

It remains to be seen (a) whether the inactivated cells have specifically lost the ability to metabolize the slow-adaptive substrates or (b) whether the inactivation of the nuclei can be differentially reversed by glucose, citrate, and succinate metabolism. Details of present and further investigations will be published elsewhere. Preliminary studies indicate that exposure to visible light can reverse the ultra-violet-induced physiological modification.

The work described in this note was performed in the Department of Zoology of Columbia University while one of us (A.W.R.) was a Fellow of the U.S. Public Health Service and the other (A.N.) was a Fellow of the Atomic Energy Commission.

A. W. RAVIN and A. NORMAN

Laboratory of Genetics, Institute of Biology, University of Paris, and Atomic Energy Project, University of California, Los Angeles, September 19, 1951.

### Résumé

Il est possible de provoquer, dans des populations d'*Aerobacter aerogenes*, à l'aide de conditions spéciales de culture, ou par irradiation ultra-violette, la perte de leur capacité de proliférer dans des milieux contenant des substrats carbonés adaptatifs. Cette perte n'est pas héréditaire. L'analyse cinétique du phénomène suggère que l'induction de cette modification est due à une inactivation facilement réversible du noyau des cellules.

### Wachstumsversuche mit Myzelsuspensionen von *Mycelium Radicis atrovirens* in Ruhe- und Schüttelkulturen

Kürzlich haben WIKÉN und Mitarbeiter<sup>1</sup> eine einfache Methode entwickelt, welche zur Herstellung von Myzelsuspensionen für Wachstumsversuche mit Pilzen geeignet ist. Das Myzel wird dabei durch Schütteln mit Glaskugeln in destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen sehr fein verteilt. In Ruhekulturen, welche mit solchen Aufschwemmungen von Myzelfragmenten bzw. Hyphen geimpft werden, verläuft das Wachstum grundsätzlich in der gleichen Weise wie bei der Impfung nach der bisher üblichen Methode, das heißt mit Agarstückmyzel, das auf der Oberfläche der betreffenden Nährösung schwimmend verbleibt. Wenn die Impfung mit angemessenen Mengen der Myzelsuspension erfolgt, kann bei zahlreichen Pilzen die gleiche Wachstums geschwindigkeit und die gleiche Höchstausbeute an Myzeltrockensubstanz festgestellt werden wie in den mit Agarstückmyzel geimpften Parallelkulturen. Die neue Impfungsmethode, deren Vorteile gegenüber der alten Agarstückmyzelmethode von WIKÉN und Mitarbeitern bereits diskutiert wurden, wird jetzt bei den im hiesigen Institute durchgeführten Untersuchungen über die physiologischen Eigenschaften mykorrhizabildender und streuzersetzender Pilze laufend angewendet (KELLER<sup>2</sup>, SCHELLING<sup>3</sup>, STÖCKLI<sup>4</sup>).

<sup>1</sup> T. WIKÉN, H. G. KELLER, C. L. SCHELLING und A. STÖCKLI, Exper. 7, 237 (1951).

<sup>2</sup> H. G. KELLER (Diss. ETH., Zürich 1951, im Druck).

<sup>3</sup> C. L. SCHELLING (Diss. ETH., Zürich 1951, im Druck).

<sup>4</sup> A. STÖCKLI, Schweiz. Z. allg. Pathol. Bakteriol. 14, 567 (1951).

Verschiedene Forscher, zum Beispiel REITSMA<sup>1</sup> MODESS<sup>2</sup>, LINDEBERG<sup>3</sup> und NORRKRANS<sup>4</sup>, haben hervorgehoben, dass das Myzel höherer Pilze in seiner Entwicklung von guter Sauerstoffzufuhr stark abhängig ist. MODESS<sup>2</sup>, der das Wachstum des schwimmenden bzw. submersen Myzels von zwölf Pilzen untersuchte, konnte feststellen, dass nach Impfung mit dem ersten Myzel die Trockensubstanzproduktion bei den sechs Arten *Boletus bovinus*, *Boletus subtomentosus*, *Stropharia Hornemannii*, *Rhizopogon roseolus*, *Boletus luteus* und *Stropharia aeruginosa* 7- bis 22mal und bei den fünf Arten *Clitocybe clavipes*, *Clitocybe nebularis*, *Tricholoma albobrunneum*, *Tricholoma nudum* und *Lactarius deliciosus* 1,5-3,5mal grösser war als nach Impfung mit dem letzten Myzel. Nur bei einer Art, und zwar bei *Psalliota silvatica*, zeigte das submerge Myzel grössere Wachstums geschwindigkeit (2mal) als das schwimmende. Ohne Versuchswerte anzuführen, erwähnt LINDEBERG<sup>3</sup>, dass bei gewissen der von ihm untersuchten Marasmiusarten schwimmende Myzelien um das mehrfache rascher wachsen als submerge Myzelien. Wie bereits erwähnt, werden diese Unterschiede der Wachstums geschwindigkeit auf guten bzw. schlechten Luftzutritt zur Nährösung der Kulturen sowie auf den ungleich grossen Sauerstoffbedarf der betreffenden Pilze zurückgeführt. REITSMA<sup>1</sup> und NORRKRANS<sup>4</sup> geben weder Versuchswerte noch Schätzungen der Wachstums geschwindigkeit der untersuchten Pilze (*Armillaria mellea* bzw. *Tricholomaarten*) unter den verschiedenen Bedingungen an. In sämtlichen Untersuchungen kam als Impfmateriale Agarstückmyzel zur Verwendung.

Es sei ferner erwähnt, dass nicht nur Vertreter der Hymenomyzeten und Gasteromyzeten, sondern auch solche der niederen Pilze wegen des grossen Sauerstoffbedarfs des wachsenden Myzels bekannt sind. So zeigten beispielsweise bereits PASTEUR<sup>5</sup> und WEHMER<sup>6</sup>, dass das Wachstum gewisser Mucorarten bei schlechtem Luftp zutritt stark gehemmt wird, wobei das Myzel mehr oder weniger ausgeprägt das Aussehen einer «Kugelhefe» annimmt, indem durch Zerfall normaler, langgestreckter Hyphen kugelförmige Zellen entstehen, welche unter Umständen sogar zur Sprossung fähig sind. Der grosse Sauerstoffbedarf der bei den oxydativen Pilzgärungen wirksamen Arten der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* usw. ist ein Faktor von grösster gärungstechnischer Bedeutung (vgl. BERNHAUER<sup>7</sup>, PRESCOTT und DUNN<sup>8</sup>, FOSTER<sup>9</sup>).

Mit Rücksicht auf die erwähnten Ansichten über den Sauerstoffbedarf verschiedener Vertreter der Bodenpilze schien es uns von Interesse zu sein, das Wachstum des submersen Myzels verschiedener Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens* in Schüttelkulturen mit demjenigen in Ruhekulturen zu vergleichen. Das Studium der submersen Züchtung dieses Bodenpilzes in Schüttelkulturen war ferner von methodologischer Bedeutung für die im hiesigen Institute laufenden Untersuchungen über die Atmung der Pilze. Nach Impfung mit einer genügenden

<sup>1</sup> J. REITSMA, Phytopathol. Z. 4, 461, 470 (1932).

<sup>2</sup> O. MODESS, Symb. Bot. Upsal. V:1, 24 (1941).

<sup>3</sup> G. LINDEBERG, Symb. Bot. Upsal. VIII:2, 41 (1944).

<sup>4</sup> B. NORRKRANS, Symb. Bot. Upsal. XI:1, 12 (1950).

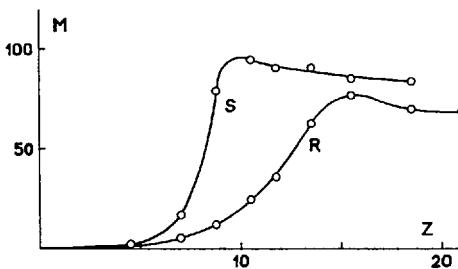
<sup>5</sup> L. PASTEUR, *Etudes sur la bière* (Gauthier-Villars, Paris 1876).

<sup>6</sup> C. WEHMER, Zentralbl. Bakteriol. II 13, 277 (1904); 14, 556 (1905); 15, 8 (1906).

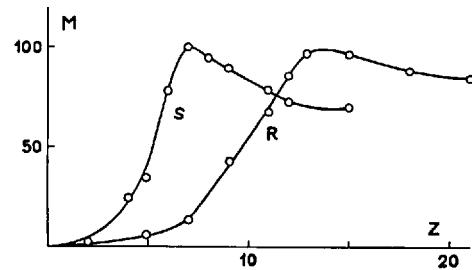
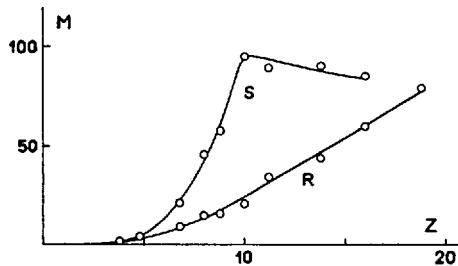
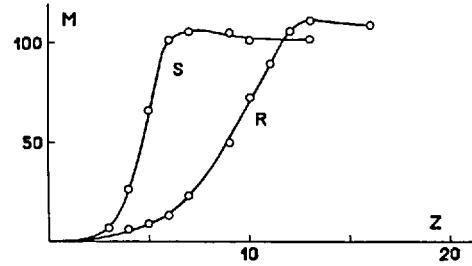
<sup>7</sup> K. BERNHAUER, *Die oxydatischen Gärungen* (Verlag Springer, Berlin 1932).

<sup>8</sup> S. C. PRESCOTT und C. G. DUNN, *Industrial Microbiology* (Mc Graw-Hill Book Co., New York, 1940).

<sup>9</sup> J. W. FOSTER, *Chemical Activities of Fungi* (Academic Press Inc., New York, 1949).



A Stamm «Melin»; Ammontartrat.

C Stamm «Levisohn» aus *Pinus sylvestris*; Ammontartrat.B Stamm «Levisohn» aus *Picea sitchensis*; Ammontartrat.D Stamm «Levisohn» aus *Pinus sylvestris*; L(+)-Glutaminsäure.

Wachstum verschiedener Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens* in Ruhe- bzw. Schüttelkulturen nach Impfung mit Myzel-suspensionen. R = Ruhekulturen. S = Schüttelkulturen. M = Myzeltrockensubstanz in Milligramm pro Kultur, Mittelwert aus 4 Parallelens. Z = Zeit in Tagen.

Menge Myzelsuspension wachsen gewisse Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens* in Ruhekulturen in der Form eines submersen Myzels mit der gleichen Geschwindigkeit und erreichen die gleiche maximale Ausbeute an Myzeltrockensubstanz wie nach Impfung mit schwimmendem Agarstückmyzel, das sich zu einer geschlossenen, auf der Oberfläche der ruhigen Nährlösung schwimmenden Luftmyzeldecke entwickelt<sup>1</sup>. Das in Ruhekulturen gewonnene submerge Myzel ist aber wie das Luftmyzel für gewisse Atmungsversuche unbrauchbar.

Bezüglich der in den Versuchen mit Ruhe- bzw. Schüttelkulturen verwendeten Methodik sowie der Zusammensetzung des Substrates verweisen wir auf die erwähnte Arbeit von WIKÉN und Mitarbeitern<sup>2</sup>. Die letzten Kulturen wurden mit einer Frequenz von je 50–60 Hin- und Herbewegungen pro Minute geschüttelt. Dabei betrug die Amplitude etwa 15 cm. Die Kulturen, in welchen eine Aminosäure als Stickstoffquelle zur Verwendung kam, enthielten die gleiche Stickstoffmenge wie die entsprechenden Kulturen auf Ammoniumtartrat, das heisst etwa 4 mg pro 20 ml.

Geprüft wurden unter anderem zwei Stämme, welche von LEVISOHN aus *Picea sitchensis* bzw. *Pinus sylvestris* isoliert worden waren, und ein Stamm, den MELIN reingezüchtet hatte. Die Ergebnisse einiger Versuche sind in Abbildung A–D graphisch dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich die drei untersuchten Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens* nach Impfung mit einer Myzelsuspension in Schüttelkulturen züchten lassen. Dabei setzt die Phase des raschen Wachstums meistens viel früher ein als in den entsprechenden Ruhekulturen. Ferner ist die Geschwindigkeit der Myzelproduktion während dieser Phase in den Schüttelkulturen bedeutend grösser als in

den unter identischen Bedingungen angeordneten Ruhekulturen derselben Versuchsreihe. Dies führt dazu, dass die Höchstausbeute an Myzeltrockensubstanz in jenen Kulturen um 6–7 oder sogar etwa 10 Tage (Levisohnstamm, isoliert aus *Picea sitchensis*) früher erreicht wird als in diesen Kulturen.

Wie wir in einem separaten Artikel<sup>1</sup> noch ausführen werden, eignet sich das in Schüttelkulturen gewonnene Myzel in intakter Form sehr gut zu Versuchen über die Atmung des Pilzes in verschiedenen Phasen des Wachstums mit Hilfe der Apparatur nach VON EULER, NILSSON und MYRBÄCK.

Einen der verwendeten Stämme von *Mycelium Radicis atrovirens* verdanken wir Herrn Professor Dr. E. MELIN, Institut für physiologische Botanik, Uppsala. Die zwei von LEVISOHN isolierten Stämme erhielten wir vom «Centraalbureau voor Schimmelcultures», Baarn.

Die Untersuchungen werden aus dem Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung sowie vom Eidg. Institut für das forstliche Versuchswesen wohlwollend unterstützt.

T. WIKÉN und H. SOMM

Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich, den 26. November 1951.

#### Summary

Three strains of *Mycelium Radicis atrovirens* were grown in a submerged state with aeration brought about by continual shaking of the cultures (100 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of substrate; shaking speed = 50–60 cycles per minute; amplitude = 15 cm). The shake cultures showed a marked acceleration in growth as compared with the corresponding stationary cultures, maximum dry weight of mycelium being attained after incubation for 7 to 10 days in the former and after 13 to 20 days, respectively, in the latter cultures. The submerged mycelium produced in the shake cultures was successfully used in experiments on respiration of the fungus.

<sup>1</sup> T. WIKÉN, H. G. KELLER, C. L. SCHELLING und A. STÖCKLI, Exper. 7, 237 (1951). — C. L. SCHELLING (Diss. ETH., Zürich 1951, im Druck).

<sup>2</sup> T. WIKÉN, H. G. KELLER, C. L. SCHELLING und A. STÖCKLI, Exper. 7, 237 (1951).

<sup>1</sup> T. WIKÉN und H. SOMM, Exper. (1952, im Druck).