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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 53 (1943)

Artikel: Zur Wirkstoffpysiologie von Trichophyton album Sab.

Autor: Schopfer, W.H. / Blumer, S.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-37683

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.10.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Zur Wirkstoffphysiologie von Trichophyton album Sab.

Von *W. H. Schopfer* und *S. Blumer*.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Bern [1].)

Mit 8 Abbildungen.

Eingegangen am 9. Juni 1943.

Einleitung.

Die meisten Dermatophyten sind leicht zu kultivieren und wachsen auf Substraten, die wenigstens in bezug auf ihre Herstellung als sehr einfach gelten dürfen. Seit den bahnbrechenden Untersuchungen von Sabouraud werden diese Pilze meistens auf den gleichen Nährböden kultiviert, und über das Verhalten verschiedener Arten auf diesen Standardnährböden liegt eine Fülle von Einzelbeobachtungen vor. Dabei standen aber meistens die Systematik und die Abgrenzung der zahlreichen Arten im Vordergrunde des Interesses. Daß dieses Ziel erreicht worden wäre, darf allerdings nicht behauptet werden; man ist auch heute noch weit entfernt von einer einigermaßen natürlichen Gruppierung dieser großen Pilzgruppe.

Für verschiedene Dermatophyten wurden ferner ihre Ansprüche an die Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung näher untersucht, doch wurden dafür oft Nährböden von sehr komplexer Zusammensetzung verwendet. Weiterhin kennt man für zahlreiche Formen die Optima der Wasserstoffionenkonzentration und der Temperatur. Tate (35) und Goddard (9) untersuchten besonders die enzymatische Aktivität verschiedener Arten. Abgesehen von diesen beiden Arbeiten finden wir in der ausgedehnten und weit zerstreuten Literatur über die Dermatophyten nur wenige Arbeiten mit rein physiologischer Fragestellung.

Nachdem im letzten Jahrzehnt die Wuchsstofforschung in immer größerem Maße in die Ernährungsphysiologie der Pilze Eingang fand, ist es nicht verwunderlich, wenn diese Fragen gelegentlich auch für die Dermatophyten aufgeworfen wurden. Wenn seit Sabouraud für die Nährböden nicht reine Glukose, sondern « glycose massé de Chanut » oder « maltose brute » neben « peptone granulée de Chassaing » verwendet wurden, so darf dies schon als sicherer Hinweis gelten, daß außer der Glukose und Maltose und außer dem Pepton noch gewisse

[1] Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch finanzielle Unterstützung der *Stiftung Dr. Joachim de Giacomi* an den einen der Autoren (Blumer) ermöglicht, wofür wir auch an dieser Stelle unsern besten Dank aussprechen.

regelmäßige Begleitstoffe dieser Substanzen für die Kultur der Dermatophyten von ausschlaggebender Bedeutung sind. In dieser Richtung gehen die Untersuchungen von Baudet (2), der fand, daß bei zwei *Trichophyton*-Stämmen die Bildung von Aleurokonidien durch Zusatz von *Staphylococcen*-Kulturen ausgelöst werden konnte. Zweifelsohne dient hier der Staphylococcusextrakt u. a. als Lieferant von Wachstumsfaktoren.

Für Trichophyton interdigitale zeigten Mosher, Saunders, Kingery und Williams (16), daß in einer synthetischen Nährlösung bestimmte Kombinationen von Aminosäuren notwendig sind. Aber auch mit diesen erfolgt eine optimale Entwicklung nur bei Zugabe bestimmter Wirkstoffe, von denen Pantothensäure, Lactoflavin, Inositol und Aneurin zur Anwendung kamen. Nach Mackinnon (13) scheint Aneurin unter besonderen Bedingungen auch auf *Trichophyton discoides* zu wirken.

Für die folgenden Untersuchungen diente uns ein Stamm von *Trichophyton album*, der von Herrn Pd. Dr. H. Kuske im dermatologischen Institut der Universität aus einer Bartflechte isoliert worden war, die sich sowohl durch das Aussehen als auch durch den chronischen Verlauf von den gewöhnlichen Bartflechten unterschied. Sie trat bei einem Wärter einer Hühnerfarm auf, der sich auch mit Kaninchen und Ratten zu beschäftigen hatte.

Auf Pepton- und Hefeextrakt-Agar wuchs der Pilz im Anfang ziemlich rasch und bildete massenhaft Aleurokonidien und Chlamydokonidien, die der Kultur ein staubiges Aussehen verliehen. Bedeutend schwächer war das Wachstum auf dem « Agar de conservation » nach Sabouraud. Das Zentrum der Kolonie war kompakt und rein weiß, an der Peripherie strahlten weiße, lockere Hyphen aus. Die Unterseite wurde auf diesem Nährboden mit der Zeit gelbbraun, während auf Czapek-Agar eine schwach rötliche Färbung auftrat.

In Nährlösungen entwickelten sich schwimmende Kolonien in Form von ziemlich kompakten abgeflachten Körnern. Die Oberseite war flaumig und rein weiß, die Unterseite in der Mitte aufgewölbt und je nach Alter gelb bis bräunlich. Die Kolonien erreichten einen Durchmesser von 1—8 mm. Daneben entwickelte sich oft ein untergetauchtes Myzel in Form von kleinen bräunlichen Klümpchen. Auch die Nährlösung ist in alten Kulturen gelb bis braun gefärbt; durch Zusatz von Kalilauge wird diese Farbe noch intensiver, besonders nach Erwärmen.

Der Pilz wächst bei Zimmertemperatur gut, bedeutend besser bei 25—30°. Alle Versuche wurden bei einer konstanten Temperatur von 28,5° C ausgeführt.

Es wurden sowohl in flüssigen als auch auf festen Nährböden hauptsächlich Aleurokonidien (Länge 6—9 μ) gebildet. Bei Kultur in Nährlösungen traten in den untergetauchten Myzelklümpchen gelegent-

lich auch Arthrokonidien auf, die hier wohl als Degenerationserscheinungen, bedingt durch die anaerobe Lebensweise zu bewerten sind. Andere Fruchtformen, z. B. Spindelkonidien, sowie Spiralbildungen konnten wir nicht feststellen. Langeron und Milochevitch (11) beobachteten bei einem vom Kalb isolierten Stamm von *Trichophyton album* bei Kultur auf Peptonagar mit Dextrin oder Stärke weitere Differenzierungen des Myzels und auf Pferdemist einmal eine Spindelkonidie. Da die morphologische Untersuchung des Pilzes für unsere Fragestellung nicht im Vordergrunde des Interesses stand, haben wir auf Verwendung natürlicher Nährböden verzichtet.

Herr Prof. Dr. G. Pollacci in Pavia hatte die Freundlichkeit, unsern Pilz näher zu bestimmen. Nach seinen Mitteilungen, für die wir ihm auch an dieser Stelle bestens danken, dürfte es sich entweder um *Trichophyton abyssinicum* Agostini oder um *T. album* Sab. handeln. Da Pollacci keine Arthrokonidien fand, betrachtet er den Pilz als eine Form von *Trichophyton album.* Nach der Nomenklatur von Dodge (5) wäre der Pilz als *Favotrichophyton album* zu bezeichnen.

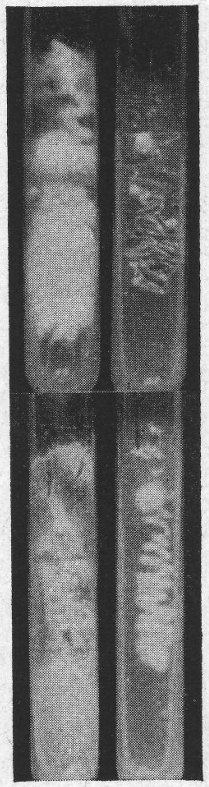

Abbildung 1.

Trichophyton album: Beginnende Degeneration («Pleomorphie») der Kulturen. Oben auf Hefeextrakt-Agar, unten auf Czapek-Pepton-Agar. Links bei 29 °, rechts bei 16 °. Alter : 21 Tage.

Während der Zeit, in der unsere Versuche durchgeführt wurden, also in ungefähr einem halben Jahre, veränderte sich der Pilz in verschiedener Hinsicht ziemlich stark. Zunächst nahm die Wachstumsintensität erheblich ab, besonders bei Kultur in Nährlösungen. Ungefähr 9 Monate nach der Isolation trat eine ausgeprägte « Pleomorphie » auf.

Die Konidienbildung trat stark zurück, und es bildete sich ein üppiges, reinweißes Luftmyzel. Der Grad der « Pleomorphie » war auf Hefeextrakt-Agar am stärksten, etwas schwächer auf Czapek-Pepton-Agar und am schwächsten auf Sabourauds « Milieu de conservation ». Bodin (4) erwähnte schon 1902, daß die « Pleomorphie » bei höhern Temperaturen stärker zutage tritt (vgl. auch Tate, 34). Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, trifft dies auch für unsern Pilz zu, auch hier ist die als « Pleomorphie » bezeichnete Degeneration bei 29° viel stärker als bei Zimmertemperatur.

Das Auftreten der Pleomorphie setzte leider allzu früh den Schlußpunkt unter unsere Untersuchungen, denn große Versuchsreihen können nur mit Konidiensuspensionen schnell und gleichmäßig beimpft werden. Ein Versuch, den Pilz durch eine Passage über das Meerschweinchen zu regenerieren, mißlang. Es erfolgte keine Infektion, weil die Pleomorphie offenbar schon zu weit fortgeschritten war. Wir danken trotzdem Herrn Prof. Dr. med. vet. G. Schmid für die Ausführung dieses Versuches bestens. Versuche zur Aufhebung der Pleomorphie durch Überimpfung auf natürliche Nährböden wurden nicht ausgeführt. (Langeron und Milochevitch, 11).

1. Teil. Der Wirkstoffbedarf.

I. Kultur von Trichophyton album in verschiedenen Nährlösungen.

1. Natürliche Nährlösungen.

Die ersten orientierenden Versuche wurden mit einer mineralischen Grundlösung nach Czapek (Dox) ausgeführt. Diese besteht nach Angabe von Dodge (5, S. 49) aus 1 ‰ K_2HPO_4, 0,5 ‰ KCl, 0,5 ‰ $MgSO_4$ und 0,01 ‰ $FeSO_4$. Da es sich bald zeigte, daß die Entwicklung ohne Eisensulfat gleich gut war, wurde dieses Salz in der Folge weggelassen. Wurde dieser Grundlösung neben 1 % Glukose noch Liebigs Fleischextrakt (2,5 ‰) beigefügt, so ergaben sich nach 12 Tagen Myzelgewichte von ca. 125 mg. Ebenso ergab Fibrin (1 ‰) eine gute Entwicklung. Dagegen wirkte ein Zusatz von Gelatine (1 %) oder Hefeextrakt nicht fördernd (Myzelgewichte 25—30 mg), während mit Asparagin allein 38 mg erreicht wurde. Auch Harnstoff ergab nur schwaches Wachstum.

Es zeigte sich in diesen Vorversuchen, daß die Nährlösung durch den Pilz ziemlich stark angesäuert wurde. Es mußte deshalb vorerst das pH-Optimum festgestellt werden, um dann mit gepufferten Nährlösungen arbeiten zu können. Versuche mit Phthalat-Pufferlösungen von pH 4 bis 6,2 ergaben nur schwaches Wachstum, wobei es sich wahrscheinlich um eine Hemmung durch die relativ bedeutenden Mengen von Kaliumphthalat handelte. Dagegen war das Wachstum in Phosphatpuffer-

lösungen nach Clark mit Glukose und einer geeigneten Stickstoffquelle sehr gut. Das Optimum liegt zwischen pH 6—7. Bei pH 4 ist in ungepufferten Nährlösungen fast keine Entwicklung mehr festzustellen, ebenso sinkt die Kurve zwischen pH 7 und 8 rasch ab. Es wurde deshalb für die meisten Versuche eine Grundlösung mit dem Phosphatpuffer pH 6,2 nebst Zusatz von 0,5 ‰ $MgSO_4$ und 0,5 ‰ KCl verwendet. In dieser Lösung blieb die Wasserstoffionenkonzentration während der Dauer des Versuches annähernd konstant. Nur bei Verwendung von Ammoniumsalzen als N-Quelle erfolgte auch in dieser Lösung eine Ansäuerung.

2. Wirkung des Leberextraktes.

Schon in den ersten Versuchen stellten wir fest, daß ein Zusatz von 0,25 ccm eines hochkonzentrierten, in Wasser vollständig löslichen Leberextraktes (Präparat Roche) fast ebenso hohe Erntegewichte ergibt wie Liebigs Fleischextrakt, nämlich 101 mg. Hier war der Leberextrakt als einzige N-Quelle beigefügt.

Es zeigte sich aber, daß dieser Extrakt mit Asparagin als N-Quelle noch in sehr starken Verdünnungen fördert. Schon bei Zugabe von 0,0001 ccm, was dem Extrakt von 14 mg Leber entspricht, ergibt sich eine Zunahme des Trockengewichtes um mehr als 60 % gegenüber der Kontrolle (Tabelle 1).

Tabelle 1.

Wirkung von Leberextrakt in verschiedenen Konzentrationen. Grundlösung: Phosphatpuffer nach Clark, pH 6,2, KCl 0,5 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰, Asparagin 1 ‰, Glukose 1 %.

Leberextrakt	Myzelgewicht mg
0 (Kontrolle)	49,8
0,0001 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 14 mg Leber)	80,5
0,001 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 140 mg Leber)	84,1
0,01 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 1,4 g Leber)	126,1
0,05 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 7 g Leber)	109,5
0,1 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 14 g Leber)	112,2
0,5 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 70 g Leber)	137,3
1 ccm (Entsprechend dem Extrakt v. 140 g Leber)	165,7

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß der Leberextrakt als Zusatz zu jeder für den Pilz verwendbaren Stickstoffquelle stark wirksam ist. So erreichen wir durch Zugabe von 0,1 ccm dieser Substanz mit Ammoniumtartrat 4—5mal höhere, mit Ammoniumzitrat sogar 11mal höhere Trokkengewichte als in den Kontrollen. Es erschien daher wahrscheinlich, daß im Leberextrakt neben besonders geeigneten stickstoffhaltigen Sub-

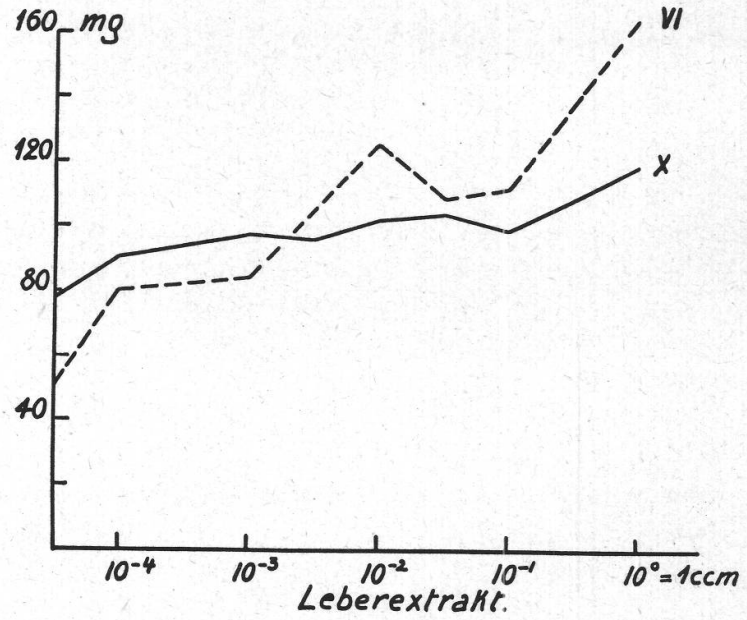

Abbildung 2.
Förderung durch Leberextrakt in gepufferter Nährlösung in zwei verschiedenen Versuchen (VI und X).

stanzen auch bestimmte Wirkstoffe, besonders Biotin oder Wirkstoffkombinationen enthalten sind.

3. Wirkung verschiedener Peptone.

Auf die besondere Bedeutung der Peptone für die Mikroorganismen wurde schon von verschiedenen Autoren hingewiesen. Die Tatsache, daß schon sehr geringe Mengen von Pepton für die Entwicklung von gewissen Bakterien ausreichen, drängt zur Annahme, daß hier nicht nur der Stickstoffgehalt dieser Substanzen, sondern vor allem auch ihr Gehalt an Verunreinigungen vitaminischer Natur ausschlaggebend ist. So fand z. B. Den Dooren de Jong (6), daß *Micrococcus Eykmanii* einen vitaminischen Wachstumsfaktor benötigt, der in gewissen Peptonen enthalten ist (das Pepton Poulenc enthält diesen Aktivator nicht). Ferner haben auch Orla-Jensen und Mitarbeiter (18) nachgewiesen, daß in den Peptonen Wuchsstoffe enthalten sind.

In einer früheren Arbeit (Blumer und Schopfer, 3) konnten wir zeigen, daß zahlreiche Pepton-Präparate genügend Aneurin enthalten, um die Entwicklung von *Ustilago scabiosae* zu ermöglichen. In andern Peptonen, z. B. Pepton Merck, Bacto-Protone und Peptone spongieuse wächst dieser Pilz nur bei Zugabe von Aneurin. Es erschien ohne weiteres wahrscheinlich, daß die Peptone neben dem Aneurin auch noch andere Wachstumsfaktoren organischer Natur enthalten. Mit Hilfe des Hefetestes (vgl. S. 437) konnte nachgewiesen werden, daß in den Peptonen auch Biotin enthalten ist, wobei allerdings zwischen den einzelnen Peptonsorten bedeutende quantitative Unterschiede bestehen.

Tabelle 2.

Verschiedene Peptone als Stickstoffquellen (1 ‰).
(Gepufferte Nährlösung.)

	Trockengewicht des Pilzes mg	Biotingehalt des Peptons γ/g Trockengewicht
Sehr gutes Wachstum:		
Peptone granulée, Chassaing	127,8	0,20—0,40
Peptone sèche, Chapoteaut	115,7	0,05—0,10
Gutes Wachstum:		
Neopepton, Difco	92,5	
Peptone bactériologique, Byla	88,1	0,10—0,20
Peptone de soie, Rhône-Poulenc	83,0	0,10—0,20
Bacto-Pepton, Difco	81,5	
Mittelmäßiges Wachstum:		
Bacto-Trypton, Difco	71,2	
Peptone exempte d'indol, Rhône-Poulenc	65,7	0,20—0,40
Pepton Hoffmann-La Roche	63,7	0,05—0,10
Pepton Siegfried	62,8	0,05—0,10
Schwaches Wachstum:		
Pepton Witte	55,2	0,02—0,05
Peptone British Drog Houses Ltd.	50,7	0,02—0,05
Proteose-Peptone, Difco	46,8	
Pepton für bakteriologische Zwecke, Merck	44,3	<0,02
Sehr schwaches Wachstum:		
Bacto-Proton, Difco	16,9	<0,02
Peptone pepsique, Rhône-Poulenc	8,4	0,05—0,10
Peptone spongieuse, Rhône-Poulenc	3,1	<0,02

Für die Kultur der Dermatophyten spielten seit Sabouraud die Peptone eine bedeutende Rolle. Schon unsere ersten Versuche mit *Trichophyton album* zeigten indessen, daß die einzelnen Peptonsorten auch für diesen Pilz sehr ungleich wirkten. Dies beruht sicher zum Teil darauf, daß die verschiedenen Handelspräparate in ihrer Zusammensetzung an Abbauprodukten des Eiweißes stark voneinander abweichen. Aber auch der verschiedene Gehalt an Wirkstoffen, besonders an Biotin, muß sich in der Entwicklung ganz oder teilweise auxo-heterotropher Pilze auswirken.

Tabelle 2 zeigt die Eignung der verschiedenen Peptone im Vergleich zu ihrem Biotingehalt. Eine gewisse Übereinstimmung zwischen dem Biotingehalt der Peptone und ihrer Eignung für *Trichophyton album* ist unverkennbar. Peptone granulée, das für den Pilz besonders geeignet ist, zeichnet sich auch durch den höchsten Biotingehalt aus. Es ist wohl

kein Zufall, wenn Sabouraud für seine Nährböden gerade dieses Fabrikat besonders empfahl.

Noch fast eindeutiger ist die Übereinstimmung zwischen niedrigem Biotingehalt und dem sehr schwachen Wachstum des Pilzes, mit Peptone spongieuse, Bacto-Protone und dem Pepton für bakt. Zwecke (Merck). Unsere frühern Untersuchungen mit *Ustilago scabiosae* zeigten übrigens, daß diese Peptone auch sehr wenig Aneurin enthalten.

Auf Peptone pepsique ergab sich trotz des mittleren Biotingehaltes eine sehr schwache Entwicklung des Pilzes. Dies kann natürlich auf verschiedenen, vorläufig nicht bekannten Ursachen beruhen. Wir müssen immer bedenken, daß die Peptone komplexe, nicht genau definierte Substanzen darstellen und daß sie nicht zuletzt auch durch ihre Aschensubstanzen wirken können.

II. Allgemeine Ernährungsphysiologie von Trichophyton album.

1. Kohlenstoffquellen.

Über die Eignung verschiedener Kohlenstoffquellen für *Trichophyton album* wurden keine systematischen Versuche ausgeführt. Schon die ersten Vorversuche zeigten, daß bei Verwendung einer komplexen N-Quelle (Gelatine, Fleischextrakt, Hefeextrakt usw.) die höchsten Myzelgewichte mit Glukose als C-Quelle erzielt wurden. In einigen Fällen ergab Mannose ebenso gute Resultate, während Glyzerin meistens erheblich schwächer wirkte. Ein weiterer Versuch ergab, daß auch mit Maltose Kahlbaum und Saccharose bedeutend niedrigere Ernten erzielt wurden als mit Glukose. Dies ist besonders für Maltose etwas auffallend, da im allgemeinen die Maltose bei den Pilzen sehr verbreitet ist, und da zudem die Maltose Kahlbaum gewisse Stoffe enthält, die nach Schopfer (23) als Wirkstoffe fördernd auf *Phycomyces* wirken. Es muß allerdings erwähnt werden, daß gerade unsere Versuche mit Maltose in den ersten Tagen scheinbar eine gute Entwicklung zeigten, die jedoch nicht weiter ging, und am Schluß des Versuches betrugen die Trockengewichte mit Maltose kaum einen Viertel (7,8 mg) gegenüber den Kulturen mit Glukose (30,7 mg). Dies zeigt deutlich, daß eine bloße Schätzung des Wachstums, wie sie z. B. auch von Mosher, Saunders, Kingery und Williams (16) angewendet wurde, für die Dermatophyten nicht angängig ist und zu Fehlschlüssen verleiten kann.

2. Stickstoffquellen.

Aus der Tatsache, daß die Dermatophyten vor allem mit Peptonen als N-Quelle gut wachsen, ist zu schließen, daß diese Pilze gewisse Ansprüche an ihre Stickstoffversorgung stellen. Es zeigte sich auch in unsern Versuchen, daß mit verschiedenen Stickstoffquellen von sehr

komplexer Zusammensetzung die höchsten Trockengewichte erzielt wurden. Mit Peptonen lassen sich drei- bis viermal höhere Ernten erzielen als mit Asparagin. Harnstoff, Gelatine und Hefeextrakt ergeben nur ein unbedeutendes Wachstum.

Tate (34) fand, daß verschiedene Dermatophyten mit Nitraten und Ammoniumsalzen als N-Quelle auskommen. Dagegen stellten Mosher, Saunders, Kingery und Williams fest, daß *Trichophyton interdigitale* auf organisch gebundenen Stickstoff angewiesen ist. Die einzelnen Arten der Dermatophyten scheinen sich also sehr verschieden zu verhalten.

Tabelle 3 zeigt, daß sich *Trichophyton album* mit Nitraten als N-Quelle überhaupt nicht entwickelt, auch nicht mit Zusatz von Biotin oder Leberextrakt. Mit Ammoniumzitrat und -tartrat ergibt sich ein ziemlich schwaches Wachstum, wobei allerdings ein Zusatz von Biotin oder Leberextrakt eine bedeutende Vermehrung des Trockengewichtes bedingt. Bedeutend besser ist die Entwicklung mit Ammoniumsulfat und Ammoniumnitrat, die nach diesem Versuche ebenso hohe Erntegewichte ergeben wie die wirksamsten Aminosäuren.

Tabelle 3.

Myzelgewichte bei verschiedenen Stickstoffquellen in gepufferter Nährlösung.

N-Quelle (1 ‰)	Grundlösung	Grundlösung + 0,1 γ Biotin		Grundlösung + 0,1 ccm Leberextrakt
	mg	mg	%	mg
KNO_3	0,7	0,8		1,0
$NaNO_3$	0,3	0,5		0,5
$(NH_4)_2SO_4$	33,7	56,7	+ 68,2	52,7
NH_4NO_3	42,5	53,0	+ 25,7	58,5
Ammoniumtartrat . . .	14,0	22,5	+ 60,7	63,2
Ammoniumzitrat . . .	9,7	83,7	+ 76,3	108,0
l-Asparagin	44,1	65,0	+ 47,4	
l-Asparaginsäure . . .	27,0	54,4	+ 101,5	
d,l-Asparaginsäure . .	50,7	51,6	+ 1,7	
Asparaginhydrochlorid .	38,8	43,5	+ 12,1	
Glykokoll	5,2	7,0	+ 34,6	
d,l-Leucin	6,5	6,1	— 6,1	
d-Arginin	27,1	32,5	+ 20	
d,l-Phenylalanin . . .	0	3,0		
d-Lysin-dihydrochlorid .	0	0		
d,l-Alanin	4,9	6,9	+ 40,8	
l-Oxyprolin	0	1,2		
Glutaminsäure	54,8	58,5	+ 6,7	

Von den verwendeten Aminosäuren zeigte Glutaminsäure die beste Wirkung. Mit dieser Stickstoffquelle erfolgt eine starke Schleimbildung durch den Pilz, während mit Asparagin und Asparaginsäure fast kein Schleim gebildet wird. Nach Tabelle 3 wäre Glykokoll als ungeeignete Stickstoffquelle zu betrachten, da nach 12 Tagen nur 5,2 bzw. 7,0 mg Trockengewicht gebildet werden. Es zeigte sich aber, daß diese Aminosäure sehr gut verwertet werden kann, nur ist das Wachstum außerordentlich langsam. In einem Zeitversuch wurden nach 26 Tagen mit Glykokoll Myzelgewichte von 82,5 mg im Durchschnitt erzielt. Diese Feststellung zeigt, daß man im Grunde genommen nur durch den Zeitversuch sicher feststellen kann, ob irgendeine N-Quelle von einem Organismus verwertet werden kann oder nicht. Leucin, das nach Williams und Mitarb. (16) für *Trichophyton interdigitale* die beste Entwicklung gibt, kann von *T. album* kaum verwertet werden (Tabelle 3), wenigstens nicht während unserer normalen Versuchsdauer von 12 bis 14 Tagen.

Bei Verwendung gewisser Aminosäuren kann nach Tabelle 3 *Trichophyton album* in synthetischer Nährlösung, ohne Zusatz von irgendeinem Wirkstoff kultiviert werden. Durch Zugabe von 0,1 γ Biotin zeigte sich indessen eine bedeutende Erhöhung der Myzelgewichte, die bei l-Asparaginsäure in diesem Versuch über 100 % ausmacht. *Trichophyton album* ist also bis zu einem gewissen Grade auxo-autotroph, doch stehen die in synthetischen Nährlösungen erreichten Myzelgewichte weit unter den Trockengewichten, die mit Peptonen oder andern komplexen Stickstoffquellen erreicht werden können.

Es fragte sich nun, ob durch Kombination verschiedener Aminosäuren Mehrerträge erzielt werden können. Da eine vollständige Kombination auch nur der wichtigsten Aminosäuren eine endlose und unfruchtbare Arbeit darstellen würde, beschränkten wir uns auf einige beliebige Kombinationen, die in Tabelle 4 zusammengestellt sind. Es scheint, daß durch gewisse Kombinationen die Myzelgewichte erhöht werden können, so z. B. mit Glykokoll, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin. Auffällig ist auch, daß die Mischung des wirksamen Asparagins mit dem unwirksamen Leucin einen bedeutenden Mehrertrag ergibt. In dieser Hinsicht verhält sich *T. album* offenbar ähnlich wie T. interdigitale, bei dem Williams und Mitarbeiter (16) ebenfalls gewisse, besonders wirksame Gemische von Aminosäuren ermittelt haben. Allerdings müssen wir hier für unser Objekt eine Einschränkung anbringen. Wenn z. B. in Tabelle 4 von Nr. 1 bis Nr. 5 eine deutliche Abnahme des Trockengewichtes festzustellen ist, so beruht dies hier sicher nicht auf irgendwelchen antagonistischen Wirkungen der verschiedenen Komponenten des Aminosäurengemisches, sondern ganz einfach auf der Tatsache, daß von Nr. 1 bis 5 die Konzentration der allein wirksamen Aminosäure, nämlich des Asparagins, stufenweise geringer

Tabelle 4.

Wirkung einiger Kombinationen von Aminosäuren.
Nährlösung: Phosphatpuffer n. Clark, pH 6,2 KCl 0,5‰, $MgSO_4$ 0,5‰, Glukose 1%.
Die Aminosäuren sind so dosiert, daß sie zusammen 1‰ ausmachen.

Aminosäurenmischung	Myzelgewichte	
	ohne Biotin	mit 0,01 γ Biotin
	mg	mg
1. Asparagin + Leucin	79,5	82,5
2. Asparagin + Leucin + d-Lysindihydrochlorid .	76,7	56,5
3. Asparagin + Leucin + d-Lysindihydrochlorid + Arginin	72,4	51,5
4. Asparagin + Leucin + d-Lysindihydrochlorid + Arginin + d,l-Phenylalanin	34,6	25,1
5. Asparagin + Leucin + d-Lysindihydrochlorid + Arginin + d,l-Phenylalanin + Tyrosin . .	34,4	31,1
6. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure	21,5	18,7
7. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure	59,4	58,3
8. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure + d,l-Alanin	121,0	74,0
9. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure + d,l-Alanin + l-Oxyprolin	10,6	9,0
10. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure + d,l-Alanin + l-Oxyprolin + l-Tryptophan	7,2	5,5
11. Mischungen Nr. 5 + Nr. 10 zusammen . . .	34,5	19,7

wird. Da immer nur 1‰ Aminosäuren in der Nährlösung vorhanden ist, beträgt die Asparaginkonzentration in Nr. 1 0,5‰, in Nr. 2 0,3‰ usw. bis 0,15‰ in Nr. 5. Das Trockengewicht ist also hier direkt eine Funktion der Asparaginkonzentration, während die übrigen beigefügten Aminosäuren praktisch unwirksam sind.

Der merkwürdige Fall von Nr. 8, wo das sonst nicht fördernd wirkende α-Alanin neben Glykokoll, Asparaginsäure und Glutaminsäure eine Verdoppelung des Myzelgewichtes ergibt, muß vorläufig auf unbekannte Ursachen zurückgeführt werden. Eine Wiederholung dieses Versuches ergab keine Steigerung des Wachstums durch Zusatz von Alanin zu den andern 3 Aminosäuren.

Schon aus Tabelle 3 geht hervor, daß *Trichophyton album* mit Alanin als Stickstoffquelle nur schwach und mit l-Oxyprolin überhaupt nicht wächst. Aus Tabelle 4 ergibt sich sogar eine deutliche Hemmung durch diese beiden Aminosäuren (Nrn. 9 und 10). Diese Erscheinung erschien so interessant, daß noch einige weitere Versuche in dieser Richtung ausgeführt wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5.

Hemmende Wirkung von d,l-Alanin und l-Oxyprolin einzeln und in Mischung mit andern Aminosäuren.

Aminosäuren	Myzelgewichte	
	nach 12 Tagen	nach 16 Tagen
	mg	mg
1. d-Glutaminsäure 1 ‰	41,6	45,6
2. d,l-Asparaginsäure 1 ‰	41,3	51,1
3. d,l-Alanin 1 ‰	3,3	5,0
4. l-Oxyprolin 1 ‰	Spur	0,6
5. d-Glutaminsäure + d,l-Alanin je 0,5 ‰ . . .	13,0	22,3
6. d-Glutaminsäure + l-Oxyprolin je 0,5 ‰ . .	Spur	0,3
7. d-Glutaminsäure + d,l-Alanin + l-Oxyprolin je 0,35 ‰	2,6	5,3
8. d,l-Asparaginsäure + d,l-Alanin je 0,5 ‰ . .	3,8	6,0
9. d,l-Asparaginsäure + l-Oxyprolin je 0,5 ‰ . .	Spur	0,6
10. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure je 0,35 ‰	48,5	51,3
11. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure + d,l-Alanin je 0,25 ‰	41,8	—
12. Glykokoll + d,l-Asparaginsäure + d-Glutaminsäure + d,l-Alanin + l-Oxyprolin je 0,2 ‰ .	6,6	8,0

Die starke Hemmung durch d,l-Alanin und in vermehrtem Maße durch l-Oxyprolin geht aus dieser Tabelle einwandfrei hervor. Durch Alanin wird das Trockengewicht auf einige mg reduziert. Auffällig war dabei, daß alle Kolben mit Alanin einen starken üblen Geruch verbreiteten. Es scheint also, daß der Pilz imstande ist, das Alanin ziemlich schnell umzuwandeln. Mit Oxyprolin ist die Hemmung noch viel ausgeprägter, doch wurden diese übelriechenden Substanzen nie wahrgenommen.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, in welchen Konzentrationen diese beiden Aminosäuren in Gegenwart einer gut assimilierbaren Aminosäure noch hemmend wirken. Die gepufferte Grundlösung enthielt als N-Quelle 1 ‰ d-Glutaminsäure und 1 % Glukose als C-Quelle. Dieser Lösung wurden abgestufte Mengen von d,l-Alanin, resp. l-Oxyprolin beigefügt. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse zusammengestellt, wobei die nach 10 Tagen erzielten Gewichte der Kontrollen als 100 % berechnet wurden.

Bei Zusatz von α-Alanin macht sich bei den drei niedersten Konzentrationen eine schwache Hemmung bemerkbar, die vielleicht noch innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Auffällig ist aber die deutliche För-

Tabelle 6.

Hemmung durch steigende Konzentrationen von d,l-Alanin und l-Oxyprolin, in gepufferter Nährlösung. (Zeit: 10 Tage.)
Nährlösung: Phosphatpuffer pH 6,2 · KCl 0,5 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰, Glukose 1 %, d-Glutaminsäure 1 ‰. Zeit: 10 Tage.

Zusatz von d,l-Alanin	Myzelgewicht		Zusatz von l-Oxyprolin	Myzelgewicht	
	mg	%		mg	%
0	50,7	100	0	50,7	100
0,001 ‰	49,8	98	0,001 ‰	47,6	94
0,01 ‰	47,8	94	0,01 ‰	47,6	94
0,05 ‰	47,0	92	0,05 ‰	14,5	28
0,1 ‰	63,4	125	0,1 ‰	0,4	0,8
0,5 ‰	11,8	23	0,5 ‰	0,2	0,4
1 ‰	9,6	19	1 ‰	Spur	0

derung durch 0,1 ‰ Alanin. Wie aus Tabelle 4, Nr. 8, hervorgeht, wurde auch in diesem Versuche einmal eine deutliche Förderung durch Alanin beobachtet. Es wäre denkbar, daß es sich in beiden Fällen um eine Frage der Konzentration handeln könnte. Man müßte in diesem Falle annehmen, daß α-Alanin, je nach dem Mischungsverhältnis, mit andern Aminosäuren sowohl hemmend als fördernd wirken könnte. Zur endgültigen Abklärung dieser Frage wären jedoch weitere Versuche erforderlich. Da diese Fragen aber nicht in der Richtung unserer eigentlichen Problemstellung lagen, verzichteten wir darauf, sie weiterzuverfolgen.

Sicher ist die Hemmung durch α-Alanin bei einer Konzentration von 0,5 ‰. Hier wird das Trockengewicht auf 23 % gegenüber der Kontrolle herabgesetzt. Diese Ergebnisse stimmen übrigens gut mit den Angaben in Tabelle 5 überein. Auch hier zeigt sich bei Zusatz von 0,5 ‰ Alanin eine sehr starke Hemmung, während mit 0,35 ‰ noch bedeutend höhere Myzelgewichte erzielt wurden.

Viel eindeutiger fiel der Versuch mit Zusatz von Oxyprolin aus. Die Hemmung war schon mit 0,05 ‰ sehr stark, d. h. ein Zusatz von 1,25 mg Oxyprolin in 25 ccm Nährlösung reduziert das Trockengewicht auf 28 %. Bei höhern Konzentrationen erfolgte überhaupt kein Wachstum mehr.

Neuerdings haben Alten und Orth (1) die Bedeutung verschiedener Aminosäuren für die Sporangienkeimung von *Phytophthora infestans* untersucht. Verschiedene Aminosäuren bewirkten eine Hemmung der Keimung, doch scheint der Mechanismus der Hemmung bei den einzelnen Aminosäuren recht verschieden zu sein. In ihren Versuchen hemmten Asparaginsäure, Lysindichlorhydrat, Glutaminsäure,

Glutathion und Asparagin durch eine Verschiebung des pH nach der sauren Seite, während für Methionin, Cystein und Cystin die Hemmung auf den Schwefelgehalt zurückgeführt wird. Weitaus am stärksten war die Hemmung bei Arginin, für die indessen keine Erklärung gegeben werden konnte. In unserem Falle bestehen also für die durch Alanin bedingte Hemmung gewisse Indizien, daß wahrscheinlich Umwandlungsprodukte des α-Alanins hemmend wirken. Für die durch Oxyprolin ausgeübte, noch bedeutend stärkere Hemmung sind uns die Ursachen völlig unbekannt.

3. Wirkung von Begleitstoffen in Asparagin und Glutaminsäure.

Es mußte nun zunächst abgeklärt werden, ob die fördernde Wirkung von Asparagin und Glutaminsäure lediglich auf der besonderen Eignung dieser Aminosäuren als Stickstoffquelle beruht, oder ob in ihnen organische Verunreinigungen oder metallische Katalysatoren enthalten sind, die letzten Endes das gute Wachstum von Trichophyton bedingen könnten.

Für das Asparagin hat H. Utiger (36) in seinen Untersuchungen über die künstliche Symbiose *Mucor Ramannianus — Rhodotorula rubra* gezeigt, daß neben andern Faktoren die im Asparagin enthaltenen Spurenelemente für die Wirkung des Asparagins von Bedeutung sind. Damit wird die besonders günstige Wirkung dieser Stickstoffquelle zum Teil erklärt. Seit den Untersuchungen von Steinberg muß die Wirkung von Spurenelementen im Auge behalten werden, auch wenn man mit « chemisch reinen » Substanzen arbeitet.

Aus Tabelle 7 geht nun tatsächlich hervor, daß die Wirkung des Asparagins durch wiederholtes Umkristallisieren abnimmt. Für Asparagin Hoffmann-La Roche wurden in den Versuchen XIII und XV die Myzelgewichte um mindestens 50 % reduziert, ebenso in Versuch XIII für Asparagin Schuchardt und Asparagin British Drog Houses.

Versuch XV lieferte schon wegen der längern Versuchsdauer bedeutend höhere Myzelgewichte und zeigt auch sonst einige vorläufig unerklärliche Ergebnisse. (Das Umkristallisieren scheint hier bei Asparagin B. D. H. sogar eher fördernd zu wirken). Dagegen scheint es für Asparagin Hoffmann-La Roche sicher zu sein, daß durch das Umkristallisieren gewisse Begleitstoffe eliminiert werden, die fördernd auf *Trichophyton album* wirken.

Zur Prüfung der Frage, ob Asparagin und Glutaminsäure wirksame Aschensubstanzen enthalten, wurden 2 g der beiden Aminosäuren im Platintigel verascht. Die Asche wurde mit 10 ccm n/10 HCl aufgenommen und dann mit der gleichen Menge NaOH neutralisiert. Pro Kolben wurden 0,5 ccm der Lösung beigefügt, was einem Gehalt von ca. 2 $^0/_{00}$ Asparagin oder Glutaminsäure entspricht.

Tabelle 7.

Wirkung verschiedener Asparagin-Präparate (Mittelwerte aus Versuch XIII, 10 Tage und Versuch XV, 13 Tage), in ungepufferter Nährlösung.

Asparagin	Myzelgewichte			
	ohne Biotin		mit 0,01-Biotin	
	XIII	XV	XIII	XV
	mg	mg	mg	mg
Hoffmann-La Roche	30,7	67,6	37,7	63,9
Hoffmann-La Roche, dreimal umkristallisiert	14,5	29,0	24,0	47,4
Schuchardt	—	52,3	—	67,9
Schuchardt, einmal umkristallisiert	10,8	53,7	27,7	57,7
British Drog Houses	22,5	57,7	43,7	47,8
British Drog Houses, zweimal umkristallisiert	10,7	65,3	32,0	61,9

Es zeigte sich, daß die Aschensubstanzen des Asparagins vollständig unwirksam waren. Dagegen stiegen die Myzelgewichte bei Zugabe der Asche von Glutaminsäure bedeutend an, und zwar mit Ammoniumzitrat wie auch mit Glutaminsäure als Stickstoffquelle. Diese Zunahme äußerte sich allerdings mit Ammoniumzitrat nur dann deutlich, wenn neben den Aschensubstanzen auch Biotin beigefügt wurde. In den Kulturen mit Glutaminsäure als Stickstoffquelle hatte dagegen eine Zugabe von Biotin keinen Mehrertrag zur Folge.

Die Vermutung liegt somit nahe, daß beim Asparagin die organischen Verunreinigungen fördernd wirken, während bei der Glutaminsäure in erster Linie die Aschensubstanzen wirksam sind, was aber noch durch weitere Versuche bestätigt werden müßte.

III. Die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren.

Die bisher mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß *Trichophyton album* bis zu einem gewissen Grade auxo-autotroph ist, d. h. er wächst auch in rein synthetischen Nährlösungen mit gewissen Ammoniumsalzen oder Aminosäuren als Stickstoffquellen, weil er, wenigstens zum Teil, die Fähigkeit der Synthese seiner Wirkstoffe besitzt. Aber dieses Wachstum entspricht in keiner Weise den Erträgen, die der Pilz liefert, wenn er komplexe Stickstoffquellen zur Verfügung hat, in denen sicher Wachstumsfaktoren organischer Natur vorhanden sind, wie im Leberextrakt und in den Peptonen. Daß daneben auch noch mineralische Beimengungen fördernd wirken können, zeigt das Beispiel der Glutaminsäure-Asche. Es soll nun im folgenden untersucht werden, welche Wachstumsfaktoren fördernd auf *Trichophyton album* wirken.

1. Biotin.

Außer der Hefe und einigen Bakterien sind bisher nur wenige Pilze bekannt, die auf Biotin reagieren (vgl. Kögl und Fries, 10, sowie Fries, 8). Allerdings muß hier bemerkt werden, daß es bis jetzt schwierig war, genügend reine Biotinkonzentrate für solche Versuche zu erhalten. Nachdem in zahlreichen Versuchsreihen ein Biotinkonzentrat SMACO (mit einem Biotingehalt von 100 γ/ccm) deutlich fördernd auf Trichophyton album wirkte, konnten wir nun dazu übergehen, auch die Wirkung anderer Konzentrate zu untersuchen.

a) Wirkung anderer Biotin-Konzentrate.

Die Firma Hoffmann-La Roche stellte uns in verdankenswerter Weise ihre Biotinkonzentrate Nr. 4417/80, /86, /87 und /88 zur Verfügung. Nach dem Hefetest beträgt der Biotingehalt für Nr. 80 : 0,248 γ, für Nr. 86 : 0,155 γ, für Nr. 87 : 0,554 γ, und für Nr. 88 : 0,292 γ pro ccm.

Aus Tabelle 10 geht mit Sicherheit hervor, daß alle vier Biotinkonzentrate eine deutliche Erhöhung des Trockengewichtes bewirkten. Diese Förderung zeigte sich sowohl mit Asparagin als auch mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle.

Tabelle 10.

Wirkung verschiedener Biotin-Konzentrate mit Asparagin oder Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle, in gepufferter Nährlösung.

	Asparagin 1‰ 13 Tage		Ammoniumzitrat 1‰ 18 Tage	
	mg	Mehrertrag %	mg	Mehrertrag %
Kontrolle .	58,7	—	48,7	—
Nr. 80 . .	76,7	+ 37,5	66,0	+ 35,5
Nr. 86 . .	67,1	+ 14,2	71,2	+ 46,2
Nr. 87 . .	83,5	+ 42,2	65,5	+ 34,5
Nr. 88 . .	89,7	+ 52,8	67,3	+ 38,2

b) Wirkung des reinen Biotins.

Das verwendete Biotin ist ein reines Präparat SMACO, freundlichst übermittelt durch die Firma Hoffmann-La Roche.

Die Versuche mit diesem Präparat wurden leider erst zu einer Zeit ausgeführt, als der Pilz schon Anzeichen einer zunehmenden Degeneration aufwies, was sich besonders deutlich an der langsamen und unregelmäßigen Entwicklung mit Asparagin als N-Quelle zeigte. Die

Myzelgewichte sind denn auch im allgemeinen bedeutend geringer als in den frühern Versuchen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 und Abbildung 3 dargestellt.

Die Bestimmung der optimalen Konzentration des Biotins stieß auf gewisse Schwierigkeiten. Ein Vorversuch zeigte schon, daß die bisher angewandte Konzentration von 0,01 γ/25 ccm weit über dem Optimum lag. Schon mit 0,00025 γ (0,25 mγ) ergab sich mit Asparagin als Stickstoffquelle nach 12 Tagen eine Erhöhung des Trockengewichtes von 50,8 auf 77,2 mg (52 %) und mit Ammoniumzitrat nach 18 Tagen eine Erhöhung von 39,9 auf 51 mg (28 %). Es mußten also zur Bestimmung der niedrigsten wirksamen Konzentration und des Optimums noch viel geringere Konzentrationen angewendet werden.

Tabelle 11.

Wirkung des reinen Biotins in steigenden Konzentrationen, in gepufferter Nährlösung.

Biotinkonzentration	Myzelgewichte		
	Ammoniumzitrat 1 ‰		Asparagin 1 ‰
	Versuch XXV 21 Tage	Versuch XXV a 20 Tage	22 Tage
	mg	mg	mg
0	2,2	11,0	23,3
0,000 000 4 mγ 4 · 10^{10} γ	6,2	13,3	35,2
0,000 004 mγ 4 · 10^{9} γ	7,4	27,6	25,7
0,000 04 mγ 4 · 10^{8} γ	8,2	21,8	29,4
0,000 4 mγ 4 · 10^{7} γ	8,4	18,9	20,2
0,004 mγ 4 · 10^{6} γ	13,0	16,7	20,4
0,04 mγ 4 · 10^{5} γ	16,3	12,8	21,5
0,4 mγ 4 · 10^{4} γ	10,6	14,8	21,3
4 mγ 4 · 10^{3} γ	10,7	20,8	24,3

Die in Tabelle 11 angegebenen Trockengewichte sind Mittelwerte von 8, resp. 10 Kolben, man sollte deshalb annehmen dürfen, daß sie trotz bedeutender zufälliger Schwankungen einigermaßen zuverlässig wären. Es wurde für diese Versuche Asparagin Roche, dreimal umkristallisiert, und reinste Glukose verwendet. Auch der Reinigung der Kulturgefäße wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Eine eigentliche quantitative Wirkung des Biotins läßt sich aus diesen Versuchen nicht ableiten. Dagegen scheint festzustehen, daß der Schwellenwert der Biotinwirkung schon bei der außerordentlich geringen Konzentration von 0,000 000 4 mγ ($4 \cdot 10^{-10}$ γ) pro 25 ccm Nährlösung erreicht oder sogar überschritten ist. Mit Asparagin als N-Quelle wurde mit dieser Konzentration schon das höchste Myzelgewicht dieses Ver-

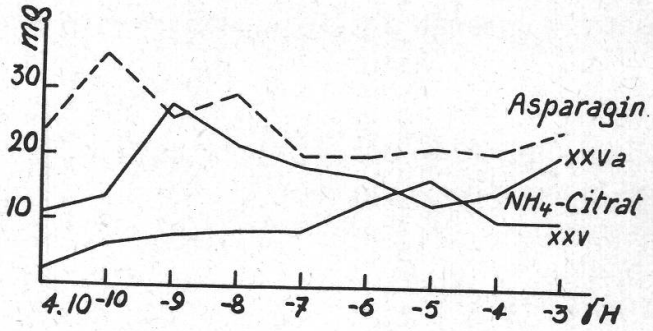

Abbildung 3.

Förderung durch steigende Konzentrationen von Biotin in gepufferter Nährlösung mit Asparagin oder Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle.

suches erreicht, obschon gesagt werden muß, daß uns die Ergebnisse dieses Versuches wegen der abnorm kleinen Gewichte nicht befriedigen.

Von den drei Versuchen zeigt nur Nr. XXV ein einigermaßen ausgeprägtes Optimum der Biotinwirkung, und zwar bei einer Konzentration von 0,04 mγ ($4 \cdot 10^{-5}$ γ). Aber auch hier zeigt sich bei « höhern » Konzentrationen ein ziemlich unregelmäßiges Abfallen und Wiederansteigen.

Auch Fries (8) konnte für das Biotin keine eigentliche quantitative Wirkung feststellen. Er nimmt an, daß in gewissen Fällen eine minimale Biotinmenge ausreicht, um ein unbegrenztes Wachstum zu ermöglichen. G. Lindeberg (12) stellte für *Marasmius androsaceus* fest, daß nur bei geringen Konzentrationen (0,2—0,5 mγ/20 ccm) eine quantitative Wirkung des Biotins besteht.

Nach Robbins und M. Bartley Schmidt (19) wirkt das Biotin deutlich quantitativ auf *Ashbya gossypii*. Obschon in unsern mehrfach wiederholten Versuchen nicht immer eine deutliche quantitative Wirkung des Biotins nachgewiesen werden konnte, glauben wir vorläufig doch, daß sich dieses Vitamin nicht anders verhält als die übrigen bekannten Wachstumsfaktoren. Beim Biotin ist jedoch wegen der geringen Konzentrationen eine Bestimmung des Schwellenwertes und des Optimums mit besondern Schwierigkeiten verbunden. Würde eine quantitative Wirkung des Biotins nicht bestehen, so müßte man eine katalytische Wirkung annehmen, bei der mit sehr geringen Mengen des Vitamins eine Entwicklung des Pilzes ausgelöst werden könnte, wodurch dann weiterhin die Biosynthese in Gang gebracht würde, die den Organismus von der Biotin-Zufuhr unabhängig macht. Es muß aber betont werden, daß eine endgültige Entscheidung, ob das Biotin quantitativ wirkt oder nicht, nur mit einem Organismus erbracht werden könnte, der diesem Vitamin gegenüber vollständig heterotroph ist.

2. Aneurin.

Für die Dermatophyten wurde eine Wirkung des Aneurins für *Trichophyton interdigitale* (R. J. Williams und Mitarbeiter, 16) und für *T. discoides* (Macinnon, 13) wahrscheinlich gemacht. Aneurin allein scheint aber die Entwicklung von *T. interdigitale* nicht wesentlich zu fördern, erst mit Kombinationen von Aneurin mit Inositol oder Pantothensäure ergibt sich ein stärkeres Wachstum. *T. discoides* ist nach Macinnon gegenüber dem Aneurin autotroph. Immerhin wirkt dieses Vitamin in Nährböden mit Bacto-Pepton fördernd, wobei in erster Linie die Wuchsform der Riesenkolonien modifiziert wird.

Es wurde früher schon auf die interessante Parallele zwischen *Trichophyton album* und *Ustilago scabiosae* in ihrem Verhalten gegenüber einigen Peptonen aufmerksam gemacht. Peptone, die für *Ustilago scabiosae* ohne Zusatz von Aneurin keine nennenswerte Entwicklung ergeben, sind auch für *T. album* nicht verwertbar. Wir sahen darin schon einen Hinweis auf eine Aneurin-Heterotrophie von *T. album.*

Trichophyton album wird in der für die Biotin-Versuche verwendeten Phosphatpufferlösung durch Aneurin nicht oder höchstens in geringem Maße gefördert. Viel deutlicher zeigt sich die Wirkung des Aneurins in einer einfachen, ungepufferten Nährlösung mit 1,5 ‰ KH_2PO_4, 0,5 ‰ $MgSO_4$, 1 ‰ Asparagin und 1 % Glukose. Es ist dies die Nährlösung, die von Schopfer (23) für die Kultur von Mucorineen angewendet wird. Allerdings muß das pH dieser Nährlösung durch Zugabe von NaOH auf ca. 6 gebracht werden, da sonst überhaupt kein Wachstum erfolgt. In dieser einfachen Nährlösung zeigt *T. album* eine deutliche Förderung durch Aneurin, wie aus Tabelle 12 hervorgeht.

Tabelle 12.

Wirkung des Aneurins und seiner Komponenten in ungepufferter Nährlösung.

	Myzelgewichte (20 Tage)
	mg
Kontrolle	28,0
Pyrimidin 2,5 γ	27,8
Thiazol 2,5 γ	26,5
Pyrimidin + Thiazol je 2,5 γ	43,8
Aneurin 5 γ	42,2

Im Gegensatz zum Biotin äußert sich die Wirkung des Aneurins erst in spätern Entwicklungsstadien. Die Heterotrophie gegenüber dem Aneurin ist eine teilweise, da auch in der hier verwendeten Nährlösung die Kontrollen ein ziemlich hohes Myzelgewicht erreichen. Immerhin bedingt das Aneurin einen Zuwachs von rund 50 %.

Gegenüber den Komponenten des Aneurinmoleküls, dem Pyrimidin und dem Thiazol, verhält sich *Trichophyton album* wie *Phycomyces, Ustilago violacea* und andere Pilze. Keine der beiden Komponenten vermag allein eine Förderung zu bewirken, dagegen wirken beide zusammen wie das ganze Aneurinmolekül (Phycomyces-Staphylococcus-Typ).

3. Adermin (Vitamin B_6).

Die Bedeutung des Adermins (Pyridoxin) als Wachstumsfaktor für die Mikroorganismen ist erst in den letzten Jahren erkannt worden. Dieses Vitamin wirkt als Wachstumsfaktor auf die Hefe (Schultz, Atkin and Frey, 32; Eakin and R. J. Williams, 7), auf gewisse Milchsäurebakterien (Möller, 15) sowie auf verschiedene *Ceratostomella*-Arten (Robbins and Ma, 21). Es war für uns deshalb von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob das Adermin auch in den noch nicht vollständig ermittelten Komplex der für *Triphophyton album* notwendigen Wachstumsfaktoren gehört.

In ungepufferter Nährlösung mit Asparagin als N-Quelle wird, wie aus Tabelle 13 hervorgeht, das Myzelgewicht durch Zusatz von 5 γ Adermin pro 25 ccm Nährlösung fast verdoppelt. In den Versuchen mit gepufferter Nährlösung wurde Adermin nicht einzeln beigefügt (Tabelle 15), doch erscheint es wahrscheinlich, daß die in Nr. 5 erreichte weitere Erhöhung des Trockengewichtes nicht auf β-Alanin, sondern auf Adermin zurückzuführen ist.

Tabelle 13.

Wirkung von Aneurin, Biotin, Inositol und Adermin in ungepufferter Nährlösung.

	mit Asparagin 1 ‰		mit Ammoniumzitrat 1 ‰	
	Myzelgewicht	Mehrertrag gegenüber Kontrolle	Myzelgewicht	Mehrertrag gegenüber Kontrolle
	mg	%	mg	%
Kontrolle	27,6	—	19,6	—
Aneurin 5 γ	51,5	+ 86,6	22,8	+ 16,3
Biotin 1 mγ	38,1	+ 38,0	22,8	+ 16,3
Inositol 1 mg	47,5	+ 72,1	20,9	+ 24,5
Adermin 5 γ	54,3	+ 96,7	20,5	+ 4,5
Aneurin 5 γ + Biotin 1 mγ	56,7	+ 105,4	28,9	+ 37,4
Aneurin 5 γ + Inositol 1 mg	56,2	+ 103,6	29,4	+ 50,0
Aneurin 5 γ + Adermin 5 γ	66,7	+ 141,6	30,3	+ 54,5
Aneurin 5 γ + Biotin 1 mγ + Inositol 1 mg	69,4	+ 151,4	32,3	+ 64,8
Aneurin 5 γ + Inositol 1 mg + Adermin 5 γ	66,1	+ 139,5	29,0	+ 47,9
Aneurin 5 γ + Biotin 1 mγ + Inositol 1 mg + Adermin 5 γ	84,8	+ 207,2	32,5	+ 65,8

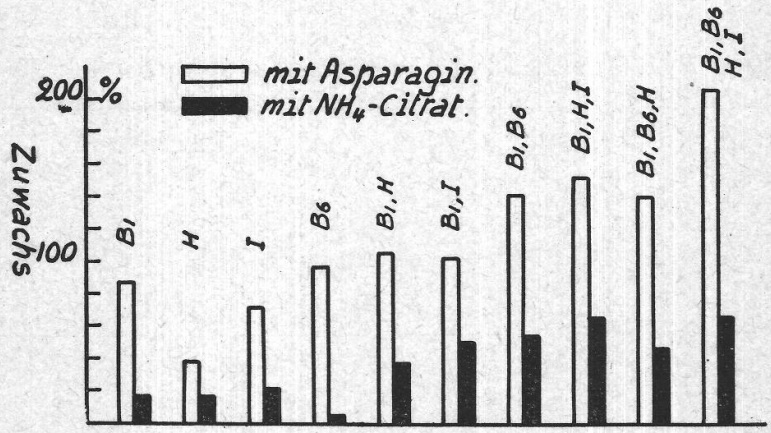

Abbildung 4.

Prozentuale Förderung durch verschiedene Wachstumsfaktoren, einzeln und in Kombinationen in ungepufferter Nährlösung (Kontrolle = 0 %).

4. Inositol, Pantothensäure und andere Wachstumsfaktoren.

Aus Tabelle 15 geht hervor, daß Inositol mit Asparagin als N-Quelle in ungepufferter Nährlösung deutlich fördernd wirkt. Allerdings kam hier eine ziemlich hohe Konzentration zur Anwendung. Auch mit Ammoniumzitrat ist eine gewisse Förderung unverkennbar, obschon sie hier, wie auch die Wirkung der übrigen Wachstumsfaktoren weniger deutlich zum Ausdruck kommt.

Dagegen scheint Pantothensäure, die nach R. J. Williams und Mitarbeitern (16) wenigstens in Kombinationen mit Aneurin und Lactoflavin fördernd auf *Trichophyton interdigitale* wirkt, für *T. album* in gepufferter Nährlösung unwirksam zu sein. Dasselbe gilt für β-Alanin und Pimelinsäure sowie Lactoflavin (Tabelle 15).

5. Einige Kombinationen von Wachstumsfaktoren.

Die Mehrzahl der auxo-heterotrophen Lebewesen bedarf verschiedener Wachstumsfaktoren. Den Typus dieser Organismen stellt die Hefe *(Saccharomyces cerevisiae)* dar, wo die Konstellation der Wachstumsfaktoren immer komplexer erscheint. Kögl sowie Kögl und Fries (10) haben für verschiedene Pilze nachgewiesen, daß bestimmte Kombinationen von Wachstumsfaktoren viel wirksamer sind als die einzelnen Komponenten. So bedarf *Nematospora gossypii* einer Kombination von Mesoinositol + Aneurin + Biotin. Dasselbe gilt für *Melanconium betulinum,* wo mit der gleichen Kombination ungefähr dasselbe Wachstum erreicht wurde wie mit Hefeextrakt.

Trichophyton album zeigte mit einer Kombination von Aneurin und Biotin ein bedeutend besseres Wachstum als mit Aneurin oder Biotin allein (Tabelle 14).

Tabelle 14.

Wirkung von Aneurin und Biotin in ungepufferter Nährlösung.

	Myzelgewichte (15 Tage)	
	mg	Zuwachs gegenüber Kontrolle %
Kontrolle	16,9	—
Aneurin 5 γ	26,2	+ 55
Biotin 0,1 mγ	18,75	+ 10,9
Aneurin 5 γ + Biotin 0,1 mγ . .	30,2	+ 78,7

Wir erreichen aber mit Zugabe dieser beiden Wachstumsfaktoren allein bei weitem nicht die Trockengewichte, die mit Leberextrakt oder Pepton erzielt werden. Bei Kombination weiterer wirksamer Faktoren gelingt es, die Trockengewichte bedeutend zu steigern. So bewirkt nach Tabelle 13 ein Zusatz von Aneurin und Biotin eine Erhöhung des Trokkengewichtes um ca. 105 %. Fügen wir außerdem noch Inositol bei, so ergibt sich ein Mehrertrag von ca. 151 %, und endlich erreichen wir mit Aneurin + Biotin + Inositol + Adermin eine Zunahme von 207 %, d. h. die erhaltenen Trockengewichte sind mehr als dreimal höher als die Kontrolle. Es handelt sich also um eine additive Wirkung dieser vier Wachstumsfaktoren (Abbildung 4).

In gepufferter Nährlösung (Tabelle 15) zeigt sich ungefähr dasselbe Bild. Auch hier ist das Trockengewicht in Nr. 7 mehr als dreimal so hoch als bei der Kontrolle, wobei zu bemerken ist, daß hier sehr wahrscheinlich nur Biotin, Adermin und in geringerem Maße Inositol wirksam sind. Tabelle 15 zeigt aber auch, daß diese Kombination von Wachstumsfaktoren noch nicht optimal ist, denn mit einer Zugabe von 0,1 ‰ Peptone granulée können Myzelgewichte erreicht werden, die bedeutend höher sind. Bezeichnend ist auch, daß sämtliche Wachstumsfaktoren, einzeln und in Kombination in Gegenwart von Pepton kaum eine Förderung bewirken. Das weist darauf hin, daß sie im Pepton schon in genügender Menge enthalten sind. Allerdings besteht auch noch die Möglichkeit, daß das Pepton überdies durch eine besondere Kombination seiner Aminosäuren oder durch seine Aschenbestandteile die höheren Myzelgewichte bedingen kann.

Bei Zusatz von 0,0005 ccm Leberextrakt (was einem Extrakt aus 70 mg Leber entspricht) bewirkt Biotin allein eine Zunahme von 12,7 %, während die Zugabe aller andern Wachstumsfaktoren und ihrer Kombinationen wirkungslos ist.

Tabelle 15.

Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren in gepufferter Nährlösung. (Zeit: 11 Tage.)

	Grundlösung (1‰ Asparagin)	Grundlösung + 0,1 ‰ Peptone granulée	Grundlösung + 0,0005 ccm Leberextrakt
	mg	mg	mg
0 Kontrolle	19,0	93,3	77,0
1 Biotin[1]	45,2	96,5	86,8
2 Pantothensäure	14,8	95,8	81,7
3 Lactoflavin	19,2	97,3	70,3
4 Biotin + Pantothensäure + Lactoflavin	41,8	91,3	89,8
5 Biotin + Pantothensäure + Lactoflavin + Adermin + β-Alanin	61,2	95,2	88,8
6 Biotin + Pantothensäure + Lactoflavin + Adermin + β-Alanin + Aneurin + Inositol . . .	63,2	96,8	91,8
7 Biotin + Pantothensäure + Lactoflavin + Adermin + β-Alanin + Aneurin + Inositol + Pimelinsäure	62,8	97	86,3

[1] Die Wuchsstoffe wurden in folgenden Konzentrationen beigefügt: Biotin (Konzentrat Nr. 4) 0,01 γ, Pantothensäure 5 γ, Lactoflavin 5 γ, Adermin 5 γ, β-Alanin 50 γ, Aneurin 5 γ, Inositol 500 γ, Pimelinsäure 5 γ.

2. Teil. Die Wirkstoff-Synthese.

IV. Die Bedingungen der Wirkung vitaminischer Wachstumsfaktoren.

Es handelt sich nun darum, für die fakultative und variable Wirkung der für *Trichophyton album* notwendigen Wachstumsfaktoren Aneurin, Adermin und Biotin eine Deutung zu finden.

Als Ausgangspunkt dieser Erörterungen muß das Prinzip des Syntheseverlustes herangezogen werden. Seit 1934/35 wurde angenommen und für einige Fälle auch bewiesen, daß das Fehlen von Vitaminen bei den Mikroorganismen typische Avitaminosen hervorruft, die durch die Abwesenheit eines oder mehrerer Vitamine im Organismus bedingt sind. Das Fehlen von Vitaminen beruht auf einem Verlust eines Synthesevermögens. Dieser wurde in einigen Fällen nachgewiesen und später automatisch auf andere Fälle angewendet, was sich meistens auch bewährt hat. Auch für *Trichophyton album* gibt uns dieses Prinzip die Möglichkeit einer Interpretation der bereits erwähnten Beobachtungen.

Praktisch beruht das Prinzip auf zwei Voraussetzungen :

1. Muß man einem Organismus ein bestimmtes Vitamin in der Nährlösung beifügen, so bedeutet dies, daß dieses Vitamin in dem betreffenden Organismus fehlt, bzw. nicht gebildet werden kann.
2. Hat das der Nährlösung beigefügte Vitamin für die Entwicklung eines Lebewesens keine Bedeutung, so weist dies darauf hin, daß der Organismus imstande ist, dieses Vitamin selbst zu synthetisieren.

Diese beiden Postulate haben eine um so umfassendere Bedeutung, je weiter die allgemeine Verbreitung eines Vitamins in allen Stufen der belebten Welt ist.

Es gibt immerhin gewisse Ausnahmen, wo besonders das zweite Postulat seine Gültigkeit verliert : Das Vitamin E übt keine Wirkung auf *Phycomyces* aus, obschon die Analyse des Myzels kein α-Tocopherol ergibt, das nach unserm zweiten Postulat hier eigentlich vorhanden sein sollte. Es handelt sich hier um einen Sonderfall, wo ein Vitamin nicht wirkt, obwohl es vom Organismus nicht selber synthetisiert werden kann.

Ein weiterer Vorbehalt muß gegenüber dem ersten Postulat angebracht werden : Auch wenn es notwendig ist, einem Organismus ein bestimmtes Vitamin mit der Nährlösung zuzuführen, so bedeutet dies noch nicht in jedem Falle, daß dieses Vitamin nicht synthetisiert werden kann. Es kann in einer unwirksamen Form vorhanden sein, oder die Kulturbedingungen (pH, Zusammensetzung der Nährlösung usw.) können derart sein, daß sich das vorhandene Vitamin nicht auswirken kann, so daß die Lebensvorgänge so ablaufen, als ob überhaupt das betreffende Vitamin nicht vorhanden wäre (scheinbare Auxo-Heterotrophie).

Um das Prinzip des Syntheseverlustes anwenden zu können, müssen also, wie wir von jeher betont haben, die Versuchsbedingungen in einem möglichst weiten Rahmen variiert werden. Wenn auch nur eine einzige Kulturbedingung ausfindig gemacht werden kann, bei der das Vitamin der Nährlösung beigefügt werden muß, weil es im Myzel nicht vorhanden ist, so läßt sich die Anwendung des Prinzipes vollauf rechtfertigen.

Für *Trichophyton album* konnten wir eine fakultative Wirkung des Aneurins, des Adermins und des Biotins nachweisen und zeigen, daß diese Wirkung durch die Beschaffenheit der Nährlösung bedingt ist oder daß sie als Funktion der Zeit (d. h. des Alters oder der Entwicklung des Pilzes) auftritt.

1. Vitaminwirkung durch die Beschaffenheit der Nährlösung bedingt.

a) Aneurin.

Die ersten Versuche mit *Trichophyton album*, die mit unserer gewöhnlichen ungepufferten Nährlösung ausgeführt wurden, zeigten eine deutliche Erhöhung des Trockengewichtes bei Zusatz von Aneurin. Dagegen ist dieses Vitamin in einer gepufferten Nährlösung (Phosphatpuffer pH 6,2) ohne jede Wirkung (Tabelle 15). Als später wieder die ungepufferte Nährlösung zur Anwendung kam, trat auch die Aneurinwirkung wieder auf (Tabellen 12—14).

b) Adermin.

Mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle (Tabelle 13) bewirkt das Adermin nur eine ganz geringe Förderung (+ 4,5 %), die sicher innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Wird aber das Ammoniumzitrat durch Asparagin ersetzt, so konnte in einem Versuch durch Zusatz von Adermin eine Erhöhung des Trockengewichtes um 96,7 % erzielt werden.

Wir dürfen in diesen beiden Fällen wohl annehmen, daß das Synthesevermögen für die hier als unentbehrlich betrachteten Wachstumsfaktoren Aneurin und Adermin durch die Beschaffenheit der Nährlösung bedingt sein kann. Das Synthesevermögen ist also in gewissem Sinne eine Funktion des Milieus.

Für das Aneurin haben Robbins und Kavanagh (20) an *Pythium Butleri* gezeigt, daß dieser Pilz in einer bestimmten Nährlösung eines Zusatzes von Pyrimidin bedarf, in einer andern jedoch nicht. Die Verhältnisse liegen allerdings in unserem Falle etwas anders. Bei *Pythium Butleri* handelt es sich um ein « Alles- oder Nichts-Phänomen », d. h. vollständige Entwicklung in einem Fall, überhaupt keine Entwicklung im andern. Bei *Trichophyton album* dagegen handelt es sich lediglich um eine Erhöhung des Trockengewichtes, was damit zusammenhängt, daß unser Pilz auch in den Kontrollen, ohne Zusatz von Vitamin gedeiht, und anderseits ist für eine maximale Entwicklung nicht nur Aneurin, sondern eine Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren notwendig.

Auch die von Utiger (36) untersuchte künstliche Symbiose von *Mucor Ramannianus* mit *Rhodotorula rubra* ergab Resultate, die wohl auf derselben Basis interpretiert werden dürfen : Ausbleiben der Synthese der einen Aneurinkomponente in einer bestimmten Nährlösung, Auftreten dieser Synthese in einer andern Nährlösung.

Für das Adermin sind uns keine entsprechenden Untersuchungen über eine veränderliche und von Außenfaktoren abhängige Wirkung dieses Vitamins bekannt.

c) Biotin.

Die Intensität der Biotinwirkung ist ebenfalls in hohem Maße von der Art der Stickstoffquelle abhängig. Auch hier nehmen wir in Anwendung desselben Prinzipes an, daß die Biosynthese des Biotins je nach der Beschaffenheit der Nährlösung mit verschiedener Intensität erfolgt. Die Verhältnisse erscheinen jedoch hier noch verwickelter, weil die Biosynthese außerdem noch als Funktion der Zeit erscheint, was im folgenden Abschnitt näher besprochen werden soll.

2. Vitaminwirkung als Funktion der Zeit.

Über die Vitaminwirkung als Funktion der Zeit, d. h. des Entwicklungsstadiums eines Lebewesens bestehen nur wenige Untersuchungen. Versuche in dieser Richtung, in denen der Zeitfaktor mit dem Faktor

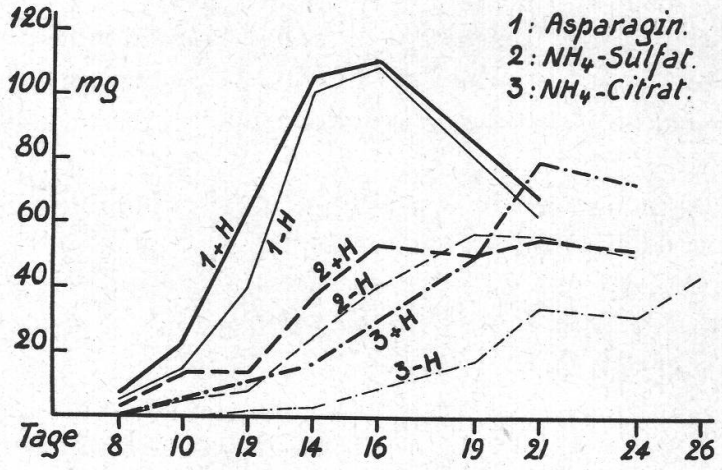

Abbildung 5.

Förderung durch Biotin
mit verschiedenen Stickstoffquellen in gepufferter Nährlösung. (Zeitversuch.)

Konzentration kombiniert wurde, führten Schopfer (1926) an *Phycomyces,* sowie Schopfer und Blumer (1930) an *Ustilago violacea* aus. Es handelte sich aber in beiden Fällen um auxo-heterotrophe Pilze, bei denen das Aneurinbedürfnis absolut ist, und bei denen dieses Vitamin, soweit es bis heute bekannt ist, unter allen Bedingungen notwendig ist.

Ein durch das Alter der Kulturen bedingtes Aneurinbedürfnis wurde für *Boletus granulatus* eindeutig festgestellt (Melin und Nyman, 14), wobei hier das Aneurin besonders in den ersten Stadien der Entwicklung wirksam war. Dasselbe gilt für *Rhizopus suinus* (Schopfer, 28, 29). Hier ist die Wirkung des Meso-Inositols zeitlich bedingt, und die Periode, in der eine Vitaminwirkung auftritt, ist eine Funktion der Temperatur. Die empfindliche Phase, in der eine Vitaminwirkung zutage tritt, darf nicht als absolute Zeitspanne betrachtet

werden, sondern ihre Dauer wird durch die Einwirkung bestimmter Temperaturen festgelegt. Maßgebend ist also nicht das absolute, sondern das physiologische Alter des Pilzes (über den Begriff des physiologischen Alters vgl. Schopfer, 1936).

Für *Trichophyton album* liegen die Verhältnisse folgendermaßen:

Mit Asparagin wächst der Pilz verhältnismäßig rasch. Nach 14 Tagen sind die unsern Kulturbedingungen entsprechenden Maximalwerte erreicht. Eine Förderung durch Biotin läßt sich nur in jungen Kulturen nachweisen, sie erreicht am 10. und 12. Tage mit 57 bzw. 55% ihre höchsten Werte. Sobald die Wachstumskurve ihre Kulmination erreicht hat, bewirkt das Biotin keine Erhöhung der Myzelgewichte mehr.

Mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle wächst der Pilz bedeutend langsamer. Die Wachstumskurve steigt bis zum 18. oder 19. Tage an.

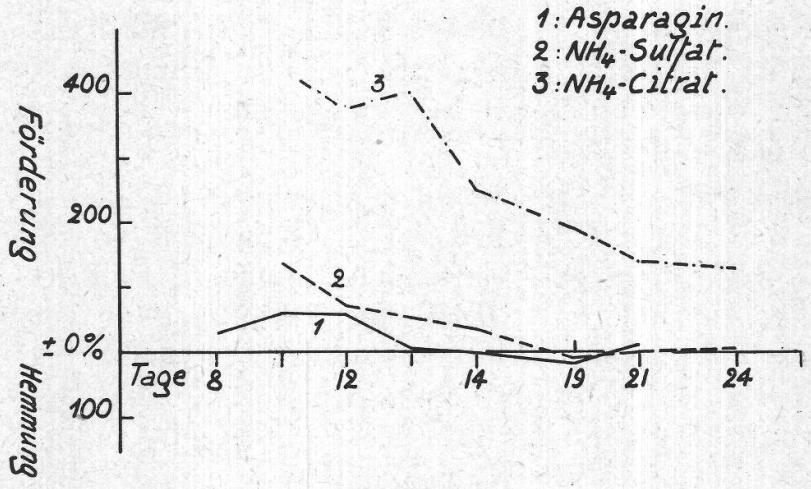

Abbildung 6.

Prozentuale Förderung durch Biotin mit verschiedenen Stickstoffquellen im Zeitversuch (Kontrolle = 0 %).

Auch hier wirkt das Biotin nur in den frühern Entwicklungsstadien, nämlich bis zum 16. Tage fördernd.

Noch langsamer endlich vollzieht sich die Entwicklung mit Ammoniumzitrat. Die Myzelgewichte steigen sehr langsam an, und es erscheint fraglich, ob die Wachstumskurve beim Abschluß des Versuches (nach 24 Tagen) überhaupt ihre Kulmination erreicht hat. Das Biotin wirkt hier während dieser ganzen Periode deutlich fördernd.

Man kann also bei *Trichophyton album* die veränderliche Geschwindigkeit der Entwicklung als eine Funktion der Stickstoffquelle betrachten, sie ist relativ kurz mit Asparagin, länger mit Ammoniumsulfat und Ammoniumzitrat. In gleicher Weise wird auch die Periode der Biotinwirkung durch die Stickstoffquelle bedingt. Diese Tatsache läßt sich mit dem Begriff des physiologischen Alters in Beziehung bringen, indem wir feststellen, daß die Zeit, während der das Biotin wirksam ist, nicht

durch das absolute Alter der Kultur bedingt wird, sondern daß sie eine Funktion des physiologischen Alters ist.

Williams und Mitarb. (16) haben darauf hingewiesen, daß sich bei *Trichophyton interdigitale* die Wirkung gewisser Wachstumsfaktoren, besonders der Pantothensäure, ebenfalls in den frühern Entwicklungsstadien zeigt, während sich später die Unterschiede mehr oder weniger ausgleichen.

Die Tatsache, daß die Biotinwirkung als Funktion der Zeit auftritt, kann auf zwei Arten erklärt werden :

1. Der Pilz verfügt in den ersten Entwicklungsstadien noch nicht über ein ausreichendes Synthesevermögen. Das der Nährlösung beigefügte Biotin kann das Wachstum fördern bis zu dem Zeitpunkt, wo das Synthesevermögen für die weitere Entwicklung ausreicht.
2. Ein ungenügendes Synthesevermögen für Biotin ermöglicht es dem Pilz immerhin, ein gewisses Entwicklungsmaximum zu erreichen, wobei von diesem Stadium an eine weitere Synthese nicht mehr notwendig wäre.

Im ersten Falle hätten wir ein langsames Ansteigen des Synthesevermögens, das sich mit der Zeit verstärkt und ein Maximum erreicht. Im zweiten Falle dagegen könnte man annehmen, daß der Pilz die Tendenz zeigt, zu einer Entwicklung ohne Biotin überzugehen.

Indem wir zu unserm Ausgangspunkt über das Prinzip des Syntheseverlustes zurückkehren, können wir feststellen, daß, theoretisch betrachtet, auf alle Fälle eine teilweise Auxo-Heterotrophie besteht. Für die endgültige Lösung dieser Frage bleibt uns nur die direkte Analyse von Myzelien verschiedenen Alters und von verschiedenen Nährböden übrig. *Ein Vergleich des Biotingehaltes der mit und ohne Zusatz von Biotin gewachsenen Myzelien muß den Grad der Heterotrophie gegenüber dem Vitamin H aufdecken.*

V. Die Biosynthese des Biotins und ihre Bedingungen[1].

Es wurden dieser Arbeit die Richtlinien zugrunde gelegt, die der eine von uns (Schopfer) an einigen Organismen ausgearbeitet hat, die in bezug auf dieses Vitamin autotroph sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden später veröffentlicht werden.

Hier mußte in erster Linie festgestellt werden, ob die mit Zusatz von Biotin gewachsenen Myzelien während der Periode des stärksten Wachstums einen höheren Biotingehalt aufweisen als die langsamer wachsenden Myzelien der Kontrollkulturen. Dieser Nachweis kann nur

[1] Dieser Abschnitt ist ein Teil einer umfangreicheren Arbeit über die Biosynthese des Biotins bei auxo-autotrophen und auxo-heterotrophen Mikroorganismen, die demnächst erscheinen wird.

an einem Organismus erbracht werden, der gegenüber dem Biotin teilweise heterotroph ist, er wäre weder für einen vollständig autotrophen, noch für einen strikte heterotrophen Pilz möglich.

Für Mikroorganismen, die in bezug auf das Biotin *autotroph* sind, wurde nachgewiesen, daß die Biosynthese des Vitamins H während den ersten Entwicklungsstadien, bis zu dem Zeitpunkte, wo die Maximalgewichte erreicht werden, besonders intensiv ist. Analoge Beobachtungen wurden bei Keimpflanzen von *Pisum, Phaseolus* u. a. gemacht. Auch hier ist die Biosynthese des Vitamins H in jungen Organen am stärksten. Ebenso zeigten Versuche mit keimblattlosen Embryonen, daß in den ersten Entwicklungsstadien, in denen eine teilweise Heterotrophie besteht, das Bedürfnis nach Biotin am stärksten in Erscheinung tritt und daß in diesem Zeitpunkt eine Zugabe von Biotin auch am stärksten fördernd wirkt. Es war deshalb zu erwarten, daß sich *Trichophyton album,* den wir nach den vorher mitgeteilten Ergebnissen als teilweise heterotroph gegenüber dem Biotin betrachten müssen, ähnlich verhalten werde.

1. Methode.

a) *Herstellung der Extrakte:* Die geernteten Myzelien werden gewaschen, bei 100° getrocknet und pulverisiert. Eine bestimmte Menge des Pulvers wird mit destilliertem Wasser versetzt und während 15 Minuten im Autoklav bei 110—115° gehalten. Das freie Biotin ist nun in der Flüssigkeit, die zur Analyse gelangt, gelöst. Wir konnten uns überzeugen, daß dieser erste Extrakt den größten Teil des im Thallus vorhandenen Biotins enthält.

b) *Ermittlung des Biotingehaltes:* Wir bedienten uns hier der Methode von Snell, Eakin und R. J. Williams (33), die von den durch Kögl, Nielsen, Dagys und andern Forschern vorgeschlagenen Verfahren abweicht.

Ein Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* wird drei Tage auf einem natürlichen Nährboden gezüchtet, zentrifugiert, mehrmals gewaschen und in destilliertem Wasser suspendiert. Diese Suspension dient als Impflösung.

Die Kulturlösung hat folgende Zusammensetzung:

$(NH_4)_2SO_4$	3 g	$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0,1 mg
KH_2PO_4	2 g	KJ	0,1 mg
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,25 g	Saccharose puriss.[1]	20 g
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	0,25 g	l-Asparaginsäure	0,1 g
H_3BO_3	1 mg	Inositol	5 mg
$ZnSO_4$	1 mg	β-Alanin	0,5 mg
$MnCl_2$	1 mg	Aneurin	20 γ
$TlCl_3$	1 mg	Vitamin B_6	20 γ
$FeCl_3$	0,5 mg	dest. Wasser	1 Liter

[1] Es darf nur reinste Saccharose verwendet werden, die durch mehrmaliges Umkristallisieren in Alkohol gewonnen wurde. Die Saccharose des Handes ent-

Diese Grundlösung wurde entweder unverändert oder mit gewissen Modifikationen angewendet[2]. Es wurden ferner regelmäßige Kontrollserien mit Zusatz des reinen Vitamins H durchgeführt. Der Test ermöglicht den Nachweis des Biotins bis zu einer Verdünnung von $1:5\cdot10^{11}$. Die Erlenmeyerkolben enthielten 25 ccm der Grundlösung mit steigenden Mengen der auf Biotin zu prüfenden Extrakte. Diese wurden entweder mit der Grundlösung zusammen oder getrennt sterilisiert. Eine Kontrollserie wurde mit steigenden Mengen von reinem Biotin oder mit Extrakten von bekanntem Biotingehalt angesetzt. Die Kontrollen und die Kolben mit den zu prüfenden Substanzen wurden gleichzeitig angesetzt und beimpft. Nach einem Aufenthalt von zwei Tagen bei 29° wurde die durch die Entwicklung der Hefe verursachte Trübung mit dem lichtelektrischen Kolorimeter von Lange nephelometrisch bestimmt. Nun wurden die Entwicklungskurven als Funktion des beigefügten Biotins, bzw. der Menge des beigefügten Extrakts aufgestellt. Wählt man im aufsteigenden Teil der Kurve, also bei einer suboptimalen Biotindosis, drei Punkte aus, so ergibt sich die Möglichkeit, den Biotingehalt einer gegebenen Suspension, deren Gehalt an Pilzsubstanz bekannt ist, mit genügender Genauigkeit zu bestimmen. Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde durch zahlreiche Kontrollversuche sichergestellt.

Das Prinzip dieser Methode läßt sich folgendermaßen umschreiben :

Die Grundlösung enthält alle für die Entwicklung der Hefe heute bekannten notwendigen Nährstoffe und Spurenelemente sowie auch die für *Saccharomyces cerevisiae* notwendige Vitaminkombination, mit Ausnahme des Biotins. Die Entwicklung der Hefe wird also durch den Biotingehalt des beigefügten Myzelpulvers bedingt.

Natürlich sind die Resultate nur unter der Voraussetzung gültig, daß in den Pilzextrakten keine andern Vitamine vorkommen, die für die Hefe als bis jetzt noch unbekannte Wachstumsfaktoren in Betracht kommen könnten. Die erhaltenen Werte für das Biotin sind verhältnismäßig hoch. Es ist deshalb wohl anzunehmen, daß neben dem Biotin noch andere, unbekannte Substanzen wirksam sind, die wie Biotin wirken oder die Biotinwirkung erhöhen.

Wir haben übrigens festgestellt, daß die biotinhaltigen Extrakte durch Tierkohlebehandlung vollständig inaktiviert werden, während eine Autoklavierung in alkalischer Lösung (NaOH) ihre Aktivität nicht beeinflußt. Anderseits aber konnten wir beobachten, daß die Wirkung einer bestimmten Biotindosis, der noch ein Myzelextrakt mit einem

---

hält, auch wenn sie als « reinst » bezeichnet wird, immer noch beträchtliche Mengen von Bios-Substanzen.

[2] Es wurde ihr namentlich noch Pantothensäure und Adermin (Vitamin B_6) beigefügt. In einigen Versuchen wurden auch Nikotinsäure und p-Aminobenzoesäure zugesetzt.

vorher bestimmten Biotingehalt beigefügt wurde, höher ist, als man nach einfacher Addition der Wirkung beider Komponenten erwarten dürfte. Dies legt die Annahme nahe, daß hier noch gewisse störende und fördernde Faktoren in Betracht gezogen werden müssen.

2. Biotingehalt von Thalli auf verschiedenen natürlichen Nährlösungen.

In Tabelle 16 ist der Biotingehalt einiger Myzelien von *Trichophyton album* zusammengestellt.

Tabelle 16.

Biotingehalt des Myzels (vgl. Versuche S. 430, Tab. 15).

Myzelien, gewachsen in	Gehalt an Biotin γ/g Trockengewicht des Myzels
Synthetische Nährlösung (Kontrolle)	0,332
Synthetische Nährlösung + Leberextrakt HLR 3431/264 .	0,335
Synthetische Nährlösung + Leberextrakt + Vitaminkombination[1]	0,482
Synthetische Nährlösung + Vitaminkombination	0,405
Synthetische Nährlösung + Peptone granulée	0,626
Synthetische Nährlösung + Peptone granulée + Vitaminkombination	1,223

[1] Biotin, Pantothensäure, Lactoflavin, Adermin, β-Alanin, Aneurin, Inositol und Pimelinsäure.

Dieser erste Versuch zeigt schon, daß der Biotingehalt des Myzels von *Trichophyton album* je nach der Zusammensetzung der Nährlösung beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist. Zugabe von Leberextrakt zu einer synthetischen Nährlösung bedingt einen niedrigen Biotingehalt, Peptone granulée dagegen einen hohen. In beiden Fällen bewirkt die Zugabe einer Vitaminkombination eine Erhöhung des Biotingehaltes, wobei die höchsten Werte mit Pepton granulée + Vitamine erreicht werden.

Diese Erhöhung des Biotingehaltes könnte zunächst auf eine Absorption des beigefügten Biotins zurückgeführt werden. Es wäre aber ebensogut denkbar, daß in einer zusagenden Nährlösung die Biosynthese des Biotins begünstigt würde. Die Frage kann nach diesem Versuch noch nicht entschieden werden.

3. Biotingehalt der gebrauchten Nährlösungen.

Das Biotin kann nicht nur in den Myzelien, sondern auch in beträchtlichen Mengen in den gebrauchten Kulturlösungen nachgewiesen werden. Tabelle 17 zeigt den Biotingehalt verschiedener gebrauchter Nährlösungen.

Tabelle 17.
Biotingehalt der gebrauchten Nährlösung.

N-Quelle	Alter der Kultur Tage	Biotingehalt pro 25 ccm Nährlösung γ
Ammoniumsulfat, Kontrolle .	24	0,041125
Ammoniumsulfat + Biotin (0,1 γ)	21	0,06425
Ammoniumzitrat, Kontrolle .	24	0,0208
Ammoniumzitrat + Biotin (0,1 γ)	21	0,027
Glykokoll, Kontrolle	24	0,114
Glykokoll, Kontrolle	26	0,018
Glykokoll + Biotin (0,1 γ) . .	26	0,031

Die Tabelle zeigt, daß überall da, wo Biotin beigefügt worden war, auch ein deutlich höherer Biotingehalt nachzuweisen war. Die Kontrollen und die mit Zugabe von Biotin gewachsenen Myzelien sind ungefähr gleich alt. Mit Ammoniumsulfat haben die Kontrollen nach 21—24 Tagen die Kulturen mit Biotinzugabe im Wachstum eingeholt. Es handelt sich also hier um Myzelien von gleichem physiologischem Alter. Bei den Kulturen mit Ammoniumzitrat dagegen ist dies noch nicht der Fall, nach drei Wochen Kulturdauer sind die mit Zugabe von Biotin gewachsenen Myzelien noch bedeutend besser entwickelt als die Kontrollen (vgl. S. 435). Die Kontrollen sind also physiologisch jünger als die Kulturen mit Biotin. Mit Glykokoll als N-Quelle erscheinen die Verhältnisse vorläufig weniger abgeklärt.

4. Biotingehalt von Myzelien, die mit Asparagin oder Asparaginhydrochlorid gewachsen sind.

Der Biotingehalt von Myzelien, die mit Asparagin als N-Quelle, mit oder ohne Biotin gewachsen sind, ergab die in Tabelle 18 zusammengestellten Werte.

Hierzu ist zu bemerken, daß die Kontrollen nach 14—16 Tagen die Kulturen mit Biotinzusatz im Wachstum eingeholt haben. Von diesem Zeitpunkt an haben wir es also mit physiologisch gleichaltrigen Myzelien zu tun. Im übrigen erscheinen hier die Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Kulturen mit Biotinzugabe wenig konstant. Sicher ist lediglich eine Zunahme des relativen Biotingehaltes, die der letzten Phase in der Entwicklung des Pilzes entspricht. Abbildung 5 zeigt merkwürdigerweise eine Abnahme der Myzelgewichte, was für das Eintreten einer Autolyse spricht.

Mit Asparaginhydrochlorid ist der Biotingehalt etwas geringer als mit Asparagin. Es wäre möglich, daß die im Asparagin enthaltenen Ver-

unreinigungen (Spurenelemente, vgl. S. 422) günstig auf die Biosynthese einwirken könnten.

Tabelle 18.

Relativer Biotingehalt von Myzelien, die mit Asparagin oder Asparaginhydrochlorid gewachsen sind.

N-Quelle	Alter der Kulturen Tage	Biotingehalt γ/g trocken	
		Kontrollen	+ Biotin
Asparagin	16	0,510	0,4674
»	19	0,5574	0,708
»	21	0,7166	0,698
Asparaginhydrochlorid .	10	0,444	0,393
» .	12	0,395	0,269
» .	14	0,295	0,226
» .	16	0,272	0,216
» .	19	0,534	0,345
» .	21	0,553	0,545

Es zeigt sich mit Asparaginhydrochlorid in den Kontrollen wie auch in den Kulturen mit Biotin nach dem 10. Tage eine Abnahme des relativen Biotingehaltes, während später, vom 19. Tage an, eine noch deutlichere Zunahme eintritt. Auffällig ist auch, daß die Myzelien mit Biotinzusatz bis zum 19. Tage einen deutlich geringeren relativen Biotingehalt aufweisen.

5. Biotingehalt von Myzelien, die mit Asparagin von verschiedener Reinheit sowie mit Glutaminsäure gewachsen sind.

Utiger (36) hat nachgewiesen, daß der Grad der Reinheit des Asparagins für seine Wirkung auf die künstliche Symbiose *Mucor Ramannianus-Rhodotorula rubra* ausschlaggebend ist. Über analoge Beobachtungen an *Trichophyton album* verweisen wir auf S. 422. Ein mehrfach umkristallisiertes Asparagin fördert den Pilz bedeutend weniger stark als die als rein bezeichneten Handelspräparate. Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Wirkung von Spurenelementen im natürlichen Asparagin. Es erschien uns nun aber wichtig, die verschiedenen Asparaginsorten sowie die sehr wirksame Glutaminsäure auch auf ihren Biotingehalt zu untersuchen.

Mit 13tägigen Kulturen erhielten wir folgende Ergebnisse:

	Kontrollen	Mit Biotin
Asparagin, Hoffmann-La Roche, normal	0,8366 γ/g	1,054 γ/g
Dasselbe, dreimal umkristallisiert	0,575 γ/g	0,508 γ/g
Glutaminsäure	0,154 γ/g	0,231 γ/g

Unbehandeltes Asparagin wirkt auf den Pilz deutlich stärker fördernd als das umkristallisierte, es bedingt also auch einen höheren Biotingehalt des Myzels. Auffällig erscheint hier, daß sich das beigefügte Biotin nur bei Verwendung des unbehandelten Asparagins im Biotingehalt der Myzelien auswirkt. Verwenden wir das dreimal umkristallisierte Asparagin, so bewirkt auch ein Zusatz von Biotin keinen höheren Biotingehalt im Thallus.

Die Ausschaltung der Begleitsubstanzen des Asparagins bewirkt also für Kulturen von 13 Tagen eine Herabsetzung des Myzelgewichtes (vgl. S. 423), eine Verminderung des relativen Biotingehaltes im Myzel sowie ein Verschwinden der Wirkung des beigefügten Biotins auf den relativen Biotingehalt des Thallus.

Es muß allerdings erwähnt werden, daß diese Kulturen physiologisch nicht vergleichbar sind. In der Versuchsreihe mit unbehandeltem Asparagin wurde ein Trockengewicht von 67,6 mg für die Kontrollen und von 63,9 mg für die Kulturen mit Zusatz von Biotin erreicht. Die beiden Reihen dürfen also als physiologisch gleich alt bezeichnet werden. Dieses Stadium wurde in den meisten Fällen nach 14 Tagen erreicht. In der Versuchsreihe mit umkristallisiertem Asparagin dagegen betrug das Trockengewicht der Kontrollen ebenfalls nach 13 Tagen 29 mg, gegenüber 47,4 mg mit Zusatz von Biotin. Obschon diese Kulturen gleich alt sind wie die mit unbehandeltem Asparagin, bewirkt bei ihnen ein Zusatz von Biotin eine Erhöhung des Trockengewichtes um ca. 63 %. Die bedeutend langsamere Entwicklung in den Kontrollen mit gereinigtem Asparagin dürfte also hier wohl auf den Wegfall der Begleitsubstanzen zurückzuführen sein. Eine ähnliche Herabsetzung des Biotingehaltes im Thallus tritt auch auf, wenn anstatt Asparagin Asparaginhydrochlorid als Stickstoffquelle verwendet wird (Tabelle 18). Allerdings wurden mit Asparaginhydrochlorid relativ hohe Myzelgewichte erreicht.

Die eigentümliche Tatsache, daß sich bei Verwendung von umkristallisiertem Asparagin ein Zusatz von Biotin nicht im relativen Biotingehalt des Myzels auswirkt, bleibt vorläufig unerklärlich.

6. Der Biotingehalt des Myzels als Funktion verschiedener Nährlösungen und des Alters der Kultur.

Für den Nachweis des Biotins wurden zwei Versuchsreihen benützt, die eine mit Ammoniumzitrat, die andere mit Glykokoll als N-Quelle.

Ammoniumzitrat: Der Pilz wurde nach einer Kulturdauer von 12, 14, 16, 19, 21, 24 und 26 Tagen geerntet (vgl. S. 434, Abb. 5). Für die Analyse konnten die Myzelien des 12. Tages (Kontrollen) nicht verwendet werden, weil sie zu klein waren. Die Kulturen mit Ammoniumzitrat erschienen zur Untersuchung besonders geeignet, weil das Myzel-

gewicht der Kontrollen bis zum 26. Tage immer geringer ist als das der Biotinkulturen; dieser Unterschied ist überall sehr ausgeprägt.

Wie aus Abbildung 7 klar hervorgeht, ist der Biotingehalt der Myzelien, die mit Zugabe von Vitamin H gewachsen sind, schon vom 12. Tage an bedeutend höher als bei den Kontrollen. Vom 16. Tage an verwischt sich der Unterschied nach und nach, und am 24. Tage ist der Gehalt bei den Kontrollen gleich hoch wie in den Vitaminkulturen.

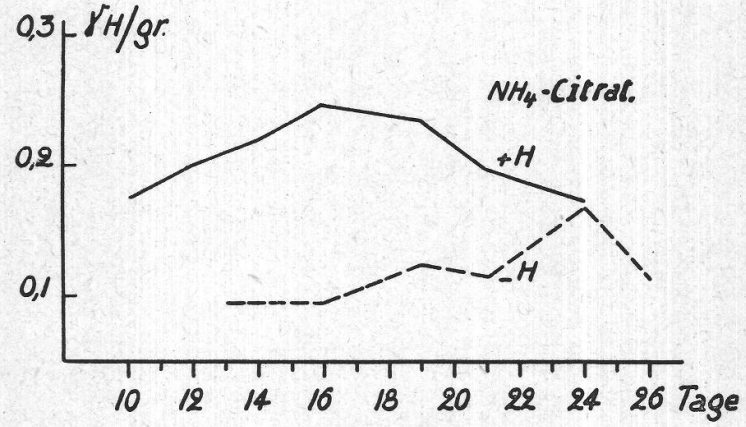

Abbildung 7.

Relativer Biotingehalt der Myzelien auf Ammoniumzitrat mit oder ohne Zusatz von Biotin, als Funktion der Zeit.

Man kommt in diesem Falle ohne weiteres zum Eindruck einer Parallelität von Myzelgewicht und relativem Biotingehalt. Es scheint naheliegend, daß die anfängliche schwache Entwicklung der Kontrollen auf eine teilweise Heterotrophie, d. h. auf ein Unvermögen des Pilzes, das Biotin in genügender Menge synthetisieren zu können, hinweist. Man wäre deshalb leicht geneigt, eine kausale Beziehung zwischen den beiden Erscheinungen anzunehmen. Dafür besteht aber trotz diesen interessanten und scheinbar überzeugenden Ergebnissen noch keine Sicherheit, solange wir nicht auch die Menge des in die Nährlösung hinaus diffundierten Biotins kennen.

Glykokoll : Die Analysen der mit Glykokoll gewachsenen Myzelien gaben weniger befriedigende Ergebnisse. Die Kontrollen sind hier sehr hoch, und in den Trockengewichten zeigt sich kaum ein Unterschied zwischen den Kontrollen und den mit Zugabe von Biotin gewachsenen Myzelien.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten wir feststellen, daß die Kontrollen von Anfang an einen ebenso hohen Biotingehalt aufweisen wie die Vitaminkulturen (Abbildung 8). Später zeigt sich bei den Kontrollen eine schnellere Abnahme des Biotingehaltes, was vermutlich auf eine Diffusion in die Nährlösung zurückgeführt werden muß.

So unbefriedigend die Ergebnisse der Versuche mit Glykokoll auf den ersten Blick auch scheinen und so widersprechend sie gegenüber den Versuchen mit Ammoniumzitrat auch anmuten mögen, so ergänzen sich die Ergebnisse der beiden Reihen doch in gewissem Sinne. Die Kulturen mit Ammoniumzitrat, die in bezug auf das Trockengewicht die erwarteten Ergebnisse zeitigten, lieferten auch befriedigende und eindeutige Resultate in bezug auf den Biotingehalt. Die Myzelien der

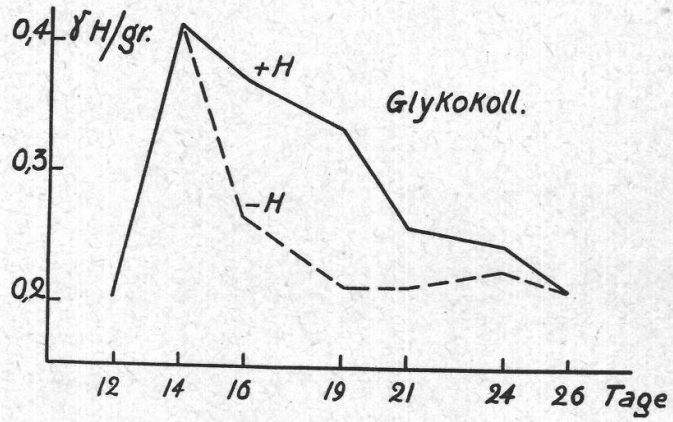

Abbildung 8.

Relativer Biotingehalt der Myzelien auf Glykokoll mit oder ohne Zusatz von Biotin als Funktion der Zeit.

Glykokollreihe dagegen entwickelten sich so stark von der Norm abweichend, daß aus diesen Versuchen keine eindeutigen Beziehungen zum Vitamin H als Wachstumsfaktor ermittelt werden könnten, und entsprechend unklar sind auch die Ergebnisse der Biotinbestimmungen im Thallus.

Immerhin zeigt sich in beiden Versuchsserien *eine* Erscheinung, die bei Organismen, die gegenüber dem Biotin auxo-autotroph sind, überaus klar zutage trat : *Das Vitamin H ist im Zeitpunkt der stärksten relativen Produktion lebender Substanz am notwendigsten.*

7. Biotingehalt der mit Ammoniumzitrat und steigenden Mengen von Biotin entstandenen Myzelien.

Durch diese Versuche sollte ermittelt werden, ob der Biotingehalt der Myzelien durch Zugaben von steigenden Mengen Biotin proportional erhöht wird. Durch das Ammoniumzitrat als N-Quelle kann erreicht werden, daß sich die Vitaminkulturen während des ganzen Versuches von den Kontrollen durch höhere Myzelgewichte unterscheiden (vgl. S. 434), was für diese Versuche besonders günstig ist.

Wir benützten hier die Myzelien einer Serie, die eine Beziehung zwischen dem beigefügten Biotin und den erhaltenen Myzelgewichten erbrachte, doch muß hier erwähnt werden, daß diese Voraussetzung

nicht in allen Versuchen dieser Art erfüllt wurde. Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, nimmt hier das Myzelgewicht bis zu einer Dosis von 0,04 mγ ziemlich regelmäßig zu, während bei höheren Biotinkonzentrationen wieder eine Abnahme eintritt.

Tabelle 19.

Biotingehalt im Thallus bei steigender Vitaminkonzentration.

Nr.	Beigefügtes Biotin mγ	Myzelgewicht mg	Relativer Biotingehalt γ/g Trockengewicht	Absoluter Biotingehalt pro Thallus mγ	Biotinüberschuß gegenüber Kontrolle[1] mγ
1	4,0	10,7	0,174	1,8618	1,6594
2	0,4	10,6	0,158	1,6748	1,4724
3	0,04	16,3	0,119	1,9397	1,7373
4	0,004	13,0	0,085	1,1050	0,9026
5	0,0004	8,4	0,097	0,8148	0,6124
6	0,000 04	8,2	0,070	0,5740	0,3716
7	0,000 004	7,4	0,105	0,7770	0,5746
8	Kontrolle	2,2	0,092	0,2024	—

[1] Diese Werte wurden durch Subtraktion des Gehaltes der Kontrolle (0,2024 mγ) von den entsprechenden Werten für den absoluten Biotingehalt errechnet.

Aus dieser Tabelle geht als wichtigste Tatsache hervor, daß der relative Biotingehalt eine Funktion des Entwicklungsstadiums ist. Den höchsten Biotingehalt finden wir bei Myzelien, die das Maximum ihres Wachstums erreicht haben (soweit dies unter den gegebenen Kulturbedingungen möglich ist). Ein physiologisch junger Thallus, der auch in einem jugendlichen Stadium verharrt, weil die beigefügte Menge von Biotin ungenügend ist, weist auch einen dauernd niedrigen Biotingehalt auf.

Diese Tatsache wurde vom einen der Verfasser (S c h o p f e r , 25) schon 1934/35 an einem Organismus beobachtet, der gegenüber dem Biotin auxo-autotroph ist. Es handelte sich damals um die von *Phycomyces blakesleeanus* bei optimaler und suboptimaler Aneurinkonzentration synthetisierten Bios-Substanzen. Myzelien, deren Entwicklung durch eine ungenügende Aneurindosis blockiert worden war, haben einen geringern, auf Saccharomyces cerevisiae wirksamen Biosgehalt als Myzelien, die sich bei einem optimalen Aneuringehalt entwickelt hatten.

Diese Variation im relativen Biotingehalt kann auf verschiedene Weise erklärt werden: Man kann annehmen, daß in jugendlichen Stadien, bei physiologisch jungen Myzelien, eine sehr intensive Synthese lebender Materie vor sich geht, die verhältnismäßig größer ist als die Biotinsynthese. Die Folge wäre ohne weiteres, daß der relative Biotin-

gehalt klein wird. Anderseits wird in gut entwickelten, physiologisch alten Myzelien die Biosynthese, die zur Bildung lebender Materie führt, verlangsamt, während die Biotinsynthese (in vollem Umfange) erhalten bleibt. Dies hätte einen höhern relativen Gehalt an Vitamin H zur Folge. Man könnte sich die Variationen im Biotingehalt des Myzels auch erklären, indem man sie direkt auf eine Veränderung des Synthesevermögens für das Vitamin H zurückführt, ohne daß diese mit andern synthetischen Prozessen in Beziehung zu stehen braucht.

Welche dieser Erklärungen wir hier nun beiziehen, das sichtbare Ergebnis ist dasselbe : *Verhältnismäßig geringer Biotingehalt bei physiologisch jungen Myzelien.* Diese Feststellung wurde von uns in Bestätigung der Ergebnisse von 1934 (Schopfer, 24, 25) an einigen Organismen gemacht, die in bezug auf das Biotin auxo-autotroph sind, und es ist nun interessant, daß sie auch bei einem, gegenüber dem Vitamin H teilweise auxo-heterotrophen Pilz, wie *Trichophyton album*, ihre Bestätigung finden.

Die in Tabelle 20 zusammengestellten Werte können auch in einem andern Zusammenhang betrachtet werden. Wir haben als Variable :

1. Die der Nährlösung beigefügte Biotindosis,
2. die entsprechenden Myzelgewichte,
3. der relative Biotingehalt dieser Myzelien und
4. der absolute Biotingehalt des Myzels.

1 und 2 sind durch den Versuch gegeben, 3 ist eine physiologisch unbestreitbare Tatsache, und 4 wird berechnet aus 2 und 3.

Wir können nun versuchen, die durch den Pilz wirklich gebildete Menge von Biotin zu berechnen, indem wir den Biotingehalt der Kontrolle und die Menge des beigefügten Biotins vom absoluten Gehalt (4) subtrahieren. Diese Differenz, die positiv sein muß, entspricht der Menge von Biotin, die vom Pilz unter dem Einfluß einer bestimmten Dosis von beigefügtem Biotin synthetisiert worden ist.

Tabelle 20.

Der Biotingehalt von Trichophyton unter dem Einfluß verschiedener Biotin-Konzentrationen.

	1[1]	2	3	4	5	6	7
a) . . .	1,8618	1,6748	1,9397	1,1050	0,8148	0,5740	0,7770
b) . . .	0,2024	0,2024	0,2024	0,2024	0,2024	0,2024	0,2024
c) diff. .	1,6594	1,4724	1,7373	0,9026	0,6124	0,3716	0,5746
d) . . .	4,0000	0,4000	0,0400	0,0040	0,0004	0,00004	0,000004
e) diff. .		1,0724	1,6973	0,8986	0,6120	0,37156	0,574596

[1] Entspricht der Numerierung in Tabelle 19.

Es bedeuten hier :

a) Absoluter Gesamtgehalt an Biotin eines Thallus (vgl. Tabelle 19).

b) Biotingehalt der Kontrolle. Dieser Wert enthält die mit dem Impfmaterial in die Kultur gebrachte Biotinmenge, die sicher sehr gering ist + die Biotinmenge, die vom Pilz synthetisiert werden kann, wenn der Nährlösung kein Biotin beigefügt wird.

c) Differenz von *a* und *b*.

d) Der Nährlösung beigefügtes Biotin (vgl. Tabelle 19).

e) Synthetisiertes Biotin, d. h. Menge des Biotins, die vom Pilz bei einer bestimmten Dosis von beigefügtem Biotin synthetisiert wird.

Die Werte von 1 sind nicht verwertbar, weil hier der Biotingehalt des Thallus geringer ist als die beigefügte Biotinmenge.

Bei 2, 3 und 4 haben die Quantitäten des beigefügten Biotins für die Differenz noch eine gewisse Bedeutung, während sie für 5, 6 und 7 zu gering sind, um die durch die Analyse erhaltenen Werte zu modifizieren.

Wir sehen also, daß von 2—7 der Biotingehalt des Myzels höher ist als die Menge des beigefügten Biotins. Besonders auffällig ist dies für 5—7.

Dieses Ergebnis spricht auf den ersten Blick für die Annahme, daß das beigefügte Biotin nicht quantitativ wirkt, wie dies schon von andern Autoren vermutet wurde. Man müßte also eine katalytische Wirkung annehmen, bei der schon eine sehr geringe Menge ausreichen würde, um eine genügende Biosynthese auszulösen.

Gegen diese Auffassung spricht aber die Tatsache, daß wir bis zu einer Biotindosis von 0,04 mγ doch ein deutliches Ansteigen der Myzelgewichte beobachten können (Tabelle 19), was ohne weiteres auf eine quantitative Wirkung des Biotins hinweist. Bedenken wir ferner, daß die Annahme einer quantitativen Wirkung auf direkt beobachteten Werten beruht, während als Indizien für eine katalytische Wirkung nur berechnete Werte dienen können, so muß man vorläufig wohl an einer quantitativen Wirkung des Biotins festhalten, auch wenn diese nicht so augenfällig ist wie bei andern vitaminischen Wachstumsfaktoren.

Man muß sich aber doch fragen, worauf dieser Widerspruch zurückgeführt werden muß. Wir sehen dafür vorläufig nur eine mögliche Erklärung : Es wäre denkbar, daß die Analysenwerte, von denen wir bis jetzt annahmen, daß sie nur den Biotingehalt anzeigen, einen Komplex von Faktoren darstellen, die für die Hefe wirksam sind. In diesem Komplex könnten weitere, vorläufig unbekannte Wachstumsfaktoren vorhanden sein, die neben dem Biotin im Thallus vorhanden sind und mit diesem zusammenwirken. Es müßte dann angenommen werden, daß die Biosynthese dieses Faktorenkomplexes von der Dosis des beigefügten Biotins abhängig wäre. Damit könnten auch die relativ hohen « Biotinwerte », die *Trichophyton album* verglichen mit andern Organismen liefert, erklärt werden.

Ferner haben wir festgestellt, daß unter unsern Versuchsbedingungen und nach einer bestimmten Versuchszeit die Nährlösung mindestens ebensoviel, wenn nicht mehr Biotin enthält als das Myzel. Dieser Anteil wurde für unsere Berechnungen nicht berücksichtigt, weil man wohl voraussetzen darf, daß vor allem das im Myzel fixierte und extrahierbare Biotin als physiologisch wichtig betrachtet werden muß. Wir wissen also nicht, in welcher Weise unsere Ergebnisse modifiziert worden wären, wenn der *Biotingehalt der Kulturlösung* ebenfalls berücksichtigt worden wäre. Wollte man einen ökologischen Koeffizienten für das Biotin berechnen, so müßten ohne Zweifel beide Komponenten in Rechnung gezogen werden. Übrigens wiederholen wir hier, daß mit dem verwendeten Test sehr wahrscheinlich nicht nur das Biotin, sondern Biotin + Faktoren X, nämlich die Gesamtheit des unter den Bedingungen des Testes auf Saccharomyces cerevisiae wirkenden Faktorenkomplexes erfaßt wird. Wenn wir den Biotingehalt der Nährlösungen berücksichtigen, so wird die unter *e)* angegebene Menge des synthetisierten Biotins noch erhöht, was unsere Schlußfolgerungen weiter bestätigt. Dies gilt wohl auch für den « Biotin »-Gehalt der Kulturlösungen.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß bei einigen Mikroorganismen ein noch nicht näher definierter Wachstumsfaktor der « Bios »-gruppe postuliert werden muß (S c h o p f e r , 28).

8. Allgemeine Betrachtungen.

Aus allen diesen Versuchen kann mit Sicherheit der Schluß gezogen werden, daß die Wirkung des Biotins, als Funktion der Zeit betrachtet, je nach der Zusammensetzung der Nährlösung variiert. *Damit kommen wir zum Prinzip der Relativität der Wirkstoffwirkung.*

Nehmen wir als Ausgangspunkt das Prinzip des Syntheseverlustes, so erscheint es sehr wahrscheinlich, daß das teilweise Bedürfnis an Wachstumsfaktoren die Folge eines teilweisen Syntheseverlustes dieser Substanzen darstellt (partielle Heterotrophie). Unsere Versuche können allerdings nicht den strikten Beweis für die Gültigkeit dieser Erklärung erbringen. Immerhin liefern sie interessante Beiträge, die für die von uns vorgeschlagene Erklärung sprechen.

Wir gehen von der allgemein angenommenen Tatsache aus, daß ein vitaminischer Wachstumsfaktor dann auf einen Organismus wirkt, wenn dieser nicht imstande ist, das Vitamin zu synthetisieren. Ist dagegen das Synthesevermögen vorhanden, so müßte das beigefügte Vitamin ohne Wirkung sein. Diese letztere Tatsache ist allerdings nicht absolut sicher, obschon sie allgemein angenommen wird. Es gibt Fälle, die zeigen, daß die Zugabe eines bestimmten Vitamins zur Nährlösung eine Erhöhung des Trockengewichtes bedingen kann, auch wenn der Organismus scheinbar über ein genügendes Synthesevermögen für dieses Vitamin verfügt.

Wir können jedoch diese neuern Erkenntnisse in unserer Besprechung noch nicht berücksichtigen.

Wir kommen nun zurück auf die S. 436 gestellte Frage :

1. Der Pilz verfügt nur über ein ungenügendes Synthesevermögen. Das der Nährlösung beigefügte Biotin fördert die Entwicklung bis zu dem Zeitpunkte, wo die Biosynthese für eine normale Entwicklung ausreicht.
2. Ein ungenügendes Synthesevermögen für Biotin ermöglicht eine gewisse Entwicklung bis zum Zeitpunkte, wo der Organismus ohne dieses Vitamin auskommt.

Die hier gefundenen Tatsachen sprechen eher für die zweite Möglichkeit. Wir sahen, daß das Biotin während der Periode des starken Wachstums nötig ist, daß es während dieser Periode wirkt, und daß der Biotingehalt nicht mehr merklich ansteigt, wenn einmal die maximale Entwicklung des Pilzes erreicht ist. Dies führt uns zur Annahme, daß das Biotin von diesem Zeitpunkt an nicht mehr notwendig ist. Wir nehmen also an, daß ein gewisses, aber ungenügendes Synthesevermögen für Biotin vorhanden ist. Dieses genügt, damit der Pilz mehr oder weniger schnell (je nach der Beschaffenheit der Nährlösung) in ein Stadium gelangt, in dem er ohne Biotin auskommt. Zugabe von Biotin in die Nährlösung bewirkt, daß dieses Entwicklungsstadium schneller erreicht wird.

Wir geben gerne zu, daß die Richtigkeit dieser Anschauung an einem Objekt erprobt werden sollte, das leichter zu kultivieren und in seinen Reaktionen konstanter ist, als dies für *Trichophyton album* der Fall ist. Es wäre interessant, die Versuche mit einem geeigneten Organismus wieder aufzunehmen.

VI. Das Wuchsstoffbedürfnis von Trichophyton album in Beziehung zum Prinzip der abgestuften Heterotrophie.

Der etappenweise Verlust des Synthesevermögens wurde für das Aneurin mit Sicherheit nachgewiesen. Wir finden hier die Synthese des Pyrimidins, verbunden mit einem Bedürfnis nach Thiazol bei *Mucor Ramannianus,* und umgekehrt Synthese des Thiazols und Bedürfnis nach Pyrimidin bei *Rhodotorula rubra.* Kultiviert man die beiden Pilze in künstlicher Symbiose zusammen, so erfolgt die Entwicklung ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren (Müller, 17).

Für dieselben Substanzen, Pyrimidin und Thiazol, konnten wir zeigen, daß die Fähigkeit, aus diesen beiden Komponenten das Aneurinmolekül zu synthetisieren, mehr oder weniger stark ausgeprägt sein kann. So wirkt für *Parasitella simplex* das Pyrimidin allein als Wachstumsfaktor, aber das vollständige Aneurinmolekül wirkt (in einer bestimmten Nährlösung) stärker als Pyrimidin. Wir haben diese Tatsache

mit der Annahme erklärt, daß das Synthesevermögen für Thiazol, das vom beigefügten Pyrimidin vollständig unabhängig ist, nur in ungenügendem Maße vorhanden sein kann. Dieses *in ungenügender Menge synthetisierte* Thiazol begrenzt die Wirkung des im Überschuß beigefügten Pyrimidins. (Man könnte hier allerdings auch eine andere Erklärung herbeiziehen und annehmen, daß in diesem Pilz die Verbindung der beiden Komponenten zum Aneurinmolekül irgendwie gehemmt ist. Fügt man der Nährlösung Aneurin bei, so wird damit dem Organismus eine Synthese erspart. Es gibt jedoch keinen Grund, anzunehmen, daß dieser Pilz, sofern man ihm genügend Pyrimidin zugibt und die Thiazolsynthese in ausreichendem Maße erfolgt, *mit der Zeit* nicht eine ebenso gute Entwicklung aufweisen sollte, wie wenn man das ganze Aneurinmolekül beifügt.) Es zeigt sich heute immer mehr, daß diese Versuche als Funktion der Zeit wieder aufgenommen werden müssen.

Die Einwendungen, die man gegenüber diesen Versuchen gelten machen kann, weisen deutlich in die Richtung unserer letzten Untersuchungen. Die ursprünglich aufgestellten Typen der abgestuften Heterotrophie basieren auf einer statischen Auffassung dieser Erscheinungen. Die Versuche wurden mit einer einzigen Nährlösung ausgeführt, die sich als besonders geeignet erwiesen hatte, und sie beziehen sich ferner nur auf eine bestimmte Zeit. Heute wissen wir, daß sich hier eine dynamische Interpretation als fruchtbarer erweisen wird; ein bestimmtes Entwicklungsstadium muß als Funktion des Milieus und der Zeit aufgefaßt werden. Diese Entwicklung der Forschung ist übrigens durchaus normal, denn man kann die Dynamik einer Erscheinung nicht erfassen, bevor man die Grundtatsachen in irgendeiner Phase der Entwicklung festgestellt hat.

Wir weisen ferner darauf hin, daß es sich bei *Trichophyton album* nur um Variationen handelt, die sich in einem geringen Bereich des Synthesevermögens abspielen. Wir haben es hier nicht mit einem «Alles- oder Nichts-Phänomen», mit der Umwandlung eines autotrophen in einen heterotrophen Organismus zu tun, sondern mit geringen Schwankungen eines partiellen Synthesevermögens.

Die für das Aneurin aufgestellten Grundtypen P, T, PT und B_1 behalten selbstverständlich ihren Wert und bleiben bestehen. Sie wurden übrigens auch bei den verschiedenen Organismen seither wieder aufgefunden und werden immer den Ausgangspunkt jeder Forschung auf diesem Gebiete darstellen, auch wenn es sich zeigen sollte, daß auch sie von der Beschaffenheit der Nährlösung abhängig sind. Ob auch diese Grundtypen als Funktion der Zeit aufgefaßt werden müssen, ist noch unsicher.

Der eine von uns (S c h o p f e r , 27) hat 1939 schon auf die innern und äußern Faktoren hingewiesen, die ein teilweises Synthesevermögen

modifizieren können. Die damals auf diesem Gebiet bekannten Tatsachen wurden folgendermaßen gruppiert :

Variationen unter dem Einfluß von :

A. Inneren Faktoren.

a) Ein Synthesevermögen ist vorhanden, doch reicht es nicht aus, um eine gute Entwicklung zu ermöglichen. Es muß in diesen Fällen nachgewiesen werden, daß es sich tatsächlich um einen teilweisen Verlust des Synthesevermögens handelt, der von den äußern Bedingungen unabhängig ist und deshalb nicht in die Kategorien 2 a und b fällt.

Dieser Verlust des Synthesevermögens ist bei den Organismen, die nur noch die eine Komponente des Aneurins benötigen, am deutlichsten ausgeprägt.

B. Äußeren Faktoren.

1. Faktoren des Milieus.

a) Quantitative Veränderungen in der Nährlösung. Einfluß der Konzentration der mineralischen Salze bei Pythium Butleri.

b) Qualitative Veränderungen. Mit einer bestimmten Kohlenstoffquelle, z. B. Glukose, ist die Synthese des Pyrimidins nicht möglich; sie kann aber durch Zusatz von Glyzerin erreicht werden *(Rhodotorula Sanniei).*

2. Der Zeitfaktor.

a) Die Synthese ist verlangsamt, ergibt aber bei genügend langer Kultur noch eine mittelmäßige Entwicklung (*Lenzites sepiaria.* Fries, 8). Wahrscheinlich könnte bei längerer Dauer des Versuches sogar eine optimale Entwicklung erzielt werden, sofern nicht andere hemmende Faktoren auftreten.

Es wäre denkbar, daß auch das Alter einer Kultur für den Grad der Verlangsamung mitbestimmend sein könnte.

b) Alle Abstufungen der Verlangsamung, die schließlich zum vollständigen Verlust des Synthesevermögens bzw. zu einem absoluten oder scheinbar absoluten Aneurinbedürfnis führen.

Diese verschiedenen Faktoren können zusammenwirken. Der Fall 2 a (verlangsamte Synthese) kann den Fall A (teilweises Synthesevermögen) vortäuschen. Diese beiden Faktoren können auch zusammenwirken. In extremen Fällen führen die Fälle A und 2 b zum gleichen Resultat und können nicht unterschieden werden.

Wir sehen ohne weiteres, daß sich die für *Trichophyton album* ermittelten Beziehungen zwanglos in diese Gruppierung einfügen lassen. Diese war ursprünglich auch so gedacht, daß sie nicht nur die damals bekannten Fälle, sondern auch Möglichkeiten der Zukunft umfassen sollte.

Bei *Trichophyton album* ist sicher ein Synthesevermögen vorhanden, doch reicht es nicht aus, um unmittelbar eine maximale Entwicklung zu gewährleisten. Das Synthesevermögen wird durch äußere Faktoren, durch das Milieu modifiziert. Ebenso übt der Zeitfaktor einen bestimmenden Einfluß auf das Synthesevermögen aus.

Damit ist gezeigt, daß sich die Verhältnisse bei *Trichophyton album,* trotz der hier auftretenden Anomalien, sehr gut in den Rahmen der bisher bekannten Tatsachen und Theorien einordnen lassen.

Zusammenfassung.

1. Der in diesen Versuchen verwendete Stamm von *Trichophyton album* Sabouraud läßt sich in synthetischen Nährlösungen nur schwer züchten. Durch Zusatz geringer Mengen von konzentriertem Leberextrakt sowie von Peptonen kann die Entwicklung beschleunigt und das Trockengewicht erhöht werden.

2. Diese Stoffe wirken durch die in ihnen enthaltenen Wachstumsfaktoren vitaminischer Natur, unter denen dem Biotin eine besondere Bedeutung zukommt.

3. Die verschiedenen Stickstoffquellen sind für den Pilz sehr ungleichwertig. Wir unterscheiden :

a) Ungeeignete N-Quellen, wie $NaNO_3$ und KNO_3, mit denen eine Zugabe von Biotin praktisch unwirksam ist.

b) Günstige N-Quellen, wie $(HN_4)_2SO_4$ und NH_4NO_3, wo die Biotinwirkung gegenüber den Kontrollen zwar deutlich, aber nicht sehr stark zum Ausdruck kommt, und

c) mittelmäßige N-Quellen, wie Ammoniumzitrat, wo das Biotin sehr deutlich wirkt. (Immer in gepufferten Nährlösungen.)

4. Auch die einzeln in gepufferter Nährlösung verwendeten Aminosäuren wirken sehr verschieden. Günstig wirken Asparagin, Asparaginsäure, Asparaginhydrochlorid, Arginin und Glutaminsäure. Durch gewisse Kombinationen von Aminosäuren kann das Trockengewicht erhöht werden. Günstig ist eine Mischung von Asparagin und Leucin, oder Asparaginsäure, Glykokoll, Glutaminsäure und Alanin. Mit diesen beiden Kombinationen zeigte sich eine Hemmung durch Biotin, die allerdings noch durch weitere Versuche bestätigt werden müßte. Fügt man der günstigen Kombination Glykokoll + Asparaginsäure + Glutaminsäure + Alanin noch Oxyprolin oder Oxyprolin + Tryptophan bei, so ergibt sich eine sehr starke Hemmung.

α-Alanin und Oxyprolin ergeben als einzige N-Quelle keine Entwicklung; als Zusatz zu Glutaminsäure verursachen diese beiden Aminosäuren deutliche Hemmungen, die für Alanin bei Dosen von über 0,5 ‰, für Oxyprolin schon bei einer Dosis von 0,05 ‰ deutlich sind.

5. Durch Umkristallisation des Asparagins (Hoffmann-La Roche, BDH) wird seine fördernde Wirkung herabgesetzt. In Gegenwart von umkristallisiertem Asparagin wirkt das Biotin stärker fördernd als mit unbehandeltem Asparagin. Die im Asparagin enthaltenen Aschenbestandteile (Spurenelemente) sind unwirksam. Dagegen scheint die günstige Wirkung der Glutaminsäure durch ihre Aschensubstanzen bedingt zu sein. Die Anwesenheit dieser Katalysatoren erhöht die Wirkung des Biotins sehr stark, wenn als N-Quelle Glutaminsäure oder Ammoniumzitrat verwendet wird.

6. Reines Biotin wirkt quantitativ. Mit einer Dosis von $4 \cdot 10^{-10}$ γ ist die Biotinwirkung schon deutlich, mit $4 \cdot 10^{-5}$ γ ist sie bei Verwendung von Ammoniumzitrat als N-Quelle maximal.

7. Aneurin wirkt in unserer gewöhnlichen, ungepufferten Nährlösung fördernd, nicht aber in der gepufferten, modifizierten Nährlösung von Dox. Das Aneurin kann durch das Gemisch von Pyrimidin + Thiazol ersetzt werden.

8. Adermin und Inositol fördern deutlich in ungepufferter Nährlösung mit Asparagin als N-Quelle.

9. In ungepufferter Nährlösung wirkt die Kombination Aneurin + Biotin + Inositol + Adermin am besten. In absteigender Reihenfolge folgen: Aneurin + Biotin + Inositol > Aneurin + Adermin = Aneurin + Inositol + Adermin > Aneurin + Biotin = Aneurin + Inositol. Die verschiedenen Faktoren scheinen sich zum Teil gegenseitig ersetzen zu können. Einzeln wirken diese Faktoren in absteigender Reihe folgendermaßen: Adermin > Aneurin > Inositol > Biotin (in ungepufferter Nährlösung). In gepufferter Nährlösung (modifiziert nach D o x) sind in erster Linie Biotin und sehr wahrscheinlich auch Adermin wirksam.

10. Die mit verschiedenen Nährlösungen ausgeführten Zeitversuche zeigen, daß die Wirkung des Biotins vom physiologischen Alter der Kultur abhängig ist. Mit Asparagin entwickeln sich auch die Kontrollen gut. Das Biotin fördert stark bis zum 10. Tage. Nach 14 Tagen sind die Kontrollen ohne Biotin gleich stark entwickelt wie die Kulturen mit Biotin. Mit Ammoniumsulfat wirkt das Biotin länger; erst nach 18 Tagen sind die Kontrollen gleich gut entwickelt wie die Biotinkulturen. Mit Ammoniumzitrat sind die Kontrollen nach 24 Tagen noch schwächer entwickelt als die Biotinkulturen. Das Biotin wirkt während dieser ganzen Periode. Durch verschiedene Stickstoffquellen kann also die Phase, in der Trichophyton album auf Biotin reagiert, verlängert und damit die Biotinwirkung deutlicher gemacht werden (Prinzip der Zeitlupe).

11. Der direkte Nachweis des Biotins im Thallus nach dem Test von Snell, Eakin und Williams zeigt, daß der Biotingehalt je nach der Zusammensetzung der Nährlösung verschieden ist.

12. Mit Ammoniumzitrat, Ammoniumsulfat und Glykokoll enthalten die mit Zugabe von Biotin erzielten Myzelien nach einer bestimmten Zeit mehr Biotin als die Kontrollen. Mit Asparagin sind die Ergebnisse weniger deutlich. Mit umkristallisiertem Asparagin ist der Biotingehalt der Myzelien geringer als mit unbehandeltem Asparagin.

13. Die Analyse der Myzelien, die mit Ammoniumzitrat und steigenden Dosen von Biotin erzielt worden waren, ließ die folgende wichtige Beziehung erkennen : Der relative Biotingehalt des Myzels ist eine Funktion des Entwicklungsstadiums, d. h. des physiologischen Alters der Myzelien. Ein bei suboptimaler Biotindosis gewachsener Thallus hat einen geringern relativen Biotingehalt als ein Myzel, das sich bei optimaler Biotindosis stark entwickelte.

14. Der Biotingehalt verschiedener Myzelien steht in keiner direkten Beziehung zur Menge des beigefügten Biotins, besonders wenn es sich um sehr kleine Dosen dieses Vitamins handelt. Es wird angenommen, daß der verwendete Test auch auf andere Wachstumsfaktoren reagiert als auf Biotin, das theoretisch allein wirken sollte.

15. Die hier ermittelten Beziehungen finden ihre Erklärung im Rahmen des Prinzips des Syntheseverlustes, das die Vitaminbedürfnisse eines Organismus bestimmt. Der verwendete Stamm von Trichophyton album ist in bezug auf das Biotin teilweise heterotroph, die Fähigkeit zur Biosynthese des Vitamins H wird durch das Milieu (Beschaffenheit der Nährlösung) und durch das physiologische Alter einer Kultur stark modifiziert. Das exogen beigefügte Biotin wirkt hier als komplementärer vitaminischer Wachstumsfaktor.

Wir sprechen der Direktion der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, für das Interesse, das sie unsern Untersuchungen entgegenbrachte, sowie für die zahlreichen Vitamine, die sie uns zur Verfügung stellte. unsern wärmsten Dank aus.

Der zweite Teil dieser Arbeit wurde durch den einen von uns (S.) unter Mithilfe von Fräulein M. Guilloud, Laborantin, ausgeführt. Auch ihr wird für ihre gewissenhafte Mitarbeit bestens gedankt.

Literatur.

1. Alten, F., und Orth, H. Untersuchungen über den Aminosäurengehalt und die Anfälligkeit der Kartoffel gegen die Kraut- und Knollenfäule. (Phytophthora infestans de By.) — Phytopatholog. Zschr. 13 : 243—271. 1940.
2. Baudet, E.-A.-R.-F. Recherches expérimentales sur les Trichophyton animaux à cultures faviformes. — Ann. de Parasitologie humaine et comparée 10 : 520—541. 1932.
3. Blumer, S., und Schopfer, W. H. Beiträge zur Biologie und Wirkstoffphysiologie von Ustilago scabiosa (Sowerby) Winter. — Ber. Schweiz. Bot. Ges. 50 : 248—272. 1940.

4. Bodin, E. Les champignons parasites de l'homme. — Encyclopédie scientifique des Aide-Mémoire. Paris. 1902.
5. Dodge, C. W. Medical Mycology. St. Louis. 1935.
6. den Dooren de Jong, L. E. Über Micrococcus Eykmanii n. sp., ein Bakterium, welches für sein Wachstum vitaminartige Stoffe braucht. — Arch. f. Mikrobiol. 5 : 1—13. 1934.
7. Eakin, R. E., and Williams, R. J. Vitamin B_6 as a yeast nutrilite. Jour. Americ. Chem. Soc. 61 : 1932, 1939.
8. Fries, N. Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. — Symbolae Botanicae Upsalienses III, Bd. 2, 1938.
9. Goddard, D. R. Phases of metabolism of Trichophyton interdigitale Priestley. Jour. Infect. Dis. 54 : 149—163. 1934.
10. Kögl, F., und Fries, N. Über den Einfluß von Biotin, Aneurin und Mesoinosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. H.-S. Z. physiol. Chem., 249 : 93. 1937.
11. Langeron, M., et Milochevitch, S. Morphologie des Dermatophytes sur milieux naturels et milieux à base de Polysaccharides. Essai de classification. — Ann. de Parasitologie humaine et comp. 8 : 465—508. 1930.
12. Lindeberg, G. Über die Wirkung von Biotin auf Marasmius androsaceus (L) Fr. — Arch. f. Mikrobiol. 12 : 58—62. 1942.
13. Macinnon, Juan E. The effect of Actinomyces albus on the growth of Trichophyton discoides. — Bull. Torrey Bot. Club 69 : 21—26. 1942.
14. Melin, E., und Nyman, B. Über das Wuchsstoffbedürfnis von Boletus granulatus (L.) Fr. — Arch. f. Mikrobiol. 12 : 254—259. 1941.
15. Möller, E. F. Vitamin B_6 (Adermin) als Wuchsstoff für Milchsäurebakterien. — Zeitschr. f. physiol. Chemie 254 : 285. 1938.
16. Mosher, W. A., Saunders, D. H., Kingery, L. B., and Williams, R. J. Nutritional requirements of the pathogenic mold Trichophyton interdigitale. — Plant Physiol. 11 : 795—806. 1936.
17. Müller, F. W. Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes *Mucor Ramannianus*. Diss. phil. II, Ber. Schweiz. Bot. Ges., 51 : 165—256. 1941.
18. Orla-Jensen, S., Otte, N. C., und Agnete Snog-Kjaer. Über Wuchsstoffe in den Peptonen. — Zentralbl. Bakt. II. 94 : 452—459. 1936.
19. Robbins, W. J., and Mary Bartley Schmidt. Preliminary Experiments on Biotin. — Bull. Torr. Bot. Club 66 : 139—150. 1939.
20. — and Kavanagh, F. Thiamin and growth of Pythium Butleri. — Bull. Torr. Bot. Club 65 : 453—461. 1938.
21. — and R. Ma. Vitamin Deficiencies in Ceratostomella. — Bull. Torrey Bot. Club 69 : 184. 1942.
22. — and M. B. Schmidt. Preliminary experiments on Biotin. Bull. Torrey Bot. Club 66 : 139—150. 1939.
23. Schopfer, W. H. Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez Phycomyces blakesleeanus. Influence des substances vitaminiques. — Bull. Soc. Bot. Suisse 40 : 87. 1931. 41 : 73. 1932.
24. — Sur la synthèse d'un facteur de croissance par un microorganisme. — C. r. Acad. Sci. Paris 199 : 1656. 1934.
25. — Recherches sur l'utilisation des facteurs de croissance. La synthèse biologique des facteurs de croissance. — Arch. f. Mikrobiol. 6 : 196. 1935.
26. — Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme acellulaire *(Phycomyces blakesleeanus)*. Protoplasma, 28 : 381—434. 1937.
27. — Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. Ergebn. der Biologie 16 : 1—172. 1939.

28. Schopfer, W. H. Recherches sur le besoin en facteurs de croissance et le pouvoir de synthèse de « Rhizopus suinus ». — C. r. des séances Soc. phys. et d'hist. nat. Genève, 59 : 101—106. 1942.
29. — Les facteurs de croissance pour *Rhizopus suinus*. Déterminisme et relativité des pouvoirs de synthèse. Actes soc. helv. Sci. nat., Sion. 1942, 122—123.
30. — und Blumer, S. Untersuchungen über die Biologie von Ustilago violacea II, Arch. f. Mikrobiol. 9 : 305—367. 1938.
31. — und Blumer, Recherches sur le besoin en facteurs de croissance vitaminiques et le pouvoir de synthèse d'un Trichophyton. Le problème du conditionnement des pouvoirs de synthèse. — C. r. des séances, Soc. phys. et d'hist. nat. Genève 59 : 106—112. 1942.
32. Schultz, A.S., Atkin, L., and Frey, Ch. N. Vitamin B_6 a growth promoting factor for yeast. — Jour. Americ. Chem. Soc. 61 : 1931, 1939.
33. Snell, E., Eakin, R.E., and Williams, R.R. A quantitative Test for Biotin and Observations regarding its Occurrence and Properties. — Jour. Americ. Chem. Soc. 62 : 175, 1940.
34. Tate, P. The dermatophytes or ringworm fungi. — Biol. Reviews 4 : 41—75. 1929.
35. — On the enzymes of certain dermatophytes or Ringworm fungi. — Parasitiology 21 : 31—54. 1929.
36. Utiger, H. Neue Untersuchungen über die Bedingungen der künstlichen Symbiose Mucor Ramannianus-Rhodotorula rubra. — Ber. Schweiz. Bot. Ges. 52 : 537—582. 1942.