

Über einige Kulturbedingungen des insektentötenden Pilzes *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor.

Von Vale Vouk und Zora Klas

Es wurde schon öfters versucht *Metarrhizium anisopliae* zur Bekämpfung gewisser Insekten mit mehr oder weniger günstigem Erfolg anzuwenden (Krassiltchik 1888, Friederichs 1919, Williams 1921, Barrs and Stearns 1925, Glaser 1926, Briton-Jones 1927). Neuerdings sind solche Versuche an *Pyrausta nubilalis* im Laboratorium (Wallengren) und im Felde (Hergula) mit gutem Erfolge durchgeführt worden. Von botanischer Seite ist aber der Pilz weniger untersucht worden. Man versuchte zwar seine systematische Stellung festzustellen (Vuillemin P.) und man machte auch einige Beobachtungen über die Kultur des Pilzes (Krassiltchik, Vast, Delacroix u. a.) doch immerhin fehlt uns eine genauere morphologische und speziell physiologische Analysis des interessanten Pilzes. Da für die praktische Anwendung des Pilzes die Kenntniss seiner Physiologie von evidenter Bedeutung ist, so haben wir unternommen diese zu studieren. In folgendem wollen wir über eine Reihe von Versuchen berichten, die sich auf wichtigste Kulturbedingungen, wie Temperatur, H-ionenkonzentration und verschiedene Nährstoffe beziehen. Den Licht- und Feuchtigkeitsfaktor haben wir vorläufig nicht einer physiologischen Analyse unterworfen. Wir können darüber nur einige allgemeine Beobachtungen mitteilen.

Was den Lichtfaktor anbelangt, so beobachteten wir, dass das vegetative Wachstum, wie auch Fruktifikation in Dunkelheit besser vor sich geht, als bei Licht. Die Kulturen welche auf einem Fenster des Laboratoriums teils direktem teils diffussem Lichte ausgesetzt waren, blieben in jeder Hinsicht hinter jenen in Dunkelheit kultivierten zurück. Bei direktem Sonnenlicht konnte man sogar deutliche Schädigung der Kulturen beobachten. Die Frage ob das Sonnenlicht an und für sich, oder erst im Zusammenhange mit Erhöhung der Temperatur und infolgedessen auch Erhöhung der Transpiration schädigend wirkt, blieb unerforscht.

Was den Einfluss von Feuchtigkeit anlangt, so scheint es, dass die ganze Entwicklung von *Metarrhizium* bei höherem Feuchtigkeitsgrade bedeutend besser und rascher verlaufe. Dafür bietet uns ein Beispiel die Entwicklung des Pilzes in Agarstrichkulturen. Die Keimung und die weitere Entwicklung des Pilzes findet am üppigsten auf der Oberfläche und in nächster Nähe des Kondenswassers, am spätesten und spärlichsten am obersten Teile des Impfstriches statt. Da der Feuchtigkeitsgrad in verschiedenen Höhen einer Eprouvete kaum grosse Unterschiede aufweisen kann, dürfte uns diese Erscheinung die Annahme einer ausserordentlich ausgebildeten Reaktionsfähigkeit des Organismus auf kleinste Feuchtigkeitsdifferenzen erklären. Jedenfalls ist es wünschenswert diese Verhältnisse methodisch zu durchforschen.

Unsere ersten Versuche wurden mit Sporenmaterial durchgeführt, das wir von Prof. Wallengren erhalten haben. Mit diesem Material sind im Vorjahre Feldversuche von Herrn Dr. Hergula im Botanischen Garten der Universität durchgeführt. Das Material war bereits 2 Jahre alt. Nun in drittem Jahre zeigte es sich, dass die Sporen sehr schwach keimfähig waren (kaum 1%) und wir führten deshalb unsere Versuche mit dem Material, das wir aus der frisch erhaltenen Kultur vom Centralbureau für Schimmelkulturen in Baarn herausgezüchtet haben. Die Keimfähigkeit von *Metarrhizium*sporen nimmt eben mit dem Alter stark ab, wie das auch andere Forscher (Glaser) bereits festgestellt haben. Diese Feststellung ist für die praktische Anwendung von Sporen für die Bekämpfung von Insekten von besonderer Bedeutung.

I. Der Einfluss der Temperatur auf Keimung, Wachstum und Fruktifikation.

Obwohl man in der Literatur schon einige Angaben über das Temperaturoptimum von *Metarrhizium anisopliae* vorfindet (Wallengren H. and Johnson R.), schien es zweckmässig den Einfluss der Temperatur auf das Wachstum unseres Pilzes nochmals systematisch zu prüfen. Bei diesen Untersuchungen handelte es sich nicht nur um die Feststellung der Kardinalpunkte, sondern man trachtete auch danach die Relation der Temperatur zur Schnelligkeit der Keimung, des Wachstums wie auch zur Reichlichkeit der Fruktifikation festzustellen. Um diese Fragen, welche wohl vom theoretischen Interesse, noch mehr aber von praktischer Bedeutung sind, aufzuklären, wurden zwei Versuche durchgeführt, welche vollkommen übereinstimmende und einander ergänzende Resultate ergaben.

Da nach Literaturangaben (Vast, Wallengren u. a.) *Metarrhizium anisopliae* sehr gut auf Kartoffellagar wächst, entschloss man sich für dieses Nährsubstrat, welches folgender Zusammensetzung war:

Kartoffel	200,0 gr.
Glukose	20,0 gr.
Agar-agar	17,0 gr.
Aqua dest.	1000,0 ccm.

Nach der Sterilisation pH = 7.0

I. Versuch.

Es wurden sechs Serien mit je 6 Eprouvetten bei folgenden Temperaturen aufgestellt: 7.8°, 10.5°, 21.5°, 25.0°, 30.0°, 35.0° C. Die Temperatur im Eisschrank bzw. in Thermostaten variierte höchstens ungefähr um 1.5° C. Die Beobachtungen der Kulturen wurden zweimal täglich zu gleicher und bestimmter Zeit gemacht. Versuchsdauer: 27. IV. — 6. V. 1931.

Bekanntlich erhält man in Eprouvetten mit Agarnährböden immer etwas Kondenswasser. Wir konnten nun gleich bei ersten Untersuchungen beobachten dass, obwohl das Impfmateriale auch auf ganzem Impfstriche verteilt war, als erste gerade jene Sporen keimten, welche bei Impfung in oder nahe an das Kondenswasser gelangt waren. Wie die Keimung selbst, so vollzog sich auch die ganze Entwicklung in allen Kulturen am spätesten im oberen Teile des Impfstriches. Es scheint also zwischen Feuchtigkeit des Substrates wie auch der Luftfeuchtigkeit und der Entwicklung von *Metarrhizium anisopliae* eine ganz bestimmte Relation zu bestehen. Nach unseren Beobachtungen dürfte sogar die Feuchtigkeit des Substrates den schädlichen Einfluss hoher Temperaturen teilweise abschwächen. Während sich z. B. in Kulturen der Versuchsserie bei 35° C am oberen Teile des Impfstriches kein, bzw. nur ein sehr schwaches Mycelium und dies erst am 7. Tage nach der Impfung entwickelte, keimten die Sporen auf der Oberfläche des Kondenswassers in denselben Kulturen schon am 3. Tag und bildeten in kurzer Zeit ein ziemlich derbes Myceliumhäutchen aus.

In der Versuchsserie bei 7.8° C erfolgte überhaupt keine Keimung. Die Vermutung, dass diese Temperatur für die Entwicklung der Sporen schon eine subminimale Temperatur bedeute, welche möglicherweise die Sporen schädige, erwies sich als unrichtig. Denn als der Versuch abgeschlossen und die Kulturen bei Zimmertemperatur (cca 22° C) weiter aufbewahrt wurden, konnte man schon in einigen Tagen eine ganz normale Auskeimung und später auch eine normale Fruktifikation dieser Kulturen beobachten.

Die Kulturen bei 10.5° C keimten am 5. Tage nach der Impfung. Während die Keimung in Kulturen bei 21.5° C am zweiten, bzw. dritten Tage erfolgte, konnte man die Keimung der Kulturen der Versuchsserie bei 25° C und bei 30° C bereits 24 Stunden nach der Impfung feststellen.

Die Reihenfolge der Fruktifikation der Kulturen entsprach jener der Keimung. Niedrige Temperatur verzögert eben wie die Keimung so auch die ganze Entwicklung, deren Schnelligkeit sonst,

natürlich nur bis zu gewisser Grenze, parallel der Erhöhung der Temperatur wächst.

Die Kulturen bei 7.8° C, deren Impfmateriale während der Versuchsdauer gar keinen Ansatz zur Keimung zeigten, konnten selbstredend während dieser Zeit auch nicht fruktifizieren. Die Kulturen bei 10.5° C, welche erst am 5. Tage zu keimen anfangen, zeigten bei Abschluss des Versuches wie am Kondenswasser so auch am Impfstriche eine mässige Myceliumentwicklung, doch keine Fruktifikation. Bei späterer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur fruktifizierten sie etwas früher als die Kulturen der Serie bei 7.8° C.

In Kulturen bei 21.5° C bemerkte man bereits 7. Tag der Versuchsdauer deutliche Fruktifikation. Wie zur Keimung, so kam es auch zur Ausbildung von Konidien am frühesten in nächster Nähe des Kondenswassers und erst später verbreitete sich die Fruktifikation auch auf obere Teile des Impfstriches. Während die Fruktifikation des auf Kondenswasser ausgebildeten Myceliumhäutchens wie auch der unteren Partie des Impfstriches bis zu cca 15 mm Höhe sehr reichlich war, so dass die Oberfläche dieser Partien von Menge der ausgebildeten Konidien gleichmässig dunkel-olivengrün erschien, erfolgte die Fruktifikation auf oberem Teile der Agaroberfläche linienförmig und war bei weitem nicht so reichlich. Es bildeten sich hier drei ziemlich schmale scharf abgegrenzte Fruktifikationszonen aus. Die mittlere, welche zuerst erschien, entsprach dem Impfstriche, in gleicher Entfernung von ihr bildeten sich beiderseits, fast an der Grenze der Oberfläche des Nähragars die seitlichen, schmälere Fruktifikationszonen aus.

Ähnlich wie die Kulturen bei 21.5° C verhielten sich auch die Kulturen bei 25° C und 30° C nur mit dem Unterschiede dass in den ersteren die Fruktifikation am 5. und in den letzteren bereits am 4. Tage nach der Impfung eintrat.

In Kulturen bei 35° C kam es während der Versuchsdauer nicht zur Fruktifikation und das Mycelium, welches auf dem Kondenswasser in Form von dichten Häutchen, am Impfstriche hingegen nur sehr spärlich entwickelt war, zeigte bereits ein ganz abnormales Aussehen. Das vegetative Mycelium, welches sich bei *Metarrhizium* zwar überhaupt nur sehr mässig entwickelt, jedoch normal und besonders in jüngeren Stadien schneeweisses Luftmycelium und hautartige Überzüge bildet, verbreitete sich bei diesen Kulturen nicht auf der ganzen Agaroberfläche. Es entwickelte sich vielmehr nur auf vereinzelt Stellen des Impfstriches und wuchs in Form kleiner, schmutzig-graugelblicher Klümpchen. Auch nach Übertragung in Zimmertemperatur und trotz erfolgter, jedoch nur spärlicher Fruktifikation behielten diese Kulturen ihren abnormalen Habitus.

Die Beobachtung einiger Autoren, dass in Kulturen von *Metarrhizium anisopliae* einige Stellen des vegetativen Myceliums vollkommen steril bleiben und keine Konidien ausbilden, können auch wir bestätigen. Es dürfte vom Interesse sein, dass sich in

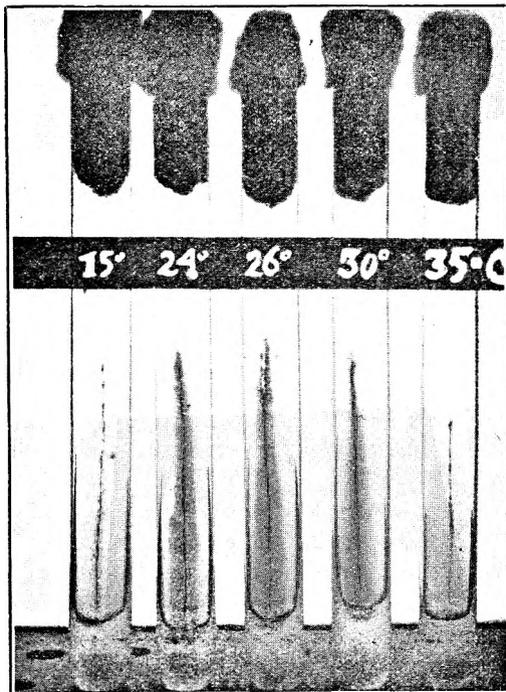
unseren Kulturen dieses sterile Mycelium fast immer an der oberen Grenze des Impfstriches befand, und nur ausnahmsweise auch an anderen Stellen vorkam.

Es sei noch erwähnt, dass wir nach Eintritt der Fruktifikation in Kulturen bei $10,5^{\circ}\text{C}$, $21,5^{\circ}\text{C}$ und $25,0^{\circ}\text{C}$ eine zitronengelbe Verfärbung der oberen Schichten des Substrates beobachteten. In den übrigen Serien konnten wir diese Verfärbung, welche jener von *Penicillium* verursachten sehr ähnlich ist, nicht feststellen.

II. Versuch.

Versuchsbedingungen ausser der Temperatur wie im I. Versuch. Die Temperaturen waren durchschnittlich: $15,5^{\circ}\text{C}$, $24,0^{\circ}\text{C}$, $26,0^{\circ}\text{C}$, $30,0^{\circ}\text{C}$ und $35,0^{\circ}\text{C}$. Allerdings variierte die Temperatur der ersten Serie im Eisschrank um etwa $7,0^{\circ}\text{C}$ und die Temperatur der zweiten Serie in einem dunklen Schrank des Laboratoriums um $6,0^{\circ}\text{C}$.

Fig. 1.



Dieser Versuch war hauptsächlich nur eine Wiederholung des I. Versuches. Die Versuchsdauer war länger (21 Tage) als im I. Versuch: 27. V. — 17. VI. 1931.

Abbildung 1 zeigt das Aussehen je einer Kultur aus allen 5 Versuchsserien am 5. Tage nach der Impfung. Anscheinend bestehen

zwischen den Kulturen bei 24°, 26°, und 30° keine grösseren Unterschiede, ebenso wie auch nicht zwischen Kulturen bei 15.5° und bei 35.0° C. Dafür ist aber der Unterschied zwischen diesen und den drei vorher erwähnten Kulturen desto schärfer.

In folgenden Tagen zeigten die Kulturen bei 24° und 26° C das aus dem 1. Versuche bereits bekannte Fruktifikationsbild: eine mittlere und zwei laterale Fruktifikationszonen waren auch diesmal klar ausgeprägt. Ähnlich verhielten sich auch die Kulturen bei 30.0° nur dass hier das vegetative Mycelium spärlicher entwickelt war und auch weiterhin die schmutzig weisse Farbe behielt.

In dieser Zeit traten in Entwicklung der Kulturen der 15.5° und 35.0° C Serie grosse Unterschiede auf. Es sei bemerkt, dass dieser Versuch nicht wie der 1. Versuch bereits nach 8 Tagen, sondern erst den 21. Tag nach der Impfung abgeschlossen wurde. Während sich also in Kulturen bei 15.5° C 6. Tag nach der Impfung ein reichliches weisses Mycelium zu entwickeln begann, war die Myceliumentwicklung in Kulturen bei 35° C sehr langsam und spärlich und führte schliesslich zur Bildung schmutziger, graugelber, dem Substrate anliegender Klümpchen. In Kulturen bei 15.5° C kam es am 9. bzw. 10. Tage zu deutlicher Fruktifikation. Die Fruktifikation dieser Kulturen zeigte gegenüber der Fruktifikationsform der Kulturen übriger Serien gewisse Unterschiede. Die Sporen entwickelten sich hier nicht in scharf ausgeprägten Fruktifikationszonen, sondern zerstreut auf der ganzen Oberfläche des Substrates. Ausserdem waren die Sporen zuerst von einer giftgrünen Farbe und nahmen erst gegen Ende des Versuches die übliche dunkel olivengrüne Farbe an. Bei Kulturen bei 35.0° C konnte man erst nach Abschluss des Versuches durch mikroskopische Untersuchung feststellen, dass das Mycelium einzelne Konidien abzuschnüüren begonnen hat. Sonst behielten diese Kulturen ihren abnormalen Habitus bis zu Ende des Versuches.

Ebenso wie im 1. Versuche beobachtete man auch diesmal eine nach dem Eintreten der Fruktifikation erfolgende citronengelbe Verfärbung des Substrates, wie auch das Auftreten steril bleibender Myceliumpartien.

Überblicken wir die Ergebnisse der beiden Temperaturversuche, welche in Tab. I. zusammengefasst sind, so können wir feststellen, dass die Temperatur, wie es übrigens auch zu erwarten war, einen recht bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung von *Metarrhizium anisopliae* ausübt. Zugleich können wir aber auch feststellen, dass der Temperaturbereich, in welchem *Metarrhizium anisopliae* annähernd normal gedeihen kann, verhältnissmässig nicht eng begrenzt ist und sich von beiläufig 10° bis 30° C ausdehnt. Für Praxis jedoch, wo es sich um eine je raschere Gewinnung von Sporenmateriale handelt, käme nur eine Temperatur von 24° bis etwa 26° C in Betracht. Bei Temperatur von 30° C erfolgt zwar die Fruktifikation einen Tag früher so dass man bei dieser Temperatur bereits 4. Tag nach der Impfung frisches Sporenmateriale erhält. Aber abgesehen

Tabelle I.

Tag nach der Impfung	7·5°C	10·5°C	15·5°C	21·5°C	24·0°C	25·0°C	26·0°C	30·0°C	35·0°C
1.	—	—	—	—	○○	○○	○○	⊙	—
2.	—	—	○	○○	○○○	○○○	○○○	⊙	○
3.	—	—	○○	○○○	⊙	⊙	⊙	⊙⊙	○
4.	—	—	○○	⊙	⊙⊙	⊙⊙	⊙⊙	●	○
5.	—	○	○○	⊙⊙	●	●	●	●	⊙
6.	—	○	⊙	⊙⊙⊙	●●	●●	●●	●●	⊙
7.	—	○○	⊙⊙	●	●●●	●●●	●●●	●●	⊙
8.	—	⊙	⊙⊙	●●	●●●	●●●	●●●	●●	⊙
9.			●		●●●		●●●	●●	⊙
10.			●		●●●		●●●	●●	⊙
15.			●●		●●●●		●●●●	●●	⊙
21.			●●		●●●●		●●●●	●●	●

Entwicklung von *Metarrhizium anisopliae* bei verschiedenen Temperaturen.

○ = Keimung, ⊙ = vegetatives Wachstum, ● = Fruktifikation.

davon, dass diese Kulturen in ihrem Habitus bereits einige Abweichungen von der Normale zeigen und als Übergang zu den ganz abnormal sich gestaltenden Kulturen bei 35° C aufzufassen sind, sei betont, dass nach approximativer Abschätzung die Ausbeute von Sporen bei Kulturen, welche einer Temperatur von 24°—26° C ausgesetzt waren, viel reichlicher war, als bei jenen Kulturen, welche man bei 30° C kultivierte. Die Grösse des Ausbeute, die Menge des erhaltenen Sporenmateriale ist aber neben Schnelligkeit der Gewinnung jener Faktor, der für die Praxis notwendig massgebend sein muss.

In Anschluss an diese Untersuchungen über die optimale und für die Entwicklung von *Metarrhizium anisopliae* in jeder Hinsicht günstigste Temperatur, möchten wir hier auch kurz den Versuch erwähnen, welcher zur Bestimmung der maximalen Temperatur unternommen wurde. Es ist ja auch ohne weiteres einleuchtend, dass für die praktische Anwendung von *Metarrhizium* als biologischen Bekämpfungsmittels der Corn-Borer Infektion die Kenntnis der die Sporen tödenden Temperatur von Wichtigkeit ist.

Die Versuchsanstellung war die bei solchen Untersuchungen übliche. Zwei Dewar-Gefässe wurden mit breiten, gut angepassten Korkstöppseln, in welche man vorher je zwei Öffnungen, eine für das Thermometer, die andere für die Eprouvette, ausgebohrt hatte, versehen und die nötige Anzahl von Eprouvetten mit sterilem Kartoffelagar bereitgestellt. Als man durch Mischung kalten und heissen Wassers in beiden Dewar-Gefässen die erwünschte, gleiche Temperatur erhielt, impfte man je zwei Eprouvetten mit *Metarrhizium*-Sporen nach Art der StICKKulturen und versenkte sie bis zum Rande in die Öffnungen der Gefässe. Nach 5 Minuten wurden die Kulturen aus den Dewar-Gefässen herausgenommen, abgetrocknet und im dunklen Schranke bei Zimmertemperatur (cca 23° C) weiterer Entwicklung überlassen. Es wurde die Einwirkung folgender Temperaturen untersucht: 35° C, 40° C, 45° C, 50° C, 60° C, 65° C und 70° C. Nach zwei Tagen konnte man bereits sehen, dass die Entwicklung nur in denjenigen Kulturen vor sich ging, welche einer Temperatur unter 60° C ausgesetzt waren.

In allen übrigen Kulturen kam es auch später zu keiner Entwicklung. Somit darf man schliessen dass die maximale Temperatur, welche bei 5 Minuten Einwirkung die Keimfähigkeit der *Metarrhizium*-Sporen noch nicht beschädigt, zwischen 55—60° C liegt. Bereits eine Temperatur von 60° C wirkt tödend auf die Sporen ein.

Dieses Resultat dürfte einen wichtigen Anhaltspunkt für die Methodik der Infektionsversuche bieten. Jedenfalls sind wir der Ansicht, dass vor Bespritzen oder Bestauben der Maispflanzen mit *Metarrhizium*-Sporen bei hohem Sonnenstande und direkter Strahlung ausdrücklich zu warnen ist.

II. Einfluss der H-ionenkonzentration.

Obwohl bekanntlich die meisten Pilze schwach saure Nährböden den alkalischen vorziehen, gibt es doch auch Ausnahmen. So sind nach Bloch witz die auf Insekten parasitierende Pilze im allgemeinen an alkalische Reaktion der Substrate angepasst. Abgesehen von praktischer Bedeutung schien es nun auch von rein theoretischer Seite interessant und wertvoll das diesbezügliche Verhalten von *Metarrhizium anisopliae* als einem typischen Vertreter der an Insekten parasitierenden Pilze experimentell zu prüfen. Ausser einem Vorversuche wurden zu diesem Zwecke noch zwei Versuchsserien mit festem Nährsubstrate und eine Versuchsreihe mit flüssigem Nährmedium durchgeführt.

1. Vorversuch (30. VII. — 17. VIII. 1931.).

Um eine erste Orientierung über das Verhalten von *Metarrhizium anisopliae* gegenüber verschiedenen H-ionenkonzentrationen und besonders gegen Azidität zu erlangen, wurde das Nährsubstrat (Kartoffelagar) mit normaler Salzsäure, bzw. Kalilauge unter Kontrolle mit Hellige-Komparator auf gewisse pH-Werte abgestimmt und in Eprouvetten verteilt. Nach erfolgter üblicher Sterilisation

betrug die H-ionen Konzentration einzelner Serien: 5.3, 6.8, 7.2, 7.4. Fünf Eprouvetten vor jeder Serie wurden möglichst gleichmässig mit Sporen einer Reinkultur von *Metarrhizium* geimpft und im Dunkelermostate bei einer Durchschnittstemperatur von 26° C weiterer Entwicklung überlassen.

24 Stunden nach der Impfung war bei den Kulturen mit H-ionenkonzentration des Nährbodens 5.3 und 6.8 noch keine Entwicklung zu beobachten. In den Kulturen mit pH 7.4 konnte man hingegen deutliche Keimung jener Sporen, welche bei Impfung auf die Oberfläche des Kondenswassers gelangt waren, feststellen, und in den Kulturen mit pH 7.2 keimten die Sporen bereits auch am Impfstrieche. Nächsten Tag beobachtete man Anfänge von Sporenkeimung auch bei den Kulturen pH 5.3 und 6.8. In den Kulturen mit pH 7.2 und 7.4 war diesen Tag schon die Entwicklung eines weissen Luftmyceliums längs des Impfstreiches feststellbar. Das Luftmycelium war bei pH 7.4 etwas schütterer als bei 7.2. Während es 4. Tag nach der Impfung bei diesen Kulturen bereits zur Fruktifikation kam, waren in den Kulturen mit pH 5.3 und in etwas grösserer Masse bei jenen mit pH 6.8 erst Anfänge von Myceliumbildung zu beobachten. Die Kulturen mit H-ionenkonzentration des Substrates 6.8 fruktifizierten 6. Tag, jene mit pH 5.3 7. Tag nach der Impfung.

Bei Abschluss dieses Vorversuches, d. h. 12 Tage nach der Impfung waren die Unterschiede in Bezug auf die Reichlichkeit der Fruktifikation zwischen den Kulturen bei pH 7.2 und 7.4 zwar fast unmerklich, doch zwischen den Kulturen bei pH 5.3, 6.8 und 7.2 (7.4) noch immer sehr klar und scharf ausgeprägt, und man konnte deutlich sehen, wie mit Zunahme der Azidität des Nährbodens die Reichlichkeit der Fruktifikation abnahm. Die reichlichste Fruktifikation wiesen die Kulturen bei pH 7.2 und 7.4 auf, eine minder reichliche jene bei pH 6.8, während die Fruktifikation der Kulturen mit H-ionen Konzentration 5.3 nur mässig war.

I. pH-Versuch (6. VIII. — 18. VIII. 1931.).

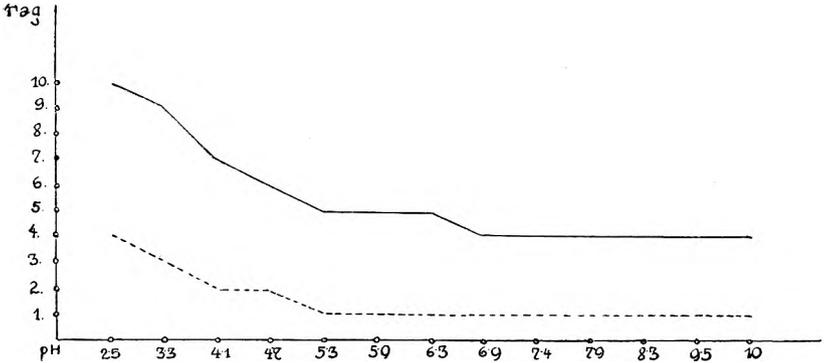
Auf dieselbe Weise wie auch im Vorversuche wurden Serien von Kartoffelagar hergestellt, deren Reaktionen von ausgesprochen saueren bis zu stark alkalischen abgestuft waren. Nach erfolgter Sterilisation (3 × 20 Min. im Dampftopfe) bestimmte man mit Hellige-Komparator die H-ionenkonzentration jeder Serie und erhielt folgende pH-Werte: 2.5, 3.3, 4.1, 5.3, 5.9, 6.3, 6.9, 7.4, 7.9, 8.5, 9.5, 10. Es sei bemerkt, dass das Nährsubstrat in Serien pH 2.5 und 3.5 flüssig, in jener mit pH 4.1 nur halbfest war.

6. VIII. wurden von jeder Serie je 5 Eprouvetten mit Sporen von *Metarrhizium anisopliae* geimpft und in dunklem Zimmerschranke bei durchschnittlicher Temperatur von 25° C weiterer Entwicklung überlassen.

In Fig. 2 ist das Eintreffen der Keimung und der Fruktifikation graphisch dargestellt. Dieses Graphikon illustriert sehr

deutlich die Adaptationsfähigkeit unseren Pilzes, bringt aber auch etwas sehr überraschendes. Man erwartete nämlich, dass das Verhalten von *Metarrhizium* gegen verschiedene pH-Werte in Bezug auf den Zeitpunkt des Eintreffens der Keimung und Fruktifikation in einer s. g. Optimumkurve resultieren wird. Wie wir sehen, ist dies nicht der Fall.

Fig. 2.



Einfluss verschiedener H-ionenkonzentration auf Keimung und Fruktifikation von *Metarrhizium anisopliae*.
Gestrichelte Linie = Keimungskurve. Ausgezogene Linie = Fruktifikationskurve.

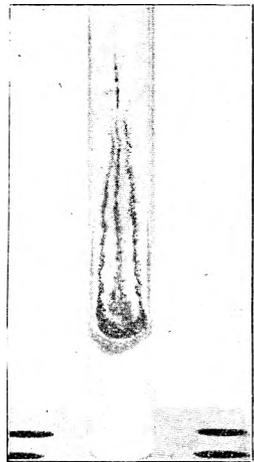
Während bei grosser Azidität des Nährbodens die Entwicklung von *Metarrhizium* deutlich verzögert wird und zwar desto mehr je grösser sie ist, haben verschiedene Grade der Alkalität anscheinend keinen Einfluss auf den Zeitpunkt des Eintreffens der Keimung und Fruktifikation. Betrachtete man aber die Reichlichkeit des vegetativen Wachstums und der Fruktifikation, welche für die Beurteilung der Reaktion des Organismus selbstverständlich wichtiger ist, stellte man doch bei hoher Alkalität einen wenn auch nicht sehr grossen, Abfall fest. Am Ende des Versuches bestand nach approximativer Beurteilung folgendes Verhältniss zwischen verschiedenen pH Werten und Reichlichkeit der Fruktifikation:

pH 2.5	F (*)	(sehr schwach)
3.3	(*)	
4.1	*	(schwach)
4.7	**	(mässig)
5.3	**	
5.9	***	(reichlich)
6.3	***	
6.9	****	(sehr reichlich)
7.4	****	
7.9	****	
8.5	****	
9.5	****	
10	****	

Diese Relation zwischen der Reichlichkeit der Fruktifikation und verschiedenen pH-Werten bestand jedoch nicht während der ganzen Dauer der Fruktifikation der Kulturen. Vielmehr konnte man feststellen, dass bei hoher Alkalität des Nährsubstrates, wie z. B. bei pH 9.5 und 10 die Fruktifikation zwar nicht früher einsetzte, aber früher zu einer gewissen Reichlichkeit führte als bei Kulturen mit pH 6.9—7.4. Bei hochalkalischer Reaktion des Nährsubstrates schien der Fruktifikationsprozess anfänglich lebhafter von statten zu gehen, als bei Kulturen mit schwächerer alkalischer Reaktion des Nährbodens, fand aber dort auch früher seinen Abschluss, so dass in Bezug auf die Reichlichkeit der Fruktifikation die Kulturen mit pH 6.9—7.4 jene bei pH 9.5 und 10 nicht nur bald erreichten, sondern auch überholten.

Wie bereits erwähnt, blieben die Kulturen von pH 2.5 — pH 5.9 von Anfang an wie in Bezug auf die Üppigkeit des vegetativen Wachstums, so auch in Bezug auf die Reichlichkeit der Fruktifikation hinter den alkalischen Kulturen zurück, und zwar desto mehr je saurer die Reaktion des Nährbodens war. Die Kulturen bei pH 2.5 bis 5.3 stellten in diesem Versuche die in jeder Hinsicht schwächsten und kümmerlichsten Kulturen dar. Die Kulturen bei pH 6.9 (s. Abb. 3) ergaben dagegen am Schlusse des Versuches das typische, schon bei den Temperaturversuchen besprochene Bild einer Optimalkultur mit einer Mittel- und zwei seitlichen kontinuierlichen Fruktifikationszonen.

Fig. 3



Was die Verfärbung des Substrates anbelangt, konnte man feststellen, dass sie auch in diesem Versuche kurz von dem Beginn der Fruktifikation der Kulturen erschien und bei Kulturen mit saurerer Reaktion des Nährbodens etwas intensiver als bei neutraler, bzw. alkalischer Reaktion war. Die deutlich zitronengelbe Verfärbung greift aber nur die oberflächlichen Schichten des Substrates an und lässt die tieferen Schichten unverändert, was wohl mit dem nur oberflächlichen Wachstum von *Metarrhizium anisopliae* im Zusammenhang steht.

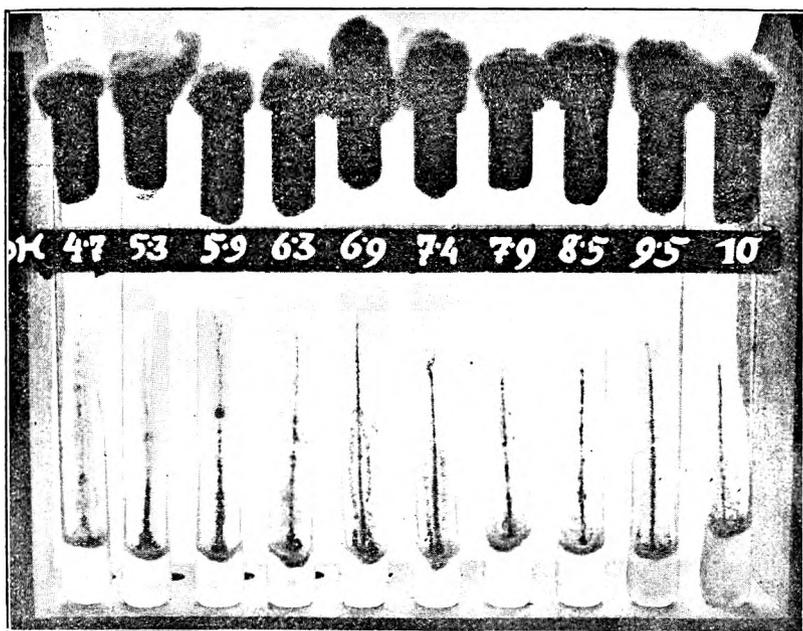
2. pH-Versuch (18. VIII. — 30. VIII. 1931).

Die Resultate dieses Versuches, welcher auf dieselbe Art wie der früher besprochene Vorversuch und 1. pH-Versuch durchgeführt wurde, stimmen vollkommen mit den bereits erhaltenen Resultaten überein. Der approximativen Abschätzung nach waren auch diesmal die Kulturen bei neutraler, bzw. schwach alkalischer Reaktion des Nährbodens am besten entwickelt (pH 6.9, 7.4).

Fig. 4 zeigt den Zustand der Kulturen von pH 4.7 — pH 10 bei Abschluss des Versuches.

Man sieht, und das wollen wir betonen, dass die Grenzen der H-Ionenkonzentrationen des Nährsubstrates, bei denen *Metarrhizium anisopliae* annähernd normal gedeihen kann, sehr weit sind und sich eigentlich von pH 4.7 bis über pH 10 erstrecken. Wir können somit *Metarrhizium* zu den euryionischen Organismen in Sinne von Legendre zählen. Ähnliche Verhältnisse mit noch weiteren pH Grenzen, innerhalb welcher der Organismus gedeihen konnte, wurden bei verschiedenen Pflanzenschädlingen konstatiert,

Fig. 4.



Einfluss der H-Ionenkonzentration des Nährsubstrates auf die Fruktifikation von *Metarrhizium anisopliae*.

so bei einigen *Fusarium*, *Penicillium* und *Ophiobolus*-Arten. Während aber bei diesen Pilzen das pH-Optimum vorwiegend an der saueren Seite liegt (Ausnahme z. B. *Ophiobolus cariceti*, *Fusarium minimum* und einige *Helminthosporium*-Arten) finden wir bei *Metarrhizium anisopliae* das pH-Optimum bei schwach alkalischer Reaktion des Substrates, was die Angaben von Blochwitz bestätigen möchte.

3. pH-Versuch (16. VIII. — 28. VIII. 1931).

Als Nährboden diente Kartoffelabkochung mit 2% Glukosezusatz.

Unter Kontrolle mit Hellige-Komparator wurde die Nährlösung, deren ursprüngliche Reaktion fast neutral ist, durch Zugabe

von normaler Salzsäure auf verschiedene pH-Werte abgestimmt und in Rundkölbchen von 200 ccm zu je 50 ccm verteilt. Nach erfolgter üblicher Sterilisation bestimmte man nochmals die H-Ionenkonzentration einzelner Serien und erhielt folgende Werte: 3.3, 4.3, 5.3, 6.3, 7.3. Je 5 Kölbchen von jeder Serie wurden mit *Metarrhizium*-Sporen geimpft und im dunklen Schranke bei durchschnittlicher Temperatur von 23° C weiterer Entwicklung überlassen.

2. Tag nach der Impfung war bei den Kulturen mit H-Ionenkonzentration der Nährlösung 3.3 und 4.3 nur eine sehr schwache Keimung zu beobachten. Die Kulturen mit pH 7.3 und 5.3 keimten bedeutend besser und jene bei pH 6.2 sogar sehr reichlich. In allen Kulturen keimten nicht nur jene Sporen, welche bei Impfung auf der Oberfläche der Nährlösung haften blieben, sondern auch jene, welche auf den Boden der Kölbchen gelangt waren. Während den nächsten Tag die Entwicklung von *Metarrhizium anisopliae* bei pH 3.3 kaum und bei pH 4.3 nur in sehr geringem Masse fortgeschritten war, zeigten die übrigen Kulturen auf der Oberfläche der Nährlösung bereits eine deutliche Myceliumbildung. Das Verhältniss der Reichlichkeit der Myceliumausbildung war zwischen Kulturen einzelner Serien dasselbe wie auch bei der Keimung, d. h. mit Optimum bei 6.2. 4. Tag nach der Impfung beobachtete man in einigen Kölbchen der Serie pH 4.3 und in allen Kölbchen der übrigen Serien mit Ausnahme der pH 3.3 Serie Anfänge der Fruktifikation wie auch den Beginn einer zitronengelben Verfärbung der Nährlösung. 8. Tag fruktifizierten bereits alle Kulturen. Tabelle II. zeigt das Verhältniss, welches zu dieser Zeit zwischen den Kulturen einzelner Serien in Bezug auf die Reichlichkeit der Myceliumentwicklung, Fruktifikation und Intensität der Verfärbung der Nährlösung bestand. Zur Erklärung der Tabelle sei bemerkt, dass das Zeichen + schwach, ++, mässig, +++ reichlich und ++++ sehr reichlich bedeutet.

Tabelle II.

H-Ionenkonzentration:	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3
Myceliumentwicklung:	+	++	+++	++++	++
Fruktifikation:	+	++	+++	++++	++
Verfärbung des Substrates:	+	++	+++	++++	++

Bei Abschluss des Versuches also 12. Tag nach der Impfung waren die Kulturen mit Wasserstoffexponenten der Nährlösung 3.3 und 4.3 wie in Bezug auf den Stand der Myceliumausbildung so auch auf den der Fruktifikation fast gleich und stellten die schwächsten Kulturen dar, welche man ohne Mühe von anderen Kulturen unterscheiden konnte. Ebenso waren auch die Unterschiede zwischen den Kulturen bei pH 5.3, 6.2 und 7.3 fast vollkommen verschwunden, d. h. die Kulturen bei pH 5.3 und 7.3 erreichten in ihrer

Entwicklung diejenigen bei pH 6.2. Was die Verfärbung der Nährlösung anbelangt, so war ihre Intensität mit Ausnahme der pH 3.3 und 4.3 Kulturen, wo sie etwas schwächer war, bei übrigen Kulturen annähernd gleich.

Wie wir sehen, weichen diese Resultate von den Resultaten der früheren pH-Versuche, bei welchen man als Nährmedium Kartoffelagar gebrauchte, insofern ab, als es dort bei Abschluss der Versuche nicht zu solch einem fast vollständigem Ausgleiche des Entwicklungsgrades der Kulturen kam. Wir betonten zwar auch dort, dass eine annähernd normale Entwicklung im Bereiche von pH 4.7 bis pH 10 erreicht wird, bemerkten aber auch, dass die optimale Entwicklung welche bei pH 6.9 schon anfänglich zu beobachten war, auch bei Abschluss der Versuche feststellbar war.

Die pH-Verhältnisse nach Abschluss des Versuches zeigt uns die folgende Tabelle:

Ursprüngliche H-ionenkonzentration der Nährlösung:	3.3	4.3	5.3	6.2	7.3
H-ionenkonzentration der Nährlösung bei Abschluss des Versuches:	3.3	4.3	4.5	5.0	5.0

Es fand also bei pH 3.3 und 4.3 keine Veränderung der ursprünglichen H-ionenkonzentration der Nährlösung statt, während die Reaktion übriger Serien nach saurerer Seite hin verändert wurde. Es ist interessant, dass gerade bei pH 3.3 und pH 4.3, wo auch die Entwicklung des Pilzes nur schwach war, auch keine weitere Ansäuerung der Nährlösung stattgefunden hat. Der Grad der Ansäuerung nähert sich, wie wir sehen, der unteren Grenze der H-ionenkonzentration, bei welcher noch eine annähernd normale Entwicklung des Pilzes möglich ist. Als diese untere Grenze bezeichneten wir schon früher pH 4.7.

Obwohl man voraussetzen konnte, dass eine analoge Ansäuerung auch bei hochalkalischer Reaktion des Nährmediums stattfindet, war ein experimenteller Beweis dafür sehr erwünscht. Da aber keine Kulturen in Flüssigkeit mit höherem ursprünglichen Wasserstoffexponenten der Nährlösung als 7.3 zu Verfügung standen, benutzte man dazu Agarkulturen. Die bei Zimmertemperatur aufbewahrten Kulturen des 1. pH-Versuches mit ursprünglichem pH-Werte des Nährsubstrates 7.9, 8.5, 9.5 und 10 wurden im Wasserbade gelöst und man bestimmte neuerdings die Reaktion des abfiltrierten Nährmediums. Dabei erhielt man folgendes Resultat:

Ursprüngliche H-ionenkonzentration des Substrates:	7.9	8.5	9.5	10.0
Konstatierte H-ionenkonzentration des Substrates	5.2	5.2	5.0	5.0

Es kommt also auch bei hochalkalischen Kulturen von *Metarrhizium* ebenfalls zu einer Ansäuerung.

Als Resultat unserer pH-Untersuchungen können wir folgendes verzeichnen:

1. Der Bereich von pH-Werten, innerhalb welchem eine annähernd normale Entwicklung von *Metarrhizium anisopliae* stattfindet, erstreckt sich von pH 4.7 bis über pH 10.

2. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 6.9 bis pH 7.4.

3. Im Laufe der Entwicklung des Pilzes wird die Reaktion des Nährmediums verändert und auf cca pH 5.0 herabgedrückt.

Es ist selbstverständlich, dass sich diese Resultate welche man bei Kultivierung des Pilzes auf Kartoffelglukose-agar, bzw. Kartoffelglukose-lösung erhielt, auch nur auf diese Substrate beziehen. Wie sich die Verhältnisse der pH-Konzentrationen bei Anwendung anderer Nährmedien ergeben, wollen wir im folgendem Kapitel über den Einfluss der Nährsubstrate auf *Metarrhizium* besprechen.

III. Das Verhalten gegenüber verschiedenen Nährstoffen.

Das Verhalten von *Metarrhizium* auf natürlichen Nährböden wurde schon aus praktischen Gründen öfters untersucht, doch sein Benehmen gegenüber verschiedenen Nährstoffen auf künstlichen Substraten war seltener (V a s t u. a.) ein Gegenstand der Untersuchung, da die letzteren Fragen mehr von theoretischem als vom praktischem Interesse sind. Doch hielten wir als eine wichtige Aufgabe in Rahmen unserer Untersuchungen namentlich das Verhalten von *Metarrhizium* gegenüber verschiedenen N und C Quellen zu untersuchen um eine physiologische Charakteristik des Pilzes geben zu können.

Es wurde zu diesem Zwecke zunächst ein Vorversuch ausgeführt um zu erfahren, wie sich *Metarrhizium* auf reinem Agar, das bekanntlich etwas N- und viel C-Substanzen enthält, entwickelt und wie es sich auf Agar nach Zusatz von Glukose, Glycerin und Pepton verhält. Nach diesem Vorversuch folgte dann eine Versuchserie über das Verhalten gegen Nitrate, Ammoniumsalze und höhere N-Quellen (Asparagin und Pepton) und eine Serie von Versuchen mit verschiedenen Kohlenhydraten.

1. Vorversuch.

Es wurde in der üblichen Weise eine Reihe von Nährböden mit 2% Agar hergestellt. Glukose wurde in der Menge von 50 auf 1000 gr. und Pepton und Glycerin 5 auf 1000 gr. gegeben. Es waren folgende Nährböden:

1. Aqua destillata-Agar
2. Leitungswasser-Agar
3. Glukose-Agar (mit Leitungswasser)

4. Glukose-Glycerin-Agar (mit Leitungswasser)
5. Glukose-Pepton-Agar (mit Leitungswasser)
6. Glukose-Pepton-Glycerin-Agar (mit Leitungswasser).

Die Kulturen wurden natürlich in diesem wie auch in allen folgenden Versuchen bei optimaler Temperatur von cca 26° C gehalten.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst. Da dieser Versuch nur ein Orientationsversuch sein sollte, bestimmte man nicht das Erntegewicht und begnügte sich mit approximativer Beurteilung des Entwicklungsgrades der Kulturen einzelner Serien.

No.	Nährmedium	pH nach steril.	pH bei Abschl. d. Vers.	Anfang d. Keim.	Vegetatives Wachstum	Fruktifikation
S. 1	Destillata-agar	7.3	8.0	3. Tag	+	+
S. 2	Leitungswasser-agar	7.4	8.0	3. „	+	+
S. 3	Glukose-agar	7.3	4.7	1. „	++	+++
S. 4	Glukose-Glycerin-agar	7.3	4.7	1. „	++	++
S. 5	Glukose-Pepton-agar	7.3	zu wen. Mater.	1. „	++++	++++
S. 6	Gluk.-Pepton-Glyc.-agar	7.3	2.7	1. „	+++	++++

Metarrhizium wächst also und fruktifiziert sogar auf reinem Agar und kann alle Nährstoffe, C und N wie auch Mineralstoffe ausnützen, wenn auch sein vegetatives Wachstum sehr schwach und nur eng auf den Impfstrich begrenzt war. Obwohl schon ein Zusatz von Glukose auf *Metarrhizium* begünstigend wirkte, bildete sich das normale Myceliumhäutchen erst bei Zusatz von Pepton. Die Fruktifikation war jedoch auch hier nicht so reichlich wie bei normalen Kartoffelagarkulturen. Der Zusatz von Glycerin schien nicht günstig auf die Kulturen gewirkt zu haben. Die übliche zitronengelbe Verfärbung des Substrates war bei Zusatz von Glukose und Glycerin allein sehr schwach, doch in Kulturen Glukose-Pepton und Glukose-Pepton-Glycerin in voller Stärke zu sehen.

2. Versuche mit verschiedenen N-Quellen.

Als Ausgangsnährboden und zugleich als Kontrolle ohne N (ausgenommen jenen im Agar enthaltenen) diente uns folgendes Substrat:

H ₂ O (destill.)	1.000 gr.
KH ₂ PO ₄	1 «
Mg SO ₄	0.5 «
Fe SO ₄	Spuren
Glukose	50 «
Agar	2 «

Aus diesem Grundnährboden wurden nun weitere Nährböden durch folgende Zusätze hergestellt: Kaliumnitrat (2.0 gr.), Ammoniumnitrat (3.0 gr.), Ammoniumsulfat (3.0 gr.), Asparagin (0.5 gr.), Pepton (5.0 gr.), Pepton (5 gr.) + Glycerin (5 gr.). pH wurde auf 7.1 — 7.3 reduziert. Der Versuch wurde einmal wiederholt.

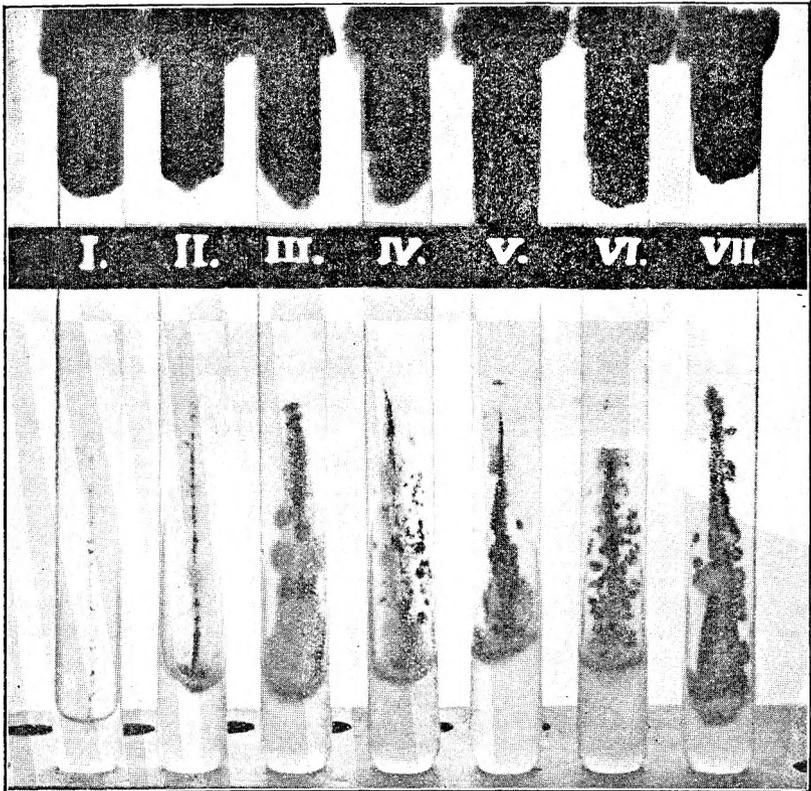
Die Keimung erfolgte zuerst und am reichlichsten im Pepton-agar und natürlich am spärlichsten im Grundnährboden ohne eigentliche N-Quelle, wo der Pilz nur auf kleine Mengen von Agarstickstoff angewiesen war. Den Zustand der Kulturen in bezug auf vegetatives Wachstum und Fruktifikation nach 9-tägiger Versuchsdauer zeigt uns die folgende Tabelle, während die Fig. 5 die Kulturen nach 12-tägiger Versuchsdauer darstellt.

Nährmedium	pH nach Steril.	pH nach Abschluss der Versuche		Anfang der Keimung	Vegetatives Wachstum	Fruktifikation
		nach 9 Tagen	nach 24 Tagen			
Kaliumbiphosphat Kontroll - agar ohne N	7.2	6.7	4.7	2 Tag	+	+
Kaliumnitrat - agar	7.3	6.8	4.3	2 „	+++	+++
Ammoniumnitrat - agar	7.3	2.3		2 „	+++	++++
Ammoniumsulfat - agar	7.1	1.5	1.5	2 „	+++	+++
Asparagin - agar	7.3	6.3	4.3	2 „	+-	++
Pepton - agar	7.1	6.3	4.0	1 „	++++	++++
Pepton - Glycerin - agar	7.1	5.3	3.5	1 „	++++	++++

Vor allem können wir die sehr interessante Feststellung machen, dass *Metarrhizium* ausser organischen N-Quellen ebenso auch anorganische N-Quellen ausnützen kann. Der Pilz ist also kein ausgesprochener Peptonorganismus, wie man dies zu nennen pflegt, er ist ebenso auch ein Nitrat und Ammonium-Organismus. Das Wachstum und die Fruktifikation war allerdings am üppigsten auf Pepton-Agar, doch die Ammoniumnitrat-Kulturen erwiesen sich fast den Peptonkulturen gleichwertig. Die Kaliumnitrat- und Ammoniumsulfatkulturen blieben hinter den Pepton- und Ammoniumnitratkulturen etwas zurück, doch waren sie immerhin besser als die Asparaginkulturen, was eigentlich unverständlich bleibt.

Diese Versuche ergaben zugleich auch eine Bekräftigung der bei Besprechung der pH-Versuche geäußerten Meinung, dass die Änderung der ursprünglichen Reaktion des Substrates auch bei *Metarrhizium anisopliae* in enger Beziehung zu der chemischen Zusammensetzung der Nährböden steht. Obwohl man bei allen Kulturserien eine Ansäuerung des Substrates feststellen konnte, war doch, wie dies aus der Tabelle ersichtlich, der Grad der Ansäuerung sehr verschieden. Es wird wohl weiterer Versuche bedürfen um dieses Verhältniss zwischen dem Chemismus des Substrates und der Änderung seiner Reaktion exakt fassen zu können.

Fig. 5.



3. Versuche mit verschiedenen C-Quellen.

Es wurde schon bisher festgestellt, dass Glukose eine äusserst geeignete C-Quelle für *Metarrhizium* bedeutet. Eine Reihe von Versuchen, in denen anstatt Glukose Glycerin dargeboten wurde, hat uns gelehrt, dass auch dieses als C-Quelle für *Metarrhizium* dienen kann, doch bei weitem nicht so, wie Glukose. Es erschien also wichtig verschiedene Kohlehydrate in ihrem Nährwert für den Pilz zu prüfen.

Zu diesem Zwecke wurden sechs verschiedene Nährlösungen hergestellt, denen als Grundlösung folgende Zusammensetzung diente.

Glukose	10.0 gr.
Glycerin	5.0 gr.
Pepton	5.0 gr.
Leitungswasser	1000.0 gr.
pH = cca 7.5	

Die Nährlösung wurde auf diese Weise variiert, dass anstatt Glukose folgende Kohlehydrate genommen wurden: Laevulose, Arabinose, Galaktose, Saccharose und Inulin.

Eine annähernd normale Entwicklung der Myceliumdecke mit, wenn auch nur mässiger Fruktifikation, konnten wir nur bei den Kulturen auf Inulinlösung beobachten. Auf allen anderen Nährlösungen, selbst bei Glukose-Lösung, entwickelten sich mehr oder weniger unvollständige, fast schleimige Oberflächenüberzüge mit stellenweise verdichteten Myzeliumklümpchen, welche von schmutzig-weisser bis gelblicher Farbe waren. Bei einzelnen Kulturen verschiedener Serien beobachtete man auch eine sehr schwache Fruktifikation. Auf Galaktose- und Arabinoselösung war die Entwicklung scheinbar etwas reichlicher als auf Glukose-, Laevulose-, und Saccharose-lösung.

Abgesehen von dem abnormalen Habitus der Kulturen, welcher auch durch ungünstige Konzentration hervorgerufen sein könnte, würde es überhaupt schwer fallen bei dieser Versuchsanordnung einen Schluss über den Nährwert verschiedener Zuckerarten zu ziehen. Obwohl man die Nährlösungen nur wenige Minuten und im Intervalle von je 24 Stunden sterilisierte, ist es doch fraglich, ob die Hitze bereits nicht zerstörend oder umändernd auf die Konstitution der verwendeten Zuckerarten eingewirkt hatte. Eben deshalb scheint es zweckmässiger das Studium des Verhaltens von *Metarrhizium anisopliae* gegenüber verschiedenen Zuckerarten auf die Keimungsstadien des Pilzes zu beschränken und auf diese Weise, die Methode der feuchten Kammer anwendend, dem immerhin gefährlichen Sterilisieren der Zuckerarten auszuweichen. Nicht destoweniger dürfte man auch aus diesen Versuchen den Schluss ziehen, dass *Metarrhizium* verschiedene Kohlehydrate sowohl Polysaccharide, wie auch Di- und Monosaccharide als C-Quellen verarbeiten kann. Wie bei N-Quellen, so ist er auch bei C-Quellen nicht wählerisch und spezialisiert, was jedenfalls zu seiner allgemeinen Charakteristik gehört. Eben deshalb wird es nicht uninteressant sein die Ernährungsphysiologie von *Metarrhizium* auf breiter physiologischer Basis mit Rücksicht auf seine saprophytische wie auch parasitische Lebensweise zu verfolgen, was wir nach diesen einleitenden Untersuchungen durchzuführen beabsichtigen.

IV. Erfahrungen mit Massenkulturen.*

Wir hatten die Aufgabe für Feldversuche von Herrn Dr. Hergula im Botanischen Garten in Zagreb über die Anwendung von *Metarrhizium* zur Bekämpfung des Maiszünslers, Sporen in Massen zu züchten. Bei dieser Gelegenheit haben wir einige Erfahrungen gesammelt, die für praktische Kultur und Gewinnung von Sporen von Bedeutung sind und wir können deshalb die Gelegenheit nicht unterlassen darüber hier eine Mitteilung zu machen.

Als günstigen natürlichen Nährboden benützen wir Reis, obwohl sich Mais ebensogut bewährt. Der Reis wurde fein gemahlen und eine volle bakteriologische Epruvette von diesem groben Reismehl (24,581 gr.) wurde in Erlenmayer-Kolben (600 ccm) geschüttet und gleichmässig am Boden verteilt. Zu dieser Menge wurde in jeden Kolben 50 gr. von gekochten und nachher abfiltrierten Wasser zugegeben. pH des kalten Reisauges war in der Regel 6,9, was dem Optimum gut entspricht. Der Nährboden wurde $\frac{1}{2}$ Stunde bei 115° C im Autoklav sterilisiert. Die Impfung erfolgte mit einer womöglich gleichmässigen Menge von Sporenmateriel vermittelt einer Platinnadel aus einer Reinkultur am Kartoffelagar. Bei der Kultur zogen wir Erlenmayerkolben den Petrischalen vor, da bei den letzteren eine Infektion von aussen eventuell durch ähnliche *Penicillium*-Arten immerhin leichter möglich ist, als in Erlenmayerkolben.

Nach 2—3 Tagen sieht man in solchen Kulturen die erste Überwucherung von weissen Mycelien, die langsam die ganze Oberfläche des Nährbodens überziehen. Nach 4—6 Tagen beginnt die Fruktifikation. Nach 2—3 Wochen, in der Regel nach 20—25 Tagen kann man schon mit Hilfe eines etwas schärferen flachen Pinsels bereits die erste Abstaubung durchführen. Länger als 25 Tage soll man die Kultur nicht stehen lassen, da nachher neuentwickelte Mycelien die Sporenschicht teilweise überwuchern und die ganze Oberfläche nicht ganz ausgenutzt wird. Man muss bemerken, dass allzugrosse Feuchtigkeit der Kulturen die richtige Sporenabstaubung verhindert. Die genommene Sporenmenge wurde durch ein feines Drahtnetz durchgeseiht um die Sporenmasse von darauf haftenden Substratstücken zu befreien.

Als wir die bereits abgestaubte Kultur stehen liessen, bemerkten wir, dass alsbald die ganze abgestaubte Reisoberfläche von neuem mit frischem Mycel überwachsen war. Der Pilz wächst also weiter ungehindert, sogar scheint es mit einer grösseren Wucht. Dies war erfreulich, denn auf diese Weise erhielten wir eine zweite Ausbeute von Sporen. Nach der zweiten Sporulation wiederholten wir die Abstaubung und die Kultur entwickelte sich wieder weiter. Wir wiederholten diese Abstaubung abermals so, dass wir schliesslich von einer Kultur vier Ernten von Sporen erhalten konnten. Von prakti-

* Bei Massenkulturenzüchtung und Abwägung des Sporenerntes war uns Fr. D. Strail behilflich, wofür wir ihr hier unseren Dank aussprechen.

schem Standpunkte der Sporenwinning en masse war diese Entdeckung sehr erfreulich.

Um eine genauere zahlenmässige Übersicht über die gewonnene Sporenmenge zu erhalten, haben wir von zwei Versuchsserien mit je 6 Kolben jede gewonnene Sporenmenge von vier aufeinanderfolgenden Abstaubungen gewogen. Die erste Serie enthielt Kolben mit Durchmesser von 9.5 cm (Tabelle III) und die zweite Serie Kolben von 10.5 Durchmesser (Tabelle IV).

Die beiden Serien können wir leider nicht zum Vergleiche nebeneinanderstellen, da in jeder Serie die Abstaubungszeiten verschieden waren. Nicht destoweniger ergab sich die Menge der gewonnenen Sporen pro Einheit von 1 cm² Oberfläche in gr. annähernd gleich:

Abstaubung	Serie I.	Serie II.
1.	0.01408	0.01628
2.	0.01138	0.00577
3.	0.00617	0.00413
4.	0.00436	0.00279
Zusammen	0.03599 gr.	0.02897 gr.

TABELLE III. (SERIE I).

Probe N ^o	Datum der Impfung	Durchmesser des Kolbens in cm	1. Abstaubung		2. Abstaubung		3. Abstaubung		4. Abstaubung	
			Datum	Sporenernte in gr.						
1	5. VI.	9.5	24. VI.	0.935	17. VII.	0.886	9. VIII.	0.451	1. IX.	0.515
2	5. VI.	9.5	24. VI.	0.902	17. VII.	0.677	9. VIII.	0.243	1. IX.	
3	5. VI.	9.5	24. VI.	1.031	17. VII.	0.786	9. VIII.	0.475	1. IX.	0.131
4	5. VI.	9.5	24. VI.	1.140	17. VII.	0.765	9. VIII.	0.441	1. IX.	0.253
5	5. VI.	9.5	24. VI.	1.069	17. VII.	0.817	9. VIII.	0.476	1. IX.	0.271
6	5. VI.	9.5	24. VI.	0.911	17. VII.	0.912	9. VIII.	0.538	1. IX.	0.377
Durchschnittliche Sporenernte in gr.				0.938		0.807		0.4373		0.3094

Einerseits sieht man aus den Tabellen, wie die Sporenmengen in jedem Kolben bei jeder Abstaubung ziemlich gleich waren, so dass man von einem Durchschnitt reden kann. Andererseits sieht man, wie jede weitere Abstaubung allmählich eine kleinere Menge von Sporen ergab. Wenn wir die Oberfläche des Kulturbodens um 1 Kg. Sporenmaterial zu gewinnen, berechnen wollen, so nehmen wir die Durchschnittsmenge von beiden Serien d. h. 0.328 gr. pro 1 cm² oder 325.8 gr pro 1 m². Daraus ergibt sich, dass wir um 1 Kg

Tabelle IV. (Serie II.)

Probe No	Datum der Impfung	Durchmesser des Kolbens in cm	1. Abstaubung		2. Abstaubung		3. Abstaubung		4. Abstaubung	
			Datum	Sporenernte in gr.						
1	21. V.	10.5	13. VI.	1.35	30. VI.	0.535	6. VIII.	0.483	3. IX.	0.348
2	21. V.	10.5	13. VI.	1.30	30. VI.	0.638	6. VIII.	0.387	3. IX.	0.147
3	21. V.	10.5	13. VI.	1.45	30. VI.	0.375	6. VIII.	0.146	3. IX.	0.021
4	21. V.	10.5	13. VI.	1.50	30. VI.	0.457	6. VIII.	0.332	3. IX.	0.260
5	21. V.	10.5	13. VI.	1.45	30. VI.	0.451	6. VIII.	0.361	3. IX.	0.300
6	21. V.	10.5	13. VI.	1.42	30. VI.	0.541	6. VIII.	0.440	3. IX.	0.346
Durchschnittliche Sporenernte in gr.				1.40		0.4995		0.3581		0.2415

Sporen zu gewinnen eine Nährbodenoberfläche von etwa 3 m² brauchen.

Bei dieser Gelegenheit taucht eine andere praktische Frage auf: es wäre wichtig zu wissen, wie viel Maispflanzen man mit einer Menge von 1 Kg Sporen bei 10% Mischung mit Stärke, die sich nach Hergula als genügend stark und wirksam bewährte, bestauben könnte.

Herr Dr. Hergula lieferte uns folgende Zahlen dazu:

Flasche + Stärke-Metarrhizium 10%	...	wiegt	59.8268	gr.
Flasche allein	...	»	23.0791	»
Stärke-Metarrhizium 10%	...	»	36.7477	»
5 cm ³ Metarrhizium allein	...	»	0.9583	»

Um 1 Pflanze zu bestauben mit 10% Stärke-Metarrhizium Mischung sind notwendig » 1.05808 »

Daraus ergibt sich nun die Rechnung:

$$36.7477 : 0.9583 = 1.05808 : x$$

x = 0.02759 gr. von reinen Metarrhiziumsporen sind notwendig um 1 Pflanze zu bestauben und daher für 1 Feld von 100.000 Pflanzen 2.759 Kg d. h. etwa 3 Kg. Da bei obiger Berechnung versuchsweise erwachsene Pflanzen bestaubt waren, so können wir annehmen, dass mit der berechneten Sporenmenge eigentlich eine zweimalige Bestäubung durchgeführt werden könnte, wenn zur Zeit der Bestäubung die Pflanzen noch nicht die normale Höhe und Entwicklung erlangt haben.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Der Temperaturbereich, in welchem *Metarrhizium anisopliae* normal gedeihen kann, ist verhältnismässig eng begrenzt (10—30° C). Das Optimum für das Wachstum und Fruktifikation

liegt bei 24—26° C. Die Temperatur, bei welcher die Sporen ihre Keimfähigkeit verlieren liegt zwischen 55—60° C und zwar ist diese tödend bereits nach Einwirkung von 5 Minuten.

2. Der Bereich von pH-Werten, innerhalb welchen eine annähernd normale Entwicklung von *Metarrhizium* stattfindet, erstreckt sich von pH 4.7 bis über pH 10. Das Optimum der H-Ionenkonzentration liegt zwischen pH 6.9 bis pH 7.4. Im Laufe der Entwicklung des Pilzes wird die H-Ionenkonzentration von höheren Werten stark herabgedrückt. Im Kartoffel - Glukose - Nährmedium geht diese Erniedrigung auf pH 5.0 zurück und in künstlichen verschiedenen Nährboden auch unter pH 5 bis unter pH 4.0. Ausnahmsweise wird pH bei Ammoniumsulfat als N-Quelle bis auf 1.5 erniedrigt.

3. Als N-Quelle kann *Metarrhizium* sowohl organische (Pepton, Asparagin), wie auch anorganische (Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat und selbst Kaliumnitrat) N-Substanzen ausnützen, obwohl organische Substanzen (Pepton) speziell das vegetative Wachstum begünstigen.

Auch in bezug auf C-Nährstoffe ist *Metarrhizium* gar nicht spezialisiert, denn er verarbeitet sowohl verschiedenartigste Kohlehydrate (Glukose, Lävulose, Arabinose, Galaktose, Saccharose, Inulin) wie auch Glycerin als C-Quelle.

4. Das Wachstum und Fruktifikation von *Metarrhizium* wird durch das Licht gehemmt. Für das Wachstum und insbesondere für die Fruktifikation des Pilzes ist ein entsprechender nicht geringer Grad der Feuchtigkeit von grosser Bedeutung.

5. Zur Massenkultur von *Metarrhizium* eignet sich gut gekochter Reis (pH = 6.9). Von solchem Nährsubstrat kann man durch Abstaubung vermittels eines harten Pinsels von derselben Kultur vier aufeinander folgende Ernten erhalten. Eine Oberfläche des Nährmediums von 1 cm² ergab auf diese Weise durchschnittlich 0.03258 gr. reiner *Metarrhizium*sporen, woraus sich berechnen liess, dass für die Gewinnung von 1 Kg reiner Sporen etwa 3 m² Nährfläche notwendig sind.

Es wurde weiter berechnet, dass zur Bestäubung einer erwachsenen Maispflanze ungefähr 0.03 gr. Sporen von *Metarrhizium* in 10 Vol. proz. Mischung mit Stärke notwendig sind, woraus sich ergibt, dass bei Maiszünslerbekämpfung für etwa 100.000 Maispflanzen ungefähr 3 Kg reiner Sporen von *Metarrhizium* auch eventuell für zweimalige Bestäubung genügen dürften.

WICHTIGSTE LITERATUR.

- BARRS H. P. & STEARNS H. C.: The green muscardine fungus (*Oospora destructor* (Metschn.) Delacroix) on European earwing and other insects in Oregon. *Phytopathologie*. XV., 11. p. 729, 1925. Ref. Rew. Mycol. Vol. p. 228.
- BLOCHWITZ A.: Schimmelpilze als Tierparasiten. *Ber. d. deutsch. Bot. Ges.* Bd. 47, (1929).

- Briton-Jones H. R.: A note on green muscardine (*Metarrhizium anisopliae* Sor.) Minutes & Proc. Froghopper Invest. Trinidad & Tobago, IX. 293—305, 1927. Ref. Rew. Mycol. Vol. III. (1928), p. 404
- Delacroix M. G.: Oospora destructor, champignon produisant sur les insectes la muscardine verte et *Isaria dubia* n. sp. Bull. Soc. Myc. France IX., p. 260—264, (1893).
- Friederichs K.: Über die Pleophagie des Insektenpilzes *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sor. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 50, p. 335—356 (1920) Hier ausführliches Literaturangaben.
- Glaser R. W.: The green muscardine disease in silkworms and its control. Ann. Entom. Soc. Amer. XIX. 2, p. 180—192 (1926). Ref. Rew. Mycol. VI. p. 31.
- Hergula B.: On the application of *Metarrhizium anisopliae* against *Pyrausta nubilalis*. Int. Cornborer Inv. Sc. Rep. Vol. III. (1930).
- Krassiltschik J.: La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insectes nuisibles. Bull. Sciences France et Belgique. 1888.
- Legendre R.: La concentration ion Hydrogen de l'eau de mer le p H. Les presses universitaires de France. Paris.
- Le Mout I.: La destruction des insectes nuisibles par les parasites vegetaux. Rev. Bot. appliquee, III., 18., p. 84—102, (1923). Ref. Rew. Mycol. II. p. 412.
- Mevius W.: Reaction des Bodens und Pflanzenwachstum. 1927.
- Vast A.: A propos de la culture d'*Oospora destructor*. Bull. Soc. Myc. France, 20., p. 64—69, (1904).
- Vuillemin P.: Les *Isaria* de genre *Penicillium*. Bull. Soc. Mycol. France, T. 20. (1904).
- Wallengren H. and Johansson R.: On the Infection of *Pyrausta nubilalis* Hb. by *Metarrhizium anisopliae*. Intern. Cornborer Invest. Scient. Rep. Vol. II. pp. 131 (1929).
- Wallengren H.: On the Infection of *Pyrausta nubilalis* Hb. by *Metarrhizium anisopliae* II. Intern. Corn Borer Invest. Sc. Rep. Vol. III. (1930).
- Williams C. B.: Report on the Froghopper blight of Sugarcane in Trinidad. Mem. Dept. Agric. Trinidad, (1921). Ref. Rew. Mycol. I., p. 271.

Erklärung zur Fig. 5.:

I = Kontrolle ohne N, II = Asparaginagar, III = Pepton-Glycerinagar, IV = Ammoniumsulfatagar, V = Kaliumnitratagar, VI = Ammoniumnitratagar, VII = Peptonagar.