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

**Herausgeber:** Schweizerische Botanische Gesellschaft

**Band:** 54 (1944)

**Artikel:** Beiträge zur Physiologie von Trichoderma viride Pers. ex Fries.

**Autor:** Blumer, S.

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-38530

**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:** 05.12.2025

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

# Beiträge zur Physiologie von Trichoderma viride Pers. ex Fries.

Von *S. Blumer.*

(Aus dem Botanischen Institut und dem Botanischen Garten der Universität Bern.)

Mit 3 Abbildungen.

Eingegangen am 25. September 1944.

## Einleitung.

*Trichoderma viride* kommt als Saprophyt auf Holz und auf allen möglichen pflanzlichen Abfällen sehr häufig vor. Als eigentlicher Bodenpilz hat er eine sehr weite Verbreitung besonders im Rohhumus, während er nach Okada (7) in nassem Torf und in Sandböden weniger reichlich auftritt. Okada fand *Trichoderma* besonders in den obersten Bodenschichten bis 40 cm Tiefe, während ich im God del Fuorn (Schweizerischer Nationalpark, Unterengadin) den Pilz mehrmals noch in 90 cm Tiefe im Anreicherungshorizont einer Variante des Eisenpodsols nachweisen konnte. Allerdings könnte es sich dabei um Konidien handeln, die in die Tiefe verschwemmt wurden.

Es ist seit langem bekannt, daß *Trichoderma viride* zu den aktivsten Zelluloseabbauern unter den Bodenpilzen gehört. Neuere Arbeiten weisen auf die vielfachen Wechselbeziehungen zwischen *Trichoderma* und andern Bodenpilzen wie auch mit höhern Pflanzen hin. Nach Vuillemin (vgl. Bisby, 1) wächst *Trichoderma* auch parasitisch auf *Mucor-Arten.* Weindling (19, 20) beobachtete, daß unter bestimmten Bedingungen schädliche Bodenpilze, wie *Rhizoctonia, Phytophthora* und *Pythium,* von *Trichoderma* befallen werden, und es gelang ihm auch, eine für diese Pilze toxische Substanz aus *Trichoderma*-Kulturen zu isolieren. Waksman und seine Mitarbeiter (18) zeigten wiederholt, daß dieser Pilz ein wichtiges Glied im komplizierten System der Bodenorganismen darstellt. Schließlich konnte Niethammer (6) nachweisen, daß *Trichoderma* auf die Keimung von Erbsen fördernd einwirkt.

Schon 1865 konnten die Gebrüder Tulasne durch direkte Beobachtungen den Nachweis erbringen, daß *Trichoderma* als Nebenfruchtform in den Entwicklungskreis von *Hypocrea rufa* gehört, was 1891 von Brefeld durch Reinkultur bestätigt wurde. Bisby erhielt *Trichoderma viride* auch in Gewebekulturen aus dem stromatischen Ge-

flecht von *Hypocrea rufa*. In der Literatur wurden mehrere *Trichoderma*-Arten beschrieben, wobei meistens Form und Größe der Konidien als Unterscheidungsmerkmale benützt wurden, doch scheint es sich nach den eingehenden Untersuchungen von Bisby (1) um eine einzige, ziemlich variable Art zu handeln.

Meine Versuche wurden zum größten Teil mit einem Stamme ausgeführt, den ich im Juni 1941 aus Lauberde des Botanischen Gartens in Bern isoliert hatte. Morphologisch unterscheidet sich diese Form nicht wesentlich von einem Stamme, den ich von Baarn bezog, dagegen verhalten sich die beiden Pilze in physiologischer Hinsicht nicht gleich. Einige ergänzende Versuche wurden mit Stämmen ausgeführt, die aus verschiedenen Böden des Schweizerischen Nationalparks im Unterengadin isoliert wurden. Die Untersuchungen wurden im Herbst 1941 begonnen und mit verschiedenen, durch die Zeitumstände bedingten Unterbrechungen im Frühjahr 1944 abgeschlossen. Sie bewegten sich in zwei verschiedenen Richtungen : Einerseits sollte der Abbau der Zellulose durch *Trichoderma* näher studiert werden, und anderseits wurde das Verhalten des Pilzes gegenüber Aneurin als Wachstumsfaktor untersucht. In beiden Richtungen konnten nur vorläufige Ergebnisse erzielt werden. Da ich jedoch in absehbarer Zeit kaum noch Gelegenheit finden werde, auf diesem Gebiete zu arbeiten, sollen die gewonnenen Resultate hier zusammengestellt werden.

Ich möchte vor allem dem Direktor des Botanischen Institutes der Universität Bern, Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer, für die Förderung dieser Arbeit meinen besten Dank aussprechen. Ferner schulde ich den Herren Prof. Dr. R. Signer, Bern, und Prof. Dr. H. Pallmann, ETH, Zürich, meinen besten Dank für ihre wertvollen Anregungen. Die Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der bernischen Hochschule ermöglichte durch ihre finanzielle Unterstützung die Durchführung dieser Untersuchungen, was ich hier ebenfalls bestens verdanken möchte.

## I. Wachstum in synthetischen Nährlösungen.

### 1. Allgemeine Ernährungsbedingungen.

*Trichoderma viride* wächst in verschiedenen synthetischen Nährlösungen ohne Zugabe irgendwelcher Wachstumsfaktoren. Allerdings kann die Entwicklung durch Zugabe von Hefeextrakt oder andern pflanzlichen Auszügen stark gefördert werden. Es soll hier nicht näher untersucht werden, ob bei diesen Zugaben spezielle Nährstoffe oder Wachstumsfaktoren ausschlaggebend sind.

Es wurden folgende Nährlösungen angewendet :

1. Als ungepufferte Nährlösung die von W. H. Schopfer für die Kultur von Mucorineen modifizierte Coonsche Lösung (1,5 ‰ $KH_2PO_4$, 0,5 ‰ $MgSO_4$, 1 % Glukose, 1 ‰ einer zusagenden N-Quelle). Gelegentlich wurde diese Lösung mit NaOH auf ein bestimmtes Anfangs-pH eingestellt.
2. Als gepufferte Lösungen wurden Phosphatpufferlösungen nach Clark mit 0,5 ‰ $MgSO_4$, oder Phthalatpuffer nach Clark mit 1,5 ‰ $KH_2PO_4$ und 0,5 ‰ $MgSO_4$ nebst 1 % Glukose und 1 ‰ einer N-Quelle verwendet. Es zeigte sich allerdings bei längern Zeitversuchen, daß 1 % Glukose nicht ausreicht.

   Wurde Zellulose als Kohlenstoffquelle verwendet, so erfolgte in diesen Nährlösungen nur unbefriedigendes Wachstum. In diesen Fällen bediente ich mich zuerst der Nährlösungen von Traaen (17) sowie der sauren Nährlösung von Stapp und Bortels (16). Später zeigte es sich, daß sich
3. eine etwas modifizierte Nährlösung nach Meyer (aus Oppenheimer, Fermente) für diese Versuche am besten eignete. Diese hatte folgende Zusammensetzung: 1 ‰ $KH_2PO_4$, 0,1 ‰ $CaCl_2$, 0,3 ‰ $MgSO_4$, 0,1 ‰ NaCl, 0,01 ‰ $FeCl_3$, 0,01 ‰ $MnCl_2$, 0,001 ‰ $ZnSO_4$ und 0,0001 ‰ $CuSO_4$, neben 1 ‰ Nitrat- oder Ammonstickstoff. Das Filtrierpapier wurde in Form von kleinen Rollen (0,5—0,8 g) in die Erlenmeyerkolben gebracht, und zwar so, daß ein Teil davon über die Oberfläche der Nährlösung hinausragte, dabei aber immer feucht blieb. In dieser Zone wächst der Pilz viel besser als im untergetauchten Teil.

*Trichoderma viride* entwickelt sich mit Kalium- oder Natriumnitrat als N-Quelle mittelmäßig, etwas besser mit Ammoniumsalzen (Sulfat, Chlorid, Nitrat oder Zitrat). Von den Aminosäuren wurden nur Asparagin und Glykokoll verwendet, die beide ein sehr gutes Wachstum ergaben. Milburn (4) stellte auch mit Leucin, Tyrosin sowie mit verschiedenen Proteinen eine gute Entwicklung fest.

Der Pilz wächst nach Weindling (20) im Bereiche von pH 3—6 gut; bei pH 8—9 erfolgt ein starker Abfall. Für die Temperatur ermittelte Milburn folgende Kardinalpunkte: Maximum 30°, Optimum 20—24°, Minimum 0—4°. Der hier verwendete Stamm (TL) zeigte ein etwas abweichendes Verhalten:

| Temperatur: | 10—11° | 14—17° | 21—22° | 26—27° | 36° |
|---|---|---|---|---|---|
| Trockengewicht nach 8 Tagen: | 8 mg | 52 mg | 52 mg | 50 mg | 0 |
| » » 15 » | 74 mg (!) | 60 mg | 46 mg | 29 mg | 0 |

Bei höheren Temperaturen scheinen frühzeitig autolytische Vorgänge aufzutreten. Das Optimum liegt hier auffallend tief. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Die unvermeidlichen Schwan-

kungen haben dabei manche Versuchsreihe entwertet, da der Pilz gegenüber Temperaturveränderungen sehr stark reagiert.

Die Kulturen standen im diffusen Tageslicht. Ein orientierender Versuch zeigte, daß nach 8 Tagen die Trockengewichte bei dunkel gehaltenen Kulturen durchschnittlich um 17 % niedriger waren als bei normal belichteten Kulturen.

### 2. Zellulose als Kohlenstoffquelle.

Trotzdem die Tatsache, daß *Trichoderma* zu den aktivsten Abbauern der Zellulose im Boden gehört, seit langem bekannt ist, scheinen bis jetzt auf diesem Gebiet kaum Versuche mit rein synthetischen Nährlösungen ausgeführt worden zu sein. Waksman und Hutchings (18), die den Pilz auf Luzernestengeln und andern pflanzlichen Substraten kultivierten, beobachteten, daß die Zellulose der Luzerne nicht angegriffen wurde, wenn *Trichoderma* in Reinkultur darauf geimpft wurde. Wächst der Pilz aber auf demselben Substrat zusammen mit *Rhizopus,* der seinerseits die Zellulose nicht anzugreifen vermag, so wird die Zellulose bis zu einem gewissen Grad durch *Trichoderma* zersetzt. Es scheint, daß der Pilz die hier reichlich vorhandenen Proteine als Energiequellen bevorzugt. Übrigens gibt es nach Spradling (15) auch *Trichoderma*-Stämme, die Zellulose überhaupt nicht angreifen.

Unser Stamm (TL) zeigte in den Nährlösungen von Traaen, Stapp und Bortels, besonders aber in derjenigen von Meyer, eine sehr gute, oft sogar eine üppige Entwicklung. Da das gewöhnliche Filtrierpapier nicht unbedeutende Mengen von Aschenbestandteilen enthält, die unter Umständen für den Pilz als Katalysatoren dienen könnten, wurden zunächst einige Parallelkulturen mit aschenarmen Filtrierpapieren sowie mit « aschenfreien » analytischen Filtern durchgeführt. Es zeigten sich in der Entwicklung nicht die geringsten Unterschiede gegenüber dem gewöhnlichen Filtrierpapier, so daß in der Folge nur noch solches verwendet wurde.

Tabelle 1 gibt einen Überblick der verwendeten Zellulose- und Ligninpräparate, die ich den Herren Prof. Signer und Prof. Pallmann verdanke. Leider ist es auf diesen Substraten nicht möglich, das Trockengewicht des Myzels zu ermitteln, da dieses nicht vom Substrat zu trennen ist. Am Schlusse des Versuches, nach 20 Tagen, wurde die Nährlösung auf reduzierende Zucker untersucht. Zu Beginn des Versuches war die Fehlingsche Reaktion bei allen Präparaten negativ.

Sobald der über die Nährlösung herausragende Teil des Papiers vollständig vom Myzel durchwachsen ist, scheint sich der Pilz viel langsamer zu entwickeln. Nach 4—5 Monaten zerfällt das Papier schon bei leichtem Schütteln in feine, kurze Fasern. Besonders interessant ist die Tatsache, daß mit Methylzellulose trotz dem sehr schwachen Wachstum

des Pilzes ein enzymatischer Abbau der Zellulose eingetreten ist. Wachstum und Enzymwirkung scheinen hier nicht parallel zu verlaufen.

Tabelle 1.

Wachstum von *Trichoderma* auf einigen Zellulose- und Ligninpräparaten in Meyerscher Nährlösung mit 1 ‰ $KNO_3$.

| Präparat | Wachstum | Fehlingsche Reaktion nach 20 Tagen |
|---|---|---|
| Filtrierpapier . . | sehr gut . . . . | — |
| Holzzellstoff . . . | gut bis sehr gut . | — |
| Baumwoll-Linters . | sehr gut . . . . | — |
| Methylzellulose . . | kaum sichtbar . . | + |
| Tylose A 100 . . | schwach . . . . | — |
| Tylose 4 S . . . | schwach . . . . | — |
| Tannenholz . . . | mittelmäßig . . . | |
| Säurelignin . . . | mittelmäßig . . . | |
| Alkalilignin . . . | kein Wachstum . | |

Es sei hier beigefügt, daß sich die hier angewandte Methode der Kultur auf Filtrierpapier sehr gut als Elektivkultur für die Isolation zellulosezersetzender Pilze aus dem Boden verwenden läßt, wenn man die Kulturen mit etwas Erde beimpft. Da sich aber bei längerer Dauer des Versuches auch andere Keime entwickeln, können die eigentlichen Zellulosepilze nur am Anfang einigermaßen rein gewonnen werden.

### 3. Enzymwirkung.

Solange der Pilz wächst, lassen sich in der Nährlösung höchstens Spuren reduzierender Substanzen nachweisen. Die aus dem Abbau der Zellulose entstehende Glukose scheint also sofort bis auf die letzten Reste verbraucht zu werden. Da die Nährlösung keinen Zucker enthält, bildet sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit nie ein Myzel; dieses ist nur auf das Filtrierpapier selber beschränkt. Man kann indessen auf einfache Art eine Anreicherung von Glukose in der Nährlösung bewirken. Wird eine wachsende Kultur mit Toluol überschichtet und einige Tage bei etwa 30° aufbewahrt, so wird das Wachstum abgestoppt, während die Enzymwirkung weiter andauert. In der Nährlösung muß deshalb nach und nach Zucker angereichert werden. Wenn nun nach einigen Tagen das Toluol verdunstet ist, beginnt die Lebenstätigkeit des Pilzes von neuem, und nun entwickeln sich auch die in der Flüssigkeit vorhandenen Konidien oder Myzelfragmente und bilden auf der Nährlösung schwimmende Kolonien. Man kann diese Kolonien steril aus der Nährlösung herausnehmen und die Kultur erneut mit Toluol überschichten,

worauf sich der Vorgang so oft wiederholt, bis kein Stickstoff mehr vorhanden ist.

In einigen Versuchen sollte nun die Stärke des enzymatischen Abbaus quantitativ erfaßt werden. Als Ausgangsmaterial dienten 16 Tage alte Kulturen in Meyerscher Nährlösung mit $KNO_3$ oder $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle. Bei Einleitung des Abbauversuches zeigten die Kulturen nur Spuren reduzierender Substanzen. Um das Wachstum des Pilzes auf ein Minimum herabzusetzen, wurde jede Kultur mit 1 ccm Toluol überschichtet, das im Laufe des Versuches mehrmals erneuert wurde. Die eine Hälfte der Kolben wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt, während die andere Hälfte in einem Thermostaten bei 36° gehalten wurde. Da in der Literatur allgemein angegeben wird, daß die Cellulase bei pH 5,5 ihr Wirkungsoptimum hat, wurde zudem in einem Teil der Kolben die Nährlösung auf dieses pH eingestellt, während in den andern Kolben das pH bei zirka 3,0 lag.

Nach 23 Tagen wurden die Zuckerbestimmungen nach Bertrand ausgeführt, wobei die Gesamtheit der reduzierenden Substanzen als Glukose berechnet wurde. Die Bestimmungen wurden mit 10 ccm Nährlösung ausgeführt und dann auf die ganze Kulturlösung (25 ccm) umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Zuckerbestimmungen in Kulturen, die mit Toluol überschichtet wurden nach 23 Tagen in Meyerscher Nährlösung mit $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle.

| Temperatur | Substrat (ursprünglich 800 mg) | Glukose pro Kultur | |
|---|---|---|---|
| | | pH ca. 3 | pH 5,5 |
| | | mg | mg |
| 18—22° | Filtrierpapier . . . . . | 12,5 | 16,2 |
| | Holzzellulose . . . . . | 57,0 | 68,5 |
| | Baumwoll-Linters . . . | 43,2 | 58,5 |
| 36° | Filtrierpapier . . . . . | | 84,8 |
| | Holzzellulose . . . . . | 46,8 | 95,5 |
| | Baumwoll-Linters . . . | 77,2 | 144,0 |

Die Form, in welcher die Zellulose geboten wird, scheint also nicht wesentlich zu sein. Dagegen ist, was von vorneherein zu erwarten war, der Abbau bei pH 5,5 wesentlich stärker als bei pH 3 und bei 36° stärker als bei Zimmertemperatur. Verglichen mit dem Zelluloseabbau durch thermophile anaerobe Bakterien handelt es sich hier um einen sehr langsamen Abbau. Im Boden, wo die Bedingungen für den Zelluloseabbau selten optimal sind (Feuchtigkeit, Wärme), muß natürlich dieser Vorgang noch viel langsamer verlaufen.

In einem weitern Versuch wurde in 16 Tage alten Kulturen die Nährlösung abgeschüttet und durch einen Phosphatpuffer pH 5,5 ersetzt. Die Kolben kamen dann in einen Thermostaten von 36°. Hier wurde das Wachstum des Pilzes durch den Nährstoffmangel und die hohe Temperatur vollständig unterdrückt. Dagegen war der Zelluloseabbau viel intensiver als im ersten Versuch. Schon nach 4 Tagen konnten mit Filtrierpapier als C-Quelle 35 mg Glukose pro Kultur nachgewiesen werden. Baumwoll-Linters war nach 16 Tagen vollständig in feine Fasern zerfallen. Auch mit Holzzellstoff ergaben sich nach 25 Tagen hohe Konzentrationen von Glukose.

Um festzustellen, ob die zelluloseabbauenden Enzyme auch in der Nährlösung vorhanden sind, wurde schließlich noch folgender Versuch angesetzt: Die Nährlösung aus einer 16 Tage alten Kultur wurde durch eine Chamberland-Kerze steril filtriert und das Filtrat durch Zugabe von Pufferlösung auf pH 5,5 eingestellt. Hierauf wurden Filtrierpapierrollen, Baumpoll-Linters oder Methylzellulose (im Autoklaven sterilisiert) beigefügt und die Kolben bei 36° aufbewahrt. Bei Verwendung von Methylzellulose zeigte sich nach 16 Tagen eine deutliche Anreicherung an reduzierenden Substanzen.

Alle diese Versuche waren ursprünglich als Zeitversuche angelegt worden, doch mußte ich mich wegen Militärdienstes damit begnügen, in unregelmäßigen Intervallen einige Stichproben zu entnehmen. Immerhin zeigen sie, daß *Trichoderma viride* enzymatisch sehr wirksam ist und daß es wahrscheinlich möglich wäre, aus diesem Pilze brauchbare Cellulase-Präparate herzustellen. Zwei *Geomyces-Arten* aus Böden des Schweizerischen Nationalparkes erwiesen sich gegenüber der Zellulose als viel weniger aktiv.

## II. Wirkung des Aneurins und seiner Komponenten.

Den Ausgangspunkt für diese Versuche bildete eine zufällige Beobachtung, die darauf hinwies, daß das Aneurin eine hemmende Wirkung auf *Trichoderma* ausübt. In einer ungepufferten Nährlösung (pH 6,2) mit Ammoniumzitrat als N-Quelle zeigten nach 20 Tagen die Kulturen mit 2,5 $\gamma$ Aneurin ein mittleres Trockengewicht von 28,5 mg, während die Kontrollen ohne Zusatz von Aneurin ein Myzelgewicht von 46,2 mg aufwiesen. Die Hemmung betrug also in diesem Versuch 38,3 % gegenüber der Kontrolle. Es zeigte sich bald, daß sich ein Zusatz von Aneurin je nach der Art der Stickstoffquelle in ganz verschiedener Weise auswirken kann.

### 1. Die Wirkung des Aneurins und seiner Komponenten bei verschiedenen Stickstoffquellen.

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß sich mit Asparagin als N-Quelle eine deutliche Hemmung des Wachstums durch Aneurin zeigt. Etwas weniger, aber immerhin noch deutlich, hemmen auch Pyrimidin sowie das Gemisch von Pyrimidin und Thiazol, während Thiazol allein keine Wirkung ausübt. Ähnliche Verhältnisse finden wir mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle. Bei bedeutend niedrigeren absoluten Trockengewichten ist hier die prozentuale Hemmung sogar noch bedeutend größer als mit Asparagin. In diesem Versuche zeigte sich außerdem auch eine deutliche Hemmung durch Thiazol allein, doch muß erwähnt werden, daß Thiazol in zahlreichen wiederholten Versuchen in keinem Falle mehr eine so starke Hemmung bewirkte. Abweichungen von weniger als 10 % von den Kontrollen müssen bei diesem Pilze als zufällig beurteilt werden, da die Vitaminwirkung sehr oft von andern unkontrollierbaren Faktoren überdeckt wird.

Tabelle 3.

Wirkung von Aneurin und seinen Komponenten in gepufferter Nährlösung (ph 6,8) mit verschiedenen Stickstoffquellen nach 14 Tagen.

| | Asparagin | | Ammoniumzitrat | | Kaliumnitrat | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tr.-Gew. mg | Unterschied | Tr.-Gew. mg | Unterschied | Tr.-Gew. mg | Unterschied |
| Kontrolle . . . . . | 70,2 | | 42,8 | | 27,8 | |
| 1 γ Pyrimidin . . . . | 60,2 | —14,2% | 28,3 | —33,8% | 32,3 | +15,8% |
| 1 γ Thiazol . . . . . | 71,1 | + 2,1% | 31,7 | —25,9% | 30,5 | + 9,7% |
| 1 γ Pyrmidin + 1 γ Thiazol . . . . . | 61,5 | —12,4% | 24,1 | —43,7% | 41,2 | +48,2% |
| 2 γ Aneurin . . . . . | 56,9 | —18,9% | 27,1 | —36,7% | 36,7 | +32,0% |

Mit $KNO_3$ als Stickstoffquelle finden wir an Stelle der Hemmung eine deutliche Förderung durch Aneurin. Mit Pyrimidin zeigt sich ebenfalls eine deutliche Förderung, Thiazol allein ist wirkungslos (Unterschied gegenüber der Kontrolle kleiner als 10 %), während das Gemisch von Pyrimidin und Thiazol noch bedeutend stärker fördert als Aneurin. Da sich diese Befunde in zahlreichen Wiederholungen immer wieder bestätigten, kann wohl der Schluß gezogen werden, daß die Aneurinwirkung bei *Trichoderma* durch die Art der Stickstoffquelle bedingt wird. Aneurin wirkt fördernd mit $KNO_3$, hemmend mit Asparagin und besonders mit Ammoniumzitrat. Pyrimidin allein zeigt die gleiche Wirkung wie Aneurin, wenn auch meistens etwas schwächer, während Thiazol allein unwirksam zu sein scheint.

In einem weitern Versuch (Tab. 4) sollte nun geprüft werden, wie sich der Pilz mit andern Nitraten und Ammoniumsalzen verhält und wie sich eine Mischung dieser beiden Stickstoffquellen auswirkt. Dieser Versuch wurde nur mit Pyrimidin durchgeführt.

Tabelle 4.

Wirkung von Pyrimidin (0,5 $\gamma$/25 ccm) bei verschiedenen Stickstoffquellen. Phosphatpuffer pH 7. Alter 14 Tage.

| | Myzelgewichte | | Unterschied gegenüber Kontrolle |
|---|---|---|---|
| | Kontrolle | + Pyrimidin | |
| | mg | mg | |
| Natriumnitrat 1 ‰ . . . . . | 22,3 | 27,2 | +21,9 % |
| Ammoniumnitrat 1 ‰ . . . . . | 23,0 | 26,2 | +13,9 % |
| Kaliumnitrat 1 ‰ . . . . . | 26,0 | 29,6 | +13,8 % |
| Kaliumnitrat | | | |
| 0,9 ‰ + Ammoniumzitrat 0,1 ‰ | 29,4 | 28,0 | — 4,7 % |
| 0,75 ‰ + » 0,25 ‰ | 25,7 | 30,5 | +18,6 % |
| 0,5 ‰ + » 0,5 ‰ | 27,3 | 35,2 | +28,9 % |
| 0,25 ‰ + » 0,75 ‰ | 32,6 | 30,9 | — 5,2 % |
| 0,1 ‰ + » 0,9 ‰ | 33,3 | 30,7 | — 7,5 % |
| Ammoniumzitrat 1 ‰ . . . . . | 30,4 | 25,1 | —17,4 % |
| Ammoniumchlorid 1 ‰ . . . . . | 27,2 | 24,75 | — 9,0 % |
| Ammoniumsulfat 1 ‰ . . . . . | 34,4 | 27,8 | —23,7 % |

Die Tabelle bestätigt zunächst einmal die frühern Ergebnisse und erweitert sie zugleich in dem Sinne, daß mit allen verwendeten Nitraten, einschließlich Ammoniumnitrat, eine Förderung der Entwicklung zustande kommt, während die Ammoniumsalze mehr oder weniger hemmend wirken. Bei den Mischungen scheint der fördernde Einfluß des Nitrates stärker zu sein als die durch Ammoniumzitrat bewirkte Hemmung. Erst mit 0,75 ‰ $NH_4$-Zitrat wird die durch das Nitrat bedingte Förderung aufgehoben. Immerhin muß erwähnt werden, daß die Ergebnisse für das Mischungsverhältnis 0,9 ‰ Nitrat + 0,1 ‰ Zitrat etwas aus dem Rahmen fallen. Worauf diese Unregelmäßigkeit beruht, konnte nicht ermittelt werden.

Die bis jetzt beschriebenen Versuche wurden mit demselben Stamme des Pilzes (TL) durchgeführt. Es fragte sich nun, wie sich andere Stämme von *Trichoderma* gegenüber dem Aneurin und dem Pyrimidin verhalten. Es standen mir 7 Stämme des Pilzes zur Verfügung, 6 davon waren aus Böden des Schweizerischen Nationalparks im Unterengadin isoliert worden, einer wurde von Baarn bezogen.

Außer dem Stamm TL, der hier als Kontrolle diente, wurden in den Versuch einbezogen :

St. B Stamm von Baarn, bezeichnet als *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz
Nr. 3 aus dem Rhodoreto-Vaccinietum v. God del Fuorn, 3 cm Tiefe
» 7 » » » » » » » » 10 » »
» 12 » » » » » » » » 90 » »
» 22 » » Mugeto ericetosum v. Plan Posa, 10 » »
» 35 » » Rhodoreto-Vaccinietum v. God del Fuorn, 10 » »
» 36 » » » » » » » » 90 » »

Die Stämme standen teilweise schon fast zwei Jahre in Kultur, teilweise (Nrn. 22, 35, 36) waren sie eben frisch isoliert worden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

Wachstum verschiedener Stämme von *Trichoderma* mit und ohne Aneurin in Phosphatpuffer pH 6,8. Alter 14 Tage.

| Stamm | mit 1 ‰ Kaliumnitrat | | | mit 1 ‰ Ammoniumzitrat | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Trockengewicht | | Unterschied gegenüber der Kontrolle | Trockengewicht | | Unterschied gegenüber der Kontrolle |
| | Kontrolle | + 1 δ Aneurin | | Kontrolle | + 1 δ Aneurin | |
| | mg | mg | | mg | mg | |
| TL | 28,5 | 33,2 | + 16,5 % | 32,8 | 27,2 | — 17,1 % |
| B | 13,1 | 18,0 | + 37,4 % | 25,1 | 19,3 | — 23,1 % |
| 3 | 40,1 | 53,0 | + 32,1 % | 54,3 | 49,0 | — 9,7 % |
| 7 | 34,0 | 44,1 | + 29,7 % | 47,2 | 37,5 | — 20,5 % |
| 12 | 38,3 | 54,5 | + 42,3 % | 46,1 | 41,5 | — 9,9 % |
| 22 | 41,0 | 50,6 | + 23,4 % | 48,8 | 53,3 | + 9,2 % |
| 35 | 29,7 | 34,0 | + 14,4 % | 38,5 | 36,1 | — 6,2 % |
| 36 | 39,4 | 48,1 | + 22,1 % | 39,5 | 40,2 | + 1,7 % |

Es wurden in diesem Versuche auch parallele Serien mit Pyrimidin und mit Thiazol angelegt. Beide Substanzen wirkten hier nicht. Für das Thiazol steht dies in Übereinstimmung mit zahlreichen andern Versuchen. Daß Pyrimidin nicht wirkte, kann nur darauf zurückgeführt werden, daß eine zu alte Stammlösung verwendet wurde.

Der Versuch zeigt zunächst, daß das Wachstum bei allen Stämmen mit $NH_4$-Zitrat besser ist als mit $KNO_3$. Die Förderung durch Aneurin mit $KNO_3$ als N-Quelle ist überall deutlich ersichtlich. Weniger klar zeigt sich die Hemmung mit $NH_4$-Zitrat. Sie ist bei 3 Stämmen deutlich, bei 2 Stämmen fraglich (unter 10 %), und 2 Stämme zeigen sogar eine schwache Förderung, die aber wohl innerhalb der Fehlergrenzen liegen dürfte. Die verschiedenen Stämme zeigten übrigens auch in der Wuchsform, in der Farbstoffbildung und sogar in der Konidienform bedeutende Unterschiede.

## 2. Quantitative Wirkung des Aneurins.

Systematische Versuche zur Ermittlung der optimalen Konzentration von Aneurin oder Pyrimidin wurden nicht durchgeführt. In einem schnell wachsenden Versuch in ungepufferter Nährlösung mit Ammoniumzitrat zeigte es sich, daß man für die Hemmung durch Aneurin nicht einfach eine gewisse Konzentration festsetzen darf, da hier der Zeitfaktor eine wichtige Rolle spielt.

Tabelle 6.

Wirkung steigender Aneurindosen auf *Trichoderma* in ungepufferter Nährlösung mit Ammoniumzitrat.

| Aneurin-Konzentration in 25 ccm | nach 6 Tagen | | nach 8 Tagen | |
|---|---|---|---|---|
| | Trockengewicht | Unterschied gegenüber Kontrolle | Trockengewicht | Unterschied gegenüber Kontrolle |
| | mg | | mg | |
| 0 (Kontrolle) . | 40,0 | | 44,7 | |
| 0,001 γ . . . . | 40,5 | + 1,2 % | 44,1 | — 1,3 % |
| 0,01 γ . . . . | 36,3 | — 9,2 % | 45,5 | + 1,8 % |
| 0,1 γ . . . . . | 33,8 | — 15,5 % | 41,7 | — 6,7 % |
| 0,5 γ . . . . . | 34,9 | — 12,7 % | 40,3 | — 9,8 % |
| 1 γ . . . . . | 35,1 | — 12,2 % | 34,0 | — 23,9 % |
| 5 γ . . . . . | 31,8 | — 20,5 % | 36,5 | — 18,3 % |
| 10 γ . . . . . | 37,1 | — 7,1 % | 39,9 | — 11,6 % |

Nach diesem Versuche hätten wir also nach 6 Tagen mit 0,1 γ Aneurin schon eine ziemlich starke Hemmung, während zwei Tage später die stärkste Hemmung erst mit 1 γ Aneurin pro Kolben erreicht wird. Es ist zu erwarten, daß wir für andere Zeiten auch wieder andere optimale Konzentrationen erhalten würden. Auch für die fördernde Wirkung des Aneurins zeigte es sich, daß eine Konzentration von 1 γ pro 25 ccm jedenfalls nicht weit vom Optimum entfernt ist. Es wurden deshalb in den meisten Versuchen Konzentrationen von 1—5 γ Aneurin oder 0,5—2 γ Pyrimidin angewendet. Eine quantitative Wirkung, die von Schopfer (8) als Kriterium für die Wirkung der Wachstumsfaktoren betrachtet wird, ist also sowohl für die hemmende als auch für die fördernde Wirkung vorhanden, ebenso ist die weitere Forderung der Wirkung in kleinen Mengen erfüllt.

## 3. Spezifität der Aneurinwirkung.

Ein weiteres Kriterium für die Wirkung von Wachstumsfaktoren ist die Konstitutionsspezifität der Wirkung. Es wurden in dieser Richtung zwei Zeitversuche mit gepufferten und ungepufferten Nährlösungen

ausgeführt, wobei als N-Quelle nur Ammoniumzitrat verwendet wurde. Die Ergebnisse waren besonders in den ungepufferten Serien sehr widersprechend. In gepufferter Nährlösung (pH 6,8) waren mit 4 $\gamma$ Methylaneurin, Äthylaneurin, Azetylaneurinchlorid sowie mit Aneurinkarbonsäuremethylester dieselben Hemmungen in der Entwicklung nachzuweisen wie mit Methylaneurin. Dagegen hatte eine Zugabe von 4 $\gamma$ Iso-Aneurin oder Thiochrom keinen Einfluß auf das Wachstum. Diese beiden Substanzen bewirkten wie die Kontrollen eine Verschiebung des pH von 6,8 auf 6,15—6,25 nach 28 Tagen. Bei Zugabe der wirksamen Aneurinderivate verlief die pH-Kurve anders als mit Iso-Aneurin oder Thiochrom. Zuerst war ebenfalls ein Absinken der pH-Werte auf pH 6,35—6,45 am 19. Tage festzustellen. Von diesem Zeitpunkte an setzte offenbar die Bildung von Ammoniak stärker ein, so daß nach 28 Tagen wieder ein pH von 6,4—6,5 erreicht wurde. Auf die möglichen Zusammenhänge zwischen Vitaminwirkung und Ammoniakbildung werden wir später noch zurückkommen.

### 4. Der Zeitfaktor.

Bei Mikroorganismen, die die Synthesefähigkeit für einen bestimmten Wachstumsfaktor nur teilweise verloren haben, spielt oft der Zeitfaktor für die Vitaminwirkung eine ausschlaggebende Rolle. Es besteht hier die Möglichkeit, daß ein Wachstumsfaktor nur in einem bestimmten Abschnitt der Entwicklung nicht in genügender Menge synthetisiert werden kann. So konnten wir für *Trichophyton album* nachweisen, daß Biotin nur in den ersten Entwicklungsstadien fördernd wirkt (Schopfer und Blumer, 12). Später wird dieser Pilz gegenüber dem Biotin auxo-autotroph, was entweder darauf beruhen kann, daß er im Laufe der spätern Entwicklung befähigt ist, die für den Ablauf der Lebensvorgänge notwendige Menge von Biotin selbst zu synthetisieren, oder daß dieses Vitamin später nicht mehr in so großem Ausmaße benötigt wird.

Auch für das Aneurin liegen in dieser Richtung interessante Untersuchungen von Schopfer (9, 10) vor. Nachdem früher durch Schopfer und Moser (13) und durch Moser (5) gezeigt worden war, daß dieses Vitamin auf *Rhizopus* hemmend wirkt, zeigten spätere ausgedehnte Untersuchungen von Schopfer, daß auch bei diesem Pilze in den ersten Entwicklungsstadien eine deutliche Förderung durch Aneurin zu beobachten ist. Die Dauer dieser fördernden Wirkung ist also zeitlich begrenzt, wobei andere Faktoren, z. B. die Temperatur, bestimmend einwirken können. Für *Trichoderma* scheint die Wirkung des Aneurins bedeutend geringer zu sein als für *Rhizopus*. Immerhin war es von großem Interesse, festzustellen, ob auch hier der hemmenden

Wirkung eine anfängliche Förderung durch Aneurin vorausgeht. Dieser Nachweis konnte nur durch ausgedehnte Zeitversuche erbracht werden. Um die relativ großen Schwankungen innerhalb einer Serie auszugleichen, wurde hier das Trockengewicht in den ersten Stadien aus mindestens 10 Kulturen berechnet.

Relativ einfach liegen die Verhältnisse, wenn der Pilz in gepufferten Nährlösungen mit $KNO_3$ als Stickstoffquelle wächst. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, haben wir hier eine Förderung während der ganzen Entwicklung bis zum 28. Tage. Würde man den durch Aneurin bedingten Gewichtszuwachs prozentual angeben, so ergäben sich während der ganzen Zeit des Wachstums, die in diesem Versuch durch ungünstige Temperaturen etwas verlängert wurde, immer wieder die gleichen Prozentzahlen. Erst später, wenn Autolyse eintritt, gleichen sich die Unterschiede gegenüber den Kontrollen aus. Auch Pyrimidin zeigte in diesem Versuche eine deutliche Förderung, die allerdings geringer ist als mit Aneurin. Die Kurve für die Kulturen mit Thiazol wurde hier weggelassen, weil sie sich fast vollständig mit der Kontrolle deckt.

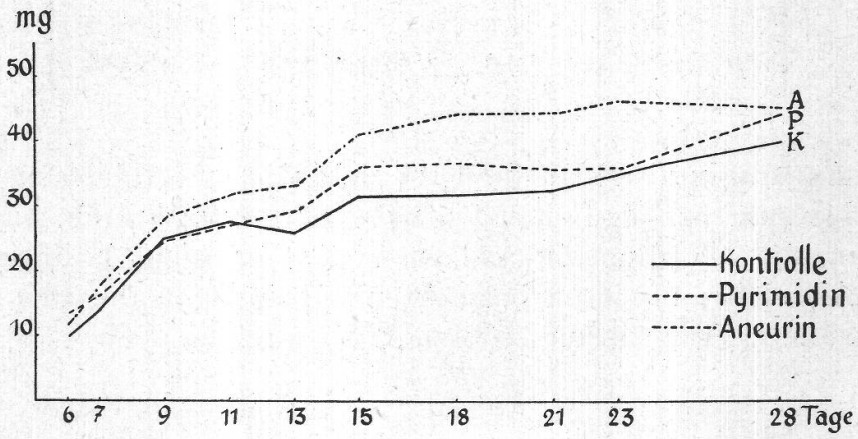


Abbildung 1.

Wirkung von 2 $\gamma$ Aneurin, resp. 1 $\gamma$ Pyrimidin in gepufferter Nährlösung (pH 6,8) mit Kaliumnitrat als Stickstoffquelle.

Die Hemmung mit Ammoniumzitrat als N-Quelle geht aus Abbildung 2 deutlich hervor. Eine Förderung am Anfang der Entwicklung scheint hier vorhanden zu sein. Da jedoch in diesem Versuch nur 6 Parallelkulturen zur Verfügung standen, sind die geringen Unterschiede vielleicht nicht ganz gesichert. Viel deutlicher geht die Förderung in den ersten Entwicklungsstadien aus den in Tabelle 7 zusammengestellten Ergebnissen hervor. Wir haben hier bis zum 5. Tage eine durch Aneurin bedingte Zunahme des Trockengewichtes bis zu 20 %, die jedoch schon am 6. Tage verschwunden ist, um dann nach dem 9. Tage in

eine deutliche Hemmung überzugehen. Abbildung 2 zeigt ferner, daß Aneurin und Pyrimidin in den spätern Entwicklungsstadien ungefähr in gleichem Maße hemmend wirken. Ebenso stark hemmt auch die Mischung von Pyrimidin + Thiazol, für die hier keine Kurve wiedergegeben ist, während Thiazol allein eher eine schwach fördernde Wirkung ausübt, die aber wohl innerhalb der Fehlergrenzen liegen dürfte.

Tabelle 7.

Wirkung von Aneurin in gepufferter Nährlösung (pH 6,8) mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle in den ersten Tagen des Versuchs.

| Alter | Trockengewicht | | Zu- oder Abnahme gegenüber der Kontrolle |
|---|---|---|---|
| | Kontrolle | + 1 γ Aneurin | |
| | mg | mg | |
| 4 Tage | 2,62 | 3,0 | + 14,5 % |
| 5 Tage | 5,80 | 6,97 | + 20,3 % |
| 6 Tage | 13,3 | 12,7 | — 4,5 % |
| 7 Tage | 16,6 | 15,6 | — 6,0 % |
| 9 Tage | 32,0 | 26,2 | — 18,1 % |

Mit Asparagin als N-Quelle zeigt sich, wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, bis zum 14. Tage eine deutliche Förderung durch Aneurin und Pyrimidin, die allerdings in andern Versuchen nicht bestätigt werden konnte. Als sicher erwiesen betrachten wir dagegen die Hemmung, die hier erst am 21. Tage ihren größten Wert erreicht.

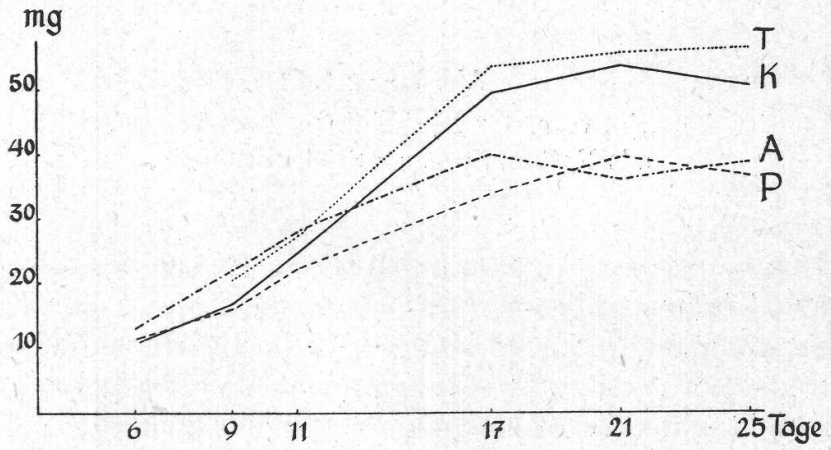


Abbildung 2.

Wirkung von 2 γ Aneurin, resp. 1 γ Pyrimidin oder Thiazol in gepufferter Nährlösung (pH 6,8) mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle.

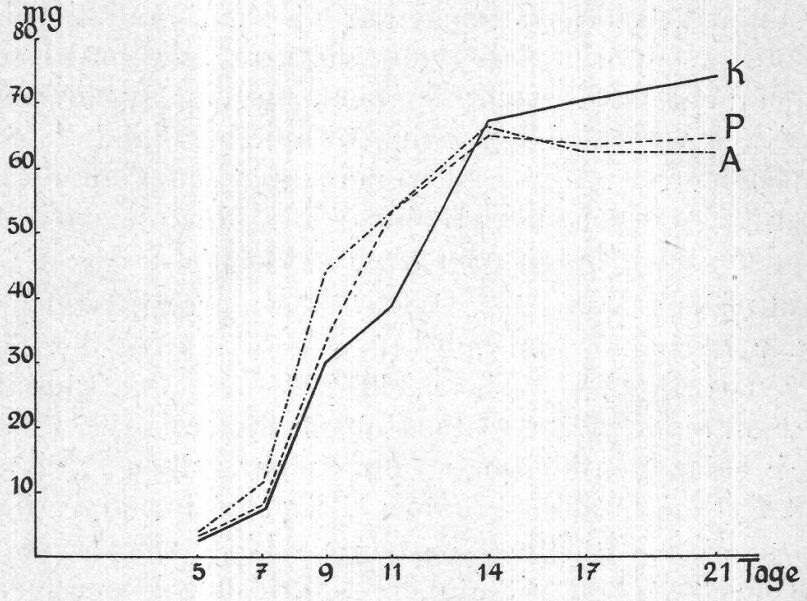


Abbildung 3.
Wirkung von 2 $\gamma$ Aneurin, resp. 1 $\gamma$ Pyrimidin in gepufferter Nährlösung (pH 6,4) mit Asparagin als Stickstoffquelle.

### 5. Wirkung des Aneurins auf die Farbstoffbildung.

Bei vielen Stämmen von *Trichoderma viride* tritt auf festen und auf flüssigen Nährböden eine intensive Färbung auf, die von Dunkel- oder Blaugrün alle Übergänge bis zum leuchtenden Goldgelb zeigt. Der Farbstoff ist vor allem in den Konidien enthalten und ist deshalb um so stärker, je ausgiebiger die Konidienbildung erfolgt. Die mehr oder weniger intensive Färbung bezeichnet also ein bestimmtes Entwicklungsstadium der Kultur. Unter den zahlreichen, aus Böden des Schweizerischen Nationalparkes isolierten Stämmen befanden sich mehrere, die nur ein weißliches Myzel mit spärlicher Konidienbildung lieferten. Unser Stamm TL zeigte nach dreijähriger Kultur eine bedeutende Abnahme in der Konidien- und Farbstoffbildung.

Die Farbe der Konidien wird weitgehend durch die Reaktion der Nährlösung bedingt. Bei pH 4—5 ist die Färbung intensiv grün; bei pH 5—6,5 geht sie ins Gelbliche über. Bei pH 7 ist sie nur noch schwach gelblich, und bei pH 8 wie auch bei pH 3 sind die Kulturen weiß, d. h. es werden überhaupt keine Konidien mehr gebildet. Auf diese Zusammenhänge hat Milburn (4) schon vor 40 Jahren hingewiesen. Er kultivierte den Pilz auf Pflaumensaftagar und konnte durch verschiedene Zusätze den Farbenumschlag von Grün nach Gelb und umgekehrt sehr schön demonstrieren.

In unsern Versuchen zeigte sich dieser Unterschied in der Farbe in Glukose- und in Zellulosekulturen. In Lösungen mit Ammoniumsalzen traten intensiv grüne bis blaugrüne Farben auf, während mit Kalium-

oder Natriumnitrat eine sattgrüne Färbung mit bräunlichem Ton vorherrschte. Mit Asparagin waren die Kulturen gewöhnlich gelblich. Es ist wahrscheinlich, daß es sich hier nicht um eine spezifische stoffliche Einwirkung der verschiedenen Stickstoffquellen handelt, sondern daß die Veränderungen der Farbe auch hier durch die Veränderung des pH bedingt werden, da sich das pH der Nährlösung, je nach der Art der Stickstoffquelle, nach unten oder oben verschiebt.

In zahlreichen Versuchen konnte nun auch durch Zusatz von Aneurin oder Pyrimidin eine auffällige Veränderung der Farbe in der Richtung von Grün zu Gelb beobachtet werden. Der Umschlag war so stark, daß man ohne weiteres alle Kolben, die Aneurin, Pyrimidin oder Pyrimidin + Thiazol enthielten, an ihrer mehr gelben Färbung erkennen konnte. Mit Pyrimidin allein ergaben sich dabei immer geringere Unterschiede als mit Aneurin. Diese Farbunterschiede zeigten sich besonders deutlich an den Myzelien, die aus der Nährlösung herausgenommen und ausgepreßt wurden. In spätern Entwicklungsstadien, besonders bei eintretender Autolyse, sind die Unterschiede nicht mehr erkennbar. Sie treten am stärksten auf, wenn das pH der Nährlösung zu Beginn des Versuches zwischen 6,4 und 6,8 liegt.

Auch in diesem Falle erschien es naheliegend, daß die Gelbfärbung auf eine Veränderung des pH in alkalischer Richtung zurückgeführt werden muß, was durch zahlreiche Stichproben mit einem Universalindikator immer wieder bestätigt werden konnte. Ferner konnte durch die Neßlersche Reaktion gezeigt werden, daß die gelbgefärbten Kulturen, also die Kulturen mit Zusatz von Aneurin oder Pyrimidin, viel mehr Ammoniak gebildet hatten als die Kontrollen oder die Thiazolkulturen. Da nun immer mit starker Gelbfärbung auch eine deutliche Gewichtsverminderung parallel ging, darf wohl angenommen werden, daß die Hemmung durch Aneurin oder Pyrimidin durch eine stärkere Ammoniakproduktion des Pilzes in Gegenwart dieser Substanzen bedingt wurde. Leider kam ich nicht mehr dazu, quantitative Untersuchungen über die Ammoniakbildung durch *Trichoderma* durchzuführen.

## 6. Allgemeine Schlußfolgerungen.

Die Wirkung des Aneurins wurde zuerst hauptsächlich an auxoheterotrophen Organismen (*Phycomyces* u. a.) untersucht, wo das Synthesevermögen vollständig verloren gegangen ist (vgl. Schopfer, 8). Nach und nach wurden zahlreiche Beispiele einer teilweisen Auxo-Heterotrophie bekannt, wo das Synthesevermögen zwar noch vorhanden ist, aber nicht für eine optimale Entwicklung ausreicht. In solchen Fällen sind oft die Kulturbedingungen ausschlaggebend. In diese Kategorie von Mikroorganismen gehört *Trichoderma viride*. Der Pilz darf im all-

gemeinen gegenüber dem Aneurin als auxo-autotroph bezeichnet werden; er wächst in synthetischen Nährlösungen ohne Zugabe irgendwelcher Wachstumsfaktoren gut, wobei allerdings beobachtet wurde, daß gewisse Kombinationen von Metallsalzen deutlich fördernd wirken. Nur unter besondern Bedingungen, z. B. mit Nitraten als Stickstoffquelle, bewirkt Aneurin, und in geringerem Maße auch Pyrimidin, eine schwache Förderung. Dabei muß betont werden, daß Nitrate für *Trichoderma* keine vollwertige Stickstoffquelle darstellen. Mit oder ohne Aneurin ergeben sie durchwegs geringere Trockengewichte als Ammoniumsalze oder Aminosäuren.

Anderseits bewirkt ein Zusatz von Aneurin mit Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle nach einer anfänglichen Förderung später eine deutliche Hemmung des Wachstums. Es sind heute aus der Literatur verschiedene Fälle solcher Hemmungen bekannt. Zum ersten Male wurden sie 1935 von Schopfer und Moser (13) an *Rhizopus*-Arten, besonders bei *Rhizopus suinus,* beobachtet und 1938 von Robbins und Kavanagh bestätigt (vgl. Schopfer, 9). Moser (5) zeigte, daß hier beide Aneurinkomponenten hemmen, allerdings Pyrimidin bedeutend stärker als Thiazol. Schultz, Atkin und Frey (14) fanden, daß ein bestimmter Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* durch Zusatz von Aneurin gehemmt wurde. Thiazol hemmte in diesem Falle nicht, Pyrimidin nur schwach, dagegen wirkten Pyrimidin + Thiazol ebenso stark wie Aneurin. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Melin und Norkrans (3) an einem Mykorrhizapilz, *M. R. atrovirens.* Die Hemmung ist hier quantitativ. Thiazol wirkt ebenfalls, wenn auch schwächer als Pyrimidin. Melin und Midén (2) geben auch für *Morchella conica* an, daß gelegentlich die Wachstumsgeschwindigkeit in den Kontrollen etwas größer war als in den Aneurinkolben. Möglicherweise handelt es sich auch hier um eine Hemmung durch Aneurin, doch trat diese Erscheinung bei ein und demselben Stamme nicht immer auf. Bei *Trichoderma* hemmte Pyrimidin im allgemeinen etwas schwächer als Aneurin, während Thiazol überhaupt keine Wirkung ausübte. Die Verhältnisse liegen also mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle genau umgekehrt wie mit Nitraten, wo Pyrimidin schwächer fördert als Aneurin.

Es ist wohl möglich, daß Hemmungserscheinungen durch Aneurin bei Pilzen häufiger auftreten, als man bisher annahm. Sie sind jedoch nicht ohne weiteres nachzuweisen, einmal deshalb, weil sie oft nicht sehr ausgeprägt sind oder auch, weil sie nur unter bestimmten Bedingungen nachzuweisen sind. Auch bei dem am besten bekannten Fall dieser Art, bei *Rhizopus,* ist die Hemmung durch die Zusammensetzung der Nährlösung bedingt; sie tritt z. B. nach Janke und Sorgo nicht auf, wenn als Stickstoffquelle Ammoniumtartrat verabreicht wird (Schopfer, 9).

Bei *Rhizopus* gelang es Schopfer (10), die durch Aneurin bedingte Hemmung durch Zusatz von Mesoinosit aufzuheben. Er konnte ferner den wichtigen Nachweis erbringen, daß *Rhizopus suinus* in den ersten Entwicklungsstadien durch Aneurin eindeutig gefördert wird. Die Zeitspanne der Förderung läßt sich durch Variation der Versuchsbedingungen verlängern oder verkürzen. Schopfer gelangte auf Grund dieser Untersuchungen zu einer dynamischen Auffassung der Wuchsstoffwirkung, eine Ansicht, die sich für die weitere Forschung auf diesem Gebiete sicher fruchtbar auswirken wird.

Auch bei *Trichoderma* ist diese Periode der anfänglichen Förderung angedeutet, doch wäre sie wahrscheinlich übersehen worden, wenn wir nicht durch das Beispiel von *Rhizopus* veranlaßt worden wären, die ersten Entwicklungsstadien besonders genau zu verfolgen.

Über den Mechanismus der durch Aneurin bedingten Hemmung sind bisher in der Literatur höchstens Andeutungen gemacht worden. Moser (5) begnügt sich mit der Annahme einer Giftwirkung im allgemeinen Sinne. Melin und Norkrans weisen darauf hin, daß die Hemmung während der ersten 10 Tage des Versuches kaum bemerkbar war, « was dafür spricht, daß die genannten Stoffe nicht toxisch gewirkt haben ». Sie vermuten, daß das Wachstum durch die Bildung gewisser Stoffwechselprodukte im Zusammenhang mit der Aneurinwirkung herabgesetzt wurde.

Bei *Trichoderma* dürfte es sich um einen ähnlichen Fall handeln. Wir betrachten hier die Hemmung nicht als eine direkte Aneurinwirkung, sondern als die Folgeerscheinung einer solchen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß hier durch die Zugabe von Pyrimidin oder Aneurin die Bildung von Ammoniak stark gefördert wurde, was schließlich zu einer Wachstumshemmung führte. Ferner glauben wir, daß hier Ammoniak an sich als toxische Substanz wirkt und daß die Hemmung nicht mit einer Verschiebung des pH in alkalischer Richtung zusammenhängt, denn es konnte in andern Versuchen bei viel höhern pH-Werten ein bedeutend stärkeres Wachstum festgestellt werden. Dagegen hängt die Gelbfärbung der Aneurinkulturen wohl mit der Veränderung des pH zusammen. Mit diesen Vermutungen ist natürlich der eigentliche Mechanismus der Hemmung noch nicht erklärt; es wären in dieser Richtung weitere Untersuchungen notwendig.

## Zusammenfassung.

1. *Trichoderma viride* wächst in synthetischen Nährlösungen mit Zellulose als Kohlenstoffquelle. Durch verschiedene Maßnahmen kann das Wachstum des Pilzes gehemmt werden, ohne daß dabei die enzymatische Wirksamkeit verloren geht.

2. In synthetischen Nährlösungen mit Nitraten als Stickstoffquelle bewirken Aneurin und Pyrimidin eine schwache Wachstumsförderung, während Thiazol nicht wirkt.
3. Mit Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle, besonders mit Ammoniumzitrat, zeigt sich mit Aneurin und Pyrimidin zuerst eine schwache Förderung, die später in eine deutliche Hemmung übergeht.
4. Ähnlich wie Methylaneurin wirken Äthylaneurin, Azetylaneurinchlorid und Aneurinkarbonsäuremethylester. Iso-Aneurin und Thiochrom haben keine Wirkung.
5. Mit Ammoniumzitrat als Stickstoffquelle bilden Pyrimidin- und Aneurinkulturen größere Mengen von Ammoniak als die Kontrollen. Wahrscheinlich wird dadurch das Wachstum gehemmt, und zugleich kann damit — wenigstens in einem gewissen pH-Bereich — eine Veränderung der Farbe der Kulturen von Grün nach Gelb verbunden sein.

---

## Literatur.


1. Bisby, G. R. Trichoderma viride Pers. ex Fries. and notes on Hypocrea. Trans. British Myc. Soc. **23,** 149—168. 1939.
2. Melin, E. und Midén, G. Morchella conica, ein Aneurin-autotropher Pilz. Svensk Bot. Tidskr. **35,** 333—336. 1941.
3. Melin, E. und Norkrans, B. Über den Einfluß der Pyrimidin- und der Thiazolkomponente des Aneurins auf das Wachstum von Wurzelpilzen. Svensk Bot. Tidskr. **36,** 271—286. 1942.
4. Milburn, Th. Über Änderungen der Farben bei Pilzen und Bakterien. Zentralbl. Bakt. II, **13,** 129—138, 257—276. 1904.
5. Moser, W. Die Trennung der Wirkstoffe vitaminischer Natur des Weizenkeimes. Diss. Bern. 1940.
6. Niethammer, A. Studien über die Pilzflora böhmischer Böden. Archiv f. Mikrobiologie **4,** 72—98. 1933.
7. Okada, Y. On the distribution of Trichoderma in the soils of various types of vegetation on Mt. Hakkoda. Sci. Rep. Tôkohu Univ. IV, **13,** 271—279. 1938 (Ref. in Berichte der Biol. **50,** 549. 1939).
8. Schopfer, W. H. Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins $B_1$. Ergebn. der Biologie **16,** 1—172. 1939.
9. — Recherches sur le besoin en facteurs de croissance et le pouvoir de synthèse de Rhizopus suinus. C. r. Séances Soc. Phys. et Hist. nat. Genève **59,** 101—106. 1942.
10. — Les facteurs de croissance pour Rhizopus suinus. Déterminisme et relativité des pouvoirs de synthèse. Verh. Schweiz. Naturf. Gesellsch. Sitten, S. 122—123. 1942.
11. — La question des vitamines considérée comme problème de physiologie générale. Mitteil. Naturf. Gesellsch. Bern aus dem Jahre **1941,** 73—103. 1942.

12. Schopfer, W. H. und Blumer, S. Zur Wirkstoffphysiologie von Trichophyton album Sab. Ber. Schweiz. Bot. Gesellsch. **53,** 409—456. 1943.
13. Schopfer, W.-H. et Moser, W. Recherches sur la concentration et la séparation des facteurs de croissance de micro-organismes contenus dans le germe de blé. Protoplasma **26,** 538. 1936.
14. Schultz, A. S., Atkin, L. and Frey, C. N. Thiamine, Pyrimidine and Thiazole as Bios Factors. Jour. americ. chem. Soc. **60,** 490. 1938.
15. Spradling, M. Penetration of Trichoderma lignorum into sapwood of Pinus taeda. Jour. Agr. Res. **52,** 541—546. 1936. (Ref. in Ber. Biol. **39,** 1936.)
16. Stapp, C. und Bortels, H. Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu. Zentralbl. Bakt. II, **90,** 28—66. 1934.
17. Traaen, A. E. Untersuchungen über Bodenpilze aus Norwegen. Nyt Magazin Naturvidenskaberne **52,** 19—121. 1914.
18. Waksman, S. A. and Hutchings, I. J. Associative and antagonistic relationships in the decomposition of plant residues. Soil Sci. **43,** 77—92. 1937.
19. Weindling, R. Trichoderma lignorum as a parasite of other soil fungi. Phytopath. **22,** 837—845. 1932.
20. — Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of Trichoderma lignorum on Rhizoctonia solani and other soil fungi. Phytopath. **24,** 1153—1179. 1934.