

Untersuchungen über die chemischen Bedingungen für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane bei einigen Hefen.

Von

Kendo SAITO, *Rigakuhakushi.*

I. Einleitung.

Aus den Untersuchungen von KLEBS und seiner Schule geht hervor, dass die verschiedensten Algen und Pilze lange Zeit kultiviert und dabei durch Aenderung der chemischen Bedingungen gezwungen werden können, je nach dem Willen des Experimentators geschlechtliche oder ungeschlechtliche Fortpflanzungsorgane zu bilden. Was die Schimmelpilze anbetrifft, so hat BACHMANN (I) bei *Thamnidium elegans* ermittelt, dass die Nährbedingungen zur Bildung resp. Unterdrückung bestimmter Sporangienformen zu führen vermögen; die Ueberfütterung mit stickstoffhaltigen Substanzen veranlasst neben den Endsporangien dieser Mukorinee dichotom verzweigte Seitenäste mit kleinen, früh erscheinenden Sporangien, während die an Kohlenhydraten oder Fetten reichen Nährsubstrate dahin wirken, dass die Sporangien grösser werden und sich mit zahlreichen Sporen, Kolumella und partieller Verquellung der Membran versehen. Nach RACIBORSKI (I) ist die Wachstumsweise des *Basidiobolus ranarum* sehr reaktionsfähig gegen chemische Substanzen. Von seinen Untersuchungen ist hier besonders zu erwähnen, dass der Pilz in einer Nährlösung mit Methylalkohol, Glyzerin, Erythrit, Dulzit, Mannit, Galaktose, Milchzucker, Inulin, Glykogen oder Stärkekleister eine lebhaftere Zygotenbildung erfolgen lässt.

Ueber den chemischen Einfluss des Nährstoffes auf die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane fand KLEBS (I) bei *Eurotium repens*, dass die Ausbildung der Konidienträger sehr von dem Vorhandensein gewisser Nährstoffe abhängt, wobei die Quantität und Qualität dieser wichtig sind; besonders ist eine gewisse Zuckerkonzentration oder ein gewisser Kohlenhydratreichtum des Substrats erforderlich. Ein Zusatz von anorganischen Salzen wie Kalisalpeter, Kochsalz, wirkt in ähnlicher Weise wie Kohlenhydrate, so dass man dadurch die Schwelle der Zuckerkonzentration herabdrücken kann. Die Ausbildung reifer Perithezien ist an eine grössere Menge von Nahrung gebunden als die der Konidien; am reichlichsten erscheinen die Perithezien in 20% Glukose. Nach KLEBS ist die Bildung der Sporangien von *Mucor racemosus* in sehr hohem Grade von der Quantität und Qualität der äusseren Ernährungsbedingungen unabhängig, aber bezüglich der Gestalt seiner Sporangienträger zeigt er deutliche Beeinflussung durch Zuckerkonzentration. Auch die Bildung der Gemmen wird ausser durch die Temperatur auch durch die Quantität und Qualität der Nährstoffe beeinflusst.

KLEBS (II) ermittelte über die chemischen Reizwirkungen auf die Ausbildung von Sporangien und Zygoten bei *Sporodinia grandis* folgendes. Stickstoffreiche Substrate begünstigen die Sporangienbildung, während die Zygotenbildung besonders durch Kohlenhydrate unterstützt wird, allerdings je nach dem geometrischen Bau der Moleküle von angewandten Zuckern und Alkoholen nicht in gleicher Weise, so: Dextrose, Fruktose, Saccharose, Galaktose, Maltose, Dulzit, Mannit, Glyzerin und Dextrin sind als Erreger der Zygotenbildung zu bezeichnen, während andere, zum Teil den ebengenannten isomere Verbindungen unwirksam sind, wie Laktose, Raffinose, Sorbit, Sorbinose, Isodulzit, Inulin, Stärke, Lichenin und Glykogen. Spezifisch günstig für die Zygotenbildung sind noch die sauren Salze von organischen Säuren, besonders der Aepfel- und Weinsäure. Bei den einzelnen Stoffen sind aber die unteren Konzentrationsgrenzen für die geschlechtliche Fortpflanzung nicht gleich. Auch die die Zygotenbildung begünst-

tigenden Stoffe sind im Vereine mit gewissen Stickstoffquellen äusserst anzuverlässig hinsichtlich der Zygotenbildung geworden.

An derselben Pilzart beobachtete FALCK (I) den bedeutsamen Einfluss der Konzentration auf die Zygotenbildung. Nach ihm ist die genügende Ernährung als allgemeine, die Konzentrationswirkung als spezielle Bedingung der Zygotenbildung wirksam. Es wurde also beobachtet, dass in einem künstlichen Nährsubstrat, das alle für das Leben von *Spörodinia grandis* nötigen Nährstoffe in geringen Mengen enthält, durch eine einseitig gesteigerte Zugabe von Traubenzucker (25—50%) oder Pepton, mit Ausnahme weniger Salze von allen löslichen Körpern die Zygotenbildung herbeigeführt wird.

Die Zoosporenbildung von *Saprolegnia mixta* wird nach KLEBS (III) durch plötzliche Nahrungsentziehung ausgelöst, und das Myzel bleibt in stetig erneuerter Nährlösung steril. In nahrungsarmen Medien, in denen Zoosporenbildung vereinzelt oder gar nicht stattfindet, geht jedoch ein kräftiges Myzel in wenigen Tagen zur Oogonienbildung über. Durch Versetzung des Myzeliums in 0.1% Leucin oder 0.05—0.1% Haemoglobinlösung wurde eine ausgezeichnete Oogonienbildung beobachtet, welche besonders durch Phosphate befördert wird, die zugleich auch für die Entstehung der Antheridien notwendig sind.

Je besser die Nährtauglichkeit eines Stoffes ist, desto niedriger liegt das Minimum der Konzentration, bei dem neben Wachstum eben die Zoosporenbildung auftritt. Dadurch erhält man einen ungefähren Masstab für den relativen Nährwert der Substanzen. Aus seinen Versuchen geht hervor, dass Eiweisstoffe, sowie Aminosäuren als besonders günstige Nahrungsmittel wirken und dementsprechend erst in sehr verdünnten Lösungen Zoosporenbildung gestatten. Auch Oogonienbildung kommt niemals von selbst, wenn ein Myzelium beständig die Zufuhr frischer Nahrung hat. Gemmenbildung wird wesentlich durch starken Nahrungsmangel veranlasst. Im wesentlichen wurden seine Beobachtungen bestätigt von OBEL (I) bei *Achlya decorata* und von HORN (I) bei *Achlya polyandra*.

KAUFFMAN (I) hat bei einigen Saprolegniaceen-Arten ermittelt, dass die Antheridienbildung in Gegenwart bestimmter organischen

Verbindungen wie Leucin, Haemoglobin nicht nur durch Phosphate, sondern auch durch andere anorganische Salze wie Kalisalpete, Calciumnitrat ausgelöst wird. Die Bedingungen für die Ausbildung geschlechtlicher Fortpflanzungsorgan'e sind nach der spezifischen Natur des Organismus verschieden, so dass die Pilzarten sowohl morphologisch als auch physiologisch von einander unterscheidbar sind. In Kulturen von *Saprolegnia mixta* in Leucinslösungen wurde die Ausbildung von antheridientragenden Oogonien durch den Zusatz von Calciumnitrat, Calciumphosphat und Magnesiumsulfat stark befördert, während in Lösungen mit Natrium- oder Ammoniumphosphat nicht nur keine Geschlechtsorgane entstehen, sondern jene ihre Entwicklung noch verzögern. *Saprolegnia hypogyna*, bei welcher gewöhnlich keine Antheridien gebildet werden, kann unter geeignetem Ernährungszustande zur Entwicklung solcher induziert werden. Dafür sind wirksam Trikaliumphosphat, Kalisalpete, Dinatriumphosphat, Calciumphosphat und Calciumnitrat im Vereine mit Haemoglobin.

In seiner allgemeinen Betrachtung über die Fortpflanzungsphysiologie der Pilze fasst KLEBS (IV) die Bedeutung der Ernährungsverhältnisse für die Fortpflanzung in der Weise zusammen, dass dieser Lebensprozess mit um so grösserer Intensität eintritt, je besser die Ernährung des vegetativen Teils vorher war, und dass die wesentliche und nächste Veranlassung für den Eintritt der Fortpflanzung eine Nahrungsänderung von der Umgebung ist. Gegenüber jeder ungünstigen Veränderung in der Qualität und Quantität der Nährstoffe, gegenüber dem Zusatz irgendwie nachteilig wirkender Substanzen ist zuerst das Wachstum weniger empfindlich als die Fortpflanzung.

Durch die schönen Untersuchungen BLAKESLEE's (I) an Mukorineen wurde es konstatiert, dass in dieser Pilzgruppe homothallische und heterothallische Arten vorhanden sind; aus dieser Tatsache schliesst er, dass bei Mukorineen die Zygosporienbildung wesentlich durch die erblichen Eigenschaften einzelner Arten bedingt wird, und die äusseren Bedingungen nur sekundäre Einflüsse ausüben. Ueber den Einfluss äusserer Bedingungen stimmen aber seine Ergebnisse im wesentlichen mit denen von

KLEBS an *Sporodinia grandis* überein. Selbst beim Zusammenwachsen von (+) und (-) Myzelien einer heterothallischen Art tritt die Zygotenbildung nur auf bestimmten Nährböden auf.

Bei *Zygorhynchus Mölleri*, einem typisch oligotrophen *Mucor*, kann man nach WISNIEWSKI (I) durch Nahrungsmangel die Bildung der Sporangien und das Uebergewicht der Zygosporen verursachen. So erleichtern hohe Temperatur (ca. 22°C), schwache Konzentration des Substrates und Lichtmangel die Zufuhr der Nährmittel, mithin auch deren Anhäufung in den äeralen Hyphen, und aus diesem Grunde begünstigen diese Faktoren die Bildung von Zygosporen, während bei umgekehrten Bedingungen Sporangien entstehen.

An einigen Mukorineen-Arten hat NAMYSLOWSKI (I) Versuche angestellt. Seine Resultate decken sich in den Hauptzügen, von wenigen Einzelheiten abgesehen, vollkommen mit den von KLEBS an *Sporodinia grandis* gemachten; vor allem in den Fällen, in welchen es sich um den Einfluss der Qualität und Quantität des Nährstoffes handelt. Obwohl das Verhalten zu den äusseren Umständen je nach der spezifischen Natur der einzelnen Art sich unterscheidet, so tritt die Abhängigkeit der Fruktifikationsweise von der Konzentration des Nährmediums sehr deutlich auf. Bei einer Konzentration, höher als die für die gegebene Art günstigste, verringert sich die Zahl der Zygoten oder sie sinkt endlich auf Null. Statt dessen entstehen nur Sporangien, welche bei noch höherer Konzentration wieder schwinden können, und jetzt entwickelt sich nur das Myzelium sehr langsam und in geringer Menge.

An *Mortierella polycephala* hat DAUPHIN (I) gleichfalls den günstigen Einfluss von Hexosen, und zwar von Dextrose und Laevulose, auf die Ausbildung von Zygosporen und Sporangien kennen gelernt. Von 20—60% Dextrose an tritt nur Stylosporen- und Sporangienbildung auf, aber ohne Zygosporen gebildet zu haben.

Was die Sporenbildung der Bakterien anbetrifft, nahmen BUCHNER (I) und SCHREIBER (I) als morphogenen Reiz für diesen Lebensprozess die Nahrungsentziehung an, nach MIGULA

(I) dagegen wird die Sporenbildung durch die Einwirkung von angehäuften schädlichen Stoffwechselprodukten ausgelöst. SELTER (I) und MATZUSCHITA (I) haben die Frage wieder bearbeitet und stellten sich auf die Seite BUCHNER's. Die Bakteriensporen sind also im gewissen Sinne als ein Erzeugnis ungünstiger Verhältnisse aufzufassen. (Vergl. KRUSE I, S. 137 und BENECKE I, S. 116).

MATZUSCHITA hat auch den Einfluss der Ernährung als allgemeine Bedingung für die Sporenbildung von Bakterien untersucht und im allgemeinen die Regel von KLEBS an Schimmelpilzen bestätigt; nach ihm tritt die Sporenbildung von Bakterien mit desto grösser Intensität ein, je mehr sich die Nahrung nach ihrer Qualität wie Quantität der für die Spezies optimalen chemischen Zusammensetzung nähert.

Bei den Hefepilzen sind die allgemeinen Bedingungen für die Sporenbildung bekanntlich dank den Untersuchungen HANSEN's festgestellt worden. Er hebt also wichtige Faktoren hervor: 1) Verwendung von jungen lebenskräftigen Zellen; 2) Zutritt von Luft; 3) eine ziemlich hohe Temperatur. Was den Nahrungsentzug anbelangt, so hält HANSEN (I, III) ihn nur als einen wichtigen Faktor unter vielen und er selbst hat hervorgehoben, dass die Sporenbildung unter verschiedenen Bedingungen stattfindet. Nach seiner Ansicht bereitet sich die Hefezelle im allgemeinen erst zur Sporenbildung vor, wenn sie sich nicht länger durch Sprossung vermehren kann, und dies tritt nicht nur ein, wenn es ihr an Nahrung fehlt, sondern auch, wenn ihre Entwicklung in dem einen Ueberschuss von Nahrung enthaltenden Substrate vor sich geht. Er hat also darauf aufmerksam gemacht, dass unter Umständen selbst wohlernährte, auf Würzgelatine wachsende Zellen an den Rändern der Vegetation gewiss ebenso gut wie in deren Mitte bei der Sporenbildung eingehen können. Nach KLEBS (V) ist aber die Beobachtung von HANSEN so verständlich, dass die an der Impfstelle massenhaft sich anhäufenden Zellen die Nahrung an der Stelle sehr rasch verbrauchen und die oberen Schichten der Zellen nicht mehr mit dem Substrat in Berührung kommen. Selbst die peripher gelegenen Zellen können

sehr wohl eine Nahrungsverminderung erfahren haben, bevor ihnen aus der Umgebung frische Nahrung zugeführt werden kann. Er hat die schnellere Sporenbildung in durchlüfteten Kulturen gegenüber nicht durchlüfteten so erklärt, dass in den ersteren ein intensiveres Wachstum erfolgt, durch das schneller eine Nahrungsverminderung erreicht wird. Nach ihm ist die günstige Wirkung der optimalen Temperatur auf die Sporenbildung nur durch seine Wirkung, den Nahrungsmangel zu beschleunigen, erklärlich. KLEBS betrachtet demgemäss den entscheidenden Grund für das Auftreten von Fortpflanzungsorganen an Stelle des vorhergehenden Wachstums in quantitativen Veränderungen der für alle Gestaltungsprozesse wichtigen allgemeinen äusseren Bedingungen.

Wenn bei den meisten Saccharomyceten auch unstrittig der Uebergang von ernährten Zellen auf die Gipsblöcke in destilliertem Wasser die Sporenbildung auslösen lässt, so ist die merkwürdige Tatsache schon mehrmals mitgeteilt worden, dass bei einigen Arten die Askosporen in gewöhnlichen Gipsblockkulturen oft ganz ausbleiben oder nur sehr spärlich entstehen, während sie von den Vegetationen, die auf den in Bierwürze gestellten Gipsblöcken entstehen, oder auf verschiedenen guten Nährböden wie Möhren Nährgelatine etc. sehr reichlich geliefert werden. Als Beispiele dafür möchten wir die folgenden Fälle angeben.

BARKER (I) beruft sich besonders auf die von ihm festgestellte, wichtige Tatsache, dass die von ihm untersuchte *Willia anomala*-Form ihre Sporen nicht bei völligem Nahrungsmangel bildet, sondern nur dann, wenn ihr noch Nahrung, z. B. Bierwürze, zur Verfügung steht. Wenn *Saccharomyces cerevisiae* I anscheinend sich umgekehrt verhielt, so erklärt er dies daraus, dass auf Gipsblöcken in Würze oder in nur wenig verdünnter Bierwürze die Kohlensäureentwicklung durch diese Hefe eine allzu starke war und die Sporenbildung verhinderte. Als Hauptresultat geht aus seinen Untersuchungen hervor, dass eine kräftige, wohlgenährte Zelle die grösste Fähigkeit, Sporen bilden zu können, besitzt, und dass nur ausnahmsweise alte ausgehungerte Zellen Sporen erzeugen. Er teilte die Bedingungen der Sporenbildung in äussere und innere. Die äusseren Bedingungen sind 1) der Einfluss der Luft, 2) der

Einfluss der Temperatur und 3) der Einfluss der Nahrung. Die inneren Bedingungen sind 1) diejenigen, welche die Lebenskraft der Zellen betreffen und 2) diejenigen, welche gewisse histologische Prozesse betreffen. BARKER hat aber nicht, wie KLEBS (V) mit Recht eingewendet hat, zu zeigen vermocht, dass seine Hefen bei unveränderter Nahrung Sporen bilden. Eine Herabsetzung der Nahrungsaufnahme von aussen kann auch in diesen Fällen als auslösender Faktor für die Sporenbildung wirken. Eine reichliche Sporenbildung von *Saccharomyces cerevisiae* I in Laktoselösung beweist doch nicht die Nährtauglichkeit dieses Zuckers; denn nach den Untersuchungen von LINDNER und SAITO (I) wird Laktose von dieser Hefe gar nicht assimiliert. Seine Versuche bestätigen also eher die Ansicht KLEBS's, dass die Hefezellen bei Nahrungsmangel zur Fortpflanzung schreiten.

Eine Rasse von Weinhefen bildet nach OSTERWALDER (I) leichter Sporen in Birnenmost als auf Gipsblöcken. Bei einer, *Willia Saturnus* ähnlichen Hefe aus dem Saft der Pisangblätter hat SARTORY (I) in ihren Reinkulturen keine Sporen bekommen, wohl aber dann, wenn eine Bakterie vorhanden war. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der chemischen Einwirkung eines unbekanntes Stoffwechselproduktes, welches von der Bakterie oder beim Zusammenleben beider Organismen gebildet wird. Auch bei einigen *Zygosaccharomyces*-Arten, z. B. *Zygosacch. Priorianus* (KLÖCKER, I), *Zygosacch. mandshuricus* (SAITO, I), *Zygosaccharomyces*-Arten aus japanischer Soya-Sauce-Maische (TAKAHASHI und YUKAWA, I) bleibt die Askosporenbildung in gewöhnlichen Gipsblockkulturen oft ganz aus oder sie entsteht nur sehr spärlich, während die Sporen auf geeigneten Nährböden reichlich gebildet werden.

Trotzdem wissen wir über den chemischen Einfluss der Ernährung auf die Sporenbildung der Hefezellen noch nicht viel. Von TULLO (I) wurden vergleichende Versuche mit *Saccharomyces ellipsoideus* II angestellt, wonach besonders gewissen Zuckerarten eine günstige Beeinflussung der Sporenbildung zukommt, während andere direkt jede Sporulation unterdrücken. Am schnellsten setzt nach seinen Untersuchungen die Sporenbildung bei der An-

wesenheit von Laktose und Rhamnose als Kohlenstoffquelle in der Nährlösung ein; wenig Sporen entstanden in den Versuchen mit Glukose, Fruktose und Galaktose. Saccharose und auch Maltose wirken hemmend, so dass jede Sporulation bei ihrer Anwesenheit ausbleibt.

Ich habe nun die chemischen Bedingungen für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane näher erforscht bei folgenden Arten:

Zygosaccharomyces mandshuricus SAITO.

Schizosaccharomyces octosporus BEIJERINCK.

Saccharomyces mandshuricus SAITO.

Um den Einfluss der Ernährung auf das Wachstum und die Fortpflanzung von Hefen zu ermitteln, wurden sie auf gereinigtem Agar-agar mit den zu prüfenden Nährstoffen herangezogen. Beim Zubereiten reinen Agars giesst man das 2%ige Agar in flache Schalen, schneidet die erstarrte Schicht in schmale Bänder und bringt diese in grossen Stöpselflaschen in destilliertes Wasser. Nach genügender Auslaugung der aus dem Agar herausdiffundierenden Stoffe werden die Agarstreifen von neuem zusammengeschmolzen und in der üblichen Weise mit Nährstoff gemischt. Wenn die chemische Zusammensetzung der Nährlösung bekannt ist, benutzte ich immer auf diese Weise zubereitetes Agar, während bei den Versuchen mit Nährlösungen von chemisch unkontrollierbaren Zusammensetzungen das käufliche Agar ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

Nach dem Zubereiten des Nähragars wurde es im geschmolzenen Zustande in Mengen von 5 resp. 10 ccm in ziemlich grosse Reagenzgläser verteilt und nach Sterilisierung auf schiefer Ebene erstarren lassen. Dann habe ich mit einer Platinöse eine kleine Menge frischer Hefe über die Oberfläche gestrichen.

Um Wiederholung zu vermeiden, sei hier von vornherein bemerkt, dass dort, wo Nährlösungen von genau bekannter Zusammensetzung benutzt wurden, und keine Nährsalze von vornherein vorhanden waren, immer 0.25 % Monokaliumphosphat und 0.125% Magnesiumsulfat zugesetzt waren. Die benutzten Chemikalien wurden, wo nichts anderes bemerkt, im reinen Zustande angewandt; verschiedene davon wurden aus der

chemischen Fabrik von E. MERCK in Darmstadt bezogen. Auch wurden einige Verbindungen im hiesigen Laboratorium von Herrn KATAYAMA und Herrn NAKAHASHI dargestellt; für die Liebenswürdigkeit dieser beiden Herren danke ich verbindlichst auch an diesem Ort.

Um das Verhalten der Hefen gegen die von der Umgebung einwirkende plötzliche Nahrungsänderung zu prüfen, wurde, wo nichts anders bemerkt, die Aussaat von jungen Zellen auf gewöhnliche Gipsblöcke aufgetragen. Gleich darauf goss man behutsam soviel sterilisierte Lösung von einer bestimmten Substanz oder destilliertes Wasser in die Schale ein, dass nach andauerndem Zuwarten die Blöcke nicht bloss vollständig durchfeuchtet wurden, sondern auch noch in einer Schicht der Flüssigkeit standen. Wenn die Substanzen wie oxalsaure Salze, Natronlauge, Natriumphosphat u. s. w. in der Gipslösung chemisch umgesetzt werden, habe ich statt der Gipsblöcke ein kleines Filterpapier, das auf einer gleichgrossen, dicken Schicht entfetteter Watte liegt, mit gutem Erfolg verwendet. Selbstverständlich ist es notwendig, bei jedem Versuche neue Gipsblöcke bezw. Filterpapier zu verwenden.

Jedesmal benutzte ich die in Kojiabsud (Ball. 12°) gezüchteten Hefezellen, welche binnen 48 Stunden sich entwickelten. Von dem entstandenen Bodensatz wurde die Kulturflüssigkeit abgegossen und ersterer in destilliertem Wasser im Laufe von 2 Stunden bei niedriger Temperatur ausgewaschen. Natürlich ist dabei ein nicht geringer Verlust an Hefezellen unvermeidlich. Die gewaschene Hefemasse wurde sofort in sterilisierte Petrischalen gegossen und mit kleiner Pipett auf Gipsblöcken bezw. Filterpapier ausgesaet.

Da, wo ein Wachstum oder eine Askenbildung bemerkt wurde, musste auch die Intensität derselben zum Ausdruck gebracht werden, und wir finden daher verschiedene Zahlen O, I, II, III in den Tabellen eingetragen. Sie bezeichnen also:

- O = fehlend.
- I = mässig.
- II = lebhaft.
- III = sehr lebhaft.

Es gibt hier keine ganz scharfen Grenzen. Die Abstufungszahlen haben selbstverständlich nur relativen Wert. Für manche Fälle ist es noch nötig, einige Zwischenstufen einzuschalten. O-I wurde angewandt, wo es uns zweifelhaft war, ob die winzigen Hefekolonien, welche auf schiefem Nähragar bemerkt wurden, auf Entwicklung durch zugeführte Nährstoffe oder auf zufällig mit dem Impfmateriale dahin gelangte Nährstoffe zurückzuführen seien. Mit dem gleichen Zeichen bezeichnete ich jene Fälle, in denen ganz vereinzelte Asken gebildet wurden. Die Intensität der Askenbildung wurde nach dem Zahlenverhältnis zwischen den vegetativen Zellen und Asken in mikroskopischen Präparaten beurteilt.

Bei diesen Untersuchungen ist es ebenfalls notwendig, mit sporogener Rasse zu arbeiten, sonst fallen die Resultate negativ aus.

II. Spezieller Teil.

I. *Zygosaccharomyces mandshuricus* Saito.

Diese Art aus der Maische des mandshurischen Branntweins ist für diese Studien sehr geeignet. Die kopulierten Zellen gleichen im allgemeinen in ihrer Gestalt und Grösse einander, und die Sporen können in beiden Zellen ebenso gut gebildet werden. Die Durchmusterung der Präparate von jungen Kulturen, welche eben zur Askenbildung fortgeschrittene Zellen enthalten, zeigt uns sofort, dass die Kopulationsschläuche nicht gleichzeitig angelegt werden, sondern vielmehr die eine Zelle zuerst einen Fortsatz treibt und an der gerade gegenüberliegenden Stelle der anderen Zelle die entsprechende Fortstzbildung veranlasst. So kommt es, dass die kopulierten Zellen die bekannte doppelkugelförmige Gestalt annehmen. Wenn die Fortsätze sich nicht genau gegenüber entwickeln, so krümmen sie sich gegen einander, bis sie sich treffen. In glücklichen Fällen konnten wir gerade in Kopulation eingetretenen Zellen beobachten, wobei sich in der Länge der Fortsätze eine unfehlbare Verschiedenheit konstatieren lässt. Welche Ursachen das Wachstum und Zusammentreffen der Kopulationsfortsätze bedingen, ist unbestimmt, doch halte ich es

für sehr wahrscheinlich, wie bei der Zygotenbildung der *Spirogyra*-fäden (HABERLANDT, I), auch für *Zygosaccharomyces* zu vermuten, dass ein chemischer Reiz bei der Wachstumsrichtung der Kopulationsschläuche mitwirkt.

Wie ich in meiner früheren Arbeit (SAITO, I) schon erwähnt habe, bildet diese Hefe oft reichliche Parthenoasken. Dies kommt dadurch zustande, dass die Kopulationsschläuche unter gewissen, noch unaufgeklärten Umständen sich nicht miteinander vereinigen, sondern dass die Zellen bald nach der Fortsatzbildung mit Sporen besetzt werden. In der Struktur verhalten sich die Parthenosporen vollkommen gleich wie die in den kopulierten Zellen entstandenen Sporen, nur sind sie im Durchschnitt kleiner als diese. Ich habe zahlreiche Kulturen durchmustert, doch gelang es mir weder nur normale Asken noch Parthenoasken allein zu finden. Beide treten meistens gemischt auf; das Zahlenverhältnis zwischen ihnen weicht aber nach den Züchtungsbedingungen ab. In der folgenden Darstellung bezeichne ich die durch Kopulation entstandenen Asken mit Z und die Parthenoasken mit P. Die Kulturen standen in einem Thermostat von 26—28°C., und der obere Teil der Strichkultur wurde nach 7 Tagen mikroskopisch untersucht, wenn nichts anderes angegeben ist.

Bei allen diesen Betrachtungen kommt es vor allem darauf an, die Bedeutung der chemischen Bedingungen für das erste Entstehen der Fortpflanzungsorgane, ausserdem gelegentlich für ihre weitere Ausbildung bis zur Reife hervorzuheben.

Zygosaccharomyces mandshuricus wird auf den für die Hefezüchtung gewöhnlich verwendeten Nährböden—festen oder flüssigen—leicht kultiviert. Es wurde zunächst bei der Züchtung dieser Hefe beobachtet, dass sie auf ungehopftem Bierwürzeagar (Bierwürze 0.5—12° Ball.) und GORODOKOWA'schem Nähragar sehr schnell eine grosse Menge von Askosporen in normalerweise kopulierten Zellen bildet, während auf Kojiabsudagar keine Andeutung der Askenbildung auftritt. Diese interessante Tatsache hat mich veranlasst, mit einem Gemisch von Nährböden in verschiedenen Mengenverhältnissen die Askenbildung zu prüfen. Das Resultat ist in Tabelle I niedergeschrieben.

TABELLE I.

Mischverhältnis von Kojiabsudagar (12° Ball)		Würzeagar (12° Ball.)	Wachstum	Askenbildung
1	0		III	o
1	$\frac{1}{5}$		III	Z I, P III.
1	$\frac{1}{2}$		III	Z II, P III.
1	1		III	Z III, P III.
1	2		III	Z III, P III.
1	5		III	Z III, P III.
0	1		III	Z III, P III.
Kojiabsudagar	Bouillonagar		Wachstum	Askenbildung
1	0		III	o
1	1		III	Z III, P I.
1	2		III	Z III, P I.
1	3		III	Z III, P I.
1	4		III	Z III, P III.
GORODOKOWA'sches Nähragar			III	Z III, P III.

Wie man aus der Tabelle sieht, kann ein Zusatz von Bierwürzeagar in $\frac{1}{5}$ Menge auf Kojiabsudagar eine reichliche Askenbildung hervorbringen. Wenn mehr Bierwürzeagar zugesetzt wird, so nehmen die normalerweise entstandenen Asken in der Anzahl zu. Auch ein Gemisch von Kojiabsudagar und Bouillonagar in gleicher Menge war imstande, eine reichliche Askenbildung zu veranlassen.

Auf sehr alten Kojiabsudagarkulturen (Kojiabsud 1—12° Ball.) fand ich aber eine Menge Asken, die aus kopulierten Zellen entstehen; daraus darf man nicht sogleich auf die günstige Wirkung des Kojiabsuds für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane schliessen. Der Grund dafür liegt ganz anderswo, denn in solchen alten Kulturen befindet sich bereits eine grosse Menge Zellen, die abgestorben und in Autolyse begriffen sind, und der Inhaltstoff dieser Zellen kann, wie Tabelle II anzeigt, bei den noch lebenden Zellen die Fortpflanzung veranlassen.

Von anderen Nährböden unkontrollierbarer Zusammensetzung wurden die folgenden verwendet; die Resultate gibt Tabelle II.

TABELLE II.

Nährboden	Wachstum	Askenbildung
Mohrrube	III	Z III, P III.
Hefewasseragar mit 0.5% Dextrose	III	Z III, P III.
Takadiastase 1%	5% Dextrose und anorganische Nährsalze	Z III, P III.
Pepsin 2%		
Pancreatin 1%		
Papayotin 1%		
Emulsin 1%		
Myzeliendekokt von		
<i>Aspergillus Oryzae</i>	1% Dextrose	Z III, P III.
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Penicillium glaucum</i>		
<i>Mucor racemosus</i>		

Es zeigt sich sofort, dass die Enzyme als Stickstoffquelle einen ungleichen Wert für die Entwicklung der Asken haben. Takadiastase, Pancreatin gestatten eine massenhafte Askenbildung dieser Hefe, dagegen vermag sie mit Pepsin sehr wenige Asken zu bilden, und Papayotin sowie Emulsin haben kein positives Resultat hervorgebracht. Wenn wir aber statt Kojidekoktagar die Kojidekoktgelatine verwenden, so kommt die Sporenbildung binnen wenigen Tagen sowohl in den nach Kopulation entstandenen als auch in parthenogenetisch entwickelten Asken besonders reichlich vor.

Da in den oben erwähnten Versuchen eine Beeinflussung der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane bei *Zygosaccharomyces mandshuricus* durch die Nährstoffe konstatiert wurde, nahm ich nun Versuche mit Nährböden von chemisch bestimmter Zusammensetzung vor. Zuerst sind verschiedene Stickstoffverbindungen zur Untersuchung herangezogen worden.

In dieser Versuchsreihe wurde der Nährboden so zubereitet, dass man das Glukoseagar mit den anorganischen Nährsalzen und der zu prüfenden Stickstoffverbindung in bestimmter Konzentration mischt. Von den verwendeten Stickstoffverbindungen wurde das Wittepepton als die vorzüglichste Stickstoffquelle erkannt, und eine massenhafte Askenbildung kommt bereits nach 3—4 Tagen auf Peptonagar zum Vorschein.

Während für die Gärungsindustriehefen nach den Untersuchungen von HAYDUCK, die auch durch LAURENT, HEINZELMANN und WIJSMANN bestätigt wurden, Asparagin als vortreffliche Stickstoffquelle zu bezeichnen ist (Vgl. LAFAR, [I], Bd. IV, S. 101), erweist es sich für unsere Hefe als nicht besonders geeignet. Zur Erklärung dieser Erscheinung vermute ich, wie PRINGSHEIM (I, S. 187) bei einigen Hefen betont hat, dass das Pepton Atomkomplexe enthält, die der Hefe ihr Eiweiss ungespalten einverleiben können. Die Gärungsgewerbehfen sind demnach zur Assimilierung des Amidostickstoffes als gut geeignet zu betrachten. Unser *Zygosaccharomyces* verhält sich in dieser Beziehung wie die DOMBRÓWSKI'schen Milchhefen (I), indem sie eher zur Assimilierung der höheren Abbauprodukte des Eiweisses geeignet sind. Im Verhalten gegen die Stickstoffquellen nimmt unsere Hefe also eine Mittelstellung zwischen dem *Schizosaccharomyces octosporus*, der nur natürlich vorkommendes Eiweiss assimilieren kann, und den Gärungsgewerbehfen, die die tieferen Abbauprodukte bevorzugen.

Auf Peptonagar treten bald reichliche Parthenoasken auf. Verhältnismässig reichliche Askenanlagen werden nicht reif, sondern gehen früher oder später zugrunde, und sie autolysieren sich sogar beim Altern der Kulturen. Bei solchen abgestorbenen Zellen ist das Glykogen noch in reichlicher Menge vorhanden. Dagegen bleiben die Zellen, welche keinen Fortsatz gebildet haben, lange am Leben. Es ist also anzunehmen, dass der Geschlechtsakt schon in ihrem Anfang eine tiefgreifende Veränderung im Protoplasma hervorgebracht hat. Wenn die Askenanlagen noch jung sind, können sie nach Rückübertragung in gute Nährböden

wiederum aussprossen und vegetativ weiter wachsen. Es ist auch bei *Zygosaccharomyces* so verständlich, dass der normale Reifungsprozess der fortsatzbildenden Zellen ein Vorgang ist, welcher zum Tode führt, wenn nicht die Kopulation mit einander oder die parthenogenetische Entwicklung diesen Vorgang paralyisiert. Wie bei Infusorien, Algenschwärmern, tierischen Eizellen liefert der *Zygosaccharomyces* ein Beispiel zur Bestätigung des allgemeinen Satzes, dass der Zustand der Befruchtungsbedürftigkeit überall nur von kurzer Zeitdauer ist. Wenn die Zellen, die für die Konjugation vorbereitet sind, nicht rechtzeitig sich kopulieren, so gehen sie zugrunde.

Die Konzentration von Wittepepton können wir in ziemlich weiten Grenzen ändern, ohne dadurch einen besonderen Einfluss auf die askenbildende Tätigkeit der Hefe zu bemerken. Selbstverständlich wächst die Hefe bei niederer Konzentration des Peptons kümmerlich, aber sie kann doch eine verhältnismässig grosse Anzahl von Asken erzeugen. Tabelle III folgt im Anschluss daran.

TABELLE III.

Nährboden	Wachstum	Askenbildung
Pepton 0.01%	o-I	Z III, P III.
„ 0.95 „	o-I	Z II, P III.
„ 0.1 „	o-I	Z I, P III.
„ 0.5 „	I	Z I, P III.
„ 1 „	III	Z I, P III.
„ 2 „	III	Z I, P III.
„ 3 „	III	Z I, P III.
„ 4 „	III	Z I, P III.
„ 5 „	III	Z I, P III.

Von anderen Eiweissarten wurden Placentapepton („Höchst“), Gluten, Haemoglobin, Hefenukleinsäure in 1%iger Konzentration verwendet. Die Resultate sind in Tabelle IV angegeben.

TABELLE IV.

Nährboden		Wachstum	Askenbildung
Placentapepton	} 5% + Dextrose	III	Z I, P I.
Gluten		o-I	o
Haemoglobin		I-II	Z I, P I.
Hefenukleinsäure		o-I	P, Z o-I

Ausgenommen das Placentapepton ist die Ausnützbarkeit der verwendeten Eiweißstoffe als Stickstoffquelle für diese Hefeart gering, es treten dabei keine oder wenige Asken auf.

Tabelle V gibt einen näheren Aufschluss über meine Versuche, welche ich bei Verwendung anderer Stickstoffverbindungen in einprozentiger Konzentration vorgenommen habe.

TABELLE V.

N-quelle (1%)	C-quelle (Dextrose %)	Wachstum	Askenbildung
Ammoniumchlorid	5	I	o
Ammoniumsulfat	„	I	o
Ammoniumnitrat	„	I	o
Kaliumnitrat	„	o	o
Harnstoff	„	o	o
Biuret	„	o	o
Azetamid	„	o-I	o
Oxamid	1	o-I	o
Succinamid	„	o-I	o
Harnsaures Natrium (gesättigt)	„	o-I	o
Hippursaures Natrium	„	o-I	o
Allantoin	„	o-I	o
Alloxanthin	„	o	o
Xanthin	„	o	o
Aethylurethan	„	o-I	o

TABELLE V. (Fortsetzung.)

N-quelle (l %)	C-quelle (Dextrose %)	Wachstum	Askenbildung
Guanidinkarbonat	1	o-I	o
Ammoniumoxalat	5	I	o
δ-Amino-n-Valerian- säure	1	I-II	o
Asparagin	5	I	o
Asparaginsäure (neutralisiert mit Soda)	1	I-II	o
Glutaminsäure (neutralisiert mit Soda)	„	II	o
Alanin	5	II-III	o
	1	II	o
	0.5	I-II	o
	0.2	I	o
	0.1	I	o
	0.08	o-I	o
	0.06	o-I	o
	0.04	o-I	o
	0.02	o-I	o
Phenylalanin	1	II	o
Leucin	„	I-II	o
Tyrosin	5	o-I	o
Glykokoll	„	o-I	o
Leucyl-glycin	1	I-II	o
Glycyl-l-tyrosin (Seidenpepton)	0.5	I-II	o
Kreatin	„	o	o
Kreatinin	„	o	o

Die Aminosäuren sind für das Wachstum des *Zygosaccharomyces mandshuricus* mehr oder weniger gut geeignet, besonders bei der Verwendung von Alanin, Phenylalanin und Glutaminsäure entwickelt sich die Hefe auf dem Striche in ziemlich grossem Belag, der aber im Verhältnis zu den Kulturen mit gleichprozentigem Pepton kleiner ist. Die Hefe assimiliert auch Peptide wie Leucyl-glycin („Kahl-

baum“) und Glycyl-l-tyrosin („Hoechst“) mässig gut, welche dabei vorerst in einzelnen Aminosäuren abgespalten werden müssen. Die Spaltbarkeit der Peptide durch diese *Zygosaccharomyces*-Art wurde von mir in folgender Weise nachgewiesen. Eine Lösung von Seidenpepton („Hoechst“) wurde mit einer kleinen Menge von Hefezellen unter Zusatz von Toluol bei Zimmertemperatur stehen lassen. Dabei schieden sich die Tyrosinkristalle aus, und es trat allmählich eine Trübung der obenstehenden Flüssigkeit ein.

Selbst bei gutem Wachstum auf aminosäurehaltigen Nährböden kommt die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane eigentlich nicht vor.

Mit Säureamiden kann dieser *Zygosaccharomyces* seinen Stickstoffbedarf nicht ausfüllen. Da der Stickstoff in der Form von Ammoniumsalzen assimiliert werden kann, so ist die Untauglichkeit des Harnstoffes dadurch verständlich, dass diese Verbindung durch die Hefe nicht in Ammoniak abgespalten wird. Ich war nicht imstande, an der Azetondauerhefe das Vorhandensein des harnstoffspaltenden Enzyms nachzuweisen. Hippursäures Natrium gestattet der Hefe nur zweifelhaftes Wachstum, und die enzymatische Spaltung dieser Substanz in Glykokoll und Benzoesäure wurde auch nicht konstatiert. Andere Verbindungen wie Xanthin, Alloxanthin, Kreatin, Kreatinin u. a. brachten sowohl kein Wachstum als auch keine Askenbildung hervor.

Es sei hier bemerkt, dass die Zellengestalt durch die Ernährungsbedingungen stark beeinflusst wird. Auf einen Aminosäure- oder Ammoniumsalz enthaltenden Nähragar gesaet, sprossen die Zellen von dieser Hefe an jeder beliebigen Stelle und sitzen in vielen kleinen Bläschen um die Mutterzelle herum oder senden einen hantelförmigen, kurzen Sprossenschlauch aus. Charakteristisch für die Sprossverbände ist ein grosser Unterschied in der Grösse der Glieder. Fast sämtliche Zellen sind glykogenfrei. Dagegen sind die Zellen auf Bierwürzeagar und Peptonzuckeragar kugelig bis oval, einzeln stehend und glykogenreich. Dies ist ein Beispiel der Abhängigkeit der Zellengestalt von den Ernährungsbedingungen, welche Kossowicz (I) einmal bei *Saccharomyces ellipsoideus* I beobachtet hat.

Um den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Wachstum und die Askenbildung dieses *Zygosaccharomyces* zu untersuchen, wurden Kohlenhydrate, mehrwertige Alkohole und organische Säuren im Vereine mit Wittepepton verwendet. (Siehe Tabelle VI).

TABELLE VI.

C-quelle	Konzentration	Wachstum	Askenbildung	Bemerkungen
Dextrose	0 (Kontrolle)	o—I	P I.	} Bald sterben die Parthenoasken meistens ab, und es treten normale Asken sehr reichlich auf.
	0.01-0.05	o—I	} Z III, P III.	
	0.1-0.25	I		
	0.5	II		
	1	III		
	3-10	III		
	15-25	II-III		
Laevulose	0.5	II	Z III, P III.	
	5	III	Z I, P III.	
Galaktose	0.1	I	P III.	
	5	I-II	Z I, P III.	
Mannose	0.1	I-II	P III.	
	5	III	Z I, P III.	
Sorbose	5	I	P II.	
Maltose	1-40	o—I	P I.	
Saccharose	1	I	Z I, P III.	
	5	I-II	Z I, P III.	
Laktose	5	o—I	P I.	
Raffinose	5	I	P I.	
Xylose	5	I	P II.	
Arabinose	5	I	P II.	
Rhamnose	5	I	P II.	
α -methylglykosid	5	o—I	P III.	
Glykogen	5	o—I	P I.	
Inulin	5	o—I	P I.	

TABELLE VI. (Fortsetzung).

C-quelle	Konzentration	Wachstum	Askenbildung	Bemerkungen
Dextrin	5	I	P I.	Zellen sind meistens plasmolysiert und abgestorben.
Glyzerin	0.1-0.25	I	Z I, P III.	
	0.5-5	II		
	10-15	I		
	20-25	I	P I.	
	30-40	o	o	
Dulzit	5	I	P III.	
Mannit	5	I	P III.	
Sorbit	0.5	I-II	Z I, P I.	
Querzit	0.5	I-II	Z I, P II.	
	5	I-II	P I.	
Erythrit	5	o-I	P I.	
Aesculin	0.5-5	o-I	P I.	
Arbutin	1	I	P I.	
Salizin	1	I-II	Z I, P II.	
Amygdalin	0.5	I	Z I, P I.	
	5	I	Z I, P III.	
Weinstein	0.25-1	o-I	P I.	
Saures weinsaures Ammonium	0.25-1	o-I	o	
Weinsäure	0.25	o-I	o	
Bernsteinsaures Kalium	0.25-1	o-I	P I.	
Zitronensäure	0.25	o-I	P I.	
Zitronensaures Kalium	0.25-1	o-I	P I.	
Milchsäure	0.25	o-I	P I.	
Milchsaurer Kalk	0.1-1	o-I	P I.	
Essigsaures Natrium	0.5-1	o-I	P I.	
Weinsaures Natrium	0.1-1	o-I	o	

Wie man aus Tabelle VI sieht, vermag dieser *Zygosaccharomyces* organische Säuren und ihre Salze gar nicht zu assimilieren.

Die günstigsten Nährböden sind Substrate mit Kohlenstoffquellen in der Form von Dextrose, Laevulose, Mannose, auch von Galaktose, und zugleich gestatten sie eine reichliche Entwicklung der Fortpflanzungsorgane. Saccharose, welche durch unsere Art invertiert wird, veranlasst ebenso eine gute Entwicklung und Askenbildung wie die gerade erwähnten Hexosen. Trotz des schlechten Wachstums der Hefe im Nährboden mit geringer Menge von Dextrose (0.1—0.25%) entwickeln sich die Fortpflanzungsorgane noch reichlich.

Während bei Raffinose, Sorbose, Glycerin, Mannit, Dulzit, Querzit, Sorbit, Rhamnose, Amygdalin, Arbutin, Salizin, Xylose, Arabinose eine mässig gute oder schwache Entwicklung an den Tag kommt, vermag unsere Hefe Glykogen, Maltose, α -methylglykosid, Laktose, Inulin Aesculin und Erythrit nicht zu assimilieren.

In allen diesen Kulturen beobachtete ich die Askenbildung; die positiven Resultate entscheiden aber wenig, weil auf Peptonagar mit keiner besonderen Kohlenstoffquelle noch wenige Fortpflanzungsorgane gebildet werden. Welche der hier untersuchten Substanzen für die Askenbildung notwendig sind, darauf werde ich nochmals zurückkommen.

Wie schon oben erwähnt, sind Aminosäuren und Ammoniumsalze ungeeignet, die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane unseres *Zygosaccharomyces* zu veranlassen, wenn diese Verbindungen mit Dextrose dem letzteren dargeboten werden. Wie verhält sich aber die Sache, wenn die Kohlenstoffquelle in verschiedener Weise geändert wird? Als Stickstoffquelle wurden 1% Ammoniumsulfat und Alanin, als Kohlenstoffquelle verschiedene Kohlenhydrate und Alkohole in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Selbst wenn die Hefe wachsen konnte, beobachtete ich in keinem Falle eine Andeutung von Askenbildung. (Siehe Tabelle VII).

TABELLE VII.

N-quelle	C-quelle	Konzentration der C-quelle	Wachstum	Askenbildung
1%ige Ammoniumsulfat	Dextrose	0.25-0.5	o-I	o
		1	I	o
		5	I-II	o
		10-20	I	o
	Laevulose	10	II	o
	Galaktose	10	II	o
	Maltose	10	o-I	o
	Saccharose	10	II	o
	Laktose	10	o	o
	Arabinose	10	o	o
	Glycerin	0.1-5	I	o
		10	I-II	o
		15	I	o
		20	o-I	o
		30	o	o
Mannit	10	I	o	
1%ige Alanin	Dextrose	5	II-III	o
	Laevulose	„	II-III	o
	Galaktose	„	II	o
	Mannose	„	II-III	o
	Maltose	„	o-I	o
	Saccharose	„	II-III	o
	Laktose	„	o-I	o
	Raffinose	„	o-I	o
	Inulin	„	o-I	o
	Rhamnose	„	o-I	o
	Dulzit	„	o-I	o
	Sorbose	„	II	o
Xylose	„	o-I	o	

TABELLE VII. (Fortsetzung).

N-quelle	C-quelle	Konzentration der C-quelle	Wachstum	Askenbildung
1%ige Alanin	Arabinose	5	o—I	o
	Dextrin	„	II	o
	α -methylglykosid	„	o—I	o
	Glykogen	„	o—I	o
	Glyzerin	0.1-5	o—I	o
	Mannit	5	I—II	o
	Kontroll(^{ohne} C-quelle)	—	o	o

Wenn Ammoniumsalze und Aminosäuren in einer günstigen Konzentration mit zuckerhaltigem Nährboden gemischt wurden, kam die Entwicklung des *Zygosaccharomyces mandshuricus* im Vergleich mit Kulturen auf einem Nährboden mit sehr geringer Menge Wittepepton viel üppiger vor; trotzdem versagte die Askenbildung im erstgenannten Nährboden. Die Ursache des Sterilbleibens auf einem Aminosäure oder Ammoniumsalz enthaltenden Nährboden liegt also nicht in der mit kümmerlichem Wachstum verknüpften, schlechten Ernährung der Hefezellen, sondern in der ungünstigen chemischen Bedingung für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane.

Durch die oben erwähnten Untersuchungen wurde die Tatsache festgestellt, dass andere Stickstoffverbindungen als einige Eiweiss-substanzen niemals die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane unseres *Zygosaccharomyces* veranlassen können, selbst wenn sie ein gutes Wachstum gestatten.

Ob die Ammoniumsalze und Aminosäuren für die Askenbildung dieser Hefe bloss ungeeignet sind, oder ob die betreffenden Substanzen in spezifischer Weise dem Fortpflanzungsprozess eher hinderlich wirken, wurde durch die folgenden Versuche aufgeklärt.

Zu den guten Nährböden wie Peptonzuckeragar, Bierwürzeagar, auf welchen die Fortpflanzungsorgane leicht und reichlich ausgebildet werden, wurden verschiedene Stickstoffverbindungen

in gewissen Konzentrationen hinzugefügt und nach bestimmter Kulturdauer auf Askenbildung untersucht. Tabelle VIII (A-B) zeigt die gewonnenen Resultate.

TABELLE VIII. A. 5% Glukóse+1% Peptonagar.

Hinzugefügte Verbindung	Konzentration	Wachstum	Askenbildung	Bemerkungen
(Kontrolle)	—	III	P III, Z I	Nach 2 Tagen haben reichliche Asken angesetzt, die nach 4 Tagen mit Sporen besetzt sind.
Alanin	0.1	III	P III, Z I	
	0.5-1	III	o	
Leucin	0.1	III	P III, Z I	Nach 4 Tagen Askenanlegung und am 6 ten Tage Sporen vorhanden.
	0.5-1	III	o	
Harnstoff	0.1	III	P III, Z I	Nach 4 Tagen Askenbildung, und am nächsten Tage schon Sporen gebildet.
	0.5-1	III	P III, Z I	
Ammoniumchlorid	0.1	III	P III, Z I	Nach 4 Tagen Askenbildung, am nächsten Tage reichliche Sporen.
	0.5-1	III	o	
Ammoniumsulfat	0.1	III	P III, Z I	Wie bei 0.1% NH ₄ Cl.
	0.5-1	III	o	
Ammoniumphosphat	0.1	III	P III, Z I	Wie bei 0.1% NH ₄ Cl.
	0.5-1	III	o	
Ammoniumnitrat	0.1	III	P III, Z I	Nach 4-5 Tagen reichliche Asken angesetzt.
	0.5-1	III	o	
Saurer weinsaures Ammonium	0.1	III	P II	Wie bei 0.1% NH ₄ Cl.
	0.5	III	o	
Weinstein	0.5	III	P III	Nach 2 Tagen schon Asken gebildet, und am 4 ten Tage Sporen vorhanden.
Kreatin	0.5	III	P III, Z I	Wie bei Kontrolle.
Kreatinin	0.5	III	P III, Z I	

TABELLE VIII. B. Bierwürze (3° Ball.)-Agar.

Hinzugefügte Verbindungen	Konzentration	Wachstum	Askenbildung	Bemerkungen
(Kontrolle)	—	III	Z III, P I.	Am 2ten Tage schon Askenbildung.
Ammoniumchlorid	0.1	III	P I	Am 9ten Tage Askenbildung zuerst bemerkt.

TABELLE VIII. B. Bierwürze (3° Ball.)-Agar. (Fortsetzung).

Hinzugefügte Verbindung	Konzentration	Wachstum	Askenbildung	Bemerkungen
Ammoniumchlorid	0.5-1	III	o	
Ammoniumnitrat	0.1	III	Z III, P I.	Am 5 ten Tage Asken gebildet.
	0.5-1	III	o	
Ammoniumsulfat	0.1	III	P I	Wie bei 0.1% NH ₄ Cl.
	0.5	III	P I	
	1	III	o	
Harnstoff	0.1	III	Z II, P I.	Am 5 ten Tage } Asken gebildet.
	0.5-1	III	Z II, P I.	
Leucin	0.1	III	Z III, P I.	Nach 5 Tagen } Asken gebildet.
	0.5-1	III	Z III, P I.	
Alanin	0.1	III	Z III, P I.	Nach 5 Tagen } Asken gebildet.
	0.5-1	III	Z III, P I.	
Asparagin	0.1-1	III	Z II, P I.	Nach 5 Tagen Asken gebildet.
Saures weinsaures Ammonium	0.1	III	Z II, P III.	} Wie bei Asparagin.
	0.5-1	III	P I	
Weinstein	0.1-1	III	Z III, P I.	Wie bei Asparagin.

Wie diese Tabelle zeigt, wird die Askenbildung durch den Zusatz von Ammoniumsalzen stark verzögert. Wenn die letzteren in einer Konzentration von 0.1 Prozent vorhanden waren, fand sich noch jedenfalls Askenbildung, aber im Gegensatz zur Kontrollkultur trat sie spärlich oder langsam auf. Bei zunehmender Konzentration beobachteten wir grösstenteils keinen Ansatz von Asken, ausgenommen die Fälle, in denen 0.5%ige Ammoniumsulfat oder 0.5—1% saures weinsaures Ammonium mit Bierwürzeagar gemischt wurde. Wenn Aminosäuren in einer Konzentration von 0.5—1% auch die Askenbildung auf Bierwürzeagar gar nicht beeinflussen können, lassen sie in Peptonzuckeragar den betreffenden Lebensprozess vollständig aufhören. Dies weist darauf hin, dass die Fortpflanzung der Hefe je nach ihrem übrigen Ernährungszustande nicht gleichartig von anderen chemischen Substanzen beeinflusst wird.

Da nach den Untersuchungen von F. EHRlich (I, II) die Aminosäuren, bevor sie von der Hefe assimiliert werden, in Alkohole (bezw. Säure), Ammoniak und Kohlendioxyd abgespalten werden müssen, so kann man aus den obenerwähnten Versuchen leicht schliessen, dass die hemmende Wirkung der Aminosäuren auf die Askenbildung von dem produzierten Ammoniak abhängig ist. Ich war sogar imstande, in leucinhaltigen Kulturen die Entstehung des Amylalkohols nachzuweisen. Je schneller und je mehr Ammoniak abgespalten wird, desto stärker scheint die Aminosäure die Askenbildung unseres *Zygosaccharomyces* zu hemmen. Diese Vermutung wird noch durch die Tatsache bestätigt, dass der von dieser Hefe nicht desamidierbare Harnstoff und auch Weinstein hierbei keinen Einfluss auf ihre askenbildende Tätigkeit ausgeübt haben.

Was den Einfluss der osmotischen Wirksamkeit verschiedener Stoffe auf die Askenbildung anbetrifft, so wurden Natriumnitrat, Kochsalz, Kaliumchlorid, Kalisalpete und Glyzerin in Bezug darauf geprüft, welche in verschiedenen Konzentrationen mit Bierwürzeagar (Bierwürze 3° Ball.) gemischt waren. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle IX angegeben.

TABELLE IX.

Konzentration (%) Substanz	0	1	5	10	15	20	25
Natriumnitrat	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z II, P I (II)	Kein Wachstum		
Kaliumnitrat	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	P III (III)	P III (III)	P III (III)
Natriumchlorid	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z II (II)	—	—	—
Kaliumchlorid	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (II)	Z I, P I (II)	—	—	—
Glyzerin	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z III, P I (III)	Z II, P I (III)	Z II, P II (II)

(Die Zahlen in Klammern zeigen die Wachstumsintensität in 14 Tagen).

Diese Versuchsreihe zeigt uns, dass die Hefe in hochkonzentrierten Nährböden wie denjenigen mit 25% Kaliumnitrat oder Glycerin noch gut wachsen und die Fortpflanzungsorgane sowohl an der Ränder wie in der Mitte des Striches ausbilden kann. Doch stimmt die Verzögerung des Wachstums nicht nur mit der osmotischen Wirksamkeit der angewandten Konzentrationen überein, sondern es übt die chemische Natur der Substanzen einen Einfluss aus. So hemmt 15% Natriumnitrat (Salpeterwert 1.18) schon die Entwicklung dieser Art, während 25% Kaliumnitrat (Salpeterwert 0.99) noch üppiges Wachstum und reichliche Askenbildung gestattet. Diese Versuche bestätigen aber im wesentlichen die Angabe über die osmophile Eigenschaft unserer Hefeart. (Vgl. SAITO I).

Bei einer beständig fortgehenden Erneuerung der Nahrung bleibt die Fortpflanzung unserer Hefe aus. Auf ein entfettetes Wattestück, welches mit einer Menge Bierwürze getränkt ist, impfte ich die Hefe, und jeden Tag einmal wurde die Watte mit der entwickelten Hefe in eine neue Bierwürze übertragen und schwach geschüttelt, so dass der ganze Heferasen fortdauernd mit genügendem Nährstoff und Luftzufuhr versehen war. In diesem Zustande kommt die Entwicklung der Hefe üppig vor, während die Askenbildung vollständig ausbleibt. Die zur Kontrolle in einer und derselben Bierwürze ungeschüttelt gestandene Kultur bildete auf der Watte einen dicken Belag, und darin beobachtet man bald reichliche Asken. Selbst im letzteren Falle erzeugt die Hefe umso schneller die Asken, je niedriger die anfängliche Konzentration der Bierwürze ist. (Siehe Tabelle X).

TABELLE X.

Bierwürze 20 ccm.		Askenbildung bemerk nach		Bemerkungen
0.5°	Ball	1½	Tagen	
1°	„	„	„	
2°	„	2½	„	
3°	„	4½	„	
4°	„	6	„	
10°	„	12	„	} Es entwickelte sich nach einigen Tagen ein dicker Belag auf der Watte.
12°	„	12	„	

Diese Tatsache beweist, dass *Zygosaccharomyces mandshuricus* unter den für das Wachstum günstigen äusseren Bedingungen nicht die Fortflanzungsorgane zu bilden vermag. Nach diesen Beobachtungen ist es auch verständlich, warum die Askenbildung von dem oberen Teil der Nähragarstriche aus nach dem unteren fortschreitet. Denn die Nahrungsstoffe werden viel schneller der ersteren dünnen Agarschicht entzogen als der letzteren dicken. Ueberträgt man eine einmal gebildete Askenanlage auf einen neuen Nährboden, so sprosst sie wieder aus und kann vegetativ wachsen, wenn der Fortpflanzungsakt im Protoplasma noch nicht genügend fortgeschritten ist. Wenn die Askenanlage aber etwas alt ist, sprosst sie auch beim Darbieten neuer Nährstoffe nicht mehr vegetativ aus, sondern schreitet entweder zur Reife oder geht bald zugrunde.

Wie verhalten sich die jungen Zellen unserer Hefeart gegen den von der Umgebung einwirkenden plötzlichen Nahrungsmangel? Dass die Askenbildung auf den in destilliertes Wasser getauchten Gipsblöcken gar nicht oder nur vereinzelt eintritt, und dass sie auf denjenigen mit verdünnter Bierwürze ausnahmslos reichlich vorkommt, lässt uns daran denken, dass die plötzliche und gänzliche Entziehung der Nahrung bei unserer Hefe den Fortpflanzungsprozess auszulösen nicht imstande ist, sondern dass für den letzteren ein bestimmter chemischer Stoff in der Umgebung vorhanden sein muss. Wie KLEBS an der Entwicklung gewisser Fortpflanzungsorgane von Schimmelpilzen nachgewiesen hat, wirkt hier nicht ein ganzer, sondern ein teilweiser Nahrungsentzug auf die Askenbildung auslösend ein.

Nach vielfachen Untersuchungen gelang es mir, die für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane des *Zygosaccharomyces mandshuricus* notwendigen chemischen Verbindungen herauszufinden. Bei dieser Versuchsreihe wurde auf gewöhnlichen Gipsblöcken resp. Filterpapieren die Aussaat von jungen Zellen aus Kojiabsudkultur aufgetragen, und sogleich goss ich behutsam die sterilisierte Lösung der zu prüfenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen darauf. Die Kulturen standen im Thermostat von 26—28°C.

Sehr günstig für die Entstehung der genannten Fortpflanzungsorgane erwiesen sich zunächst Hexosen, namentlich Dextrose, Laevulose und Mannose; die Anzahl der gebildeten Asken ist aber nicht sehr gross. Ich fügte den Lösungen 0.25%ige Monokaliumphosphat zu. Dieser Zusatz beförderte merkwürdigerweise die Askenbildung, so dass bei vergleichenden Versuchen mit und ohne Zusatz von Monokaliumphosphat der Unterschied sehr auffallend war.

Bei den folgenden Versuchen wurden stets einer 0.25%igen Lösung von Monokaliumphosphat die zu prüfenden Stoffe zugesetzt; jede Verbindung wurde in den Konzentrationen von 0.05—5% verwendet, wenn das Löslichkeitsverhältnis es gestattet.

VERZEICHNIS DER UNTERSUCHTEN STOFFE.

(Die Askenbildung auslösenden Stoffe sind mit * bezeichnet).

Ammoniumchlorid	Rhamnose	Bernsteinsaures Kalium
Ammoniumnitrat	*Glyzerin	Fumarsäure
Ammoniumsulfat	*Mannit	Maleinsäure
Kaliumnitrat	Erythrit	Aepfelsäure
Kaliumsulfat	*Sorbit	Oxalsaures Kalium
Natriumchlorid	*Dulzit (bis 3%)	Akrylsaures Natrium
Kaliumchlorid	Glykol	Glykonsaurer Kalk
Natriumnitrat	Aethylalkohol	Glyzerinsaurer Kalk
Monokaliumphosphat	Amygdalin	Pepton-Witte
Dikaliumphosphat	Aesculin (gesättigt)	Haemoglobin
—	Salizin	Alanin
*Dextrose	Arbutin	Phenylalanin
*Laevulose	α -methylglykosid	Tyrosin
*Mannose	Hydrochinon	Glutaminsaures Natrium
*Galaktose	Brenzcatechin	Asparaginsaures Natrium
*Sorbose	Resorcin	Glykokoll
*Saccharose	Phloroglucin	Leucin
Maltose	Querzit	Hippursaures Natrium
Laktose	Inosit	Harnsaures Natrium
Trehalose	Weinsäure	Harnstoff
*Raffinose	Weinstein	Biuret
Dextrin	Saures weinsaures Am-	Azetamid
Inulin	Kaliumzitrat	Allantoin
Glykogen	Bernsteinsäure	Alloxanthin
Xylose	Milchsäure	Asparagin
Arabinose	Essigsäures Natrium	

Unter den hier angeführten Stoffen konnte ich nur bei Dextrose, Laevulose, Mannose, Galaktose, Sorbose, Saccharose, Raffinose, Glycerin, Mannit, Sorbit und Dulzit die Wirkung auf die Askenbildung mit aller Sicherheit wahrnehmen. Wir wollen nun die Wirkung der letztgenannten organischen Stoffe etwas näher ins Auge fassen.

In Tabelle XI ist die Wirkungsweise der betreffenden Substanzen für die Askenbildung angegeben; für die Tabelle gebe ich meist die Resultate nach 24 Stunden, wenn nichts anderes angegeben ist.

TABELLE XI.

Substanz	Konzentration (%)	Askenbildung	Bemerkungen
Dextrose	0.05-0.125	o-I	Erst nach 5 Tagen reichliche Asken.
	0.25	II	
	0.5-1	III	
	2.5-5	o	
Laevulose	0.05-0.125	o-I	Nach 5 Tagen viele Asken.
	0.25	II	
	0.5-1	III	
	2.5-5	o	
Mannose	0.05-0.125	o-I	Nach 5 Tagen viele Asken.
	0.25	II	
	0.5-1	III	
	2.5-5	o	
Galaktose	0.125-0.25	o-I	
	0.5-1	I	
	2.5-5	II	
Saccharose	0.05-0.125	o-I	Nach 5 Tagen viele Asken.
	0.25	II	
	0.5-1	III	
	2.5-5	o	
Sorbose	0.1-0.5	o	

TABELLE XI. (Fortsetzung).

Substanz	Konzentration (%)	Askenbildung	Bemerkungen
Sorbose	1	I	
	5	II	
Raffinose	0.1-0.25	o	Nach 3 Tagen ziemlich reichliche Asken.
	0.5-2.5	I	
		II	
Glyzerin	0.05-0.25	o-I	
	0.5-1	II	
	2.5-5	III	
Mannit	0.1-0.25	o-I	
	0.5-1	II	
	2.5-5	III	
Sorbit	0.1-0.25	o	
	0.5-1	I	
	5	II	
Dulzit	0.1-0.5	o	
	1	I	
	3	II	

Die Feststellung der unteren Konzentrationsgrenze war mit grossen Schwierigkeiten verknüpft, weil gerade bei solchen Bestimmungen die individuelle Verschiedenheit im physiologischen Zustande der auf Gipsblöcken ausgesaeten Hefezellen ins Gewicht fällt.

Was zunächst die askenbildende Geschwindigkeit der gleichzeitig aufgegangenen Zellen betrifft, so ist immer wieder beobachtet worden, dass unter gleichen äusseren Verhältnissen für die Fortpflanzung der einzelnen Zellen eine recht verschiedene Zeit erforderlich ist. Vereinzelte, am besten disponirte Zellen bilden zuerst Fortsätze, dann folgt eine grössere Anzahl von gut und mittelmässig disponirten Zellen. Die nachträglich fortsatzbildenden, schlecht disponirten Zellen entziehen sich im Laufe unserer Versuchszeit meist der weiteren Beobachtung.

Je mehr wir uns der optimalen Konzentration der betreffenden Substanzen nähern, desto grösser ist die Zahl der anscheinend gleichzeitig fortsatzbildenden Zellen. Dies ist so zu erklären, dass die Abänderung der Substanzkonzentration den zeitlichen Einfluss bis zu einem gewissen Grade ersetzt und dadurch die zeitigere Umwandlung einer entsprechenden Zahl von schlechter disponierten Zellen veranlasst. Selbst derselbe Reizgrad wirkt nicht auf alle Zellen gleichzeitig auslösend ein. Die Reizschwelle liegt für die einzelnen Zellen offenbar verschieden, so dass einige Zellen ohne nachweisbaren Stoffreiz schon zu Asken werden. Auf eine gleichartige Beschaffenheit der Zellen ist gar nicht zu rechnen, solange sich die letzteren im Alter und in den Zelleinschlüssen etc. ungleich sind. Auch das Kojiabsud, in welchem die Hefe kultiviert ist, kann nicht jedesmal gleich zusammengesetzt sein.

Im folgenden habe ich also das Konzentrations-Minimum für die untersuchten Substanzen so angegeben, dass ich einmal die Konzentration anführe, die binnen 24 Stunden eine mässige oder lebhaftige Askenbildung gestattet, zweitens jene, bei der der Prozess nicht oder nur vereinzelt beobachtet worden ist. Aus der Tabelle XI ergibt sich Folgendes:

Substanzen.	Konzentrations-Minimum.
Dextrose	
Laevulose	
Mannose	0.125—0.25 %
Saccharose	
Galaktose	"
Raffinose	
Glyzerin	0.25—0.5 %
Mannit	
Sorbit	
Sorbose	
Dulzit	0.5—1 %

Vergleicht man die Konzentrations-Minima der oben erwähnten Substanzen mit einander, so erhält man einen ungefähren Paralle-

lismus zwischen der Nährtauglichkeit und der Wirkung auf die Askenbildung. Da Dextrose, Laevulose und Mannose die vorzüglichsten Kohlenstoffquellen für diesen *Zygosaccharomyces* sind, so liegt das Konzentrations-Minimum für die Askenbildung am niedrigsten. Saccharose, die von unserer Art leicht invertiert wird und eben nahrhaft ist, zeigt auch einen gleichen Wert des Konzentrations-Minimums. Raffinose, welche auch hydrolysiert werden kann und dabei eine Hexose entstehen lässt, bringt ebenso eine gleiche Wirkung auf die Askenbildung hervor, aber wegen geringen Nährwerts liegt das Konzentrations-Minimum höher als bei den genannten Hexosen.

Da die isomeren Kohlenhydrate, wie Rohrzucker, Maltose und Laktose eine verschiedene Bedeutung für den Fortpflanzungsprozess von *Zygosaccharomyces* haben, so ist es auch bei diesem Falle bewiesen, dass geometrisch verschieden angebaute Verbindungen sich in der Auslösung des betreffenden Aktes, wie bei der Zygotenbildung von *Basidiobolus* (RACIBORSKI, I) und von *Sporodinia* (KLEBS, II), entgegengesetzt verhalten. Es ist aber bei unserem Falle die Erscheinung sehr einfach dadurch zu erklären, dass von den Disacchariden Maltose und Laktose durch unsere Hefeart gar nicht angegriffen werden; nach hydrolytischer Spaltung konnten sie also auf die Askenbildung eine positive Wirkung hervorbringen. Aus diesen Tatsachen kann man erkennen, dass die Hexosen für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane unserer Hefe eine besonders wichtige Bedeutung haben.

Wie Hexosen verhalten sich auch sechswertige Alkohole, die von den ersteren durch Reduktion dargestellt werden und im geometrischen Bau der Moleküle ganz ihnen entsprechen; je nach dem Nährwert für den *Zygosaccharomyces* sind sie in dem Konzentrations-Minimum für die Askenbildung verschieden. So wurde die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane beobachtet bei der Verwendung von Sorbit, Mannit und Dulzit. Von anderwertigen Alkoholen konnte die Auslösung der Askenbildung nur in Gegenwart von Glycerin konstatiert werden.

Obwohl Glukose und Glycerin die Fortpflanzung unserer Hefe auslösen können, versagt sie bei der Verwendung von Glukonsäure

und Glycerinsäure, welche auch nicht assimiliert werden. Dies zeigt uns, dass das Ersetzen des Alkohol-resp. Aldehydradikals in den erstgenannten Verbindungen durch Karboxyl die Fortpflanzung sowie das Wachstum unserer Hefe unmöglich macht.

Ausser den oben erwähnten Verbindungen wurde die Askenbildung auch in Gegenwart von Wittepepton (0.001—1%) im Vereine mit anorganischen Bestandteilen ausgelöst, wenn auch nur sehr spärlich und oft zuerst nach einigen Tagen auf Gipsblöcken. Es scheint mir nicht unmöglich, dass der Kohlenhydratrest, welcher im Eiweissmolekül vorkommt, die Ursache dieses Vermögens ist. Obwohl in diesem Falle die Asken sehr schwer und in geringer Anzahl erzeugt werden, befördert ein kleiner Zusatz von Dextrose den Fortpflanzungsprozess; so z. B. vermehrt sich die Askenanzahl schon beim Vorhandensein einer 0.001—0.005%igen Dextrose, und bei 0.05%iger Dextrose treten die Asken immer reichlich auf. In ähnlicher Weise wirkt auch das Mischen einer geringen Menge Pepton mit einem der oben erwähnten Kohlenhydrate und Alkohole. Mischungen von Dextrose, Pepton und Phosphat liefern also Substrate, die für die Fortpflanzung dieser Hefe besonders günstig sind. Deshalb treten die Askenanlagen binnen 24 Stunden mässig reichlich auf, wenn die Hefezellen aus Kojiabsudkulturen nur kurze Zeit in destilliertem Wasser aufbewahrt und nachher in Peptonlösung übergeführt werden. Denn solche Hefezellen sind noch nicht genügend von der in den Membranen imbibierten Nährlösung befreit worden, so dass die letztere im Vereine mit Pepton und Phosphat bei den Hefezellen die Entstehung der Fortpflanzungsorgane auslösen kann.

Meine Ergebnisse haben aber nur einen begrenzten Wert; sie gelten zunächst für die Bedingungen, unter denen die Versuche gemacht wurden. Bei diesen wurden die Hefezellen aus der Kojiabsudkultur nach genügendem Waschen mit Wasser auf Gipsblöcke gesät. Denn der gleiche Pilz kann bei der Kultur auf verschiedenartigen Substraten doch etwas verschiedene Eigenschaften erhalten. Wie meine Versuche beobachten liessen, gelang es mir jedoch bei Hefezellen, welche sich sowohl in Bierwürze als

in 5%iger Dextroslösung mit 1% Ammoniumsulfat, Asparagin, Alanin oder Pepton entwickelten, niemals Asken zu erhalten, wenn sie auf Gipsblöcken mit destilliertem Wasser gesetzt sind ; beim Vorhandensein von 1%iger Dextrose im Vereine mit 0.25%iger Monokaliumphosphat beobachtete ich jedesmal reichliche Askenbildung.

Um den Einfluss des Ernährungszustandes der Hefezellen zu erfahren, nahm ich die Bodensatzhefe aus verschiedenen alten (2—9 Tage) Kojiabsudkulturen; es zeigten sich bei Hefezellen in 1%iger Dextroslösung mit 0.25% Monokaliumphosphat junge Asken, die meist in 24 Stunden gebildet wurden. Bei Hefezellen in destilliertem Wasser trat keine Askenbildung auf.

Da der Zusatz von Monokaliumphosphat in Zuckerlösungen sich als sehr förderlich für die Askenbildung in Gipsblockkulturen erwies, fragte es sich jetzt, ob andere Salze die gleiche Bedeutung für die Askenbildung besitzen. Bei allen Versuchen wurden die Hefezellen, welche in Kojiabsud herangewachsen waren, benutzt; sie wurden nach Waschen auf sterilisierte Gipsblöcke oder Filterpapier ausgesaet. Stets wurden 20 ccm einer 1%igen Dextroslösung mit den zu prüfenden Salzen in 0.1—0.25%iger Konzentration versetzt; folgende Verbindungen wurden verwendet und die Ergebnisse nach 24 Stunden sind dabei angegeben.

Substanzen.	Askenbildung.
Monokaliumphosphat...	III
Calciumnitrat ...	o
Kaliumnitrat ...	I
Magnesiumsulfat ...	?
Kaliumsulfat ...	II
Dikaliumphosphat ...	II
Ammoniumphosphat ...	o
Natriumchlorid ...	o
Kaliumchlorid ...	I
Ammoniumnitrat ...	o
Ammoniumchlorid ...	o
Ammoniumsulfat...	o
Natriumnitrat ...	o
Dinatriumphosphat ...	I

Die Resultate der Versuche waren so eindeutig wie möglich. Denn in Dextroselosungen mit Ammoniumsalzen versagte die Askenbildung, wie schon oben erwähnt ist. Nur bei der Verwendung von Monokaliumphosphat erfolgte die lebhafteste Askenbildung; dagegen sind Dikaliumphosphat und Dipatriumphosphat entschieden weniger günstig. Die Kalisalze üben auf die Erzeugung der Asken eine mehr oder minder günstige Wirkung aus.

Wir möchten hier noch über die Veränderung der Gestalt und des Inhalts der Hefezellen nach dem Uebertragen auf die Gipsblöcke etwas sprechen. Die aus dem Kojiabsud herausgenommenen und genügend gewaschenen Hefezellen enthalten Glykogen nur in spärlicher Menge, so dass sie beim Behandeln mit verdünnter Jodjodkaliumlösung im Ganzen gelblich und stellenweise braunrot gefärbt werden. Nach der Uebertragung auf Gipsblöcke in Zuckerlösungen vakuolieren die Zellen, und in jeder Zelle erscheint Glykogen in grosser Menge, so dass eine platinösevolle Hefemasse mit Jodlösung sofort braunrot gefärbt wird, und darauf folgt die Fortsatzbildung in der Regel von einer Stelle der Zelle aus. Diese Veränderung wurde an allen Substanzen, in deren Gegenwart die Askenbildung ausgelöst wurde, ausnahmslos beobachtet.

Von anderen Zelleinschlüssen bemerkt man, dass der Kern, welcher in vegetativen Hefezellen gewöhnlich zentral gelagert ist, in den fortsatzbildenden Zellen meistens an der Basis des Fortsatzes gewandelt ist. Der Kern wurde nach dem Fixieren der Zellen mit Pikroformol und bei darauf folgender Färbung mit Eisenhaematoxylin untersucht. Aus dieser Art der Lagerung ist bei Hefezellen zu schliessen, dass der Kern, wie HABERLANDT bei anderen Pflanzenzellen konstatiert hat, bei ihrem Wachstum auch eine wichtige Rolle spielt. Eine solche Lagerung des Kernes ist auch in den zytologischen Arbeiten GUILLIERMOND's über andere *Zygosaccharomyces*-Arten und viele fortsatzbildende Hefezellen abgebildet.

Aus der Tatsache, dass die Hefezellen vor der Umwandlung in Asken zunächst reichlich Glykogen aufspeichern, darf man nicht

sogleich den Schluss ziehen, dass die glykogenhaltige Zelle unbedingt sofort sich zu Asken umwandeln kann. Denn die Hefezelle speichert beim Darbieten von Arabinose, Glykol u.s.w. eine mässige Menge Glykogen auf, aber ohne besondere Wirkung auf die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane beobachten zu lassen. Die beiden Lebensprozesse können also unabhängig voneinander verlaufen.

2. *Schizosaccharomyces octosporus* Beijerinck.

Kultiviert man auf festem Nährboden diesen *Schizosaccharomyces*, so werden die Sporen schnell und reichlich in den Askengebilden, welche durch Vereinigung zweier vegetativen Zellen entstehen. Auf Gipsblöcken im Wasser tritt aber die Sporenbildung viel sparsamer auf, was durch meine eigenen Versuche bestätigt wurde.

Der frische Bodensatz im Kojiabsud bildet nach dem Waschen mit Wasser auf gewöhnlichen Gipsblöcken gar keine oder nur vereinzelt Sporen, während die letzteren beim Vorhandensein von verdünntem Kojiabsud oder von Bierwürze bei 28°C nach 24 Stunden sehr massenhaft gebildet werden, so dass eine kleine Menge Hefezellen aus solchen Kulturen mit Jodlösung sich dunkelblau färbt. Es ist also vorläufig anzunehmen, dass bei der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane ein bestimmter chemischer Stoff unbedingt vorhanden sein muss.

Dieser *Schizosaccharomyces* charakterisiert sich noch durch sehr wählerisches Verhalten gegen die Stickstoffquelle; er assimiliert nur natürlich vorkommende Eiweissstoffe in Bierwürze, Rosinen, Kojiabsud, Hefewasser u.s.w., und es konnte auch unter sonst günstigen Bedingungen mit Pepton, Asparagin oder Ammoniumsalzen ein kaum sichtbares Wachstum erreicht werden. Von den Kohlenhydraten und Alkoholen verursachen Dextrose, Laevulose und Maltose ein kräftiges Wachstum, Galaktose, Mannit und Glycerin nur ein schwaches; Rohrzucker, Erythrit, Milchsücker, Raffinose, Dulzinit, Quercit, Arabinose und Inosit gar keins. (vgl. LINDNER [I], S. 495).

Für die Versuche über den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Entstehung der Fortpflanzungsorgane wandte ich vor allem Hefewasseragar mit den zu prüfenden Kohlenhydraten oder Alkoholen an. Ich benutzte stets 10 ccm Kulturgallerte, die sich erstarrt in Reagenzgläsern auf schiefer Ebene befand. Auf einem reinen Hefewasseragar tritt kein Wachstum auf. Die beigegebene Tabelle XII gibt näheren Aufschluss über meine Versuche, bei denen die obengenannten Kohlenstoffquellen, die von diesem *Schizosaccharomyces* assimiliert werden, auf ihre Bedeutung für die Sporenbildung geprüft wurden.

TABELLE XII.

Substanz	Konzentration	Wachstum	Askenbildung
Dextrose	0.05	o-I	o-I
	0.1	I	I
	0.5	I-II	I
	1	II	II
	3	II	III
	5-15	III	III
	20	II	III
Laevulose	0.05	o-I	o-I
	0.1-0.5	I	I
	1	II	II
	5-10	III	III
Galaktose	0.05-0.5	o	o
	1	o-I	o-I
	5	I	I
	10	I-II	I
Mannose	0.05	o	o
	0.1	I	I
	0.5-1	II	I
	5-10	II-III	III
Maltose	0.1-0.5	o-I	o-I
	1-5	I	I

TABELLE XII. (Fortsetzung)

Substanz	Konzentration	Wachstum	Askenbildung
Maltos	10	II	III
Glyzerin	0.5-1	o	o
	5-10	I	I
	15	I	o
Mannit	0.05-3	o	o
	5	I	I
	10	o	o

Aus dieser Tabelle ergibt sich als niedrigste Konzentration der Substanzen für die sichere Sporenbildung :

Dextrose	} 0.05-0.1
Laevulose	
Mannose	
Maltose... 0.5-1
Galaktose 1-5
Glyzerin	} 5
Mannit	

Nach diesem Versuche wirken Dextrose, Laevulose und Mannose, die für diesen *Schizosaccharomyces* besonders nahrhaft sind, ebenso förderlich auf die Entstehung der Fortpflanzungsorgane ein, denn 0.05-0.1%ige Konzentration genügt schon zur Sporenbildung. Die minder nahrhaften Maltose und Galaktose müssen schon in etwas höherer Konzentration angewandt werden ; noch mehr ist dies der Fall bei Glyzerin und Mannit.

Um den Einfluss von plötzlicher Nahrungsänderung auf die Fortpflanzung zu prüfen, habe ich junge Bodensatzzellen aus Kojiabsudkulturen herausgenommen und in 10 ccm-Lösungen der zu prüfenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen in

Petrischalen ausgesaet. Keine anorganische Substanz veranlasst Sporenbildung; nur bei 1–2% Kaliumkarbonat, 0.5–2% Natriumkarbonat, 0.05–0.1% Ammoniumkarbonat und 0.05% Natronlauge sowie Kalilauge beobachtete ich nach 24 Stunden mit Jodjodkaliumlösung eine tiefblaue Färbung des Zellinhalts, aber eine Sporenbildung trat niemals ein. Diese Substanz kann oft in solcher Menge aufgespeichert sein, dass die ganze Zelle mit Jodjodkaliumlösung dunkelblau erscheint.

Eine ganz gleiche Färbung des Zellinhalts mit Jodjodkaliumlösung wurde auch bei Verwendung von Harnstoff in Konzentrationen von 0.1–1 Proz. beobachtet; dabei änderte sich jede Lösung alkalisch und sandte einen starken ammoniakalischen Geruch aus. Nach diesen Erscheinungen kann man leicht daran denken, dass diese eigentümliche Farbenreaktion des Zellinhalts mit Jodkaliumlösung nicht von dem Harnstoff selbst, sondern von dem abgespaltenen Ammoniak verursacht ist. Es wurde eben bei diesem *Schizosaccharomyces* das Vorkommen von harnstoffspaltendem Enzyme in folgender Weise nachgewiesen. Destilliertes Wasser mit milchig fein verteilter Hefe wurde in zwei Teile geteilt, der eine Teil wurde während kurzer Zeit aufgekocht, der andere blieb unverändert. Jetzt wurden den beiden gleiche Mengen von Harnstoff und dann, um die Einwirkung von Mikroorganismen auszuschalten, etwas Toluol zugestzt und bei 28°C stehen lassen. Nach 24 Stunden wurden beide Flüssigkeiten chemisch untersucht; dabei färbt sich der ungekochte Teil mit rotem Lackmuspapier deutlich blau und zugleich gibt er mit NESSLER'schem Reagenz einen gelbbraunen Niederschlag, welche Reaktionen jedoch bei dem einmal aufgekochten Teil ganz ausblieben.

Bislang wurde die eigentliche Sporenbildung nur bei der Verwendung von Dextrose, Laevulose, Galaktose, Maltose, Mannose, Mannit und Glycerin beobachtet. Ein Zusatz von phosphorsaurem Kalium hat aber keine Förderung der Askenbildung verursacht. In der folgenden Tabelle XIII ist das diesbezügliche Ergebnis niedergeschrieben.

TABELLE XIII.

Substanz	Konzentration	Askenbildung
Dextrose	0.1-1	I
	5-20	II
Laevulose	0.1-2.5	I
	5	II
Mannose	0.5	o
	1-5	I
	10	II
Galaktose	0.5-1	o
	5-10	I
Maltose	0.5	o
	1-5	I
	10	II
Glyzerin	0.5-1	o
	5-10	I
	20	o
Mannit	0.5-1	o
	3-10	I

Nach diesem Versuche wirken auch Dextrose und Laevulose besonders förderlich auf die Sporenbildung vom *Schizosaccharomyces octosporus* ein, denn 0.1% Konzentration genügt schon zur Sporenbildung. Von anderen Verbindungen, die die Sporenbildung dieser Hefe auslösen konnten, ist die niedrigste Konzentration für die Entstehung der Fortpflanzungsorgane umso niedriger, je nahrhafter die Substanz ist.

Nicht so günstig wie die natürlichen Nährböden z.B. Bierwürze, Kojiabsud wirken die oben erwähnten chemischen Substanzen auf die Sporenbildung ein; die Askén treten auf den ersteren immer zahlreich und mit unbedingter Sicherheit auf, während sie auf den letzteren nicht in so grosser Menge erzeugt werden. Ausserdem herrschen bei der Verwendung der oben erwähnten Ver-

bindungen Asken mit nur vier Sporen vor, und die achtsporigen kommen selten vor.

Nach dieser Beobachtung lässt sich annehmen, dass eine Zufuhr von gewissen Kohlenhydraten oder Alkoholen ein wesentlicher unter vielen Faktoren ist, welche auf die sichere Entstehung der Sporen einwirken. Je nach dem physiologischen Zustande der Hefezellen können sie auch in einer Lösung der eben genannten chemischen Substanzen schon zur Sporenbildung schreiten. Es geht daraus hervor, dass eine kräftige, wohlgenährte Zelle die grösste Fähigkeit, Sporen bilden zu können, besitzt, und dass nur ausnahmsweise ausgehungerte Zellen Sporen erzeugen.

Weiter wurde geprüft, wie einige Substanzen, die selbst die Sporenbildung hervorzubringen nicht imstande sind, die Wirkung von 5%iger Dextroselösung auf die Fortpflanzung beeinflussen. Dafür wurden die zu prüfenden Verbindungen in Konzentrationen von 0.1–1 Proz. verwendet. (siehe Tabelle XIV.)

Wie man aus dieser Tabelle sieht, werden die geprüften Verbindungen in ihrem Einfluss auf die Sporenbildung des *Schizosaccharomyces* in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe umfasst diejenigen Verbindungen, welche auf die Sporenbildung hemmend einwirken; darin sind einzureihen: Ammoniumsalze, Alanin, Asparagin, Harnstoff und Pepton. Schon ein 0.1%iger Zusatz zu 5%iger Dextroselösung verzögert die Sporenbildung, und ebenso verhalten sich freie organische Säuren und Dikaliumphosphat, während organische Salze (einschl. saure Salze) gar keinen Einfluss konstatieren lassen. Die andere Gruppe besteht aus denjenigen Verbindungen, welche die Wirkung von Dextrose auf die Sporenbildung nicht verhindern. Ausser den bereits erwähnten organischen Salzen gehören dazu noch Laktose, Kalisalpeter und Monokaliumphosphat.

TABELLE XIV.

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Kontrolle (Kein Zusatz)	—	II	
Harnstoff	0.1	o-I	} Zellen färben sich mit Jod- jodkaliumlösung blau
	0.5-1	o	
Alanin	0.1	o-I	
	0.5-1	o	
Asparagin	0.1	o-I	
	0.5-1	o	
Wittepepton	0.1-1	o	
Kalisalpeter	0.1-1	II	
Monokalium- phosphat	0.1-1	II	
Dikalium- phosphat	0.1	o-I	} Zellen färben sich mit Jod- kaliumlösung blau
	0.5	o-I	
	1	o	
Ammoniumsulfat	0.1-1	o	
Saures weinsaures Ammonium	0.1	o-I	
	0.5-1	o	
Weinstein	0.1-1	II	
Kaliumzitrat	0.1-1	II	
Weinsäure	0.1-1	o	
Zitronensäure	0.1-1	o	
Aepfelsäure	0.1-1	o	
Fumarsäure	0.1-1	o	
Maleinsäure	0.1-1	o	
Laktose	1-5	II	

In welcher Weise die antagonistische Wirkung solcher Substanzen auf Dextrose zustande kommt, ist uns noch nicht geklärt. Doch beeinflusst jede Substanz, welche die Sporenbildung hemmt, gar nicht das Durchdringungsvermögen der Kohlenhydrate in den Hefezellen, weil nach der LINDNER'schen Kleingärmethode kon-

statiert wurde, dass die Gasblasen in dextroshaltigen Objektträgerhöhlen ebenso schnell und stark beim Fehlen als beim Vorhandensein von Alanin, Asparagin, Harnstoff und Ammoniumsulfat in einprozentiger Konzentration auftraten. Da die letztgenannten Stickstoffverbindungen vom *Schizosaccharomyces* nicht assimiliert werden, so liegt die Ursache des Sterilbleibens bei einem Zusatz zu Dextroslösung nicht in der Wachstumsbeförderung, sondern in einer Verschiebung des physiologischen Zustandes der Hefezellen nach einer anderen, uns noch unbekanntem Richtung hin.

Wenn wir statt Dextroslösung gewöhnliche Bierwürze verwenden, so findet keine Verzögerung der Sporenerzeugung durch die Gegenwart der oben erwähnten Verbindungen statt. Alle Kulturen bildeten so gut Sporen wie die Kontrolle, die nur mit Bierwürze versehen war. Dies weist darauf hin, dass der Einfluss von chemischen Substanzen auf die Fortpflanzung je nach den übrigen Ernährungsbedingungen der Hefezelle in der einen oder anderen Weise abgeändert wird.

Was den morphogenen Reiz der Sporenbildung von diesem *Schizosaccharomyces* anbetrifft, so nimmt KLEBS (IV) an, dass er auf einem festen Substrat mit zuckerreicher Nährflüssigkeit an der Impfstelle sehr rasch die Nahrung verbraucht, und die oberen Schichten der Zellen sehr schnell zur Sporenbildung übergehen. Um zu prüfen, ob diese Ansicht für den *Schizosaccharomyces* gerechtfertigt ist, wurden einige Versuche neu angestellt.

Die jungen kräftigen Hefezellen aus Kojiabsudkultur wurden in Petrischalen, von denen je eine mit 10 ccm Bierwürze von verschiedenen Konzentrationen (0.5–12 Ball.) beschickt war, hineingebracht. Bei 28°C sind binnen 24 Stunden in allen Schalen reichliche Sporen entstanden, aber in 0.5 Ball. Bierwürze entwickelte sich die Hefe nur kümmerlich. In destilliertem Wasser trat schliesslich keine Sporenbildung ein.

Dass die Sporenbildung des *Schizosaccharomyces octosporus* auch in einem Ueberschuss von Nahrung ruhig vor sich geht,

wurde durch folgenden Versuch bestätigt. Auf einen kleinen Gipsblocke in einer grossen Schale wurden wenige kräftige Hefezellen ausgesaet und dann eine grosse Menge Bierwürze (12 Ball.) in die Schale eingeführt, bis die Flüssigkeit noch ein bischen über der Oberfläche des Gipsblockes stand. In einem solchen Zustande werden die Hefezellen an keine Armut der Luftzufuhr und der Nahrungsstoffen geraten. Selbstverständlich sprosseten die ausgesaeten Zellen, aber bereits nach 20 Stunden entwickelten sich die Sporen an einem grossen Teil der Zellen.

Dass kein Nahrungsmangel dabei eintritt, ist dennoch klar, weil nach Herausnahme einer kleinen Menge von Kulturflüssigkeit in Reagenzgläser unter gewöhnlichen Vorsichtmassregeln wiederum eine üppige Entwicklung des *Schizosaccharomyces* darin beobachtet wurde. Auch möchte ich die Annahme, dass die Nahrungsänderung dabei die Ursache der Sporenbildung ist, für weniger wahrscheinlich halten. Denn eine grosse Menge Nährflüssigkeit kann während kurzer Kulturdauer durch wenige Hefezellen nicht so tiefgreifend verändert werden, um die letzteren in einen anderen Lebensprozess abzulenken.

Da alle anderen allgemeinen Bedingungen für die Lebensprozesse günstig sind, dürfen wir anscheinend keine schlechte Nahrungsbesorgung von der Umgebung annehmen wie bei den von MATZUSCHITA (I) untersuchten anaeroben Bakterien, bei welchen durch plötzliche Luftzufuhr eine gleiche Wirkung wie der Nahrungsentzug hervorgebracht wurde. Obwohl man an viele Möglichkeiten denken könnte, ist es aber bei *Schizosaccharomyces*, wie KLEBS einmal bei der Alge *Hydrodictyon* vermutet hatte, möglich, dass in den jugendlichen, mit Protoplasma gefüllten Zellen die Vakuolen allmählich erscheinen, die zuerst der Zahl nach sich vermehren, und dadurch später die Zunahme des Zellsaftes im Verhältnis zu dem immer dünner werdenden Plasmabelag Bedingungen schafft, die die Lebenstätigkeit der Hefezellen mehr und mehr einschränken. Es gibt aber bis jetzt nicht den geringsten Beweis für das Zutreffende dieser Ansicht.

Wenn der Nahrungsmangel bei Konstanz der anderen Aussenbedingungen keine notwendige Bedingung für die Sporen-

bildung dieses *Schizosaccharomyces* ist, so vertrete ich gerade die Ansicht, dass für den betreffenden Lebensprozess wesentlich innere Ursachen in Frage kommen. Während der Entwicklung einer Hefezelle kann jede Veränderung geschehen, und infolgedessen wird ihre spezifische Ontogenese durch eine selbstregulatorische Lenkung und Verschiebung der inneren Ursachen bedingt (vgl. PFEFFER [I], S. 222). Im Verlauf der Ontogenese können in den Hefezellen immer tiefer greifende Veränderungen der inneren Bedingungen eintreten, und ein gewisser Zustand des Protoplasmas wäre für die Qualität des resultierenden Gestaltänderungen massgebend. Jede vegetative Zelle vom *Schizosaccharomyces octosporus* kann in frischer Nährlösung durch Spaltung vegetativ wachsen, während die einmal entstandenen Asken nicht mehr weiter sich spalten können, sondern Sporen bilden oder bald zugrunde gehen.

Vor allem ist aber genügende Luftzufuhr eine unbedingt notwendige Bedingung für die Sporenbildung dieser Hefeart. Wenn verschiedene Mengen Bierwürze (12 Ball.) in gleichgrossen Petrischalen ausgegossen und eine Menge kräftiger Hefezellen hineingebracht wurden, bekam ich schon nach 24 Stunden eine reichliche Sporenbildung in den Schalen mit 5, 10, 15, 20 ccm von Nährflüssigkeit, doch blieb der Fortpflanzungsprozess in einer 40 ccm haltenden Schale aus, in welcher erst nach 4 Tagen nur wenige Sporen hie und da gefunden wurden.

Anscheinend widerspricht ein anderer Versuch dieser Annahme, weil in einer Mischung von 30 ccm Wasser und 10 ccm Bierwürze (12 Ball.) nach 24 Stunden massenhafte Sporenbildung an jungen kräftigen Zellen beobachtet wurde. Dennoch ist dies so zu erklären, dass in konzentrierter Würze durch den Gehalt an Salzen die Absorptionsfähigkeit derselben für Sauerstoff stärker herabgesetzt wird als in verdünnter. Ausserdem wirkt eine chemische Absorption des Sauerstoffes durch Kohlenhydrate und andere Stoffe mit. Dazu kommt noch der beständige Sauerstoffverbrauch durch Hefezellen und die Kohlensäurebildung durch Gärung, so dass in konzentrierten Nährlösungen der Sauerstoffgehalt immer geringer wird.

Wenn der Sauerstoff auch ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane vom *Schizosaccharomyces octosporus* ist, dürfen wir ihm aber nicht eine Bedeutung als morphogener Reiz des betreffenden Lebensprozesses beilegen. Denn diese Art bedarf insbesondere des freien Sauerstoffes; in dieser Hinsicht ist diese Art ähnlich wie Kahlmhefe (LINDNER [I], S. 495). Ohne freien Sauerstoff wächst sie kaum, so dass der Sauerstoff wenigstens für diese Hefe eine allgemeine Lebensbedingung ist. Das Konzentrations-Minimum des Sauerstoffes, welches diese Hefeart für die Fortpflanzung bedarf, ist noch nicht ermittelt worden; am wahrscheinlichsten liegt es höher als für das vegetative Wachstum.

Hier möchte ich nebenbei mitteilen, dass die Sporen vom *Schizosaccharomyces octosporus* nur in natürlich vorkommenden Nährböden zur Keimung gebracht wurden. Vergebens wurden Hefewasser, Wittepepton, Glukose, Asparagin, Leucin, Pepsin, Papayotin (alle in 1%) geprüft. Wenn aber dem Hefewasser 1% Dextrose oder Laevulose hinzugefügt wird, tritt die Keimung sicher auf, während ein Zusatz von 0.1% Dextrose als auslösender Reiz des letzteren Prozesses noch nicht genügt. Das Hefewasser mit Saccharose, Mannit und Laktose in 1%iger Konzentration war auch nicht imstande, die Keimung der Sporen hervorzubringen. Mit unbedingter Sicherheit können wir die Keimung bei Verwendung von Kojiabsud und Bierwürze von 12 Ball. beobachten.

3. *Saccharomyces mandshuricus* Saito, Forma I.

Diese Art zeichnet sich durch die leichte Sporenbildung aus. Um diese Hefe zur Bildung von Sporen zu bewegen, muss man junge kräftige Zellen im besten Ernährungszustande plötzlich in ein nahrungsarmes Substrat bringen, wie es in den zumeist angewendeten Gipsblöcken geboten wird. Die Zellen können dadurch bei 25–26°C innerhalb 24 Stunden zur Sporenbildung eingehen.

Bringt man dagegen die Hefezellen aus einer Kojiabsudkultur statt in reines Wasser in die Lösung einer Sub-

stanz, so ist das Resultat sehr verschieden. Dieses hängt einmal von der chemischen Natur der Substanz, zweitens von ihrer Konzentration ab.

Da nach der Gipsblockmethode die Wachstumsintensität der ausgesaeten Hefezellen kaum richtig beurteilt werden kann, so habe ich vorläufig einige Versuche über den Nährwert einiger Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ausgeführt. Dazu bediente ich mich der Züchtung auf reinem Agar-agar mit anorganischen Salzen und den Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Die Kulturen standen 14 Tage in einem Thermostat von 25–26°C. In Tabelle XV sind die Resultate darüber angegeben.

TABELLE XV.

C-quelle (1%)	N-quelle	0.5% Ammonium- sulfat	C-quelle N-quelle (1%)	5% Dextrose
Dextrose		III	Ammoniumsulfat	II-III
Laevulose		III	Ammoniumnitrat	III
Mannose		III	Kaliumnitrat	o-I
Galaktose		III	Asparagin	III
Rohrzucker		III	Asparaginsäure	II-III
Maltose		III	Glutaminsäure	II-III
Laktose		o	Phenylalanin	II
Raffinose		III	Alanin	III
Inulin		o-I	Tyrosin	I
Dextrin		I	Leucin	III
α-methylglykosid		II	Seidenpepton	III
Amygdalin		o-I	Wittepepton	I-II
Mannit		o-I	Succinamid	o
Arabinose		o-I	Azetamid	o-I
Xylose		o	Oxamid	o
Erythrit		I	Aethylurethan	o-I
Glyzerin		II	Biuret	o-I
Querzit		o	Harnstoff	III
Dulzit		o-I	Allantoin	III
Kontrolle (ohne C-quelle)		o	Guaindinkarbonat	o
Bemerkung zu dieser Tabelle: Bei Seidenpepton entstanden nach einer Woche einige sporentragende Zellen auf dem oberen Strichteil. Bei allen anderen Kulturen blieb die Sporenbildung aus. Bei Ammoniumsalzen starben viele Zellen innerhalb 14 Tagen ab.			Natriumhippurat	I
			Natriumurat	I
			Kreatin	o-I
			Kontrolle (ohne N-quelle)	o-I

Unter den Kohlenhydraten sind als Kohlenstoffquelle sehr geeignet: Dextrose, Laevulose, Mannose, Galaktose, Saccharose, Raffinose und Maltose; α -methylglykosid, Glyzerin, Dextrin und Erythrit verursachen schwaches Wachstum; Inulin, Amygdalin, Mannit, Arabinose, Xylose, Querzit, Dulzit gar keins. Im Vereine mit Dextrose gestatten Ammoniumsalze, Aminosäuren, Pepton, Harnstoff und Allantoin ein mehr oder weniger üppiges Wachstum, während Kaliumnitrat, Succinamid, Azetamid, Oxamid, Biuret, Aethylurethan, Guanidinkarbonat, Kreatin nicht von dieser Hefe assimiliert werden.

Im folgenden sind die Einflüsse von chemischen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen auf die Sporenbildung der betreffenden Art untersucht. Da die chemische Konstitution einen wesentlichen Einfluss auf die Sporenbildung hat, so will ich die Versuche nach den Gruppen chemisch verwandter Stoffe ordnen.

Bei all den folgenden Versuchen benutzte ich ausnahmslos junge Hefezellen, die 48 Stunden im Kojiabsud (12 Ball.) herangewachsen waren, d.h. also ein sehr gleichmässig vorgebildetes Material. Die Hefezellen aus einer solchen Kultur wurden nach genügendem Waschen mit Wasser auf Gipsblöcke in der Lösung der zu prüfenden Substanz ausgesaet, die Kulturen standen im Thermostat von 26°C. Nach 24 Stunden wurden die Hefezellen untersucht, wie auch die folgenden Tage. Für die Tabelle gebe ich meist die Resultate nach 24 Stunden, wenn nichts anderes angegeben ist.

Tabelle XVI zeigt, dass bei gleicher Versuchsanstellung die einzelnen Substanzen einen sehr verschiedenen Einfluss auf die Sporenbildung ausüben, eine Tatsache, die auch von KLEBS für die Fortpflanzung anderer Pilze festgestellt ist. Wenn die zu prüfende Substanz einen grossen Nährwert besitzt und gleichzeitig von der Hefe vergoren werden kann, so ist die obere Konzentrationsgrenze, welche dem *Saccharomyces* noch die Sporenbildung gestattet, immer niedrig. Da den Hefezellen keine besonderen Stickstoffquellen zur Verfügung standen, hing das Wachstum in

TABELLE XVI.

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Dextrose	0 (Kontrolle)	III	Nach 5 Tagen sind wenige Asken gebildet. Zellen sind vakuoliert.
	0.1	III	
	0.25	II	
	0.5	I	
	1	o	
	2-5	o	
Laevulose	0.25	III	Nach 48 Stunden sind Asken ziemlich reichlich gebildet. Nach 48 Stunden sind wenige Asken gebildet. Zellen sind vakuoliert
	0.5	o	
	1	o	
	2-5	o	
Mannose	0.1-1	III	Nach 48 Stunden sind ziemlich reichliche Asken gebildet. Zellen sind vakuoliert
	2-4	o	
	5	o	
Galaktose	0.5	I	In den nächsten Tagen vermehren sich die Asken an Zahl. Nach 3 Tagen sind viele Asken gebildet. Ebenso in den nächsten Tagen.
	2	o	
	3-5	o	
Maltose	0.1-5	III	
Saccharose	0.5-1	I	Ebenso in den nächsten Tagen. Die Zellen sind vakuoliert.
	2-5	o	
Laktose	0.5-5	III	
Inulin	1	III	
Dextrin	0.5-5	III	
Glykogen	0.1-1	III	
α -methylglykosid	0.5-5	III	
Raffinose	0.1-2	III	
Sorbit	0.1-2	III	
Mannit	0.5-2	III	Am nächsten Tage sind einige Asken gebildet.
	3-5	o	
Glyzerin	0.1-0.5	III	

TABELLE XVI. (Fortsetzung.)

Substanzen	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Glyzerin	1-2	I	} Nach 48 Stunden sind reichlich Asken gebildet. Nach 48 Stunden sind nur vereinzelte Asken gebildet.
	3-4	o	
	5	o	
Amygdalin	0.1-2	III	
Salizin	0.1-2	III	
Arbutin	0.1-1	III	
Aesculin	0.05 (gesättigt)	III	

den ersten 24 Stunden in erster Linie von dem Kohlenstoff ab ; denn die im Kojiwasser aufgewachsenen Hefezellen besitzen einen grossen Stickstoff-Vorrat, der für die erst Zeit ausreicht.

Warum gestattet aber Maltose, die für diesen *Saccharomyces* einen grossen Nährwert besitzt und auch von ihm vergoren wird, selbst bei relativ höheren Konzentrationen innerhalb so kurzer Zeit wie 24 Stunden eine reichliche Sporenbildung ? Man könnte daran denken, dass die im Kojiabsud herangewachsenen Hefezellen im Gegensatz zu den in der Bierwürze gezüchteten sehr schwer Maltose vergären. (vgl. SAITO, [I], S. 24). Deshalb stellte ich mit den Hefezellen, welche in Bierwürze herangezogen sind, Versuche über den Einfluss von Maltose an ; trotzdem war das Resultat kein anderes als das gerade erwähnte. Der Grund für die schnelle Ausbildung der Sporen in Maltoselösungen liegt wahrscheinlich darin, dass diese Zuckerart sehr langsam in die Zellen dieser Hefeart eindringt, infolgedessen geraten diese beim Uebertragen auf die Gipsblöcken zeitweilig in einen schlechten Ernährungszustand und werden zur Sporenbildung veranlasst, so dass das nachfolgende Eindringen des Zuckers in das Zellinnere nicht mehr die durch Nahrungsmangel erweckte Reizwirkung hemmen kann. Wirklich konnte ich bei Uebertragung von den in Bierwürze gewachsenen Hefezellen in eine 2%ige Lösung von Dextrose, Saccharose und Maltose eine verschiedene Geschwindigkeit der sichtbaren Gasbildung in Gärungsröhren nachweisen ; bei den erstgenannten.

beiden Zuckerarten trat die Gasblase binnen kurzer Zeit, sogar fast momentan, nach der Mischung mit den Hefezellen auf, und die Gärung ging stürmisch weiter, während bei dem letztgenannten Zucker eine bemerkbare Gasblase erst nach 3–4 Stunden beobachtet wurde. Hieraus ist also ersichtlich, wie Prior in betreff der Carlsberg Unterhefe Nr. 2 nachgewiesen hatte, dass das Diffusionsvermögen der Maltose das kleinste ist.

Was ist nun die Ursache des Unterbleibens der Sporenbildung bei niederer Konzentration von Dextrose? Eine solche Lösung Traubenzucker kann zunächst durch die Förderung des Wachstums die Sporenbildung verhindern. Dabei wirkt aber die Zuckervergärung mit, welche eine allzu starke Kohlensäureentwicklung kontinuierlich in den Hefezellen herbeischafft, wodurch die Sporenbildung gehemmt wird. Wie die obenstehende Tabelle XVI anzeigt, hemmen also leicht vergärbare und eben gut assimilierbare Zuckerarten, wie Dextrose, Laevulose, Mannose, Galaktose und Saccharose, in niederen Konzentrationen die Sporenbildung bei unserer Art. Allerdings hemmen andere Stoffwechselprodukte als Kohlensäure ebenso die Sporenbildung dieser Art; denn es wurde bei den Hefezellen auf den Gipsblöcken in einer vollständig vergorenen und von Kohlensäure befreite Lösung von 2%iger Dextrose eine viel schwächere Sporenbildung konstatiert als bei denjenigen in destilliertem Wasser.

In 2–5%igen Dextroslösungen tritt die Sporenbildung schliesslich nicht von selbst ein, wenn Nahrungsmangel auch in solchen Kulturen erfolgt. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass der Nahrungsmangel stets allmählich eintritt, und die Gärwirkung lange andauert; infolgedessen geraten die Hefezellen langsam in einen schlechten Ernährungszustand, in welchem dann der Reiz des Nahrungsmangels in der Umgebung unwirksam bleibt. Wenn man daher die Hefezellen aus einer frischen Dextrosekultur in reines Wasser versetzt, so erfolgt wiederum lebhaftere Sporenbildung. Nach 4 Tage langem Aufenthalte in Dextroslösungen, wo die Nahrungsabnahme langsam eintritt und die Gärungsprodukte angesammelt sind, sind die Hefezellen beim Wiedezurückbringen in reines Wasser nicht so befähigt, mit Sporenbildung zu reagieren. Gleiches gilt für Kulturen in günstigen Nährlösungen, wie Bier-

würze, Kojiabsud u.s.w. Wenn eine kleine Menge von jungen Hefezellen auf Gipsblöcke ausgesaet und dann das ganze mit den Nährlösungen bedeckt wird, bis eine dünne Flüssigkeitsschicht auf der Oberfläche der Gipsblöcke noch zurückbleibt, so tritt üppiges Wachstum und eine kräftige Gärung ein. Langsame Nahrungsabnahme und eine Ansammlung der Stoffwechselprodukte versetzen die Hefezellen schliesslich in einen so schlechten Ernährungszustand, dass sie nicht mehr Sporen zu bilden vermögen, wenn die Luftzufuhr auch von vornherein immer genügend ist.

Umgekehrt verhalten sich kräftige Hefezellen, die durch Uebergänge von reichlicher Ernährung zu kärglicher Nahrungszufuhr einmal zur Bildung von Sporen ausgelöst sind; diese Sporenbildung schreitet auch nach Rückübertragung in 2%igen Zuckerlösungen fort, wenn sie durch 3 Stunden langen Aufenthalt in destilliertem Wasser, d.h. Nahrungsentzug, einmal eingeleitet ist. Derartige Nachwirkungen machen sich nicht geltend bei den Zellen, die nur 1 Stunde in Wasser versetzt waren.

In Gegenwart von anderen Kohlenhydraten und Glykosiden, welche einen geringeren Nährwert besitzen, ist die Hefe imstande selbst in relativ konzentrierten Lösungen Sporen zu bilden. In Lösungen von Glycerin und Mannit wird die Sporenbildung erst durch eine etwas höhere Konzentration verzögert.

Während Wittepepton und Aminosäuren beim gleichzeitigen Vorhandensein von Kohlenhydrat für diese *Saccharomyces*-Art sehr nahrhaft wirken, so dass die Sporenbildung lange Zeit nicht auftritt, erfolgt doch der letztere Lebensprozess selbst bei höheren Konzentrationen solcher Verbindungen, wenn sie den kräftigen Hefezellen als alleinige Nahrung dargeboten werden (siehe Tabelle XVII.). Die jungen Hefezellen aus Kojiabsudkultur besitzen einen gewissen Kohlenstoffvorrat, z. B. Glykogen, das aber nach Uebertragung auf Gipsblöcke in den Lösungen der obenerwähnten Substanzen nach kurzer Zeit verbraucht wird. Wegen der Nahrungsverminderung werden sie in einen Zustand übergeführt, wo die Fortpflanzung durch die Sporenbildung in der Zelle ausgelöst wird.

TABELLE XVII.

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Phenylalanin	0.1-3 (gesättigt)	III	
Alanin	0.1-3	III	
Leucin	0.1-3 (gesättigt)	III	
Asparagin	0.1-3 (gesättigt)	III	
Glykokoll	3	III	
Asparaginsäure: 1 (neutralisiert mit Soda)	0.1-3	III	
Glutaminsäure („)	0.1-3	III	
Tyrosin	Gesättigt im Ueberschuss	III	
Wittepepton	0.1-3	III	
Harnstoff	0.1	II	
	0.5	I	
	1-5	o	Schliesslich keine Asken- bildung.
Azetamid	0.1	III	
	0.5	II	
	1	I	
	2	o	Nach 48 Stunden nur wenige Asken gebildet
	3-5	o	Ebenso in den nächsten Tagen.
Biuret	0.1-0.2	III	
	0.5-1	o	Nach 48 Stunden nur wenige Asken.
Guanidinkarbonat	0.1-2	o	
Aethylurethan	0.1-0.5	II	
	1-2	o	Ebenso in den nächsten Tagen.
Hippursaures Natrium	0.1-2	III	
Harnsaures Natrium	Gesättigt im Ueberschuss	III	
Allantoin	Gesättigt im Ueberschuss	III	

Bei anderen, in Tabelle XVII bezeichneten Verbindungen dürfen wir die Einwirkung auf die Fortpflanzung dieser Hefe nicht bloss ihrem Nährwert zuschreiben. Je nach den Substanzen müssen sie einzeln betrachtet werden. Wegen des geringeren Nähr-

wertes können Hippursaures Natrium, Harnsaures Natrium, Allantoin die Sporenbildung unseres *Saccharomyces* leicht gestatten. Dagegen tritt die Sporenbildung gar nicht ein, wenn Guanidinkarbonat, Aethylurethan, Azetamid und Biuret in verhältnismässig niederen Konzentrationen dargeboten werden. In solchen Fällen könnten die Substanzen direkt hemmend auf die Sporenbildung wirken.

Was den leicht durchlässigen Harnstoff anbetrifft, so liegt der Grund des Sterilbleibens von Hefezellen vielleicht darin, dass diese Verbindung zuerst in Ammoniak abgespalten wird, und die letztere Verbindung auf die Sporenbildung direkt hindernd einwirkt. Darauf will ich im folgenden nochmals zurückkommen.

Die geprüften organischen Säuren und ihre Salze (Tabelle XVIII) besitzen für *Saccharomyces mandshuricus* in der Mehrzahl, selbst im Vereine mit einer besonderen Stickstoffquelle, keinen oder nur geringen Nährwert. In verdünnten Lösungen der freien Säuren erfolgt Sporenbildung; in etwas konzentrierteren bleibt sie

TABELLE XVIII.

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkunge
Weinsäure	0.1-0.5	I	
	1-2	o	Ebenso in den nächsten Tagen.
	5	o	Zellen abgestorben.
Zitronensäure	0.1	III	
	0.5	II	
	1-2	o	
	5	o	Zellen abgestorben.
Aepfelsäure	0.1	III	
	0.5	I	
	1-2	o	
	5	o	Zellen abgestorben.
Bernsteinsäure	0.1-1	III	

TABELLE XVIII. (Fortsetzung.)

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Bernsteinsäure	2	I	Nach zwei Tagen reichliche Asken. Zellen meistens geschrumpft, nach 2 Tagen wenige Asken.
	3-4	o	
Fumarsäure	0.1-0.5	III	
Maleinsäure	0.1-0.5	III	
Milchsäure	0.1-0.5	III	
	1	o-I	
Oxalsäure	0.1	III	Zellen plasmolysiert und meistens abgestorben. Zellen abgestorben.
	0.5	o	
	1	o	
Saures weinsaures Ammonium	0.1	I	} Nach 2 Tagen wenige Asken. Ebenso in den nächsten Tagen, Zellen vakuoliert.
	0.5	o-I	
	1	o	
	2.5	o	
Zitronensaures Kalium	0.1-0.5	III	
	1-2	I	
Essigsäures Natrium	0.1-1	III	Nach 48 Stunden reichliche Asken.
	2-4	o	
Bernsteinsaures Kalium	0.1-1	III	Nach 48 Stunden reichliche Asken.
	2-5	I	
Calciumlaktat	0.1-1	III	
Ammoniumoxalat	0.05	III	Nach 5 Tagen ziemlich reichliche Sporen. Ebenso in den nächsten Tagen.
	0.1	II	
	0.5	o-I	
	1	o-I	
Bernsteinsaures Ammonium	0.1	II	Nach 2 Tagen reichliche Asken. Nach 2 Tagen wenige Asken.
	0.5-1	I	
	2-3	o	
Kaliumoxalat	1.0	II	} Zellen vakuoliert. Nach 5 Tagen reichliche Asken.
	0.5-2	I	
	3-5	o	

aus, aber nicht infolge lebhaften Wachstums, sondern weil die Substanz schädlich wirkt. Weinsäure, Zitronensäure, Aepfelsäure töteten die Hefezellen bei einer Konzentration von 5%. Zwischen 0.5–1% liegt die obere Konzentrationsgrenze für die Sporenbildung. Besonders empfindlich ist die Hefe nach den Angaben der Tabelle gegenüber Oxalsäure, bei deren Konzentration von 0.5% die Zellen schon grossenteils absterben.

Bei Verwendung von Salzen der genannten Säuren nimmt die Zahl der in 24 Stunden gebildeten Askon mit steigender Konzentration ab. Es sei hier bemerkt, dass Ammoniumsalze einen ungünstigen Einfluss auf die Sporenbildung ausüben.

Wie Tabelle XIX zeigt, sind die anorganischen Verbindungen in ihrem Einfluss auf die Sporenbildung des *Saccharomyces mandshuricus* mannigfaltig. Bei dieser Versuchsreihe konnten wegen des Mangels an assimilierbarem Kohlenstoff nur die stickstoffhaltigen Verbindungen für das Wachstum bis zu einem gewissen Grade in Betracht kommen. Die Hefezellen mussten dabei mit dem in ihm enthaltenen Kohlenstoffvorrat auskommen. Von den geprüften stickstoffhaltigen Salzen erwiesen sich Ammoniumsalze in Form von Chlorid, Sulfat und Nitrat auch in diesem Falle als ungünstige Körper für die Sporenbildung. Primäres Ammoniumphosphat wirkt dagegen nicht so stark, und bei 1–5% wurde schon nach 2 Tagen eine grosse Menge Sporen wie bei 0.5% beobachtet. Warum aber Aminosäuren, die am wahrscheinlichsten von dieser Hefe zuerst desamidiert werden können, keine hemmende Wirkung auf die Sporenbildung ausüben, ist uns noch nicht geklärt (vergl. Tabelle XVII.). Doch ist es möglich, dass die Aminosäuren sehr langsam in die Zelle eindringen, und Ammoniakbildung zu spät vorkommt, um eine ungünstige Einwirkung auf die Sporenbildung auszuüben.

Bei Kalisalpeter, Natriumnitrat, Calciumnitrat, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Kaliumbromid, Kaliumjodid, Bariumchlorid, Dikaliumphosphat, Monokaliumphosphat, Dinatriumphosphat sollten die Versuche nur ergeben, bei welcher

TABELLE XIX.

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Ammoniumchlorid	0.1	III	Nach 2 Tagen ziemlich reichliche Askenbildung. Nach 4 Tagen wenige Asken. Nach 4 Tagen nur vereinzelte Asken. Ebenso in den nächsten Tagen.
	0.5	II	
	1	I	
	2	o	
	3	o	
	4	o	
	5	o	
Ammoniumnitrat	0.1	III	Nach 4 Tagen wenige Asken. Nach 7 Tagen wenige Asken.
	0.5-1	II	
	2-3	o	
	4-5	o	
Ammoniumsulfat	0.1	III	Ebenso in den nächsten Tagen.
	0.5-2	I	
	3-5	o	
Primäres ammoniumphosphat	0.1-0.5	III	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung.
	1-5	o	
Monokaliumphosphat	0,1	III	Zellen geschrumpft und abgestorben.
	0.5	II	
	1	I	
	2-5	o	
Dikaliumphosphat	0.1	III	Am nächsten Tage reichliche Askenbildung.
	0.5	II	
	1-5	I	
Dinatriumphosphat	0.1	III	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung.
	0.5	II	
	1-5	I	
Kaliumnitrat	0.5	III ₁	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung. Nach 4 Tagen mehr oder weniger reichliche Askenbildung.
	1	II	
	2-5	o	
	6-13	o	

TABELLE XIX. (Fortsetzung.)

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Kaliumnitrat	15-20	o	Zellen geschrumpft, schliesslich keine Sporen.
Natriumnitrat	0.1-0.5	III	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung. Nach 2 Tagen vereinzelt Asken. Zellen geschrumpft. Zellen plasmolysiert.
	1-2	I	
	3-5	o	
	8-10	o	
	13	o	
	15	o	
Calciumnitrat	0.1	III	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung.
	0.5-2	II	
	3-4	o	
Natriumchlorid	0.1	II	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung. Nach 4 Tagen vereinzelt Askenbildung. Zellen grossenteils plasmolysiert.
	0.5-3	I	
	4	o	
	5	o	
	6-8	o	
Kaliumchlorid	0.1-3	III	Nach 7 Tagen nur vereinzelt Askenbildung. Zellen geschrumpft.
	4	I-II	
	5-6	I	
	8-9	o	
	10	o	
Kaliumbromid	0.1-2	III	
	3	II	
	4-5	I	
Kaliumjodid	0.1-3	III	
	4-5	I	
Bariumchlorid	0.1-0.5	III	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung. Ebenso in den nächsten Tagen.
	1	I	
	2-4	o	
	5	o	
Calciumchlorid	0.1-0.5	I	

TABELLE XIX. (Fortsetzung.)

Substanz	Konzentration	Askenbildung	Bemerkungen
Calciumchlorid	1	o	Nach 2 Tagen reichliche Askenbildung.
	2-8	o	Nach 7 Tagen wenige Asken.
	10	o	Nach 7 Tagen wenige Asken.
	12-15	o	Zellen plasmolysiert.
Natriumkarbonat	0.1-2	III	
	3-	o	Zellen geschrumpft.
Natriumbicarbonat	0.1-1	III	
	3-5	o	Zellen geschrumpft.
Kaliumcarbonat	0.1-3	III	
	4-5	o	Zellen geschrumpft.
Natronlauge	0.02	III	
	0.04-0.08	II	
	0.2	I	Nach 48 Stunden reichliche Asken.
	0.4	o	Zellen geschrumpft und abgestorben.
Schwefelsäure	0.05-0.25	III	
	0.5	o-I	Nach 2 Tagen Zellen geschrumpft
	1-3	o	Zellen abgestorben.
Kupfersulfat	0.001	III	
	0.005-0.5	o	Zellen plasmolysiert und abgestorben.
Quecksilberchlorid	0.001	III	
	0.005-0.5	o	Zellen plasmolysiert und abgestorben.
Kobaltnitrat	0.001-0.01	III	
	0.05	II	
	0.1	I	
	0.5	o	Zellen vakuoliert.
Zinksulfat	0.001-0.05	III	
	0.1	I	
	0.5	o	Zellen vakuoliert.
Nickelsulfat	0.001-0.05	III	
	0.1	II	
	0.5	o	Ebenso in den nächsten Tagen.

Konzentration sie den Prozess der Sporenbildung hemmen. Wegen der osmotischen Wirksamkeit der genannten Salze auf die Hefezellen wird die Sporenbildung bei der Anwendung einer höheren Konzentration stark beeinträchtigt. Aber die Konzentration, bei der überhaupt die Sporenbildung gehemmt wird, liegt bei allen so geprüften Salzen relativ hoch. Dabei muss man auch die chemische Natur der Substanzen in Betracht ziehen. Denn die Sporen können noch z. B. bei 13% Kalisalpeter gebildet werden, während bei Natriumchlorid bereits in 6%iger Lösung die Zellen grossenteils plasmolysiert sind und keine Sporen mehr erzeugen. Von den Substanzen ohne Nährwert, aber mit besonderen chemischen Eigenschaften, wirken freie Säuren und Alkalien stark hemmend auf die Sporenbildung ein, so dass 1% Schwefelsäure und 0.4% Natronlauge nicht nur keine Sporen erzeugen lassen, sondern auch die Zellen gleich abtöten.

Metallgifte, die in besonderer Weise das Leben der Organismen beeinflussen, beeinträchtigen auch in sehr verdünnten Lösungen die Sporenbildung. Besonders stark hemmend wirken Kupfersulfat und Quecksilberchlorid, bei deren Vorhandensein in 0.005%iger Konzentration die Hefezellen vollständig getötet werden. Dagegen sind die Hefezellen gegen Kobaltnitrat, Zinksulfat, Nickelsulfat widerstandsfähig, und erst bei 0.5% wird die Sporenbildung unterdrückt.

Um zu prüfen, wie die Stickstoffverbindungen neben einer Kohlenstoffquelle sich gegen die Sporenbildung verhalten, stellte ich einige Versuche an, indem ich mit denselben eine Dextroselösung von 0.5% mischte, d. h. eine Lösung, die nicht genügend ist, um die Sporenbildung des *Saccharomyces mandshuricus* zu unterdrücken. Bei diesen Versuchen wandte ich die Stickstoffverbindungen in einer Verdünnung von 0.1% an, d. h. in einer solchen, bei der alle geprüften Körper für sich allein Sporenbildung gestatten. In der folgenden Tabelle XX sind die Resultate dieser Versuchsreihe angegeben.

TABELLE XX.

Die Stickstoffverbindung gemischt mit 0.5%iger Dextroslösung	Askenbildung	Bemerkungen
Wittepepton	o-I	Nach 48 Stunden viele Asken.
Alanin	o-I	Nach 72 Stunden vereinzelte Asken.
Asparagin	o	Nach 72 Stunden nur vereinzelte Asken.
Ammoniumsulfat	o	Nach 48 Stunden wenige Asken.
Saures ammonium Tartarat	o	Nach 48 Stunden wenige Asken.
Succinamid	I	Nach 48 Stunden reichliche Asken.
Oxamid	I	Nach 48 Stunden reichliche Asken.
Harnstoff	o	Nach 48 Stunden ziemlich reichliche Asken.
Kaliumnitrat	I	Nach 48 Stunden reichliche Asken.
Kontrolle ^{ohne} (N-Verbindung)	I	Nach 48 Stunden reichliche Asken.

Um die auf Gipsblöcke ausgesaeten Hefezellen stets in nächster Berührung mit dem Nährsubstrat zu halten, wurden sie nach je 24 Stunden mit einem Pinsel bestrichen. Wie diese Tabelle zeigt, verzögern die nahrhaften Stickstoffverbindungen im Vereine mit 0.5%iger Dextroslösung die Sporenbildung des *Saccharomyces*, während diejenigen mit geringerem Nährwert wie die Kontrolle eine mässig starke Sporenbildung hervorgebracht haben.

Obwohl die Sporenbildung durch Nahrungsentziehung ausgelöst werden kann, wird dieser Lebensprozess je nach dem vorangehenden Ernährungszustande stark beeinflusst. So weist bei vorangehender Ernährung mit verschiedenen Stickstoffquellen diese Hefe sehr verschiedene Anzahl sporentragender Zellen in gewöhnlichen Gipsblockkulturen auf. Nach meinem Versuche traten die Sporen sehr reichlich auf, wenn *Saccharomyces* in 10%iger Dextroslösung mit 0.5% Asparagin oder Harnstoff 72 Stunden lang vorher gezüchtet worden war, während mit Ammoniumsulfat, Alanin oder Wittepepton als Stickstoffquelle weniger Sporen erzeugt wurden.

III. Zusammenfassung und Allgemeines.

Die Hefen verhalten sich nach den vorstehenden Untersuchungen wie die anderen Pilze, insofern ihre Fortpflanzung in

notwendiger Abhängigkeit von Qualität und Quantität der chemischen Substanzen steht. Es ist aber sehr wesentlich zu beachten, dass die Gegenwart bestimmter chemischer Verbindungen je nach der spezifischen Natur der Gärungsorganismen unbedingt notwendig für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane ist. Der Beweis dafür lässt sich am besten bei *Zygosaccharomyces mandshuricus* führen, dessen Zellen bei der Uebertragung aus einer nahrungsreichen Lösung in reines Wasser keine Sporen erzeugen können. Bei dieser Hefe richtet sich aber die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane nach der chemischen Qualität der dargebotenen Substanzen: Dextrose, Laevulose, Mannose, Galaktose, Sorbose, Rohrzucker, Raffinose, Mannit, Dulzit, Sorbit und Glyzerin sind als Erreger der Askenbildung zu bezeichnen. Je höher der Nährwert der eben genannten Substanzen für die Hefe ist, desto niedriger ist das Konzentrations-Minimum für die Auslösung der Askenbildung. So liegt z. B. das Konzentrations-Minimum für Dextrose, Laevulose und Mannose bei 0.125–0.25%, für Galaktose, Raffinose, Glyzerin bei 0.25–0.5%, für Sorbose und Dulzit bei 0.5–1%.

Da Rohrzucker und Raffinose von diesem *Zygosaccharomyces* hydrolysiert werden, so ist die Ursache der positiven Erfolge mit diesen Substanzen ohne Zweifel der entstandenen Hexose zuzuschreiben. Uebrigens entsprechen die oben genannten Hexite im geometrischen Bau der Moleküle denen der Hexosen, welche die Fortpflanzung auslösen.

Die entscheidende Bedeutung der oben genannten Kohlenhydrate und Alkohole liegt ohne Zweifel in der Notwendigkeit ihrer Gegenwart für die Askenbildung dieses *Zygosaccharomyces*, doch wissen wir nicht, durch welche Eigenschaften sie eine so eigentümliche Wirkung ausüben. Auch ein geringer Zusatz von Kaliphosphat und Wittepepton wirkt besonders günstig auf die sichere Entstehung der Fortpflanzungsorgane bei dieser Hefeart ein, und die Asken entstehen viel reichlicher, vorausgesetzt dass die Nahrungsstoffe durch den Stoffwechsel der Hefezellen in einer Weise verändert und für die Fortpflanzung geeignet gemacht werden.

Einige Nährböden wie Bierwürze, Kojiabsudgelatine u.s.w. veranlassen mit sehr viel grösserer Sicherheit die Sporenbildung in den Asken, als die Mischungen von Dextrose, Pepton und anorganischen Nährsalzen, obwohl diese Substrate jenen ersteren nicht nachstehen, was die erzeugten Asken betrifft. In letztgenannten Nährsubstraten tritt die Sporenbildung nur in wenigen Asken ein, indem die meisten nach der Entstehung bald absterben. An der chemischen Zusammensetzung der erstgenannten Nährböden müssen unstreitig noch andere Stoffe bei der sicheren Entstehung der Fortpflanzungsorgane und ihrer Reife eine wichtige Rolle spielen.

Bei der Sporenbildung von *Schizosaccharomyces octosporus* ist auch eine Zufuhr von Kohlenhydrat oder Alkohol, wie Dextrose, Laevulose, Mannose, Maltose, Galaktose, Glycerin, Mannit notwendig. In vorzüglichen Nährböden, z. B. Bierwürze, Kojiabsud etc. entwickeln sich die Hefezellen nach dem Kopulieren sicher und reichlich zu Asken.

Was den *Saccharomyces* anbetrifft, so wird die Askenbildung durch eine Nahrungsentziehung eingeleitet, wenn die Zellen vorher in guten Nährlösungen herangezogen sind und sich in einem richtigen Reizzustande befinden. Darum liegt der Grund der mannigfaltigen Beeinflussung der Sporenbildung durch verschiedene Substanzen wesentlich darin, dass sie je nach ihrer Qualität und Quantität die Hefezellen zeitweilig das vegetative Wachstum fortsetzen lassen. Je mehr eine Substanz für den *Saccharomyces* nahrhaft wirkt, desto niedriger ist die obere Konzentrationsgrenze, die dem Organismus die Sporenbildung gestattet. Damit stimmt die Beobachtung von TULLO (I) an *Saccharomyces ellipsoideus* II überein, welcher nur beim Vorhandensein schlecht assimilierbarer Kohlenhydrate reichliche Sporenbildung aufwies.

Einige Substanzen verzögern in spezifischer Weise die Fortpflanzung von Hefen. Zunächst kommen einige Ammoniumsalze in Betracht, die nach der spezifischen Natur der Organismen verschiedenen Nährwert besitzen. Die Hefezellen vermögen in Gegen-

wart von Ammoniumsalzen in einer gewissen Konzentration die Asken nicht mehr auszubilden, wenn die sonstigen Bedingungen für die Auslösung der Fortpflanzung auch günstig sind. Wenn die Hefe von Säureamiden und Aminosäuren Ammoniak abspaltet, so kommt ihnen oft dieselbe Wirkung zu.

Von einer gewissen Konzentration des Säure-oder Alkaligrades an in der Umgebung wird die Askenbildung der Hefezellen allmählich in steigendem Masse verzögert; so liegt die obere Konzentrationsgrenze für die Sporenbildung von *Saccharomyces mandshuricus* auf Gipsblöcken resp. Filterpapieren bei 0.5–1% Schwefelsäure, Aepfelsäure, Weinsäure und Zitronensäure und 0.2–0.4% Natronlauge. Auch einige Metallgifte beeinträchtigen schon in niederen Konzentrationen die Sporenbildung von *Saccharomyces mandshuricus*.

Von den physikalischen Eigenschaften verschiedener Substanzen spielt die osmotische Wirksamkeit eine wesentliche Rolle für das Konzentrations-Maximum, das für die Sporenbildung des Hefen wie auch für jede Lebenserscheinung existiert. Der Wert dieses Maximums hängt von der spezifischen Natur des Organismus und von den Eigenschaften der benutzten Substanzen ab. Für eine osmophile Art wie *Zygosaccharomyces mandshuricus* liegt das Konzentrations-Maximum für die Askenbildung hoch, indem sie im Nährboden mit 25% Kalisalpeter noch gut wachsen und massenhaft Asken erzeugen kann. Wenn man das Verhalten des *Saccharomyces mandshuricus* gegenüber anorganischen Salzen betrachtet, so ist es leicht verständlich, dass das Konzentrations-Maximum für die Sporenbildung ausser durch die osmotische Wirkung des Stoffes noch durch seine chemische Natur beeinflusst wird. So hemmen z. B. hoch konzentrierte Lösungen von Kalisalpeter die Sporenbildung weniger als isotonische Kochsalzlösungen.

Wenn man auch eine bestimmte Substanz verwendet, braucht das Konzentrations-Maximum für einen Pilz nicht konstant zu sein, weil, die Hefen, wie Schimmelpilze und Bakterien, sich an eine höhere Konzentration allmählich zu gewöhnen befähigt sind.

(CLERFYT, I). Dies ist jedoch die Aufgabe spezieller Untersuchungen, die genaueren Bestimmungen bei verschiedenen Hefen zu machen.

Obwohl im allgemeinen nahrhafte organische Stoffe in niedriger Konzentration als isotonische Lösung von anderen Stoffen mit geringem Nährwert die Fortpflanzung von *Saccharomyces mandshuricus* hemmen, spielt dennoch das Durchdringungsvermögen der zugeführten Substanzen eine wichtige Rolle. Ein ausgezeichnetes Beispiel ist Maltose bei dieser Art; wegen des langsamen Eindringens in die Zelle übt eine 5%ige Lösung von diesem Zucker noch keine Hemmung auf die Auslösung der Fortpflanzung in Gipsblockkultur aus, während die gleicherweise nahrhafte, aber leicht intrameable Dextrose bereits in niederen Konzentrationen die Sporenbildung unterdrückt.

Solange frische Nahrungsstoffe zur Verfügung stehen, bilden *Saccharomyces mandshuricus* und *Zygosaccharomyces mandshuricus* keine Fortpflanzungsorgane. Die wohl genährten Zellen werden durch Nahrungsänderung in der Umgebung zur Entwicklung der Asken ausgelöst. Die Versuche HANSEN's über die Sporenbildung von Saccharomyceten, die sowohl an den Rändern der Vegetation als auch in der Mitte der dicken Nährgelatine auftritt, beweisen nicht, wie KLEBS (V, S. 461) mit Recht hervorgehoben hat, dass die Sporenbildung bei fast unveränderter Nahrung herbeigeführt ist. Selbst die peripher gelegenen Zellen können sehr wohl irgendeine Nahrungsverminderung erfahren, bevor aus der Nachbarschaft des Nährbodens frische Nahrung zugeführt werden kann, weil verschiedene Substanzen in der Diffusionsgeschwindigkeit mannigfaltig sind, und dadurch das Nahrungsgleichgewicht immer gestört werden kann. Das kräftige Wachstum und die Sporenbildung an den Strichlinien, die von alten Strichrändern mit einem Platindraht wie Rädien ausgezogen sind, beweisen auch nicht, dass keine Nahrungsänderung in der Umgebung eingetreten sei. Denn jede Hefe kann sich in einem Nährboden mit geringem Nährstoff noch gut entwickeln, und

die Fortpflanzungsorgane können dann gebildet werden, wenn die gewachsenen Zellen in richtigem Reizzustande sich befinden. Dies zeigen uns auch die Kulturversuche mit Gorodkova'schem Nähragar, dem gewöhnlich nur 0.25% Dextrose zugesetzt wird; dabei erhält man an der ganzen Strichlinie ein üppiges Wachstum und zahlreiche Sporentragende Zellen. Auf Grund dieser Betrachtungen behaupte ich, dass, wenn alle anderen Bedingungen durchaus günstig sind, die Fortpflanzung von Saccharomyceten durch eine gewisse Nahrungsänderung in der Umgebung ausgelöst wird. Allerdings befördert je nach der spezifischen Natur der Organismen eine gänzliche oder teilweise Nahrungsentziehung die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane.

Trotzdem ist *Schizosaccharomyces octosporus* eine Ausnahme von der Regel, dass die Fortpflanzung durch quantitative Veränderung der allgemeinen Bedingungen hervorgebracht wird. In fast unveränderten Nährböden bildet diese Art reichliche Sporen, wenn die anderen Bedingungen wie Sauerstoffzufuhr, Temperatur günstig sind. Die Ansicht von KLEBS (IV), dass die an dem Agarstrich massenhaft entwickelten Hefezellen infolge des Nahrungsmangels zur Sporenbildung gezwungen werden, ist wenigstens bei *Schizosaccharomyces octosporus* nicht stichhaltig.

Auch im Falle, wo die Sporenbildung durch Nahrungsmangel ausgelöst wird, sind wir voll berechtigt, von den inneren Bedingungen zu reden, da immer nur von einer selbsttätigen, inneren physiologischen Bedingung der Nahrungsentzug in besagter Weise zu direktiven Zwecken nutzbar gemacht wird. Selbst kräftig genährte Hefezellen reagieren nicht gleich auf die Nahrungsänderung, nur die in richtigem Reizzustande befindlichen Zellen wandeln sich zu Asken um. Wenn die Zellen einmal zum Prozess der genannten Fortpflanzung ausgelöst worden sind, können sie nach einiger Zeit nicht mehr zur vegetativen Vermehrung zurückkehren, wenn man dem Substrat frische Nahrungsstoffe zusetzt. Daraus geht hervor, dass bei der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane eine tiefgreifende Umänderung in den inneren Bedingungen der Hefezellen geschaffen wird.

Von den Sporen des Saccharomyces, welche KLEBS mit denen der Bakterien als einfache Karposporen betrachtet hat, und die in

den Zellen paulosporenartig entstehen, unterscheiden sich also diejenigen von *Schizosaccharomyces octosporus* und einigen *Zygosaccharomyces*-Arten, die wie echte Karposporen nach vorangehender Verschmelzung zweier vegetativen Hefezellen gebildet werden, dadurch, dass die letzteren unter verwickelteren chemischen Bedingungen in der Umgebung entstehen als die erstgenannten. Ich meine aber nicht, dass der Prozess im Protoplasma selbst mit der Komplikation der äusseren Bedingungen parallel verläuft.

Wir konnten bislang nur bei relativ wenigen Hefen die Sporenbildung finden, welche für die systematische Bearbeitung der betreffenden Pilzgruppe unbedingt notwendig ist. Es sind einige Möglichkeiten denkbar, die das Fehlen der genannten Fortpflanzungsorgane erklären lassen.

Aus einigen Hefearten entstehen durch Umbildung (HANSEN, II) oder durch Mutation (BEIJERINCK, I) konstant asporogene Rassen. Falls die Asporogenität aber nur eine flüchtige Variation von ursprünglichen Typen ist, so kann die sporenbildende Tätigkeit durch geeignete Behandlung leicht wieder erweckt werden (HANSEN, II). Vielleicht ist eine Anzahl asporogener Hefen teils in dieser Weise aus sporogenen Stammformen entstanden.

LINDNER (I) bemerkt in seinem Referat der KLÖCKER'schen Arbeit über *Apiulatus*-Formen, dass der Grund der Asporogenität von *Pseudosaccharomyces* in ähnlichen Umständen wie bei manchen Zygomyceten liegt: es müssen also beide Geschlechter gleichzeitig zur Aussaat kommen, wenn Sporen sich bilden sollen. Er vermutet, dass die geschlechtlichen Tendenzen nur in den natürlich vorkommenden Vegetationen und nicht in Einzellkulturen zu beobachten wären. Wenn diese Vermutung einmal bewiesen wäre, so müsste man an den Hefen monözioese und diözioese Arten unterscheiden (vgl. auch EULER und LINDNER, [I], S. 26). Bislang liegt jedoch kein Beweis für das Zutreffende dieser Ansicht vor.

Schliesslich kommt noch eine dritte Vermutung, nach welcher Hefezellen, die keine Sporenbildung aufweisen, nicht unter den richtigen Bedingungen stehen. Da die Hefen sich bei der Sporen-

bildung, wie ich oben bei einigen Arten nachgewiesen hatte, gegen äussere Bedingungen verschiedenartig verhalten, indem einige durch teilweisen oder gänzlichen Nahrungsentzug am sichersten zur genannten Fortpflanzung fortschreiten, und andere selbst beim Vorhandensein des Nährstoffes Sporen bilden können, so scheint die Annahme auch nicht ohne Grund zu sein, dass beim richtigen Zustandekommen der äusseren und inneren Bedingungen die Hefezellen zur Sporenbildung ausgelöst werden. Dem entspricht z. B. die Tatsache, dass nach KLÖCKER (I) *Saccharomyces Marxianus* bei vorangehender Züchtung in einer dextroshaltigen Nährlösung viel mehr Sporen auf Gipsblöcken erzeugt als bei der Verwendung gewöhnlicher Bierwürze. Im Einklang mit dieser Tatsache steht meine Beobachtung über *Saccharomyces mandshuricus*, der je nach verschiedener Stickstoffernährung eine sehr verschiedene Anzahl sporentragender Zellen auf gewöhnlichen Gipsblöcken aufweist.

Diese einfachen Beispiele deuten schon die Notwendigkeit eines richtigen Reizzustandes für die Auslösung der Fortpflanzung bei den Hefezellen an. Wir dürfen also mit Recht annehmen, dass auch Tausende von äusseren und inneren Faktoren, je nach der spezifischen Natur des Organismus, als bewegende und auslösende Kräfte für die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane eingreifen, weil die Lebensvorgänge mit einem komplizierten Mechanismus zu vergleichen sind.

April, 1916.

Centrale Untersuchungsanstalt,
Südmandschurische Eisen-
bahngesellschaft,
Dairen, Mandschurei.

Literatur-Verzeichnis.

- Bachmann, J.**, (I), Einfluss der äusseren Bedingungen auf die Sporenbildung von *Thamnidium elegans*. Bot. Ztg., 1895.
- Barker, B. T. A.**, (I), On Spore-formation among the Saccharomycetes. Journ. Inst. Brewing, Vol. VIII., 1902. Ref. in Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. X, S. 469, 1902.
- Beijerinck, M. W.**, (I), Mutation bei Mikroben. Folia Microbiologica, I, 1912.
- Benecke, W.**, (I), Bau und Leben der Bakterien. 1912.
- Blakeslee, A. F.**, (I), Sexual Reproduction in the Mucorineae. Proc. Americ. Acad. Arts and Science, Vol. XL, No. 4, 1904.
- Buchner, H.**, (I), Ueber die Ursache der Sporenbildung bei Milzbrandbacillen. Centralbl. f. Bakt., Bd. VIII, 1890.
- Clerfeyt, Ch.**, (I), Versuche über die erbliche Anpassung von Hefen an konzentrierte Salzlösungen. Zitiert nach KOCH'S Jahresbericht, 1901.
- Dauphin, J.**, (I), Contribution à l'étude des Mortierelles. Ann. Sci. Nat. Bot., IX, 8:1-112, 1908.
- Dombrowski, W.**, (I), Die Hefen in Milch und Milchprodukten. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 28, S. 345.
- Ehrlich, F.**, (I), Ueber die Entstehung des Fuselöls. Zeitschr. d. Vereins d. Deutsch. Zuckerindustrie, Bd. 55, S. 539, 1905.
- (II), Ueber die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Zeitsch., 18, 1909, S. 391.
- Euler, H. und Lindner, P.**, (I), Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung, 1915.
- Falck, R.**, (I), Die Bedingungen und die Bedeutung der Zygotenbildung bei *Sporodinia grandis*. COHN'S Beiträge z. Biologie d. Pflanzen, 1902, Bd. 8, S. 213.
- Haberlandt, G.**, (I), Zur Kenntnis der Konjugation bei *Spirogyra*. Sitzb. d. Wiener Akad., Bd. 99, 1890.
- Hansen, Emil Ch.**, (I), Neue Untersuchungen über die Sporenbildung bei den Saccharomyceten. Centralbl. f. Bakt., Bd. VI., 1899, S.
- , (II), Ueber die Variation bei den Saccharomyceten, 1900, Gesammelte Abhandlungen, S. 319.
- (III), Eine vergleichende Untersuchung über die Bedingungen des vegetativen Wachstums und der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane bei den Alkoholgärungspilzen. 1902, Ebenda, S. 352.
- Horn, L.**, (I), Experimentelle Entwicklungsänderungen bei *Achlya polyandra* De Bary. 1904, Inaugural-Dissertation, Halle.
- Kauffmann, G. H.**, (I), A Contribution to the Physiology of the Saprolegniaceae. Ann. of Botany, Vol. XXII, 1908, S. 361.
- Klebs, G.**, (I), Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen, 1896.

- Klebs, G.**, (II), Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze, I, *Sporodinia grandis*. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXXII, 1898.
- (III), Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze, II, *Saprolegnia mixta*. Ebenda, Bd. XXXIII, 1899.
- (IV), Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze, III, Allgemeine Betrachtungen. Ebenda, Bd. XXXV, 1900.
- (V), Ueber Probleme der Entwicklung. Biolog. Centralbl., Bd. 24, 1914, S. 461.
- Klöcker, Alb.**, (I), Gärungsorganismen. Zweite Auflage, 1906.
- Kossowicz, Alex.**, (I), Untersuchungen über das Verhalten der Hefen in mineralischen Nährlösungen. Zeitsch. f. d. landw. Versuchswesen Oesterreichs, 1903, Bd. 6, S. 27. Zitiert nach LAFAR, Handbuch d. techn. Mykologie, Bd. I, S. 347.
- Kruse, W.**, (I), Allgemeine Mikrobiologie. 1910.
- Lafar, F.**, (I), Handbuch d. technischen Mykologie.
- Leininger, H.**, (I), Zur Morphologie u. Physiologie der Fortpflanzung von *Pestalozzia palmarum*. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 29, S. 3.
- Lindner, P.**, (I), Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Fünfte Auflage, 1910.
- (II), Bemerkung zur Arbeit KLÖCKER'S: Beschreibung von *Saccharomyces apiculatus*-Formen. Wochensch. f. Brauerei, 1913, Jg. 30., Nr. 14, S. 220.
- u. **Saito, K.**, (I), Assimilierbarkeit verschiedener Kohlenhydrate durch verschiedene Hefen. Wochens. f. Brauerei, Jahrg. 27, Nr. 41, 1910.
- Matzschita, T.**, (I), Zur Physiologie der Bacillen, nebst Bemerkungen zum Wachstum einiger Anaeroben. 1912. Inaug.-Dissert., Halle.
- Migula, W.**, (I), System der Bakterien, Bd. I, 1897.
- Namyslowski, B.**, (I), Studien über Mukorineen. Bulletin international de l'académie des sciences de Cracovie, Série B., No. 6 B, S. 477, 1910.
- Obel, P.**, (I), Researches on the Conditions of the Forming of Oogonia in *Achlya*. Ann. Mycologici, Vol. 8, Nr. 4, 1912, S. 421.
- Osterwalder, A.**, (I), Beiträge zur Morphologie einiger Saccharomyceten etc., Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1903. Ref. in Centralbl. f. Bakt., Abt. II, 1904, Bd., 12, S. 486.
- Pfeffer, W.**, (I), Pflanzenphysiologie, Bd. II, 1904.
- Pringsheim, H.**, (I), Ueber Stickstoffernährung der Hefe. Biochem. Zeitschr., Bd. III, 1907, Heft 2-4.
- Raciborski, M.**, (I), Ueber den Einfluss äusserer Bedingungen auf die Wachstumsweise von *Basidiobolus*. Flora, 1896, S. 107.
- Saito, K.**, (I), Mikrobiologische Studien über die Bereitung des mandschurischen Branntweins. Report of the Central Laboratory, South Manchuria Railway Co., No. I, 1914.
- Sartory, A.**, (I), Sporulation d'une levure sous l'influence d'une bacterie. Compt. Rend. Soc. biol., Paris, T. 22, 1912, S. 558. Ref. in Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd., 37, 1913, S. 286.

- Schreiber, O.**, (I), Ueber die physiologischen Bedingungen der Sporenbildung bei *Bacillus anthracis, subtilis und tumescens*. Inaug.-Dissert., Basel, 1896.
- Selter, (I)**, Ueber Sporenbildung bei Milzbrand u. anderen sporenbildenden Bakterien. Centralbl. f. Bakt., 1904, Bd. 37, S. 186.
- Takahashi, T. and Yukawa, M.**, (I), On the Budding Fungi of Shoyu-Moromi and Shoyu-Koji. Journ. Coll. Agric., Tokyo, vol. V., No. 3, 1915.
- Tullo, T. W.**, (I), Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Zuckerlösungen auf die Tötungstemperatur bei verschiedenen Hefearten. Wochens. f. Brauerei, 1905, Nr. 14, XXII, S. 199.
- Werner, C.**, (I), Die Bedingungen der Konidienbildung bei einigen Pilzen. Inaug.-Dissert., Basel, 1898.
- Wisniewski, P.**, (I), Einfluss der äusseren Bedingungen auf die Fruchtform bei *Zygorhynchus Moelleri Vuill.* Bulletin international de l'academie des sciences de Cracovie, 1908, No. 7, S. 656.