rassenunterschied gegenüber Hawkers Untersuchungsobjekten geltend gemacht werden, andererseits werden aber auch die Ernährungsbedingungen einen wesentlichen Einfluß auf die Temperaturgrenzen des Wachstums ausüben (Thiele 1896, Schaub 1958, p. 81ff). Auch Gaughran (1947) sah bei thermophilen Bakterien einen Einfluß des Kulturmediums auf die Temperaturgrenzen des Wachstums.

Für *Rhizopus circinans* Z gibt Hawker (1950) keine Kardinaltemperaturen an. Ihre Angaben deuten aber auf zwei verschiedene Gruppen innerhalb der Gattung *Rhizopus* in bezug auf das Wärmebedürfnis hin (s. S. 116). Danach gehört *Rhizopus microsporus* zur «kälteliebenden» Gruppe, was nach den eigenen Erfahrungen nicht bestätigt werden kann, da sich vor allem die Optimal- und Maximaltemperaturen als viel höher gelegen erwiesen, als sie Hawker (1950) annimmt. *Rhizopus microsporus* müßte eher zu den «wärmeliebenden» Arten eingereiht werden. *Rhizopus circinans* Z kann demgegenüber gemäß seiner in dieser Arbeit beobachteten Temperaturgrenzen zu der «kälteliebenden» Gruppe gestellt werden.

Daß die Art und Weise der Pufferung und nicht nur die reine Wasserstoffionen-Konzentration einen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum und die Bildung der Trockenmasse hat, beobachtete auch schon Meder (1952). Er stellte unter dem Einfluß verschieden zusammengesetzter Puffersysteme verschiedenes Wachstum von *Rhizopus japonicus* fest, indem er für m/10 Phosphatpuffer eine maximale Wasserstoffionen-Konzentration von pH 7,4 angibt, während in Zitratpuffer der Pilz schon bei pH 6,8 zu wachsen aufhörte.

Obwohl man annehmen könnte, der Zitratpuffer könne eventuell ebenfalls vom Pilz konsumiert werden, also als zusätzliche Nährstoffquelle dienen und zum Aufbau von Zellmaterial, eventuell sogar zur Bildung von Fumarsäure verwendet werden, scheint dies nicht der Fall

zu sein oder nur in ganz geringem Maße, da in Nährlösung mit Marmorstückchen sehr viel höhere Trockengewichtsmengen (bis dreimal mehr) und mehr Fumarsäure gebildet wurden. Es ist aber anzunehmen, daß ein Pilz in einer mit genügend Glukose versehenen Nährlösung diese zuerst aufbraucht.

Ein Absinken der Trockenmasse infolge Konsumation, wie es Meder (1952) nach fünf bis sechs Tagen beobachtete, konnte nicht festgestellt werden. Das mag damit zusammenhängen, daß mit 10% Glukose die Kohlenstoffversorgung reichlich und bis zum Versuchsende nicht völlig erschöpft war, der Pilz sich also nicht genötigt sah, sein eigenes Zellmaterial zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs heranzuziehen. Meder (1952) gab teilweise beträchtlich weniger Glukose als 10% vor.

Im allgemeinen bildeten in Nährlösung mit Natriumzitat die beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus circinans* Z mehr Mycel als die beiden Stämme von *Rhizopus microsporus*, besonders bei niederen Temperaturen; bei den beiden (—) Stämmen ist der Unterschied nur gering. Hingegen produzierten die beiden Sexualstämme von *Rhizopus microsporus* in Nährlösung mit Marmor mehr Mycel als diejenigen von *Rhizopus circinans* Z, wobei die Unterschiede bei höheren Temperaturen zum Teil recht beträchtlich waren. Eine Ausnahme machten nur die beiden (+) Stämme bei 20° C. Mit steigender Temperatur nahm die Myceltrockenmasse der Stämme von *Rhizopus circinans* Z auf Nährlösung mit Marmor rasch ab, während die Stämme von *Rhizopus microsporus* keine so großen Temperaturdifferenzen zeigten.

Das Mycel wird bei *Rhizopus circinans* Z relativ rasch gebildet, bei *Rhizopus microsporus* etwas langsamer. Die erstgenannte Pilzart bildet in den ersten Tagen ihrer Entwicklung zwei- bis dreimal mehr Trockenmasse als die letztere, hört aber auch viel früher mit ihrer Mycelvermehrung auf. So kam es, daß die *Rhizopus microsporus*-Stämme gegen Versuchsende meist mehr Mycel aufwiesen. Dabei machten sich deutliche Geschlechtsunterschiede bemerkbar. *Rhizopus circinans* Z (—) brachte mit Zitat- und Marmorpufferung mehr Mycel hervor als der (+) Stamm. Von den beiden *Rhizopus microsporus*-Stämmen vermochte ebenfalls der (—) Stamm mehr Mycel zu produzieren als der (+) Stamm. Das steht im Gegensatz zu den Angaben von Foster und Waksman (1939b), deren *Rhizopus nigricans* (+) mehr als doppelt so viel Zellmaterial bildete als ihr (—) Stamm.

Parallel zur Mycelbildung war auch die Fumarsäurebildung bei den Sexualstämmen von *Rhizopus circinans* Z mit Zitatpuffer größer als bei denen von *Rhizopus microsporus*. In den frühen Entwicklungsstadien ging zwar die Fumarsäurebildung bei den Stämmen von *Rhizopus microsporus* schneller vor sich als bei jenen von *Rhizopus circinans* Z; letztere aber produzierten länger Fumarsäure (zehn bis vierzehn Tage), während die Sexualstämme von *Rhizopus microsporus* die Fumarsäurebildung nach sechs

bis acht Tagen schon merklich verlangsamten. Die Unterschiede in den zu Versuchsabschluß erreichten Mengen nahmen bei den beiden (+) Stämmen beträchtliche Größen an, bei den beiden (—) Stämmen waren sie geringer. Es ist auffallend, daß *Rhizopus circinans* Z (+) nur in den ersten Versuchstagen mehr Mycel bildete als *Rhizopus circinans* Z (—), aber doch wesentlich mehr Fumarsäure produzierte. Bei den beiden Stämmen von *Rhizopus microsporus* brachte auf Zitratpuffer der (—) Stamm mehr Fumarsäure hervor; mit CaCO₃ war es gerade umgekehrt, der (+) Stamm bildete mehr Fumarsäure als der (—) Stamm. In allen Fällen wurde auf Nährlösung mit Marmorstückchen mehr Fumarsäure gebildet als auf solcher mit Zitratpuffer.

Markante Unterschiede in der Fumarsäureproduktion erhielten Foster und Waksman (1939b) mit *Rhizopus nigricans*-Stämmen auf mit Marmor gepufferter Nährlösung bei 28° C. Ihr (+) Stamm bildete kräftig Fumarsäure, während beim (—) Stamm keine Spur dieser Säure zu entdecken war, obwohl letzterer mehr Glukose konsumierte. Sie vermuteten deshalb einen qualitativen Unterschied im Enzymsystem der Zellen der beiden Pilzstämmen. Mit zwei anderen *Rhizopus*-Stämmen erhielten sie gar keinen Unterschied im physiologischen Verhalten.

Die beobachtete kritische Zeitspanne zu Beginn der Entwicklung, während welcher fast nur Mycel und kaum Fumarsäure gebildet wird, läßt sich am wahrscheinlichsten so erklären, daß zuerst eine gewisse minimale Menge Mycel gebildet sein muß, bevor die Fumarsäureproduktion in den meßbaren Bereich eintritt. Eventuell wurden in dieser Zeit andere organische Säuren oder Alkohol gebildet, womit sich aber diese Arbeit nicht befaßte. Die kritische Mycelmenge betrug für *Rhizopus microsporus* (+) je nach der Temperatur 40 bis 180 mg und für (—) 150 bis 230 mg, für *Rhizopus circinans* Z (+) 180 bis 270 mg und für den (—) Stamm 260 bis 460 mg. Demnach benötigte *Rhizopus circinans* Z etwa doppelt so viel Mycel, bis die Fumarsäureproduktion einsetzen konnte, als die Sexualstämmen von *Rhizopus microsporus*. Es wurde allerdings auch schon vorher etwas Fumarsäure gebildet, doch nur in so geringen Mengen, daß sie meist knapp an der unteren Grenze der Meßmethode lagen. Auf die Existenz eines solchen kritischen Zeitraumes zu Beginn der Entwicklung, in welchem nur Mycel, aber noch keine Fumarsäure gebildet wird, weist auch Foster (1947) hin, der dabei bemerkt, daß Pilze allgemein im Anfangsstadium ihrer Entwicklung kaum Stoffwechselprodukte auszuschcheiden vermögen, sondern die ganze verfügbare Energie auf den Aufbau von Zellmaterial verwenden. Erst wenn ein Teil der Nährstoffe aufgebraucht sei, müsse sich der Organismus umstellen, und damit träten dann die organischen Säuren als Stoffwechselendprodukte auf.

In den Fumarsäurekurven der *Rhizopus microsporus*-Stämme wurde besonders auf Zitratpuffer ein Übergang von einem steileren in einen

flacheren Verlauf festgestellt. Diese Verlangsamung der Fumarsäurebildung trat bei beiden Stämmen dann ein, wenn 75 bis 80% der Fumarsäure produziert worden sind, die der Stamm bei der entsprechenden Temperatur zu bilden fähig ist, was nach vier bis sieben Tagen der Fall war. Eine ähnliche Beobachtung machte auch Ohara (1950) mit einem *Rhizopus*-Stamm, als nach fünf bis sieben Tagen die Umwandlung von Glukose in Fumarsäure rasch abnahm, während die Mycelbildung noch einige Tage weiterging. Das Maximum der Fumarsäurebildung wurde dann jeweils erst fünf bis sieben Tage später erreicht. Auf Nährlösung mit Marmorzusatz waren in den eigenen Versuchen diese Stellen infolge der großen individuellen Schwankungen in den Kolben nicht deutlich sichtbar, ebensowenig ließen sich solche Beobachtungen für *Rhizopus circinans* Z machen.

Die beiden Geschlechtsstämme von *Rhizopus circinans* Z waren imstande, in Nährlösung mit Zitratpuffer mehr relative Fumarsäure (bezogen auf die Mycelgewichtseinheit) zu produzieren als die entsprechenden Stämme von *Rhizopus microsporus*. Von den beiden Geschlechtsstämmen war *Rhizopus circinans* Z (+) bei allen Temperaturen der bessere Fumarsäurelieferant, er bildete zwei- bis dreimal mehr Fumarsäure pro Myceleinheit als der (—) Stamm. Bei *Rhizopus microsporus* war es bei niederen Temperaturen (10°, 20° C) der (+) Stamm, bei den höheren der (—) Stamm, der relativ mehr Fumarsäure bildete. Auf Nährlösung mit Marmorstückchen verhielten sich die Geschlechtsstämme beider Arten umgekehrt.

Alle Daten für die Mycelbildung sowie für die absolute und relative Fumarsäurebildung sprechen dafür, daß die Sexualstämme von *Rhizopus microsporus* für ihre Entwicklung auf höhere Temperaturen angewiesen sind, die des *Rhizopus circinans* Z aber niedere vorziehen. Die Optimumtemperaturen für die Mycelbildung liegen bei beiden Geschlechtern beider Pilzarten im Durchschnitt niedriger als diejenigen der Fumarsäurebildung, *Rhizopus microsporus* (+) braucht aber doch eine etwas höhere Temperatur als *Rhizopus microsporus* (—). Eine ähnliche Erscheinung sahen auch White und Munns (1951) in Gärungsversuchen mit Hefe. Die von mir festgestellten Temperaturoptima für die relative Fumarsäureproduktion waren mit zwei Ausnahmen dieselben wie für die absolute Fumarsäurebildung (Tabelle 10). Die optimalen Temperaturen für die Fumarsäure- und Mycelbildung der Stämme von *Rhizopus circinans* Z lagen meist um etwa 10° C tiefer als die der *Rhizopus microsporus*-Stämme. Irgendwelche Gesetzmäßigkeiten ließen sich aus den Daten nicht ableiten.

Aus der Literatur sind mir keine Angaben über Versuche bei anderen Temperaturen als 28° bis 30° C bekannt geworden (Bernhauer und Thole 1936: 28° bis 30° C; Bernhauer, Rauch und Miksch 1950a: 30° C; Butkewitsch 1927: 30° C; Butkewitsch und Fedoroff 1929a und b, 1930a und b: 30° C; Meder 1952: 30° C; Rauch, Mielke-Miksch

und Bernhauer 1950: 25° bis 28° C). Es zeigte sich aber in unseren Versuchen, daß die Temperaturoptima für die Fumarsäure- und Mycelbildung nicht unbedingt zusammenfallen müssen, sondern zum Teil beträchtlich variieren können.

Es konnte im Verlaufe dieser Arbeit auch festgestellt werden, daß die Temperaturoptima der beiden Geschlechter der untersuchten Pilzarten für die gleiche physiologische Funktion nicht gleich sind. So differierten die Temperaturoptima für die Mycelbildung der Stämme von *Rhizopus microsporus* ziemlich stark, und auch die beiden Stämme von *Rhizopus circinans* Z ließen solche Differenzen in Nährlösung mit Zitratpuffer erkennen. Für die Fumarsäurebildung waren solche Unterschiede nicht so klar ersichtlich (Tabelle 10). Eine ähnliche Beobachtung machte auch Korpatschewska (1909). Sie ermittelte für die beiden Geschlechter von *Mucor hiemalis* auf Saccharose Temperaturmaxima von 30° bis 31° C für den (+) Stamm und von 29° C für den (—) Stamm; je nach dem Substrat änderten sich die Temperaturgrenzen, und in gewissen Fällen waren sie für beide Geschlechter sogar gleich.

Tabelle 10

Temperaturoptima für Mycelbildung, absolute und relative Fumarsäureproduktion, Fumarsäureausbeute, Zuckerverbrauch und ökonomischen Koeffizienten. Angaben in °C

Funktion	<i>Rhizopus microsporus</i>				<i>Rhizopus circinans</i> Z			
	(+)		(—)		(+)		(—)	
	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor
Mycelbildung	40	30	20	20	20	20	10	20
Fumarsäureproduktion (absolut)	30	30	30	30	20 ¹	20 ¹	20 ¹	30
Fumarsäureproduktion (relativ)	30	20	30	30	10	30	20	30
Fumarsäureausbeute	40		40		10		10	
Zuckerverbrauch	40	30	30	30	20		20	
Ökon. Koeffizient	20	30	20	10	10		30	

¹ In den letzten Versuchstagen Verschiebung gegen 10° C.

Als optimale Temperaturen wurden die Temperaturen bezeichnet, bei denen bis zum Versuchsende die höchsten Mycel- resp. Fumarsäurewerte gemessen wurden. Dazu ist aber zu sagen, daß das Erreichen dieser Werte z. B. bei 10° C sehr viel mehr Zeit in Anspruch nahm als das Erreichen der zwar niedrigeren Höchstwerte bei z. B. 20° C, nämlich eine fünfmal längere Zeit. Es scheint eben, wie aus den beobachteten Verschiebungen der Optimaltemperatur während der Kultivierung geschlossen werden muß, daß die Optimaltemperatur für eine bestimmte Funktion sehr stark vom Zeitpunkt der Beobachtung abhängt. Je nachdem, wann eine

Kontrolle der Kulturen durchgeführt wurde, ob in einem früheren Entwicklungsstadium oder erst später, konnten andere Werte für die optimale Temperatur erhalten werden. Der Faktor Zeit, resp. Entwicklungszustand, scheint bei der Bestimmung solcher Kriterien eine große Rolle zu spielen. Es zeigte sich in dieser Arbeit, daß bei gewissen Temperaturen die Umsätze am Anfang sehr rasch vor sich gingen, aber keine so hohen Werte erreichten wie bei anderen Temperaturen, wo aber dann sehr viel mehr Zeit beansprucht wurde.

Nach Foster und Waksman (1939b) und Foster (1947) berechnet sich die Ausbeute an Fumarsäure in Prozent der verbrauchten Glukose nach $\frac{\text{produzierte Fumarsäure} \cdot 100}{\text{verbrauchte Glukose}}$. Die nach dieser Formel berechneten

Ausbeuten ergaben, daß *Rhizopus microsporus* (+) teilweise etwas größere Ausbeuten an Fumarsäure lieferte als *Rhizopus microsporus* (—), was auch bei den Stämmen von *Rhizopus circinans* Z der Fall war (Tabelle 11). Die größten Ausbeuten erschienen immer dann, wenn gerade das Wachstumsmaximum erreicht war. Bernhauer (1932) berechnete eine theoretische Ausbeute an Fumarsäure von 64,5%, Butkewitsch und Fedoroff (1929a) erhielten mit *Rhizopus nigricans* Fumarsäureausbeuten von 30 bis 40% des verbrauchten Zuckers, Foster und Waksman (1939b) mit dem gleichen Pilz 40 bis 50%.

Tabelle 11
Ausbeute an Fumarsäure

Temp. °C	<i>Rhizopus microsporus</i>				<i>Rhizopus circinans</i> Z	
	(+)		(—)		(+)	(—)
	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Zitrat
10	0	0,96	0	0,25	31,1	18,8
20	10,4	9,3	12,0	3,8	14,1	10,2
30	14,5	8,2	13,8	11,1	13,1	11,7
40	3,3	15,7	3,2	1,5	0	0

Als ökonomischen Koeffizienten bezeichnete Pfeffer (1895) (s. auch Butkewitsch und Orlow 1922) das Verhältnis des Gewichtes des verbrauchten Zuckers zum Gewicht des Pilzwachstums, das heißt die Glukosemenge, die nötig ist, um ein Gramm Zellsubstanz aufzubauen. In Tabelle 12 zeigen sich hier, wie schon bei der Fumarsäureausbeute, größere Werte für *Rhizopus microsporus* (+) und *Rhizopus circinans* Z (+) als bei ihren Partnern. Daß die optimalen Temperaturen für die Mycelentwicklung höher liegen als diejenigen für den ökonomischen Koeffizienten, wie Butkewitsch und Orlow (1922) fanden, konnte in den eigenen Versuchen

nur gelegentlich beobachtet werden; das gleiche gilt auch für ihre Beobachtung, der ökonomische Koeffizient sei bei niederen Temperaturen höher als bei höheren Temperaturen.

Die in Tabelle 12 zusammengestellten Koeffizienten sprechen für eine relativ schlechte Verwertung der zur Verfügung gestellten Glukose. Denn je höher der Koeffizient wird, um so mehr Glukose mußte zum Aufbau einer Einheit Zellsubstanz verwendet werden, also um so schlechter ist die Verwertung der Glukose. Die Zellatmung und die Abscheidung organischer Stoffwechselprodukte bleiben bei dieser Berechnung unberücksichtigt. Es scheint aber, daß das Ansteigen des ökonomischen Koeffizienten mit steigender Temperatur mit der Atmung erklärt werden kann. Es ist auch möglich, aber wenig wahrscheinlich, daß sich hier ein Zinkmangel bemerkbar macht, da ein solcher nach Foster und Waxman (1939a) zu einer schlechten Ausnützung des Zuckers beiträgt.

Eine Korrelation zwischen der Fumarsäurebildung und der entsprechenden Mycelmenge konnte nicht festgestellt werden; es bestand keine mathematische Abhängigkeit der Fumarsäuremenge von der Mycelmasse. Auch Bernhauer (1928) sah bei der Zitronensäurebildung durch *Aspergillus niger* nur, daß bis zu einem gewissen Grade die Säurebildung durch kräftige Pilzdecken größer war als durch schwache.

Tabelle 12

Ökonomischer Koeffizient nach Pfeffer (1895) (s. auch Butkewitsch und Orlow 1922)

Temp. °C	<i>Rhizopus microsporus</i>				<i>Rhizopus circinans</i> Z	
	(+)		(—)		(+)	(—)
	Zitrat	Marmor	Zitrat	Marmor	Zitrat	Zitrat
10	0	29,4	0	13,3	13,6	12,5
20	29,1	17,0	12,9	16,9	26,4	21,5
30	34,5	16,8	24,5	14,7	19,9	10,3
40	43,4	18,2	44,0	16,0	0	0

V. Zusammenfassung

1. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Temperaturabhängigkeit des Wachstums und der Fumarsäurebildung bei zwei *Rhizopus*-Arten (*Rhizopus microsporus* und *Rhizopus circinans* Z) unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsverhältnisse ([+] und [—] Stämme.)
2. Die Versuche wurden mit Hilfe der Schüttelkultur bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.
3. Das Aussehen des Mycels und die Wachstumsmöglichkeiten eines Pilzstammes sind von der chemischen Natur des Puffersystems der Nährlösung abhängig.

4. Die Temperaturgrenzen des Wachstums hängen stark von den Ernährungsbedingungen ab.
5. In den ersten Tagen der Entwicklung wird nur Mycel und noch keine Fumarsäure gebildet.
6. Die optimale Temperatur für das Wachstum ist niedriger als für die absolute Fumarsäurebildung, aber gleich wie für die Fumarsäurebildung pro Myceleinheit.
7. Die Fumarsäurebildung pro Myceleinheit zeigt einen charakteristischen Verlauf mit Maximumsbildung.
8. Das Aussehen des Mycels erwies sich als geschlechtsverschieden.
9. Der Zuckerverbrauch einer Pilzart ist in gewissen Temperaturbereichen geschlechtsverschieden.
10. Das Trockengewicht des Mycels der beiden Geschlechter einer Pilzart ist häufig verschieden; meist ist es dann beim (—) Stamm höher.
11. Ebenso ist die absolute und relative Fumarsäureproduktion geschlechtsverschieden; der (+) Stamm bildet gewöhnlich mehr Fumarsäure.
12. Bei Extremtemperaturen verwischen sich die Unterschiede im Verhalten der beiden Geschlechter.

Die vorliegende Arbeit entstand im *Botanischen Institut der Universität Basel* auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber, der mir als Vorsteher des Institutes auch das nötige Material und die notwendigen Einrichtungen großzügig zur Verfügung stellte. Ich möchte ihm an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank dafür aussprechen; ebenso bin ich ihm auch für die Hinweise und wertvollen Ratschläge während der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Für Hilfe bei den Reihenuntersuchungen danke ich Frl. V. Müller bestens, und Dank schulde ich auch allen jenen, die durch Anregungen zur Lösung der gestellten Aufgabe beitrugen.

Literatur

- Bainier, G., 1883. Observations sur les Mucorinées. *Ann. Sc. nat. Bot.*, sér. 6, t. XV, 70–104.
- Bainier, G., 1884. Nouvelles observations sur les zygo-spores des Mucorinées. *Ann. Sc. nat. Bot.*, sér. 6, t. XIX, 200–216.
- Bamann, E. und K. Myrbäck, 1941. Die Methoden der Fermentforschung, Bd. 2, 1766–1767. Leipzig.
- de Bary, A., 1864. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze, V, 1. Frankfurt a. M.
- Bernhauer, K., 1928. Über die Säurebildung durch *Aspergillus niger*. IV. Mitt. Die Bedeutung der Mycelentwicklung für die Säurebildung. *Biochem. Zs.* 197, 287–308.
- Bernhauer, K., 1932. Die oxydativen Gärungen. Berlin.
- Bernhauer, K., J. Rauch und J. N. Miksch, 1950a. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. II. Mitt. Zur Milchsäurebestimmung in der Submerskultur. *Biochem. Zs.* 320, 178–188.

- Bernhauer, K. und J. Rauch, 1950b: Beiträge zur mikrobiologischen Eiweiß- und Fettsynthese. 6. Mitt. Zur Methodik der Pilzzüchtung in der Submerskultur. *Biochem. Zs.* **320**, 368–371.
- Bernhauer, K. und H. Thole, 1936. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. I. Mitt. Die Bildung von Äpfelsäure bei der Fumarsäuregärung. *Biochem. Zs.* **287**, 167–171.
- Bertrand, G., 1906. Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. chim. France* **35**, 1285–1299.
- Blakeslee, A.F., 1904a. Zygosporangium formation a sexual process. *Science N.S.* **19**, 864–866.
- Blakeslee, A.F., 1904b. Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc. amer. acad. arts sci.* **40**, 201–319.
- Blakeslee, A.F., 1906. Zygosporangia and sexual strains in the common bread mould *Rhizopus nigricans*. *Science N.S.* **24**, 118–122.
- Blakeslee, A.F., 1913. A possible means of identifying the sex of (+) and (–) races in the Mucors. *Science N.S.* **37**, 880–881.
- Blakeslee, A.F., 1915. Sexual reactions between hermaphroditic and dioecious Mucors. *Biol. Bull.* **29**, 87–102.
- Blakeslee, A.F., D.S. Welch und J.L. Cartledge, 1921. Technique in contrasting Mucors. *Bot. Gaz.* **72**, 162–172.
- Brdicka, P., 1941. Polarographie, in Bamann und Myrbäck, 1941. Die Methoden der Fermentforschung, Bd. 1, 579–627. Leipzig.
- Breslauer, A., 1912. A propos du dimorphisme sexuel des Mucorinées. *Bull. soc. bot. Genève*, sér. 2, **4**, 228–237.
- Březina, M. und P. Zuman, 1956. Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie. Leipzig.
- Burgeff, H., 1934. Pflanzliche Avitaminose und ihre Behebung durch Vitaminzufuhr. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **52**, 384–390.
- Burger, O. F., 1919. Sexuality in *Cunninghamella*. *Bot. Gaz.* **68**, 134–146.
- Butkewitsch, Wl., 1927. Über Säurebildung bei Pilzen. *Biochem. Zs.* **182**, 99–109.
- Butkewitsch, Wl. und M.W. Fedoroff, 1929a. Über die Bildung von Fumarsäure in den Zuckerkulturen von *Mucor stolonifer* (*Rhizopus nigricans*) und sein Verhalten zur Brenztraubensäure. *Biochem. Zs.* **206**, 440–456.
- Butkewitsch, Wl. und M.W. Fedoroff, 1929b. Über die Umwandlung der Essigsäure durch *Mucor stolonifer* in Bernstein- und Fumarsäure und das Verfahren zur Trennung und quantitativen Bestimmung dieser Säuren. *Biochem. Zs.* **207**, 302–318.
- Butkewitsch, Wl. und M.W. Fedoroff, 1930a. Über die Verhältnisse zwischen Essig-, Bernstein-, Fumar- und Oxalsäure in den Kulturen von *Mucor stolonifer* und einigen anderen Pilzen. *Biochem. Zs.* **219**, 87–102.
- Butkewitsch, Wl. und M.W. Fedoroff, 1930b. Über die Umwandlung des Äthylalkohols in den Kulturen von *Mucor stolonifer*. *Biochem. Zs.* **219**, 103–121.
- Butkewitsch, Wl. und G. Orlow, 1922. Zur Frage nach dem ökonomischen Koeffizienten bei *Aspergillus niger*. *Biochem. Zs.* **132**, 556–565.
- Chodat, R. und W.H. Schopfer, 1927. Carotine et sexualité. *C. r. Soc. Phys. Hist. nat. Genève* **44**, 176–179.
- Cochrane, V.W., 1948. Commercial production of acids by fungi. *Econom. Bot.* **2**, 145–157.
- Ehrenberg, C.F., 1820. *Verhandl. Ges. Nat. freunde Berlin*, Bd. 1.
- Falck, R., 1902. Die Bedingungen und die Bedeutung der Zygotenbildung bei *Sporodinia grandis*. *Cohns Beitr. Biol. Pfl.* **8**, 213–303.
- Fisher, R.A., 1954. *Statistical methods for research workers*. Edinburgh. 12th ed.
- Fisher, R.A. und Fr. Yates, 1948. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. London – Edinburgh.
- Foster, J.W., 1947. Some introspections on mold metabolism. *Bact. rev.* **11**, 167–188.
- Foster, J.W., 1949. *Chemical activities of Fungi*. New York.

- Foster, J.W. und S.A. Waksman, 1939a. The specific effect of zinc and other heavy metals on growth and fumaric acid production by *Rhizopus*. J. Bacteriol. **37**, 599–617.
- Foster, J.W. und S.A. Waksman, 1939b. The production of fumaric acid by molds belonging to the Genus *Rhizopus*. J. amer. chem. Soc. **61**, 127–135.
- Garton, G.A., T.W. Goodwin und W. Lijinsky, 1950. The Biogenesis of β -Carotene in the Fungus *Phycomyces blakesleeanus*. Biochem. J. **46**, XXXV.
- Garton, G.A., T.W. Goodwin und W. Lijinsky, 1951. Studies in Carotenogenesis. I. General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. Biochem. J. **48**, 154–163.
- Gaughran, E.R., 1947. The thermophilic microorganisms. Bact. rev. **11**, 189–225.
- Gäumann, E., 1926. Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena.
- Gäumann, E., 1928. Die Sexualität der Pilze. Svensk. Bot. Tidskrift **22**, 33–48.
- Gäumann, E., 1949. Die Pilze. Basel.
- Gosio, B., 1905. Indikatoren des Bakterienlebens und ihre praktische Bedeutung. Zs. Hyg. Inf.-krkh. **51**, 65–125.
- Hawker, L.E., 1950. Physiology of Fungi. London.
- Herasymenko, P., 1928. Die Reduktionspotentiale der Malein- und Fumarsäure an einer tropfenden Hg-Elektrode. Zs. f. Elektrochemie **34**, 74–78.
- Heyrovský, J., 1925. Researches with the dropping mercury Cathode. Part I. General introduction. Rec. trav. chim. Pays-Bas **44**, 488–495.
- Heyrovský, J., 1941. Polarographie. Wien.
- Heyrovský, J., 1948. Polarographisches Praktikum. Berlin.
- Heyrovský, J. und M. Shikata, 1925. Researches with the dropping mercury Cathode. Part II. The Polarograph. Rec. trav. chim. Pays-Bas **44**, 496–498.
- Janke, A., 1946. Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden-Leipzig.
- Klebs, G., 1896. Die Bedingungen der Fortpflanzung einiger Algen und Pilze. Jena.
- Klebs, G., 1898. Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. I. *Sporodinia grandis*. Jahrb. wiss. Bot. **32**, 1–70.
- Klein, G., 1932. Handbuch der Pflanzenanalyse. Bd. **2**, 783–786. Wien.
- Kluyver, A.J. und L.H.C. Perquin, 1933. Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. Biochem. Zs. **266**, 68–81.
- Koch, A., 1922. Mikrobiologisches Praktikum. Berlin.
- Kolthoff, J.M. und J.J. Lingane, 1946. Polarography. New York.
- Korpatschewska, J., 1909. Sur le dimorphisme physiologique de quelques Mucorinées hétérothalliques. Bull. Soc. bot. Genève, 2^e sér., **1**, 317–349.
- Kostytchew, S. und P. Eliasberg, 1919. J. Russ. Bot. Soc. **4**, 39–40 (zitiert nach Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1925).
- Küster, E., 1907: Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. I. Aufl. Leipzig-Berlin. II. Aufl. 1913.
- Lendner, A., 1908. Les Mucorinées de la Suisse. Berne.
- Lendner, A., 1918. Les Mucorinées géophiles récoltées à Bourg-Saint-Pierre. Bull. Soc. bot. Genève, 2^e sér. **10**, 362–376.
- Lilly, V.G. und H.L. Barnett, 1951. Physiology of the Fungi. New York – Toronto – London. I ed.
- Linder, A., 1951. Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Basel. II. Aufl.
- Lindner, P., 1912. Unterschiedliches Verhalten eines (+) und (–) Stammes von *Phycomyces nitens* gegenüber verschiedenen Zuckerarten. Wschr. Brauerei **27**.
- Lindner, P., 1916. Eine nochmalige Nachprüfung des Verhaltens zweier *Phycomyces*-stämme gegenüber verschiedenen Zuckerarten und ihres Zygosporienbildungsvermögens. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **34**, 448–452.
- Ling-Young, M., 1930. Etude biologique des phénomènes de la sexualité chez les Mucorinées. Rev. gén. Bot. **42**–43.

- Manoiloff, E. O., 1924. Weitere Erfahrungen über meine chemische Blutreaktion zur Geschlechtsbestimmung bei Menschen und Tieren und durch Chlorophyll bei Pflanzen. Münchn. Med. Wschr. **71**, 1784–1789.
- Markert, C.L., 1949. Sexuality in the fungus *Glomerella*. Amer. Naturalist **83**, 227–231.
- Meder, H., 1952. Über die Bedingungen der Bildung von Fumarsäure als Endprodukt des Stoffwechsels bei *Rhizopus*-Arten. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **62**, 164–204 (Diss. Basel).
- Miksch, J., J. Rauch, R. Mielke-Miksch und K. Bernhauer, 1950. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. V. Mitt. Einige Beobachtungen über die Beeinflussung der Säurebildung in der Submerskultur durch Schwermetallionen und «Gärungshemmstoffe». Biochem. Zs. **320**, 398–401.
- Nägeli, C., von, 1891. Theorie der Gärung. München.
- Ohara, Y., 1950. Studies on the fumaric acid fermentation. J. Ferment. Technol. (Japan) **28**, 27–30. Zitiert nach Biol. Abstr. **26**, 31682 (1952).
- Orban, G., 1919. Untersuchungen über die Sexualität von *Phycomyces nitens*. Beih. bot. Ctrbl. I, **36**, 1–59.
- Pfeffer, W., 1895. Über Election organischer Nährstoffe. Jahrb. wiss. Bot. **28**, 205–268.
- Raper, J.R., 1952. Chemical regulation of sexual processes in Thallophytes. Bot. Rev. **18**, 447–545.
- Rauch, J., R. Mielke-Miksch und K. Bernhauer, 1950. Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. III. Mitt. Vergleichende Prüfung verschiedener Fumarsäurebildner in der Oberflächenkultur. Biochem. Zs. **320**, 384–389.
- Rauch, J., J.N. Miksch, R. Mielke-Miksch und K. Bernhauer (1950). Über die Säurebildung durch *Rhizopus*-Arten. IV. Mitt. Zur Fumarsäuregärung in der Submerskultur. Biochem. Zs. **320**, 390–397.
- Ronsdorf, L., 1931. Über die chemischen Bedingungen von Wachstum und Zygotenbildung bei *Phycomyces blakesleeanus*. Planta **14**, 482–514.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1925. Studies on biochemical differences between (+) and (–) sexes in Mucors. 1. Tellurium salts as indicators of the reduction reaction. Proc. Nat. Acad. Sci. **11**, 528–534.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1926a. Studies on biochemical differences between (+) and (–) sexes in Mucors. 2. A preliminary report on the Manoilov reaction and other tests. Proc. Nat. Acad. Sci. **12**, 191–196.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1926b. Biochemical differences between sexes in green plants. Proc. Nat. Acad. Sci. **12**, 197–202.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1927. Further studies on biochemical differences between sexes in plants. Proc. Nat. Acad. Sci. **13**, 115–122.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1928a. Studies on the biochemical differences between sexes in Mucors. 4. Enzymes which act upon carbohydrates and their derivatives. Proc. Nat. Acad. Sci. **14**, 229–235.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1928b. Studies on biochemical differences between sexes in Mucors. 5. Quantitative determinations of sugars in (+) and (–) races. Proc. Nat. Acad. Sci. **14**, 308–316.
- Satina, S. und A.F. Blakeslee, 1929. Criteria of male and female in bread Moulds (Mucors). Proc. Nat. Acad. Sci. **15**, 735–740.
- Schaub, H., 1958. Die Milchsäurebildung bei *Rhizopus chinensis* Saito. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **68**, 64–103 (Diss. Basel).
- Schopfer, W.H., 1928. Recherches sur la sexualité des champignons. Le problème de la biochimie comparée du sexe. Bull. Soc. bot. Genève, 2^e sér., **20**, 149–323 (Thèse Genève).
- Schopfer, W.H., 1931. Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez *Phycomyces blakesleeanus*. Influence des substances vitaminiques. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **40**, 87–111, **41**, 73–93 (1932).

- Schopfer, W.H., 1933a. Recherches sur la biométrie des spores d'une Mucorinée en rapport avec le sexe. C. r. Soc. Phys. Hist. nat. Genève **50**, 16–20.
- Schopfer, W.H., 1933b. Recherches sur l'hérédité d'un caractère physiologique chez un champignon. C. r. Soc. Phys. Hist. nat. Genève **50**, 87–90.
- Schopfer, W.H., 1943. Plants and vitamins. Mass. USA.
- Schwaer, L., 1935. Polarographic studies with the dropping mercury Cathode. Part LI. The electroreduction of some unsaturated acids. Coll. Czech. chem. Commun. **7**, 326–335.
- Schwartz, W., 1927. Die Zygoten von *Phycomyces Blakesleeanus*. Untersuchungen über die Bedingungen ihrer Bildung und Keimung. Flora **121**, 1–39.
- Seiler, Fr., 1936. Untersuchungen über Zygotenbildung und Zygotenkeimung bei *Sporodinia grandis*. Beih. bot. Ctrbl. **54** A, 235–291.
- Sjöwall, M., 1945. Studien über Sexualität, Vererbung und Zytologie bei einigen diözischen Mucoraceen. Diss. Lund.
- Stackelberg, M. von, 1950. Polarographische Arbeitsmethoden. Berlin.
- Thiele, R., 1896. Die Temperaturgrenzen der Schimmelpilze in verschiedenen Nährlösungen. Diss. Leipzig.
- van Tieghem, Ph., 1876. Troisième mémoire sur les Mucorinées. Ann. sc. nat. Bot., 6e sér., t. IV, 312–398.
- Tulasne, L. R., 1866. Note sur les phénomènes de copulation que présentent quelques champignons. Ann. sc. nat. Bot., 5e sér., t. VI, 211–220.
- Vopička, E., 1936. Polarographic studies with the dropping mercury Cathode. Part. LX. The influence of buffers and kations in the electro-reduction of fumaric and maleic acid. Coll. Czech. chem. Commun. **8**, 349–365.
- Waksman, S. A. und J. W. Foster, 1938. Effet du zinc sur la végétation de *Rhizopus nigricans* et la production d'acide par cet organisme. C. r. Acad. Sci. Paris **207**, 483–486.
- Wesendonck, J., 1930. Über sekundäre Geschlechtsmerkmale bei *Phycomyces blakesleeanus* Bgff. Planta **10**, 456–494.
- White, J. und D. J. Munns, 1951. Influence of temperature on yeast growth and fermentation. J. Inst. Brewing **54**, 280–284. Zitiert nach Biol. Abstr. **25**, 36248 (1951).
- Zikes, H., 1926. Beitrag zur Zygosporienbildung durch äußere Faktoren. Ctrbl. Bakt. II. Abt. **66**, 1–5.
- Zycha, H., 1935. Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. VIa. Pilze. II. *Mucorineae*. Leipzig.