

Beitrag zu Untersuchungen über den Stickstoffumsatz einiger thermophiler und thermotoleranter Bodenpilze

MARIA GŁADOCH

Institut für Ökologie und Umweltschutz der Landwirtschaftlichen
Akademie in Szczecin

Gładoch M.: (Institute of Ecology and Protection of Environment, Academy of Agriculture, Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, Poland). *A contribution to an investigation of nitrogen metabolism of some thermophilic and thermophilous soil fungi*, Acta Mycol. 14 (1, 2): 157-161, 1978.

The author has examined the assimilation of nitrogen on the basis of different sources of nitrogen and the secretion of nitrite to the substrate by some soil fungi. The following species of thermophilic and thermophilous fungi have been investigated: *Malbranchea pulchella* Saccardo et Penzig var. *sulfurea* Miehe, *Humicola lanuginosa* (Griffon et Maublanc) Bunce, *Sporotrichum thermophile* Apinis, *Thielavia sepedonium* Emmons, *Paecilomyces varioti* Bainier, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *A. terreus* Thom.

EINFÜHRUNG

Thermophile und thermotolerante Pilze spielen bei allen nützlichen und unter Kontrolle stehenden Fermentierungsprozessen sowohl in der Landwirtschaft als auch in der Lebensmittelindustrie eine wichtige Rolle. Pilze dieser Gruppe degegen, ihrem Schicksale überlassen, können sehr viel Schaden anrichten: So nehmen sie z.B teil an der Verringerung der Keimfähigkeit des Saatgutes und an der Selbsterhitzung landwirtschaftlicher Produkte. Sie sind ein wichtiger Faktor der Reaktionsreihe, die zur Selbstentzündung des Heues u.a. führt. Ausserdem können die eine Zersetzung hervorrufenden Wärmepilze und die bei diesem Prozess entstehenden Produkte Systemmykosen, Allergien und Vergiftungen bei Menschen und Zuchtieren hervorrufen (Gładoch 1974). Auf Grund dieser Aspekte kam es zu folgendem Beitrag über den teilweisen Stickstoffumsatz dieser interessanten und noch wenig untersuchten Pilzgruppe.

MATERIAL und METHODEN

Die Untersuchungen wurden an folgenden thermophilen und thermotoleranten Pilzarten durchgeführt: *Malbranchea pulchella* Sacc. et Penz., *Humicola lanuginosa* (Griff. et Maubl.) Bunce, *Sporotrichum thermophile* Apinis, *Thielavia sepedonium* Emmons, *Paecilomyces varioti* Bain., *Aspergillus fumigatus* Fres., *A. terreus* Thom.

Es wurde das Wachstum der Pilze auf Nährböden mit unterschiedlichen Stickstoffquellen unter besonderer Berücksichtigung des Umsatzes von Nitrat zu Nitrit verglichen. Aus diesem Grunde wurde spezieller Nachdruck auf die chemische Reinheit der Geräte und Chemikalien gelegt und die Bestandteile der Nährböden auf Spuren von Nitrit geprüft.

Die Bebrütung der einzelnen Pilzstämmen wurde in optimaler Inkubationstemperatur vollzogen, die für

<i>Malbranchea pulchella</i>	45°C
<i>Humicola lanuginosa</i>	40°C
<i>Sporotrichum thermophile</i>	38°C
<i>Thielavia sepedonium</i>	30°C
<i>Paecilomyces varioti</i>	30°C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40°C
<i>Aspergillus terreus</i>	30°C betrug

Um oben genannte Stämme auf ihre Fähigkeit zur Aufnahme unterschiedlicher Stickstoffquellen zu prüfen, wurden diese in organischer und anorganischer Form verwendet, z.B. als Nitrat bzw. Nitrit in Czapek-Agar, als Gelatine im Nährboden nach Frazier, als Pepton in Sabouraud-Agar. Der Kaseinabbau wurde auf Milchagar festgestellt, der Harnstoffumsatz auf dem Kresolrot-Agar nach Christensen (Burbianka und Pliszka 1963).

Die Anwesenheit von Nitrit wurde nach der Inkubation unmittelbar auf dem Nährboden mit Hilfe des Reagens von Griess-Ilosvaj (Hallmann 1956) geprüft. Das Reagens wurde auf den die Kolonie umgebenden Agarnährboden getropft. Bei Zimmertemperatur entstand an den betroffenen Stellen nach etwa einer Minute eine intensive kirschrote Verfärbung, die bei grosser Nitritkonzentration schnell nach gelb umschlug. Kulturen mit unbedeutender Nitritabsonderung zeigten erst nach 10-20 Minuten eine sehr blasse, kaum sichtbare Verfärbung, die auch nach längerer Zeit auf nicht beimpften Kontrollplatten auftreten kann.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Effekt von 6 verschiedenen Nährböden, die unterschiedliche Stickstoffverbindungen enthielten, ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Wie aus obiger Tabelle hervorgeht, benutzten *Malbranchea pulchella*

Tabelle 1
Wachstum auf verschiedene Stickstoffquellen enthaltenden Nährböden

Art	Stickstoffquellen					
	NaNO ₂	NaNO ₃	Pepton	Gelatina	Kasein	Harnstoff
<i>Malbranchea pulchella</i>	.	.	+	+	+	+
<i>Humicola lanuginosa</i>	.	.	+	.	.	.
<i>Sporotrichum thermophile</i>	v	+	+	+	+	+
<i>Thielavia sepedonium</i>	+	+	+	.	+	.
<i>Paecilomyces varioti</i>	+	+	+	.	.	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	.	+	+
<i>Aspergillus terreus</i>	+	+	+	.	.	+

v — verspätet.

und *Humicola lanuginosa*, als echte Vertreter der Thermophilen, deren Wachstumsminimum erst bei über 30°C liegt, Stickstoff nur in organischer Form bzw. nur als Pepton. Alle anderen Arten wie *Sporotrichum thermophile*, *Thielavia sepedonium*, *Paecilomyces varioti*, *Aspergillus fumigatus* und *A. terreus*, die zu einem gewissen Grad thermotolerant sind, assimilieren Stickstoff vor allem in Form von Nitrat und Nitrit.

Der Nachweis von Nitrit nach Beimpfung und Inkubationszeit der Nitrat- bzw. Peptonnährboden ist in Tabelle 2 dargestellt.

Auf dem Nährboden nach Czapek verursachten von allen untersuchten Arten nur *Aspergillus fumigatus* und *Thielavia sepedonium* im Medium eine Ansammlung von Nitrit. Auf Czapek-Agar mit einem Zusatz von

Tabelle 2
Nachweis von Nitrit auf verschiedenen Agarnährböden

Art	Stickstoffquellen			
	NaNO ₃	NH ₄ NO ₃	Pepton	NaNO ₃ +0,05% Pepton
<i>Malbranchea pulchella</i>	kW	kW	.	.
<i>Humicola lanuginosa</i>	kW	kW	.	+
<i>Sporotrichum thermophile</i>	.	.	.	+
<i>Thielavia sepedonium</i>	+	.	.	+
<i>Paecilomyces varioti</i>	.	.	.	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	.	.	+
<i>Aspergillus terreus</i>	.	.	.	+

kW kein Wachstum, + Nitritausscheidung, . keine Nitritausscheidung.

0,05% Pepton wurde bei sämtlichen untersuchten Arten, ausschliesslich *Malbranchea pulchella*, Nitrit im Substrat nachgewiesen.

Beim Vergleich beider Tabellen fällt auf, dass *Sporotrichum thermophile*, *Thielavia sepedonium*, *Paecilomyces varioti*, *Aspergillus fumigatus* und *A. terreus* einerseits eine Ansammlung von Nitrit im Substrat verursachten (Tab. 2), andererseits jedoch (Tab. 1) benutzten sie Nitrit als einzige Stickstoffquelle. Auf einem Ammoniumnitrat enthaltenden Nährboden wurde bei keiner der untersuchten Arten eine Nitritabsonderung nachgewiesen.

Hiermit drängt sich die Frage auf: Welche Abhängigkeit existiert zwischen der Fähigkeit einer Nitrat- und Nitritassimilierung und dem Nachweis von Nitrit in dem vor der Bebrütung nitritfreien Substrat? Während der Nitratassimilierung finden in der pflanzlichen Zelle Reduktionsprozesse über Nitrit und Hydroxylamin bis zum Ammonium statt, welches, nach gegenwärtigen Ansichten, wie Frank (1958) zitierte, zum grössten Teil zur Synthese der Aminosäuren verwendet wird.

Bei Untersuchungen über die Nitratreduktase stellten Cove und Pathman (1963) fest, dass Nitrat als einzige Stickstoffquelle bei *Aspergillus nidulans* eine Induktion der Nitratreduktase erzeugen kann. Sie bewiesen ausserdem, dass die Nitratreduktase, falls das Medium als einzige Stickstoffverbindung statt Harnstoff oder Glutaminat Nitrat enthält, in etwa 20-fach stärkerer Konzentration auftritt.

Zusätzlich wurde von Cove und Pathman (1964) berichtet, dass bei der Abwesenheit von Nitrat keine Eiweissverbindung vorhanden war, die eine Ähnlichkeit mit Nitratreduktase auch nur vermuten liesse. Dagegen kann ein Zusatz von Ammoniumjonen zum Nährboden eine Hemmung der Synthese der Nitratreduktase zur Folge haben.

Diese Fermenthemmung durch die Gegenwart von Ammonium tritt beim grössten Teil der Penicillien auf, eine Hemmung durch Pepton dagegen seltener — wie obige Ergebnisse ergänzen.

Nitratreduktase entsteht nicht immer nur auf dem Induktionswege, wie Frank (1968) in seinen Untersuchungen an *Ustilago zaeae* feststellte.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen (Tab. 2) stimmen mit den Angaben der oben genannten Autoren überein: Auf dem bebrühten Ammonium enthaltenden Nährboden wurde kein Nitrit nachgewiesen, was auf die Hemmung der Nitratreduktase schliessen lässt. Pepton dagegen hemmte bei den untersuchten Arten die Reduktase nicht, sondern begünstigte sie.

Die Ansammlung von Nitrit im Substrat lässt sich mit einer Ausscheidung von einem sich in der Zelle befindenden toxischen Übermasse an Nitrit durch den Pilz in das Substrat erklären. Die Schwelle scheint für verschiedene Arten unterschiedlich zu sein. So ist unter anderem *Paecilo-*

myces varioti, der gegen toxische Verbindungen verhältnismässig unempfindlich ist (Gładoch 1972), auch gegen eine Nitratansammlung im Mycelium verhältnismässig widerstandsfähig, was ein Fehlen der Grieschen Reaktion beweist.

Zusammenfassend kann auf Grund der Meinung zitierter Autoren sowie eigener Untersuchungsergebnisse folgender Schluss gezogen werden:

Vorgelegte Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Umsatz von Nitrat zu Nitrit mit Absonderung des letzteren in das Substrat nicht als übliche Denitrifikation in sensu stricto betrachtet werden kann, sondern einen von der Zelle verursachten, natürlichen Entgiftungsprozess darstellt. Pilze, die befähigt sind in höheren Temperaturen zu vegetieren, sind in Hinsicht auf diesen Prozess different.

LITERATURA

- Burbianka M., Pliszka A., 1963, Mikrobiologiczne badania produktów żywnościowych, Warszawa, PZWL.
- Cove D. J., Pathman J. A., 1963, Independently genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans*, Nature 198: 262-263.
- Cove D. J., Pathman J. A., 1964, Common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase, Nature 201: 58-60.
- Frank K. H., 1958, Ein Beitrag zur Energek der Nitratassimilation von *Ustilago zaeae*, Zeitschr. Naturforsch. 13b (3): 168-171.
- Gładoch M., 1973, Antibiotika, Kraftfutter und Pilze, Mykosen, 16: 381-382.
- Gładoch M., 1974, O mało znanej grupie grzybów termofilnych i ich znaczeniu chorobotwórczym, Annales Academiae Medicae Lodzensis, 15: 241-243.
- Hallmann L., 1950, Klin. Chemie Mikrosk., Stuttgart, Thieme Verl.

Przyczynek do badań nad przemianą azotową niektórych termofilnych i termotolerancyjnych grzybów glebowych

Streszczenie

Badano zdolność assimilacji termofilnych i termotolerancyjnych grzybów (*Malbranchea pulchella* Sacc. et Penz., *Humicola lanuginosa* (Griff. et Maubl.) Bunce, *Sporotrichum thermophile* Ap., *Thielavia sepedonium* Em m., *Paecilomyces varioti* Bain., *Aspergillus fumigatus* Fres., *Aspergillus terreus* Thom) w przypadku organicznych i nieorganicznych związków azotowych. Badane grzyby prawdziwie termofilne korzystają z azotu organicznego, termotolerancyjne natomiast korzystają również dobrze z azotanów i azotynów. Na podłożach azotanowych (z wyłączeniem azotanu amonu) termotolerancyjne szczepy wydzieliły do podłoża azotyny. Zjawisko przedyskutowano na podstawie literatury i własnych obserwacji oraz określono jako naturalną reakcję odtruwania komórek grzybowych.