

Archiv für Mikrobiologie 47, 57–71 (1963)

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen

**Untersuchungen an *Beauveria tenella*
(NRRL 2334, 2335, 2336; bisher *Agaricus campestris*) ***

I. Systematik

Von
H. P. MOLITORIS

Mit 7 Textabbildungen

(*Ein gegangen am 27. Juli 1963*)

Die modernen Methoden der Submerskultur im Rühr- oder Schüttelverfahren mit Belüftung vermeiden weitgehend die Nachteile der herkömmlichen Verfahren, indem sie ein schnelles, homogenes Wachstum des Mycels unter reproduzierbaren Bedingungen ermöglichen. Damit wird eine exakte Untersuchung des Zellmaterials, seines Stoffwechsels und der Stoffwechselprodukte ermöglicht.

Die Vorteile der Submerskultur lassen sich im allgemeinen nur bei der Heranzucht von Hefen und anderen einzelligen Mikroorganismen wahrnehmen, während bei höheren Pilzen (vornehmlich Basidiomyceten) gewisse Schwierigkeiten auftreten. Sie wachsen in Submerskultur meist nur langsam und begrenzt und bilden Kugeln („pellets“) oder Klumpen (BURKHOLDER u. SINNOTT 1945; SUGIHARA u. HUMFELD 1954; JENNISON 1956; BENKO 1958; ROBBINS 1958). Diese Mycelklumpen sind wachstumsphysiologisch inhomogen, da in verschiedenen Zonen unterschiedliche Sauerstoff- und Nährstoffbedingungen herrschen, so daß im Inneren bereits Autolyse einsetzen kann, während das Mycel an der Oberfläche noch aktiv wächst.

1948 fand jedoch HUMFELD bei dem Versuch, den Basidiomyceten *Agaricus campestris*¹ in Submerskultur heranzuziehen, einige Stämme (NRRL 2334, 2335, 2336), die bei einfachen Nährstoffansprüchen in Submerskultur ein schnelles, homogenes, hefeähnliches Wachstum zeigten, das für höhere Pilze ungewöhnlich war. Diese Stämme wurden, vor allem unter kommerziellen Gesichtspunkten, in der Folgezeit mehrfach untersucht (HUMFELD 1948; HUMFELD u. SUGIHARA 1949; HUMFELD 1950/51;

* Gekürzte gleichlautende Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

¹ In den angelsächsischen Ländern werden häufig noch die in der Champignonkultur verwandten Stämme als *Agaricus campestris* bezeichnet, obwohl dieser Name allein der Wildform mit viersporigem Basidium zukommt, die auch nicht auf Pferdemist wächst. Der Kulturchampignon trägt wegen seines zweisporigen Basidiums dagegen den Namen *Agaricus* (oder *Psalliot*) *bisporus* Lange, *forma albida* (weiß) und *forma avellanea* (braun).

HUMFELD u. SUGIHARA 1952; SUGIHARA u. HUMFELD 1954; O'NEIL 1956; BENKO 1958; MOUSTAFA 1960).

Hierbei hatten sich die erwähnten Stämme für stoffwechselphysiologische Untersuchungen als besonders geeignet erwiesen. Eigene Voruntersuchungen hatten ergeben, daß die Stämme Fett zu speichern vermochten. Die günstigen Wachstumseigenschaften in Verbindung mit den Möglichkeiten, moderne Methoden der Stoffwechsel- und Fettanalyse anzuwenden, ließen daher Untersuchungen über die Fettsynthese besonders aussichtsreich erscheinen; bei höheren Pilzen liegen zu diesem Problem nur wenige Arbeiten vor (JENNISON, RICHBERG u. KRIKSZENS 1957; REUSSER, SPENCER u. SALLANS 1958; FALANGHE 1962; HUGHES 1962). Für diese Untersuchungen sollten nun zunächst in Submerskultur unter normalen *Agaricus*-Stämmen solche selektioniert und allgemein charakterisiert werden, die in ihren Eigenschaften den von HUMFELD beschriebenen Stämmen weitgehend entsprachen.

A. Organismen und Methoden

1. Organismen

Die *Agaricus bisporus*-Stämme wurden von Prof. KNEEBONE, Penn. State University und den Firmen Huller/Erlangen, Huller/Osterode und Witt/Bernkastel bezogen. — Die als *Agaricus campestris* bezeichneten Stämme NRRL 2334, 2335, 2336 wurden von Prof. HESSELTINE, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, zur Verfügung gestellt. — Die Vergleichsstämme *Beauveria bassiana* und *Beauveria tenella* stammten aus der Sammlung des Centraalbureaus voor Schimmelcultures in Baarn/Holland.

2. Nährmedien

Sämtliche Stämme wurden regelmäßig auf Biomalzagar-Schrägröhrchen (2,5% Biomalz, Kirner Vitabornwerk GmbH; 1,5% Agar; pH etwa 5,5) vermehrt, sowie in Stammkulturen in Reagensgläsern mit kompostiertem, steriles Pferdemist gehalten. Von den NRRL-Stämmen und den *Beauveria*-Stämmen aus Baarn wurden Dauerkulturen nach RHODES (1950) angefertigt.

Zur Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit und anderer Kulturcharakteristika wurden feste Substrate aus Kartoffel-, Haferflocken, Kirsch- und Heuagar angesetzt. Der pH-Wert lag dabei jeweils zwischen 5 und 6.

Als flüssiges Nährmedium wurde einmal Biomalz-Nährlösung verwendet. Hierzu wurde eine entsprechende Menge Biomalz in aqua dest. gelöst und mit NaOH auf pH = 8,0 gebracht. Die Sterilisationszeit in den Erlenmeyerkolben betrug, wie auch bei allen anderen Substraten, 15 min bei 1,2 atü.

Weiterhin wurde das Medium nach HUMFELD u. SUGIHARA (1949) verwendet. Grundmedium: KH_2PO_4 0,87 g; MgHPO_4 0,40 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,37 g; H_2SO_4 2,0 n 5,7 ml; Spurenelementlösung ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,50 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,36 g; ZnCl_2 0,20 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; aqua dest. auf 1000 ml) 20,0 ml; Glucose 50,0 g (= 5%); aqua dest. auf 900 ml. Stickstoffquelle: 3% Harnstofflösung in aqua dest. steril filtriert. Das Grundmedium wurde mit NaOH auf pH 4,5 gebracht, in Mengen zu je 36 ml in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Watte- oder Schaumstoffhauben eingefüllt, autoklaviert (15 min bei 1,2 atü) und dann unter sterilen Bedingungen mit je 4 ml der Harnstofflösung versetzt (Endkonzentration Harnstoff = 0,3%, Stickstoff = 0,14%).

Für die Vergleichsversuche mit *Beauveria* wurde zusätzlich das Medium nach MACLEOD (1954a) verwendet. Grundmedium: KH_2PO_4 1,5 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g (N-Konzentration = 0,064%); Spurenelementlösung [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; aqua dest. auf 1000 ml] 20,0 ml; Glucose 10,0 g (= 1%); aqua dest. auf 1000 ml. Der pH-Wert wurde mit H_2SO_4 ebenfalls auf 4,5 eingestellt und je 40 ml der Lösung in 300 ml Kolben sterilisiert. Bei einem Anfangs-pH von 4,5 war unter den gewählten Sterilisationsbedingungen die Caramelisierung des Kohlenhydrats so gering, daß sich eine getrennte Sterilisation erübrigte.

3. Methodik

a) Versuche auf festem Substrat. Einsporkulturen wurden durch Ausspateln verdünnter Sporesuspensionen auf Agarplatten und Überimpfung der gekeimten Einzelsporen (mikroskopische Kontrolle!) auf Schrägröhrchen hergestellt.

Die Mikroaufnahmen wurden mit einem Zeiss-Winkel-Standard-Mikroskop (Neofluare), der Contax-Kleinbildkamera und der Leitz Mikrophotoausrüstung (Photoaufsatz Grundkörper II, Belichtungsmeßgerät, Elektronenblitzgerät Ukatron II) angefertigt.

Für die Infektionsversuche wurden *Agaricus*-Fruchtkörper (autoklaviert und nicht autoklaviert) in Erlenmeyerkolben mit Wattehauben mit dem *Beauveria*-Mycel beimpft und bei 25° C inkubiert.

Um die Stämme zur Fruchtkörperbildung zu bringen, wurde aus den Mycelien „Brut“ hergestellt und diese unter verschiedenen normalen Betriebsbedingungen (Fa. Hullen/Erlangen) weiterverarbeitet.

Zum Nachweis der Katalase wurde ein Mycelstück einer aktiv wachsenden Biomalzagarkultur mit frisch angesetzter 3% H_2O_2 -Lösung überspült. Blasenbildung zeigte einen positiven Ausfall der Reaktion an.

Die Enzyme Laccase, Peroxydase und Tyrosinase wurden an Biomalzagarkulturen nach LYR (1958) nachgewiesen.

b) Versuche in Submerskultur. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Schüttelkultur. Beimpft wurde mit Mycelstückchen (5 × 5 mm) einer mindestens 3 Wochen alten Biomalzagarkultur, 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schaumstoff oder Wattehauben und je 40 ml Nährlösung wurden nach der Beimpfung aerob bei 27° C auf der Schüttelmaschine (3 cm Weg, 150 Hin- und Hergänge/min) inkubiert. Es erwies sich als vorteilhaft, täglich den sich bildenden Mycelrand abzuschütteln.

Die pH-Messung wurde mit der Glaselektrode und dem pH-Meßgerät der Fa. Metrohm, Herisau/Schweiz, vorgenommen.

Die Ernte des Zellmaterials erfolgte durch Abnutschen auf Kieselgur-Filterpapier (Schl. & Sch. Nr. 287) und zweimaliges Waschen mit aqua dest.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Filter bis zur Gewichtskonstanz bei 105° C getrocknet und nach Abkühlung im Exsiccator gewogen. Für die Leergewichtsbestimmung wurden die Filter entsprechend vorbehandelt.

Die Bestimmung der Glucose im Kulturmedium wurde mit dem Anthron-Reagens nach HEWITT (1958) mit dem Zeiss-Photometer PMQ II durchgeführt.

B. Versuche und Ergebnisse

1. Versuche zur Mutantenisolierung aus *Agaricus bisporus*-Stämmen

Zur Auswahl der für die geplanten Untersuchungen geeigneten Stämme wurden zunächst Submers-Schüttelkulturen mit normalen Stämmen von *Agaricus bisporus* angesetzt. Diese Voruntersuchungen

zielten darauf ab, selbst Stämme zu selektionieren, die in Submerskultur gut wachsen, eine homogene Suspension liefern und in ihren Eigenschaften den von HUMFELD auf ähnlichem Wege (1950/51) isolierten Stämmen gleichen. Es wurden dazu normale, in der Champignonkultur verwendete Vielsporenkulturen, sowie aus Sporen gezogene Einsporenkulturen eingesetzt.

Die Erlenmeyerkolben mit 40 ml Nährlösung (5% Biomalz bzw. Humfeld-Medium) wurden mit aktiv wachsendem Mycel von Biomalz-Schrägröhrchen beimpft und auf der Schüttelmaschine bei 27°C inkubiert. Am 9. Tag wurde geerntet und die Kolben auf pH, Trocken-gewicht, makroskopisches und mikroskopisches Aussehen untersucht. Von den untersuchten 14 Vielspor- und 44 Einsporenkulturen zeigte keine Merkmale, wie sie von HUMFELD beschrieben wurden. Es wurden daher die von HUMFELD isolierten Stämme vom Northern Regional Research Laboratory, Peoria, als *Agaricus campestris* NRRL 2334, 2335, 2336 be-zogen und mit den normalen *Agaricus*-Stämmen nach verschiedenen Gesichtspunkten verglichen.

2. Vergleich der NRRL-Stämme mit *Agaricus bisporus*

a) Eigenschaften auf festem Substrat

Bei der Überimpfung der NRRL-Stämme auf festes Nährsubstrat zeigten sich viele Einzelkolonien, die auf eine starke Conidien- oder Oidienproduktion hinwiesen. Das Mycel war pelzartig bis wattig, bis etwa 8 mm hoch, zunächst rein weiß, bildete keine Stränge, wuchs schnell, wurde im Alter gelblich unter Hautbildung und zeigte dann Guttationstropfen.

Tabelle 1. Enzymnachweise auf Biomalz-Agarplatten

Stämme	<i>Agaricus bisporus</i>					NRRL-Stämme		
	E 33	1	14	20	22	2334	2335	2336
Enzyme ¹ :								
Tyrosinase	+++	+++		+++	+++	—	—	—
Laccase	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++
Katalase		++			++	(+)	(+)	(+)
Peroxydase	—	—		—	(+)	(+)	(+)	(+)

¹ Stärke der Enzymreaktion: +++ = sehr stark positiv; ++ = stark positiv; + = deutlich positiv; (+) = schwach oder unregelmäßig positiv; — = negativ.

Normales *Agaricus*-Mycel wuchs langsamer, zeigte häufig Strang- und Sektorenbildung und schied keine Guttationstropfen aus. Auf kompostiertem Pferdemist riefen die NRRL-Stämme nicht die für *Agaricus* typische Rotbraunfärbung hervor, sondern färbten das Substrat schwärzlich. Sie wuchsen hier zunächst schnell, blieben dann aber im Wachstum zurück.

Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten auf Biomalzagarplatten (25°C ; 7 Tage) ergab bei neun getesteten *Agaricus*-Stämmen einen durchschnittlichen täglichen Zuwachs des Koloniedurchmessers von 0,19 cm, bei den *NRRL*-Stämmen jedoch von 0,36 cm/Tag.

Eine Untersuchung der auf Biomalzagarplatten gebildeten Enzyme ergab die in Tab. 1 gezeigten Verhältnisse (vgl. auch BENKO 1958).

Tabelle 2. Vergleich normaler *Agaricus*-Stämme mit den *NRRL*-Stämmen

Untersuchung/Merkmal	<i>Agaricus bisporus</i> (Mittelwerte)	<i>NRRL</i> -Stämme (Mittelwerte)
A. Festes Substrat		
Biomalzagar:	—	+
Einzelkolonien b. Überimpfen	+	—
Strang- und Sektorenbildung	gelbl. \rightarrow gelbl.	weiß \rightarrow gelbl.
Mycelfarbe	gelbl. \rightarrow gelbl.	weiß \rightarrow gelbl.
Altes Mycel: Hautbildung	—	+
Guttationstropfen	—	+
Enzyme: Tyrosinase	+++	—
Laccase	+++	++
Katalase	++	(+) ¹
Peroxydase	—	(+) ¹
komp. Pferdemist:		
Anfangswachstum	langsam	schnell
Verfärbung	rot	schwarz
Durchwachsung	völlig	unvollständig
Fruchtkörperbildung	+	—
B. Submerskultur		
Sudanophile Granula	—	+
Sekundärsporenbildung	—	+
Champignon-Geruch und Geschmack	+	—
Kulturcharakter	Kugeln	feindispers
Vakuolisierung der Zellen	spät	ab 2–3 Tag
Hyphendurchmesser μ	3–9	2–4
Ernte: 9. Tag ² mg Tr.S./ml N.M.		
Humfeld-Medium	0,3	16,1
Biomalzmedium	0,9	5,6

¹ Schwache oder unbeständige Reaktion.

² Schüttelkultur, beimpft mit Agarmycelstückchen; mg Tr.S./ml N.M. = mg Trockensubstanz/ml Nährmedium.

b) Eigenschaften in Submerskultur

In Schüttelkultur (Beimpfung mit Mycelstückchen, Ernte am 9. Tag), wuchsen die *NRRL*-Stämme in einem einfachen, synthetischen Nährmedium (HUMFELD u. SUGIHARA 1949) gut, die normalen *Agaricus*-Stämme jedoch nicht. In einfacher 5% Biomalzlösung gediehen beide, die *NRRL*-Stämme jedoch auch hier weit besser (Tab. 2).

Die *NRRL*-Stämme unterschieden sich von den normalen Stämmen auch morphologisch (HUMFELD 1948; HUMFELD 1950/51). Vom dritten Kulturtage an wurden nämlich massenhaft sporenähnliche Gebilde produziert, die HUMFELD in Anlehnung an KLIGMAN (1942) „secondary spores“ nennt.

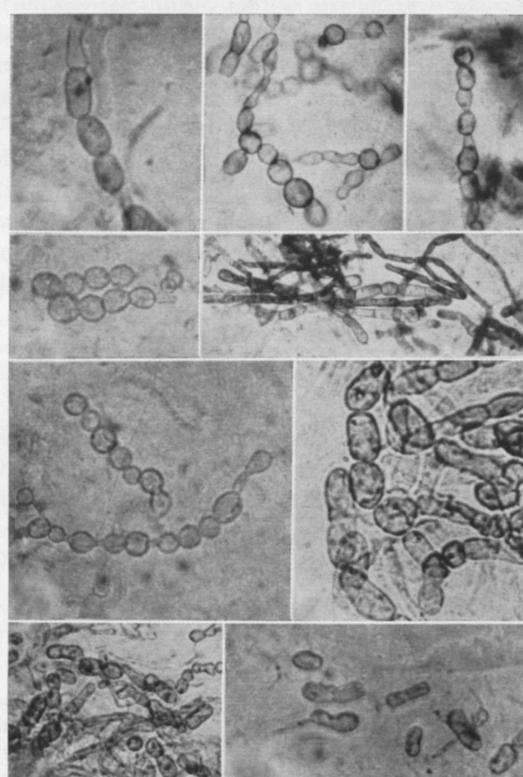
KLIGMAN bezeichnete damit chlamydosporenartige, meist runde Zellen in (ab 3 Monate) alten Hyphenverbänden auf festem Substrat, die durch Längenverkürzung und Anschwellen intercalar, also im Zellverband entstehen und diesem ein charakteristisches kettenähnliches Aussehen verleihen (Abb. 1). Diese „Kette“ kann dann in die einzelnen Sekundärsporen zerbrechen und jede davon zu einem neuen Mycel auskeimen.

Bei den von HUMFELD beschriebenen Stämmen entstehen die von ihm ebenfalls als „secondary spores“ bezeichneten, meist ovalen bis länglichen Zellen dagegen terminal an jungen, aktiv wachsenden Mycelien in Flüssigkeitskulturen und bilden keine „Ketten“ (Abb. 2). Diese in großer Zahl gebildeten Sekundärsporen (sie sollen im folgenden weiter so bezeichnet werden) geben der Suspension ein ziemlich homogenes, feinflockiges

Abb. 1. Sekundärsporen bei normalen *Agaricus*-Stämmen in festem Substrat [aus KLIGMAN (1942)]

Aussehen, während die normalen *Agaricus*-Stämme in Submerskultur in Form von Klumpen und Kugeln verschiedener Größe wuchsen.

Die Hyphen der *NRRL*-Stämme waren dünner, länger und früher vakuumisiert als bei normalen *Agaricus*-Stämmen und wiesen stark lichtbrechende Granula auf, die sich als Sudan-positiv erwiesen. Die Wachstumskurve (Beimpfung mit Agarmycelstückchen) erreichte bei den *NRRL*-Stämmen ihr Maximum am 6.—7. Kulturtag, während die normalen *Agaricus*-Stämme ein Vielfaches dieser Zeit benötigten (vgl. auch TRESCHOW 1944).



Entwickelten die *Agaricus*-Stämme auch in Submerskultur einen angenehmen, typischen Champignongeruch und Geschmack (vgl. auch BENKO 1958, sowie BLOCK in EDDY 1958), so fehlte dieser den *NRRL*-Stämmen ganz oder wurde nur als wohlriechend, angenehm und nußartig (SUGIHARA u. HUMFELD 1954) angegeben. In eigenen Versuchen konnte bei dem Mycel kein champignonartiger Geruch festgestellt

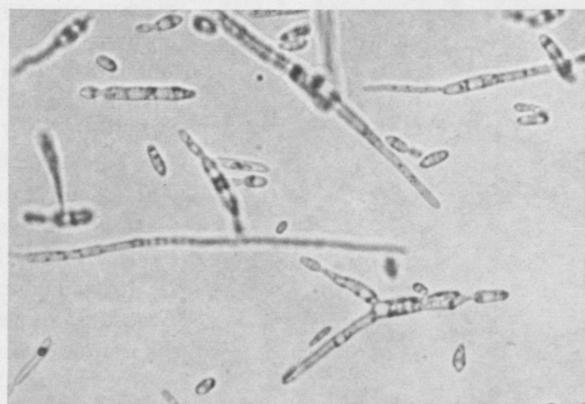


Abb. 2. Sekundärsporenbildung in Submerskultur, Humfeld-Medium, Stamm *NRRL 2334* ($\times 640$)

werden, der Geruch der Kulturen war teilweise sogar unangenehm und stechend, besonders bei höheren Stickstoffkonzentrationen (Ammoniak!).

c) Schlußfolgerungen

HUMFELD hatte unter etwa 40 in Submerskultur untersuchten normalen *Agaricus*-Stämmen der weißen und braunen Form drei so „mutierte“ oder „adaptierte“ Stämme gefunden (HUMFELD 1950/51). In eigenen Versuchen konnten jedoch aus einem noch größeren Vergleichsmaterial keine derartigen Stämme in Submerskultur selektioniert werden.

Betrachtet man nun ein in so vielen Punkten differierendes morphologisches und physiologisches Verhalten (Tab. 2), so liegen Zweifel an der Identität der *NRRL*-Stämme nahe. Es ist auch unwahrscheinlich, daß durch einen Mutationsschritt in Submerskultur in mehreren Fällen so viele Merkmale gleichartig verändert wurden und daß sich in eigenen und auch anderen Nachuntersuchungen (BENKO 1958; EDDY 1958) keine derartigen Mutationen oder Adaptationen finden ließen. Vor weitergehenden physiologischen Untersuchungen erschien es daher angebracht, die Stämme nachzubestimmen.

3. Nachbestimmung der NRRL-Stämme

a) Untersuchung der Hauptfruchtform

Zunächst wurde aus den NRRL-Stämmen und einigen normalen *Agaricus*-Stämmen im Labor der Fa. Huller, Erlangen, „Brut“ zum „Bespicken“ der Beete hergestellt. In den Anlagen des Betriebes wurde

dann unter verschiedenen Bedingungen versucht, die Stämme zur Fruchtkörperbildung zu bringen. Dies gelang bei den normalen *Agaricus*-Stämmen in allen Fällen, die NRRL-Stämme dagegen wuchsen nicht einmal in das Deckmaterial hinein, starben bald ab und bildeten keine Hauptfruchtform. Dieses Ergebnis bestätigt auch die Befunde von HUMFELD u. SUGIHARA (1952).

b) Untersuchung
der Nebenfruchtform

Zur Gewinnung von Nebenfruchtformen wurden Hängetropfenkulturen auf Biomalzagar angesetzt. Bei normalen *Agaricus*-Stämmen bildete sich in allen Fällen an ganzen Hyphenabschnitten ein typischer (SARAZIN 1951), dichter Besatz von nadelförmigen Ca-Oxalatkristallen (Abb. 3 und 4), der bei den NRRL-Stämmen stets fehlte.

Der Hyphendurchmesser betrug bei *Agaricus bisporus* $2,5-5,8 \mu$,

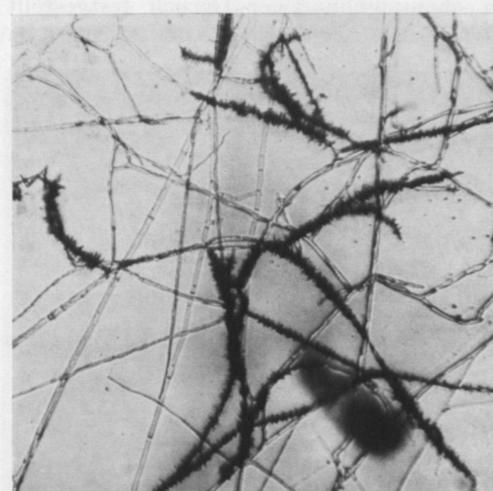


Abb. 3. Ca-Oxalat-Kristallnadeln, normaler *Agaricus*-Stamm, Hängetropfen, Biomalzagar ($\times 150$)

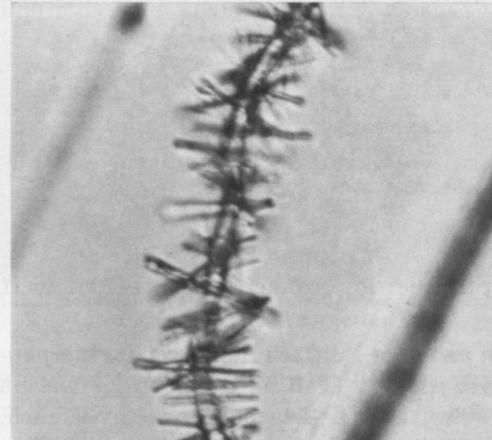


Abb. 4. Ca-Oxalat-Kristallnadeln, normaler *Agaricus*-Stamm, Hängetropfen, Biomalzagar ($\times 1000$)

bei den NRRL-Stämmen $1,1-4,7 \mu$. Letztere bildeten auch am Deckglas stets eigenartig angeschwollene, gekrümmte oder gelappte Verzweigungen in der Art von Appressorien (Abb. 5), wie sie bei pathogenen

Pilzen häufig sind, die aber bei den normalen *Agaricus*-Stämmen nicht auftraten.

In Abb. 6 ist deutlich zu sehen, wie eine fertile Hyphe, die in der Tiefe Conidien ausgebildet hat, an ihrem Ende, beim Auftreffen auf das Deckglas der Hängetropfenkultur durch diesen mechanischen Reiz zur Appressorienbildung veranlaßt wird.



Abb. 5

Abb. 5. Appressorienbildung am Deckglas einer Hängetropfenkultur, Biomalzagar, Stamm *NRRL 2335* ($\times 1000$)

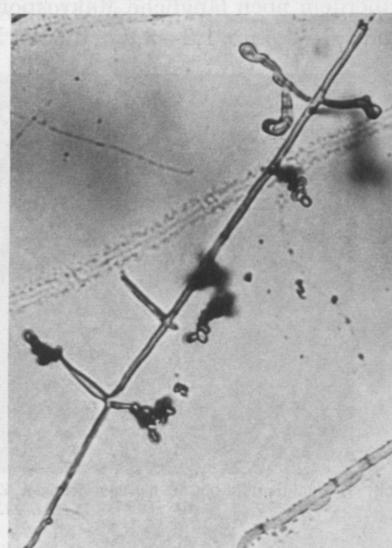


Abb. 6

Abb. 6. Appressorien- und Conidienbildung, Hängetropfenkultur, Stamm *NRRL 2335* ($\times 640$)

Es wurden weiterhin nur bei den *NRRL*-Stämmen vom 3. Tage an farblose, asexuelle Sporen (Conidiosporen) an meist flaschenförmig anschwellenen Zellen gebildet (Abb. 6, 7).

Auf Grund der bis dahin gewonnenen Befunde (Tab. 2) ließ sich bereits feststellen, daß die drei *NRRL*-Stämme, die untereinander kaum Unterschiede aufweisen, nicht zu den Basidiomyceten gehören, sondern innerhalb der *Fungi imperfecti* zu den Moniliaceen zu stellen sind.

c) Morphologische Untersuchungen¹

Zunächst wurden Entwicklung und Form der asexuellen Fortpflanzungsorgane in Objektträger- und Hängetropfenkulturen genauer untersucht. Die Conidiophoren erscheinen als gewöhnliche, undifferenzierte, septierte Hyphen und tragen die sporogenen Zellen (MACLEOD

¹ Die folgenden Untersuchungen zur Identifikation wurden im „Centraalbureau voor Schimmelmilities, Baarn, Holland“ durchgeführt.

1954 b). Diese sitzen entweder terminal in Wirteln bis zu dreien oder einzeln direkt an den Conidiophoren und sind einzellig, variabel in Form und Größe, jedoch meist bauchig bis flaschenförmig (Abb. 7).

Weit über 50% der Conidiosporen sind oval bis länglich. Sie sind farblos, hyalin, von glatter Oberfläche und sitzen so dicht am Mittelfaden, daß dieser kaum erkennbar ist. In älteren Kulturen kommen außerdem noch längliche Makrosporen vor. Die Maße der Conidiosporen sind $1,8-4,5 \mu \times 1,8-3,2 \mu$, die der Makrosporen $6,6-9,4 \mu \times 2,4-3,2 \mu$.

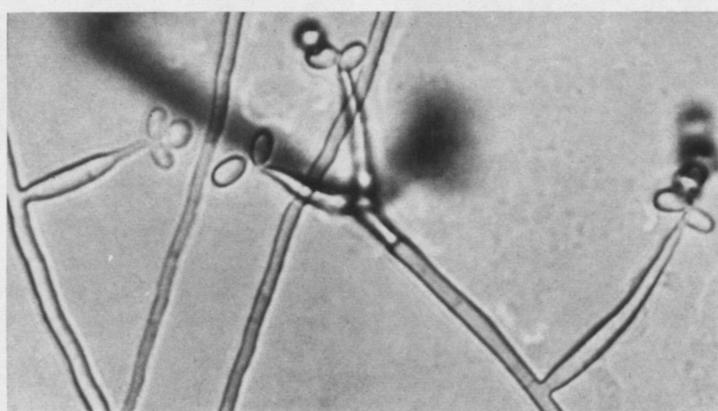


Abb. 7. Conidienbildung an flaschenförmigen Zellen, Hängetropfenkultur, Biomalzagar, Stamm NRRL 2336 ($\times 1600$)

An Hand dieser Daten, der Literatur und des reichlichen biologischen Vergleichsmaterials wurden die drei NRRL-Stämme als Gattung *Beauveria* bestimmt und auf Grund der überwiegend ovalen Sporenform zur Art *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem. gestellt.

4. Vergleich mit authentischen *Beauveria*-Stämmen

Um die Bestimmung zu sichern, wurde nun noch die Conidiospore- und Sekundärsporenbildung bei den NRRL-Stämmen und zwei authentischen *Beauveria*-Stämmen (*Beauveria bassiana* und *Beauveria tenella*) untersucht. Außerdem wurde von Stamm NRRL 2335 eine Einspor-Kultur hergestellt und mit der entsprechenden Vielsporkultur verglichen, wobei weder auf festem noch in flüssigem Substrat Unterschiede festzustellen waren, so daß das Material als einheitlich angesehen werden konnte. Der Vergleich dieser Kulturen mit den authentischen *Beauveria*-Stämmen ergab ebenfalls keine Unterschiede auf festem und flüssigem Substrat.

Auf verschiedenen festen Nährmedien (Haferflocken-, Heu-, Kartoffel-, Kirsch- und Malzagar) zeigten die NRRL-Einspor- und Vielsporkulturen gegenüber den *Beauveria*-Stämmen kaum Unterschiede

in Aussehen, Mycel- und Conidienfarbe. Die Werte der Wachstums geschwindigkeit bei den *NRRL*-Stämmen liegen ziemlich nahe bei einander und zwischen den Werten von *Beauveria bassiana* und *Beauveria*

Tabelle 3. Vergleich der *NRRL*-Stämme mit authentischen *Beauveria*-Stämmen

Untersuchung/Merkmal	<i>Agaricus bisporus</i> (Mittelwerte)	<i>NRRL</i> -Stämme (Mittelwerte)	Authent. <i>Beauveria</i> (Mittelwerte)
A. Festes Substrat (Biomalz)			
Platten:			
Temperaturopimum °C	23—24	23—25	22—25/23—27 ¹
Wachstumsgeschwindigkeit bei 25°C cm/Tag	0,19	0,36	0,31
Mycelfarbe	gelbl.→gelbl.	weiß→gelbl.	weiß→gelbl.
Enzyme: Tyrosinase	—	—	—
Laccase	++	—/+++ ¹	—
Katalase	(+) ²	+	—
Peroxydase	(+) ²	—	—
Hängetropfen:			
Ca-Oxalatnadeln	+	—	—
Appressorien	—	+	+
Sporogene Zellen	—	+ farbl.	+ farbl.
Länge μ		3,0—25,0	3,0—28,0
größter Ø μ		0,7—2,3	1,0—3,5
kleinster Ø μ		0,3—1,1	0,5—1,0
Conidiosporen	—	+ farbl.	+ farbl.
Länge μ		1,8—4,5	2,0—6,0
Ø μ		1,8—3,2	1,5—3,0
Makrosporen	—	+ farbl.	+ farbl.
Länge μ		6,6—9,4	7,0—12,0
Ø μ		2,4—3,2	3,0—3,5
B. Submerskultur			
sudanophile Granula	—	+	+
Sekundärsproben	—	+	+
Humfeld-Medium:			
Farbe, Geruch, Aussehen		gleich	gleich
Ernte: 6. Tag ³ mg Tr.S./ml N.M.		15,5	14,5
pH-Änderung		4,3 → 6,8	4,3 → 6,4
MacLeod-Medium:			
Farbe, Geruch, Aussehen		gleich	gleich
Ernte: 6. Tag ³ mg Tr.S./ml N.M.		3,1	2,9
pH-Änderung		4,5 → 2,2	4,5 → 3,5

¹ *Beauveria bassiana/Beauveria tenella*.² Schwache oder unbeständige Reaktion.³ Schüttelkultur, beimpft mit Agarmycelstückchen.

tenella (Tab. 3). Das Temperaturoptimum befindet sich bei den *NRRL*-Stämmen zwischen 23 und 25° C, bei *Beauveria bassiana* zwischen 22 und 25° C, bei *Beauveria tenella* zwischen 23 und 27° C.

Die Enzymuntersuchung ergab, daß von beiden Gruppen weder Tyrosinase noch Peroxydase gebildet wurde, Laccase war reichlich (bei *Beauveria bassiana* jedoch nicht) und Katalase wenig vorhanden (Tab. 3).

In Hängetropfenkulturen zeigten auch die authentischen *Beauveria*-Stämme Appressorien-Bildung und stimmten in Form und Größe der sporogenen Zellen und Conidien weitgehend mit den *NRRL*-Stämmen überein, die Conidiosporen saßen jedoch bei den authentischen *Beauveria*-Stämmen lockerer am Mittelfaden.

In Submers-Schüttelkulturen wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt mit dem Nährmedium nach HUMFELD und einem ähnlich zusammengesetzten synthetischen Nährmedium, das MACLEOD (1954 a) für *Beauveria* angibt. In Farbe, Geruch, Feinheit der Verteilung, sowie im mikroskopischen Aussehen der Kulturen, der Tendenz der pH-Änderung im Medium und der Erntemenge herrschte auch hier weitgehende Übereinstimmung (Tab. 3). Während im Medium nach MACLEOD jeweils stark aufgetriebene und vakuolisierte Zellen entstanden, wurde im Humfeld-Medium normales Mycel gebildet.

Faßt man die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammen, so bestätigen sie die Bestimmung der *NRRL*-Stämme als *Beauveria tenella* (MOLITORIS 1962 a, 1962 b).

C. Diskussion der Hauptergebnisse

Bei Vorversuchen mit den für eingehendere physiologische Untersuchungen vorgesehenen drei „*Agaricus campestris*“-Stämmen *NRRL* 2334, 2335, 2336 traten Zweifel an deren Identität mit *Agaricus campestris* auf. Wie nachgewiesen werden konnte, handelte es sich bei diesen Stämmen überhaupt nicht um die Basidiomyceten-Gattung *Agaricus*, sondern um eine zu den *Fungi imperfecti* gehörende Moniliacee, *Beauveria tenella* (Delacr.) Siem.

Um die Möglichkeit auszuschalten, daß bei den eigenen Untersuchungen eine Verunreinigung stattgefunden hatte, wurden die *NRRL*-Stämme noch ein weiteres Mal bezogen und untersucht. Sie zeigten jedoch wiederum die gleichen Eigenschaften.

Da die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Untersuchungsergebnisse mit den bisher über diese Stämme veröffentlichten Befunden übereinstimmen, kann man wohl eine Kontaminierung während der Zeit zwischen der Erstbeschreibung und den jetzigen Untersuchungen ausschließen. Die Stämme können während der Erstuntersuchung in Submerskultur als Verunreinigung eingeschleppt worden sein und das

ursprüngliche, langsamer wachsende *Agaricus*-Impfmaterial überwachsen haben.

Es gibt aber auch noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Der insektenpathogene Pilz *Beauveria* kommt allgemein auch dort vor, wo Champignons wachsen oder angebaut werden (BELS, persönliche Mitteilung), kann aber auch, wie im Verlaufe dieser Arbeit festgestellt werden konnte, zumindest saprophytisch auf *Agaricus*-Fruchtkörpern existieren. Bei der Erstisolierung der Stämme durch HUMFELD (1948) wurde als Impfmaterial für die Submerskulturen Mycel verwendet, das von *Agaricus*-Fruchtkörpergewebekulturen stammte (SUGIHARA u. HUMFELD 1954). Diese konnten nun aber bereits mit *Beauveria* (Sporen) infiziert gewesen sein. Möglicherweise kam also das *Beauveria*-Material schon mit dem Impfmaterial in die Submerskultur. Dort überwuchs es wegen der ihm besser zusagenden Lebensbedingungen und der besseren Vermehrungsmöglichkeit durch seine Sekundärsporenbildung den langsamwüchsigen *Agaricus*-Stamm. Durch äußerliche Ähnlichkeit des Koloniewachstums blieb die Verunreinigung bisher verborgen.

Nach diesem Untersuchungsergebnis ist es nicht mehr verwunderlich, daß die Nahrungsmittelindustrie ihre mit den angeblichen *Agaricus*-Stämmen nach einigen Patenten (HUMFELD 1952; HUMFELD 1954; SZUECS 1958) aufgenommene Mycelproduktion für Suppen und ähnliche Verwendungszwecke nach einiger Zeit wieder aufgab (STOLLER 1954), da dem Produkt der typische Champignongeschmack fehlte.

VINTING, KELLEHER u. SCHWARTING (1962) berichteten kürzlich über einen ähnlichen Fall; ein angeblicher Stamm von *Amanita muscaria*, der in Submerskultur unter Sekundärsporenbildung gut wuchs, konnte später als *Beauveria bassiana* identifiziert werden.

Zusammenfassung

Die drei als *Agaricus campestris* vom Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill., bezogenen Stämme *NRRL 2334, 2335, 2336*, wurden mit authentischen *Agaricus*-Stämmen verglichen. Auffallende morphologische und physiologische Unterschiede veranlaßten eine Nachbestimmung der *NRRL*-Stämme. Danach gehören diese nicht den Basidiomyceten, sondern innerhalb der *Fungi imperfecti* der Moniliaceengattung *Beauveria* an.

Summary

Three fungal strains (*NRRL 2334, 2335, 2336*), supposedly *Agaricus campestris* and obtained from the Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill., were compared with authentic *Agaricus* strains. The observed morphological and physiological differences led to the identification of the former (*NRRL 2334, 2335, 2336*) as *Fungi imperfecti* (Family *Moniliaceae*, Genus *Beauveria*) and not as Basidiomycetes.

Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Herrn Prof. Dr. H. G. SCHLEGEL danke ich für sein reges Interesse an der Arbeit und ihre stete Förderung.

Der Leitung des „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ Baarn, Holland, bin ich für die Stellung eines Arbeitsplatzes zu Dank verpflichtet, ebenso der Fa. Hullén, Erlangen, für die Möglichkeit, in ihren Anlagen Versuche durchzuführen.

Literatur

- BENKO, P. J.: Studies on the submerged cultivation of edible mushrooms. M. S. Thesis, Univ. Calif., Calif. (1958).
- BURKHOLDER, P. R., and E. W. SINNOTT: Morphogenesis of fungus colonies in submerged shaken cultures. Amer. J. Bot. **32**, 424–431 (1945).
- EDDY, B. P.: Production of mushroom mycelium by submerged cultivation. J. Sci. Food Agr. **9**, 644–649 (1958).
- FALANGHE, H.: Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinasse. Appl. Microbiol. **10**, 572–576 (1962).
- HEWITT, B. R.: Spectrophotometric determination of total carbohydrate. Nature (Lond.) **184**, 246–247 (1958).
- HUGHES, D. H.: Preliminary characterisation of the lipid constituents of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci. **V**, 540–546 (1962).
- HUMFELD, H.: The production of mushroom mycelium in submerged culture. Science **107**, 273–275 (1948).
- Production of mushroom mycelium. US. Dept. Agric., Yearbook Agric. **1951/52**, 242–246.
- Production of mushroom mycelium. US. Pat. 2618900 (1952).
- , and T. F. SUGIHARA: Mushroom mycelium production by submerged propagation. Food Technol. **3**, 355–356 (1949).
- — The nutrient requirements of *Agaricus campestris* grown in submerged culture. Mycologia (N. Y.) **44**, 605–620 (1952).
- JENNISON, M. W.: Cultivation of mushroom mycelium in submerged culture. Mushroom Sci. **III**, 268 (1956).
- C. G. RICHBERG and A. E. KRIKSZENS: Physiology of woodrotting basidiomycetes. II. Nutritive composition of mycelium grown in submerged culture. Appl. Microbiol. **5**, 87–95 (1957).
- KLIGMAN, A. M.: Secondary spores in the mycelium of the cultivated mushroom *Psalliota campestris*. Amer. J. Bot. **29**, 304–308 (1942).
- LYR, H.: Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion. Planta (Berl.) **50**, 359–370 (1958).
- MACLEOD, D. M.: Natural and cultural variation in entomogenous fungi imperfecti. Ann. N. Y. Acad. Sci. **60**, 58–70 (1954 a).
- Investigation on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. Canad. J. Bot. **32**, 818–890 (1954 b).
- MOLITORIS, H. P.: Identification of purported *Agaricus campestris* strains (NRRL 2334, 2335, 2336) as *Beauveria tenella* (Delacroix, Siem.). Nature (Lond.) **194**, 316 (1962).
- Bestimmung der *Agaricus campestris* Stämme NRRL 2334, 2335, 2336 als *Beauveria tenella* (Delacroix, Siem.). Mushroom Sci. **V**, 218–230 (1962 b).
- MOUSTAFA, A. M.: Nutrition and the development of mushroom flavor in *Agaricus campestris* mycelium. Appl. Microbiol. **8**, 63–67 (1960).
- O'NEIL, J. J.: Studies in the submerged culture production of mushroom mycelium. M. S. Thesis, Mass. Inst. Technol., Cambridge, Mass. (1956).

- REUSSER, F., J. F. T. SPENCER and H. R. SALLANS: Protein and fat content of some mushrooms grown in submerged culture. *Appl. Microbiol.* **6**, 1–4 (1958).
- RHODES, M.: Viability of dried bacterial cultures. *J. gen. Microbiol.* **4**, 450–456 (1950).
- ROBBINS, W. J., and A. HERVEY: Wood, tomato and malt-extracts and growth of some *Basidiomycetes*. *Mycologia (N. Y.)* **50**, 745–752 (1958).
- SARAZIN, A.: The cultivated mushroom. *MGA Bulletin* **24**, 1–75 (1951).
- STOLLER, B. B.: Principles and practice of mushroom culture. *Econ. Bot.* **8**, 48–95 (1954).
- SUGIHARA, T. F., and H. HUMFELD: Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom. *Appl. Microbiol.* **2**, 170–172 (1954).
- SZUECS, J.: Method for growing mushroom mycelium and the resulting products. *U.S. Pat.* 2850841 (1958).
- TRESCHOW, C.: Nutrition of the cultivated mushroom. *Dansk. bot. Ark.* **11**, 1–180 (1944).
- VINING, L. C., W. J. KELLEHER and A. E. SCHWARTING: Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. *Canad. J. Microbiol.* **8**, 931–933 (1962).

Dr. H. P. MOLITORIS,

Institut für Mikrobiologie der Universität, 34 Göttingen, Goßlerstraße 16