(a) La flore alpine de Taïwan a été isolée depuis assez longtemps comme l'indique le grand nombre de ses espèces endémiques.

(b) Dans cette flore je constate que l'élément Sino-Himalayen l'emporte de beaucoup sur les autres éléments, il est donc possible que beaucoup des plantes de la région des hautes montagnes de Taïwan soient originaires de la région Sino-Himalayenne. Cette conclusion est différente de celle du M. le Prof. HAYATA¹⁾ qui affirmait que la flore de la région a les plus grandes affinités avec celle des îles principales du Japon.

1) HAYATA, B.: Flora Montana Formosae (1908).

Institut de Botanique systématique et géographique
de la Faculté de Science et d'Agriculture,
Université Impériale de Taihoku, Taïwan.

Über die Anwendung der biologischen Reaktion zum Nachweis einiger Schwermetalle von geringen Mengen.

Von

Tetsu Sakamura.

Eingegangen am 22. März 1937.

Die mikrochemischen Nachweisungen verschiedener Schwermetalle lassen sich heute unter Verwendung der neuen Reagenzien immer erfolgreicher ausführen. Ebenso empfindlich oder bisweilen noch empfindlicher wie diese chemischen Reagenzien reagieren manchmal die Mikroorganismen gegen Schwermetalle. So geht z. B. aus den Arbeiten von mehreren Forschern und auch aus unseren hervor, dass das Wachstum, die Konidienbildung usw. bei *Aspergillus niger* mit einigen Schwermetallen in Spuren enge Beziehung haben und das Fehlen irgend eines unentbehrlichen oder wichtigen Schwermetalles entweder kein normales Wachstum erlaubt oder spezifische Abnormität des Entwicklungszustandes hervorruft. Diese empfindlichen Eigenschaften des Pilzes in Betracht ziehend, habe ich versucht, die Wachstumszustände von *Aspergillus niger* als Mittel zum Nachweis der Schwermetalle Fe, Zn, Cu und Mn zu verwenden.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Proben von anderen Leuten synthetisch hergestellt, und ihre Bestandteile blieben mir bis zum Ende der Versuche ganz unbekannt; nur war mir im voraus angezeigt worden, dass die Konzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-4} mol schwankten. Die

benutzten Schwermetallsalze waren $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnSO_4 , CuSO_4 und MnSO_4 .

Prinzip: Folgende Erscheinungen geschehen beim Fehlen und im Vorhandensein des einzelnen Metalles, unter Voraussetzung, dass andere notwendige Schwermetalle gegeben sind.

Fe. Bei seinem Fehlen findet kein merkliches Wachstum des Mycels auf der Oberfläche der Kulturflüssigkeit statt. Die verfügbare Grenze der Reaktion ist 10^{-7} mol in der Kulturlösung.

Zn. Dieselbe Reaktion wie beim Eisen. Die verfügbare Grenze der Reaktion ist 3×10^{-7} mol in der Kulturlösung.

Cu. Beim Fehlen des Kupfers entwickeln sich nur sehr wenige matt elfenbeinfarbige Konidien, während bei seinem Vorhandensein die Konidien sich graubraun oder ganz normal schwarz färben. Diese beiderseitige Farbenentwicklung lässt sich durch Zn—erst in der Konzentration 10^{-5} mol—verhindern. Die verfügbare Grenze der Reaktion ist 10^{-7} mol in der Kulturlösung.

Mn. Im Vorhandensein des Kupfers verursacht das Fehlen des Mangans die netzartige oder stark gefaltete Pilzdecke, die dicht aus zahlreichen Kugelzellen besteht¹⁾. Keine Konidien sind gebildet; daher ist die Oberfläche der Pilzdecke schneeweiss. Im Vorhandensein des Mangans wächst das Mycel normal lang gestreckt und bedeckt die konidientragende weiche glatte Pilzdecke die Oberfläche der Kulturflüssigkeit. Da diese Rolle des Mangans einigermassen durch Eisen ersetzt werden kann, müssen die Mengen des Eisens und Kupfers beim Nachweis des Mangans berücksichtigt werden²⁾. Die verfügbare Grenze der Reaktion ist 10^{-7} mol in der Kulturlösung.

Ausführung: Die Reinigung der Chemikalien, die Kultur usw. geschahen fast ebenso wie in meiner früheren Arbeit (1936), und die Kulturlösung ohne Zusatz der Schwermetalle besass folgende Zusammensetzung:

NH_4NO_3 (MERCK'S Reagens)	5 g
KH_2PO_4 (nach SÖRENSEN für Puffergemisch, SCHERING-KAHLBAUM)	2.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zur Analyse mit Garantieschein, KAHLBAUM)	1.25 g
Glukose (wasserfrei, TAKEDA)	22.5 g
Umdestilliertes Wasser	1000 ccm

Zum Zwecke des Adsorptionsverfahrens wurden 0.5% Calciumphosphat als Adsorptionsmittel benutzt. Der pH-Wert der Lösung betrug 5.7. Unter Fe, Zn, Cu und Mn wurde irgend ein Schwermetall eliminiert und wurden die anderen drei je in der Konzentration 10^{-6} mol der Lösung zugesetzt.

1) SAKAMURA und YOSHIMURA (Journ. Fac. Science, Hokkaido Imp. Univ., Series V, 2, 1933, Fig. 5 a Tafel XVI).

2) Siehe nachherige Versuche.

Diese vier Kulturen und noch eine andere mit allen vier Schwermetallen dienten zur Kontrolle und wurden „A-Kulturreihe“ genannt. Terex ERLENMEYER-Kolben von 250 ccm Inhalt wurden mit 100 ccm Kulturlösung beschickt, worin die Kultur geschah. Zum Nachweis des einzelnen Schwermetalles wurden 10 ccm Probelösung jeder A-Kultur (100 ccm) hinzugefügt, und diese Kulturen wurden als „B-Kulturreihe“ bezeichnet. Durch den Vergleich jeder A-Kultur mit der entsprechenden B-Kultur wurde die Beurteilung des Vorhandenseins der Schwermetalle ermöglicht. Die Konidien wurden von Fe- und Zn-haltigen Agarkulturen entnommen und deren Suspension in die Kulturlösungen geimpft. Bei der Beurteilung wurde besondere Aufmerksamkeit auf folgende Wachstumszustände gerichtet:

1. Zum Nachweis von Fe und Zn: Wenn das Pilzwachstum besser in der B-Kultur als in der entsprechenden A-Kultur geschieht, so lässt sich das Vorhandensein dieser Elemente annehmen.

2. Zum Nachweis von Cu: Wenn in der B-Kultur graubraune¹⁾ oder schwarze Konidien die Pilzdecke überziehen, während sie sich in der A-Kultur ohne Cu sehr wenig oder gar nicht entwickeln, so spricht diese für das Vorhandensein des Kupfers in der Probelösung.

3. Zum Nachweis von Mn: Im Falle, wo die Fe-Konzentration der Kulturlösung niedriger als 10^{-6} mol ist, ruft der Zusatz von Cu (2×10^{-5} mol) beim Fehlen von Mn die Entwicklung der schneeweissen Pilzdecke in netzartiger Form hervor, die sehr wenig oder fast keine Konidien trägt. Wenn der Zusatz der Probelösung die Neigung der Pilzdecke zu netzartiger Gestaltung schwächt und dem Pilze eine merkliche Konidienbildung ermöglicht, so lässt sich das Vorhandensein von Mn folgern (Die erste Methode zum Nachweis von Mn).

Wenn die Konzentration des Eisens in der Kulturlösung mehr als 10^{-6} mol beträgt, wird die Wirkung des Mangans durch das Eisen verdeckt. In solchem Falle ist der Nachweis von Mn erst dann möglich, wenn die Wirkung des Eisens durch Vermehrung der Menge des antagonistisch wirksamen Kupfers an der Konidienbildung gehindert wird. In einer so bereicherten Kulturlösung ruft ein Zusatz des Mangans schon in geringster Menge (10^{-7} mol) wieder üppige Entwicklung der Konidien hervor. Bei der Ausführung des Verfahrens setzt man Cu (10^{-4} mol) und Fe (10^{-5} mol) der Kulturlösung zu. Wenn weiterer Zusatz der Probelösung normale Bildung der schwarzen Konidien ermöglicht, so kann man auf Vorhanden-

1) Wenn die Konzentration des Kupfers sehr niedrig (10^{-7} mol) ist, so treten graubraune Konidien auf. Ein deutlicher Unterschied betreffs der Konidienfarbe sowie der Konidienzahl ist auch in diesem Falle bemerkbar zwischen der Cu-haltigen und der Cu-entbehrenden Kultur.

sein des Mangans in der Probelösung schliessen (Die zweite Methode zum Nachweis von Mn).

Beispiel 1. Kulturdauer: 5 Tage.

	Nicht zugesetzt	A (ohne Zusatz der Probe).		B (mit Zusatz der Probe).	
		Pilzdecke	Konidien	Pilzdecke	Konidien
1	Fe	spärliches Wachstum	+ + + schwarz	besser. Wachs. als A 1	+ + + schwarz
2	Zn	spärliches Wachstum	+ + + schwarz	spärliches Wachstum	+ + + schwarz
3	Cu	zieml. gutes Wachs., glatt	+ matt elfenbeinfarb.	zieml. gutes Wachs., glatt	+ + + schwarz
4	Mn	gutes Wachs., netzartig	—	gutes Wachs., glatt	+ + + schwarz
5	Alle diese zugesetzt	gutes Wachs., glatt	+ + + schwarz		

Das Mass der Konidienentwicklung ist verhältnismässig wie folgt ausgedrückt, bezogen auf die Einheit der Oberfläche der Pilzdecke:

+ Sehr spärlich. Pilzdecke ist fast nackt und schneeweiss.

+ Gute Entwicklung. Pilzdecke bleibt aber hier und da mit keinen Konidien überzogen.

Ganze Oberfläche der Pilzdecke ist mit Konidien überzogen.

	Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
Fe	10^{-6} mol	+
Zn	—	—
Cu	10^{-6} mol	+
Mn	10^{-5} mol	+

Beispiel 2. Kulturdauer: 6 Tage.

	Nicht zugesetzt	A (ohne Zusatz der Probe).		B (mit Zusatz der Probe).	
		Pilzdecke	Konidien	Pilzdecke	Konidien
1	Fe	spärliches Wachstum	## schwarz	besser. Wachs., als A 1	## schwarz
2	Zn	spärliches Wachstum	## schwarz	spärliches Wachstum	## schwarz
3	Cu	zieml. gutes Wachs., glatt	+ matt elfenbeinfarb.	zieml. gutes Wachs., glatt	+ matt elfenbeinfarb.
4	Mn	gutes Wachs., netzartig	—	gutes Wachs., glatt	## schwarz
5	Alle diese zugesetzt	gutes Wachs., glatt	## schwarz		

	Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
Fe	10^{-6} mol	+
Zn	—	—
Cu	—	—
Mn	10^{-6} mol	+

Kein Fehler.

Beispiel 3. Kulturdauer: 6 Tage.

Das Ergebnis der A-Kultur war gleich demjenigen des Beispiels 2.

B (mit Zusatz der Probe).

	Nicht zugesetzt	Pilzdecke	Konidien
1	Fe	spärliches Wachstum	## schwarz
2	Zn	spärliches Wachstum	## schwarz
3	Cu	zieml. gutes Wachs., glatt	++ graubraun
4	Mn	gutes Wachs. glatt	## schwarz

	Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
Fe	—	—
Zn	—	—
Cu	10^{-6} mol	+
Mn	10^{-6} mol	+

Kein Fehler.

Beispiel 4. Kulturdauer: 6 Tage.

Das Ergebnis der A-Kultur war gleich demjenigen des Beispiels 2.

B (mit Zusatz der Probe).

	Nicht zugesetzt	Pilzdecke	Konidien
1	Fe	besser. Wachs. als A 1	## schwarz
2	Zn	besser. Wachs. als A 2	## schwarz
3	Cu	zieml. gutes Wachs., glatt	++ graubraun
4	Mn	gutes Wachs., glatt	## schwarz

	Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
Fe	10^{-6} mol	+
Zn	10^{-6} mol	+
Cu	10^{-6} mol	+
Mn	10^{-6} mol	+

Kein Fehler.

Beispiel 5. Kulturdauer: 7 Tage.

Dass die Konzentration des Eisens 10^{-6} mol überschritten war, war im voraus bekannt. Der Nachweis von Mn wurde daher durch die zweite Methode ausgeführt.

	Nicht zugesetzt	A (ohne Zusatz der Probe).		B (mit Zusatz der Probe).	
		Pilzdecke	Konidien	Pilzdecke	Konidien
1	Fe	spärliches Wachstum	## schwarz	gutes Wachs., glatt	## schwarz
2	Zn	spärliches Wachstum	## schwarz	gutes Wachs., glatt	## schwarz
3	Cu	zieml. gutes Wachs., glatt	+ matt elfenbeinfarb.	gutes Wachs., glatt	## schwarz
4	Mn	gutes Wachs., netzartig	+ schwarz	gutes Wachs., glatt	## schwarz
5	Alle diese zugesetzt	gutes Wachs., glatt	## schwarz		

	Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
Fe	5×10^{-5} mol	+
Zn	10^{-3} mol	+
Cu	5×10^{-6} mol	+
Mn	2×10^{-6} mol	+

Kein Fehler.

Beispiel 6. Kulturdauer: 6 Tage.

Der Nachweis von Mn wurde durch die zweite Methode ausgeführt.

	Nicht zugesetzt	A (ohne Zusatz der Probe).		B (mit Zusatz der Probe).	
		Pilzdecke	Konidien	Pilzdecke	Konidien
1	Fe	spärliches Wachstum	## schwarz	gutes Wachs., glatt	## schwarz
	Zn	spärliches Wachstum	## schwarz	besser. Wachs., als A 2	## schwarz
3	Cu	ziem. gutes Wachs., glatt	+ matt elfenbeinfarb.	zieml. gutes Wachs., glatt	+ matt elfenbeinfarb.
4	Mn	gutes Wachs., netzartig	+ schwarz	gutes Wachs., glatt	## schwarz
5	Alle diese zugesetzt	gutes Wachs., glatt	## schwarz		

	Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
Fe	5×10^{-5} mol	+
Zn	10^{-6} mol	+(?)
Cu	—	—
Mn	10^{-6} mol	+

Fast kein Fehler.

Beispiel 7. Kulturdauer: 6 Tage.

Der Nachweis von Mn wurde durch die zweite Methode ausgeführt. Das Ergebnis der Δ -Kultur war gleich demjenigen des Beispiels 6.

B (mit Zusatz der Probe).

	Nicht zugesetzt	Pilzdecke	Konidien		Schwermetalle in der Probe.	Nachweis.
1	Fe	spärliches Wachstum	+++ schwarz	Fe	—	—
2	Zn	gutes Wachst., gefaltet	+++ schwarz	Zn	10^{-4} mol	+
3	Cu	gutes Wachst., gefaltet	+++ schwarz	Cu	5×10^{-5} mol	—
4	Mn	gutes Wachst., gefaltet	+ schwarz	Mn	—	+

Kein Fehler.

Aus den obigen Beispielen geht hervor, dass die vorliegende biologische Methode zum Nachweis der Schwermetalle in gewissem Konzentrationsbereiche verwendbar ist, wenn auch noch mehrere Ergänzungen dafür nötig sind. Die Methode verspricht auch die Möglichkeit, die Schwermetalle nachzuweisen, die in pflanzlichen sowie tierischen Materialien vorkommen.

Der Stiftung HATTORI Hôkôkwai sind wir für die Unterstützung unserer Arbeiten zum grössten Dank verpflichtet.

Botanisches Institut, Naturwissenschaftliche
Fakultät, Hokkaido Kaiserl.
Universität, Sapporo.