

# Studium zellulolytischer Bodenpilze mit Hilfe der Zellophanstreifen-Methode und mit Carboxymethyl-Zellulose

Von Walter G a m s

Aus dem Bodenbiologischen Institut Imst (Tirol) der Forstlichen Bundes-Versuchsanstalt Mariabrunn.

Mit 7 Textfiguren.

Im folgenden werden methodische Beobachtungen und Isolierungsergebnisse beschrieben, die mit der früher (G a m s 1959) beschriebenen Methode der im Boden eingegrabenen Zellophanstreifen gewonnen wurden, die eine Modifikation der von K u z n i a r und T r i b e verwendeten Methoden darstellt. Carboxymethyl-Zellulose ist durch ihre Wasserlöslichkeit ein sehr brauchbares Substrat für zellulolytische Pilze, dessen Abbau sich leicht feststellen lässt.

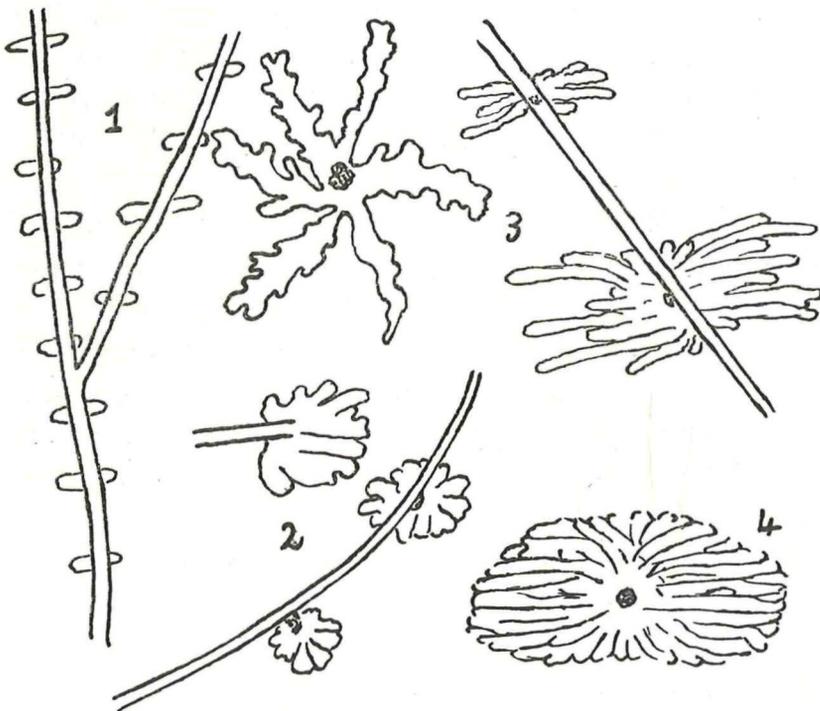


Fig. 1—4: Verschiedene Typen von Submers-Appressorien auf Zellophan, das frisch aus dem Boden entnommen ist. Schematisiert. Beschreibung im Text.

## A. Zellophanstreifen:

1. Form und Entwicklung zellulolytischer Organe auf Zellophan:

Unter den höheren Pilzen und Fungi Imperfecti kann man zwei grundsätzlich verschiedene Typen unterscheiden:

a) Einige Pilze lösen die Zellulose überall entlang den Hyphen auf, wo sie gerade damit in Berührung kommen (z. B. *Rhizoctonia solani*).

b) Zahlreiche zellulolytische Pilze senken eigene Seitenzweige in das Zellophan, die es angreifen: Diese durchbohren meist an einer eng begrenzten Stelle das Zellophan und breiten sich dann stern- oder fächerförmig an der dem Boden abgekehrten Seite oder mitten im Zellophan aus. Diese Bildungen werden von Tribes als "rooting branches" bezeichnet, was man mit "Submers-Appressorien" übersetzen könnte. Charakteristisch ist, dass dabei die Hyphen ausserordentlich dünnwandig sind und eine undeutliche, wellige oder zackige Kontur aufweisen. Auf dem frisch dem Boden entnommenen Zellophan zeigen sich morphologische Unterschiede zwischen verschiedenen Pilzarten: Von oberflächlichen Hyphen können in dichter Folge "roots" ins Zellophan eingesenkt werden, die sich kaum ausbreiten (Fig. 1). Andere Arten bilden zahlreiche "roots", von denen sich allseits zahlreiche kurze Äste ausbreiten, die einander berühren (Fig. 2), oder nur wenige, die sternförmig (mit Dendriten vergleichbar) nach allen Seiten oder in einer bevorzugten Richtung auswachsen (Fig. 3). Bei anderen Arten wieder wachsen die zellulolytischen Äste von einzelnen „Wurzeln“ dicht strahlig rasch nach allen Seiten aus, so dass sie ein kreisförmiges oder häufiger elliptisches Feld völlig bedecken, eine sehr charakteristische Form, die sich als Fächerappressorium bezeichnen lässt (Fig. 4).

Werden die Zellophanstreifen auf Agarnährboden ausgelegt, so wachsen nicht nur gewöhnliche Hyphen auf den Agar hinaus, sondern es entwickeln sich auch die angefangenen zellulolytischen Organe weiter, und neue solche werden gebildet. Jedoch kann man jetzt nur mehr den zuletzt genannten Typus des Fächerappressoriums beobachten in üppigster Ausbildung (Fig. 5). Für die Isolierung ist diese Tatsache wertvoll, da man bei mikroskopischer Beobachtung sicher geht, nur zellulolytische Pilze zu bekommen. Dadurch übertrifft diese Methode die anderen bisher gebräuchlichen (bes. Isolierung von Filtrierpapier, z. B. Traaen 1914).

## 2. Anisotropes Verhalten des Zellophan s:

a) Zellophan verhält sich mechanisch anisotrop: Besonders in nassem Zustand zeigt eine Richtung stärkere Dehnbarkeit und geringere Reissfestigkeit als die senkrecht dazu stehende. Es ist zweckmässig, diese festere durch eine Vorprobe zur Schnittrichtung zu bestimmen.

b) Die zellulolytischen Pilze mit Submersappressorien zeigen oft (je nach Pilzart stärker oder schwächer) ein auffallend parallel gerichtetes Wachstum im Zellophan. (Die Abbildungen in dieser Arbeit sind so gerichtet, dass die bevorzugte Wuchsrichtung die Horizontale ist.) Durch verschiedene Eingraberichtung gleichsinnig ge-

schnittener Streifen lässt sich diese Richtung nicht verändern. Ungleichsinnig geschnittene Streifen (senkrechte Schnittrichtung), die neben- oder übereinander auf demselben Objektträger eingegraben werden, werden in verschiedener Richtung bewachsen.

c) Beobachtung im Polarisationsmikroskop zeigt folgendes: Zellophan (regenerierte Zellulose) ist schwach doppelbrechend (und zwar unabhängig von einem allfälligen Zug, der in feuchtem Zu-

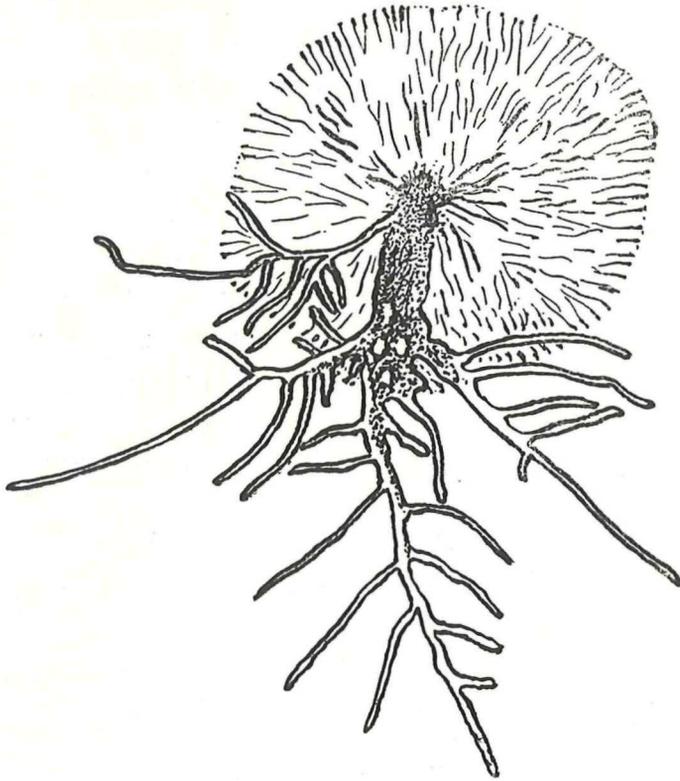


Fig. 5: Typische junge Pilzkolonie auf Zellophan, 2 Tage auf Agar: Im Zellophan das weiterwachsende Fächer-Appressorium, darüber auswachsend vegetative Hyphen. Nach einer Mikrophotographie, ca. 300 : 1.

stand ausgeübt wird). In Additionsstellung erscheint es grünlich, während die vom Pilz ausgehöhlten Stellen tief blau hervortreten, da die Doppelbrechung in der dünneren Schicht viel weniger verdeckt ist. Diese Tatsache ist sehr nützlich zur Feststellung des Zellophanabbaues und gibt ausserdem schöne Möglichkeiten für die Mikrophotographie. Bei Additionsstellung liegen Wuchsrichtung der Appressorien und  $n_{\gamma}$  des Gipses parallel. Das heisst, dass die zelluloseangreifenden Hyphen in der Richtung der Fibrillen wachsen.

Für *Cytophaga* wurde eine analoge Ausrichtung entlang der Zellulosefibrillen von Stanier 1942 festgestellt und als *Elastico-taxis* bezeichnet.

Wie zu erwarten, ist diese Richtung im Zellophan auch die der grösseren Reissfestigkeit.

### 3. Verwendung doppelter Zellophanlagen:

Nach Tribe 1957 lässt sich das Einbohren vieler zellulolytischer Pilze in das Zellophan für die Isolierung ausnützen, indem man Zellophanstreifen in dreifacher Lage ("Sandwiches") verwendet. Von der mittleren Folie lassen sich dann die Pilze von "rooting branches" leicht isolieren. Bei einigen methodischen Versuchen wurden Zellophanstreifen in doppelter und dreifacher Lage verwendet, und zwar breitere Streifen über schmäleren. Es zeigten sich in der unteren Lage jedoch auch gewöhnliche Hyphen, deren Zugehörigkeit zu den Zellulolyten nicht nachweisbar ist. Ausserdem wurden besonders am Rand der unteren Streifen starke Bakterienansammlungen und vereinzelte Nematodeneier beobachtet. Zellophan in dreifacher Lage braucht für die Bewachsung noch länger und bewährt sich auch nicht besser.

### 4. Isolierungsergebnisse:

In der Literatur sind schon sehr viele Pilzarten als Zellulolyten bekannt (White et al. 1948, — Janke 1949, — Reese, Levinson et al. 1950, — Reese et al. 1951, — Siu 1951, — Reese, Levinson et al. 1952, — Jefferys et al. 1953, — Cooke and Busch 1957, — Tribe 1957 und 1958 u. a.). Von uns wurden nur wenige Isolierungen durchgeführt.

a) Zur Erprobung der Methode wurden zuerst etliche Versuche in verschiedenen Blumenkistchen unternommen, wobei vor allem *Fusarium*- und *Cylindrocarpon*-Arten von Fächerapressorien sowie *Rhizoctonia solani* isoliert wurden. Besonders die letzte lässt sich von Zellophanstreifen äusserst leicht isolieren, da sie auf dem Agar schneller als alle anderen Pilze auswächst.

b) Im Rahmen der Untersuchungen über winterliches Pilzwachstum im Boden (Gams 1960) wurden beim Forstgarten Gunggelgrün bei Imst auch zellulolytische Pilze isoliert:

Dabei konnte lediglich von einem Objektträger an der humusreichen Stelle 4 zahlreich *Cylindrocarpon radicum* bestimmt werden; ein Stamm ist vermutlich ein *Hyalopus*; alle übrigen Stämme bleiben steril. Unter diesen fällt eine häufige Form auf durch Anhäufungen von kugeligen hyalinen Zellen, die bei starker Entwicklung als Sklerotien gedeutet werden könnten. (Sie erreichen manchmal über 100  $\mu$ .) Möglicherweise entsprechen sie auch den "bulbils" von *Papulaspora*, wobei sie *Pap. pallidula* Hotson 1917 am nächsten kommen. Sie behalten jedoch immer ihre traubig-büschelige Natur, ohne sich jemals zu einer einheitlichen Kugelgestalt zusammenzuschliessen. In der Verteilung dieser Formen lassen sich keine Unterschiede zwischen den Probenstellen erkennen. Die genannten Formen können nicht als typisch winteraktiv bezeichnet werden, da sie teilweise wohl auch von gekeimten Sporen isoliert wurden, die nachher im Labor auf dem Zellophan zellulolytische

Organe entwickeln. Die papulaspora-artige Form wurde allerdings auch von Nylonstreifen zum gleichen Zeitpunkt isoliert (vgl. G a m s 1960). Von gekeimten Sporen wurde mehrmals der stark zellulolytische *Pseudogymnoascus vinaceus* Raillo isoliert (mit einer Konidienform vom *Aleurisma*-Typ!).

## B. Versuche mit Carboxymethyl-Zellulose

Carboxymethyl-Zellulose (CMC) ist ein fast völlig wasserlösliches Zellosederivat, das sich in flüssiger Form und mit Agar kombiniert als Nährsubstrat für Pilze verwenden lässt. Sie kann wie gewöhnliche Zellulose nach J e f f e r y s et al. im Kulturfiltrat mit Chlor-Zink-Jod leicht nachgewiesen werden. Dadurch bietet CMC grosse Vorteile gegenüber den sonstigen in der Mikrobiologie gebräuchlichen Zelluloseformen (Zellulosepulver), gefälltes Zellulose-Sol, Filtrierpapier, Baumwolltuch und -faden (Abnahme der Reissfestigkeit), Watte, Stroh u. a.).

Mehrfach wurde sie von anderen Autoren zur Untersuchung der Zellulaseaktivität verwendet, wobei Kulturfiltrate zellfrei mit CMC vermischt werden. Es kann in zwei verschiedenen Weisen vorgegangen werden: Entweder werden freigesetzte reduzierende Zucker bestimmt, eine Methode, die von R e e s e, S i u, L e v i n s o n 1950 für verschiedene lösliche Zellosederivate eingeführt wurde, oder es wird nach L e v i n s o n & R e e s e 1950 und S c h a e f e r 1957 die Abnahme der Viskosität geprüft. L y r 1959 betont die Notwendigkeit regelmässig wiederholter Bestimmungen der Fermentaktivität, so dass man für verschiedene Pilze vergleichbare Werte bekommt; er verwendet Aethyl-hydroxyäthyl-Zellulose (Modocoll) statt CMC zur viscosimetrischen Zellulosebestimmung.

Bei summarischen Versuchen, wie sie zum ersten Mal von J e f f e r y s et al. 1953 mit CMC durchgeführt wurden, wobei der Abbau im Kulturfiltrat selbst nachgewiesen wird, genügt natürlich eine einmalige Bestimmung nach 3—4 Wochen Kulturdauer.

Somit stellt die CMC-Methode eine Kontrolle der Zellophan-Isolierungen dar, diese ihrerseits eine Kontrolle für den CMC-Abbau.

Für unsere Versuche standen zwei Produkte der Chemischen Fabrik v a n B a e r l e & Co, Gernsheim am Rhein, zur Verfügung: 1. Carboxymethyl-Zellulose, hochviskos mit 85/87% CMS, 2. Carboxymethyl-Zellulose, Griess mit 85/87% CMS, Spezialqualität, neutral, für Emulsionen. Bei den ersten Versuchen erwies sich die hochviskose Form für das Wachstum etlicher Askomyzeten stark überlegen. Bei *Chaetomium globosum* beispielsweise bleiben auf der zweiten Form die Perithezien völlig steril. Der Abbau war bei der hochviskosen Form ausserdem viel deutlicher zu beobachten. Daher wurde in der Folge nur noch dieses Präparat verwendet.

**Zusammensetzung des Nährmediums:** Sowohl für die Nährlösungen wie für die Agarplatten wurden die gleichen Mischungen verwendet, die sich also nur durch Zusatz von 15 gr Agar pro Liter unterscheiden. Zuerst wurde genau das Rezept von Jefferys et al. befolgt:  $\text{NH}_4$ -Tartrat 2,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq}$  0,5, KCl 0,5,  $\text{FeSO}_4$  0,01, Na.CMC 10,0 gr, Aqua dest. 1 Liter.

Das Ergebnis war, dass viele der von Zellophanstreifen isolierten Pilze schlechtes Wachstum zeigten und keinen CMC-Abbau. Wie sich aus sonstigen Erfahrungen mit Bodenpilzen und -bakterien (Augier et Moreau) leicht ableiten lässt, kann dies auf das Fehlen von Spurenelementen oder von Wuchsstoffen zurückzuführen sein (vgl. auch Siu). Um eine geeignetere Zusammensetzung zu finden, wurden zuerst einige organische Nährstoffe auf ihre Cl-Zn-J-Reaktion getestet mit folgendem Ergebnis:

Positiv (Niederschlag): Agar (schwarz), Gelatine (violettbraun), Pepton und Malzextrakt (braun), Ammonium-Tartrat und Seignettesalz (ocker in grosser Menge).

Negativ: Glukose, Saccharose, Maltose, Hefeextrakt Difco.

Hefeextrakt ist also als Wuchsstoffquelle ein geeigneter Kulturzusatz, ohne die Reaktion zu stören. Man könnte auch versuchen, geringe Zuckermengen beizufügen, sozusagen als Starthilfe für die zellulolytischen Pilze. Von diesen Voraussetzungen ausgehend, wurde folgende schwach saure Zusammensetzung gewählt (CMC + Nährsalze wie bei Czapek-Dox + Spurenelemente + Hefeextrakt):  $\text{NaNO}_3$  3 gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 gr,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq}$  0,5 gr, KCl 0,5 gr,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{aq}$  0,01 gr, CMC hochviskos 10,0 gr, Hefeextrakt Difco 0,5 gr;  $\text{CuSO}_4$  10 mg,  $\text{MnSO}_4$  5 mg,  $\text{ZnSO}_4$  1 mg,  $\text{CaCl}_2$  50 mg (in Lösungen), Aqua dest. 1 Liter.

Von der Nährlösung kommen 20 ml in 100  $\text{cm}^3$ -Erlenmeyer-Kolben.

**Cl-Zn-J-Reaktion:** Die Reaktion wird durchgeführt, indem einige Tropfen Kulturfiltrat in kleinen Porzellantiegeln zum Reagens (nach Behrens) gefügt werden. CMC gibt in 1%iger Lösung einen massiven violett-schwarzen Niederschlag. Auch bei Zelluloseabbau ist häufig noch eine Fällung zu beobachten, die jedoch viel feiner flockig ist und je nach Intensität von Violettbraun über Braun verschiedener Helligkeit bis Ocker geht. Wie aus den Vorversuchen ersichtlich, kann ein solcher Niederschlag auch auf völlig andere Verbindungen, vor allem Eiweisse, zurückzuführen sein. Bei völligem Abbau und Fehlen eines braunen Niederschlages ist häufig ein schwacher hellockerfarbener zu beobachten, der bei der ersten Nährlösung nach Jefferys et al. auf Tartrat zurückgeführt werden könnte, jedoch auch bei fehlendem Tartrat oft zu beobachten ist.

Bei der Auswertung kann nur alternativ zwischen positiv (massiv violett-schwarz) und negativ (alle übrigen Stadien) genau entschieden werden.

#### Testung des Kulturfiltrats der von Zellophanstreifen isolierten Pilze:

Die als zellulolytisch bekannten Pilze aus den Gattungen *Fusarium* und *Cylindrocarpon* sowie *Rhizoctonia solani* und etliche andere Stämme von früheren Isolierungsserien zeigten sehr deutlichen Abbau von CMC. Nicht jedoch alle sterilen Stämme der winterlichen Versuchsserie. Bei den wenigen ersten Versuchen mit der Nährlösung nach Jefferys et al. waren über die Hälfte negativ. Mit der verbesserten Nährlösung wurden einige vorher negative Stämme positiv, und das Ergebnis konnte auf 20:8 zugunsten der CMC-abbauenden Stämme verbessert werden. Vermutlich könnte durch weitere Wuchsstoffzusätze oder Zuckerstarthilfen das Ergebnis noch verbessert werden; die Schuld an diesem Versagen dürfte nicht an der Zellophanmethode liegen. Bemerkenswert ist, dass die negativen und positiven Stämme sowohl unter den *Papulaspora*-artigen wie unter den völlig sterilen zu finden sind.

#### Wachstum auf CMC-Agar:

Die Hoffnung, dass schon das Wachstum auf CMC-Agar einen Hinweis auf den Zellulose-Abbau zu geben vermöchte, war verfrüht. Auch zellulolytische Pilze wachsen auf diesem Nährboden schlechter als auf malzhältigen Substraten (besonders die Entwicklung des Luftmyzels ist stark reduziert), während Nichtzellulolyten, wie einige Mucoraceen und *Mortierella*-Arten auch auf CMC-Agar grosse Flächen überziehen und sporulieren. Bei den untersuchten sterilen Stämmen zeigen sich keine Beziehungen zwischen Wachstum und CMC-Abbau.

Bemerkenswert ist jedoch das Ergebnis, dass sich CMC-Agar ausgezeichnet bewährt hat, um sterile Formen zum Sporulieren anzuregen. Es wurden zahlreiche sterile Stämme von früheren Isolierungsserien darauf geimpft. Die besten Ergebnisse zeigten manche *Melanconiales* (*Truncatella*) und *Sphaeropsidales* (*Phoma*, *Pyrenochaeta*), lauter stark zellulolytische Arten. Einige Hyphomyzeten bildeten ausgefallene Konidienträgerformen. Die auf gewöhnlichen Nährböden sporulierenden Arten tun es meist auf CMC-Agar, jedoch ist die Sporulation oft spärlicher, was die Beobachtung erleichtern kann.

#### C. Zusammenhang der beschriebenen Methoden mit den fermentativen Zellulolyseprozessen

Der Abbau verschiedener Zelluloseformen und -derivate geht verschieden leicht vor sich. Dabei spielen eine Rolle die Grösse der

Moleküle und ihre Verzweigung, ausserdem aber auch die physikalische Struktur des Stoffes, die Reinheit bzw. Durchdringung mit Fremdstoffen. Beimengungen können auf den Angreifer stimulierend oder hemmend wirken, oder den Angriff abschirmen (Fähræus, Kühlwein und Gallwitz).

Nach den Untersuchungen von Reese, Siu und Levinson 1950 und Reese und Levinson 1952 vermögen etliche Pilze CMC abzubauen, ohne jedoch reine Zellulose anzugreifen. Daraus schliessen die Autoren, dass der Abbauprozess sich in mehrere Schritte gliedere, wovon der erste durch ein oder mehrere Fermente  $C_1$  die native Zellulose in eine modifizierte Form überführt (wie Holzzellulose oder lösliche Zellosederivate), die in einem 2. Schritt durch die 1—4  $\beta$ -Polyglucosidase (von den Amerikanern als  $C_x$  bezeichnet) in Zellobiose-Moleküle oder die nächsthöheren Polymeren gespalten wird. Diese werden intrazellulär durch  $\beta$ -Glucosidase in Glukose gespalten.  $C_x$  lässt sich durch Methanol aus dem Kulturfiltrat ausfällen (Schæfer). Besonders manchen *Aspergillus*-Arten (*A. flavus*, *A. sydowii*, *A. niger* p. p. u. a. [Reese & Downing 1951]) fehlt demnach das Ferment  $C_1$ : Sie können wohl amorphe, nicht aber kristalline Zellulose verwenden. Bei unseren Versuchen zeigten sich ähnliche Verhältnisse bei zwei *Mortierella*-Arten: *Mort. ramanniana* ist nach Domsch 1960 nicht zellulolytisch aktiv, während sie ebenso wie *Mort. vinacea* CMC leicht angreift (für *Mort. ramanniana* schon von Jefferys et al. nachgewiesen). Andere Sektionen der Gattung *Mortierella* sind auch gegen CMC inaktiv.

Es gibt jedoch nach Reese & Levinson 1952 auch zellulolytische Pilze, die wenig oder gar kein  $C_x$  in das Substrat abscheiden. Von diesen wurde hier lediglich *Chaetomium globosum* auf CMC getestet und als sehr aktiv befunden. Es wäre möglich, dass andere Pilze dieser Gruppe CMC aus der Lösung nicht abzubauen vermögen, was auch für die oben erwähnten negativen Ergebnisse eine Erklärung geben könnte.

CMC ist nach übereinstimmender Ansicht zahlreicher Autoren leicht angreifbar und erfordert nur das Ferment  $C_x$ . Die oben beschriebene Methode gibt also nur einen Hinweis für dessen Anwesenheit, während als eigentliche Zellulolyten nur solche Pilze bezeichnet werden, die auch das Ferment  $C_1$  zu bilden vermögen. Doch kann man wohl auch den anderen „Halbzellulolyten“, wie wir sie der Kürze halber nennen wollen, in natürlichen Abbauprozessen grössere Bedeutung zusprechen als reinen „sugar fungi“.

Kann Zellophan auch von  $C_x$  allein angegriffen werden?

Eine positive Beantwortung dieser Frage erscheint wahrscheinlich. Zellophan ist eine regenerierte Form der Zellulose, bei deren

Herstellung die Länge der Kettenmoleküle durch autoxydativen Abbau beim Reifen der Natronzellulose in der Viskoseherstellung auf etwa  $\frac{1}{6}$  bis  $\frac{1}{8}$  verkürzt wird (auf einen Polymerisationsgrad von ca. 300) (Staudinger und Feuerstein). Es lässt sich durch Fermentpräparate aus *Cytophaga in* reduzierende Zucker spalten, ebenso wie Lichenin, nicht jedoch native Zellulose (Fähræus). Es wurden daher zur Beantwortung der Frage mit den oben genannten „Halbzellulolyten“ diesbezügliche Versuche angestellt:

In Petrischalen mit Mineralsalz-Hefeextrakt-Agar (analog der oben (pag. 300 angegebenen Zusammensetzung) wurden ausgekochte Zellophanscheiben oder -streifen und vergleichsweise Filtrierpapierscheiben gelegt und beimpft; verwendete Pilze: *Mortierella*

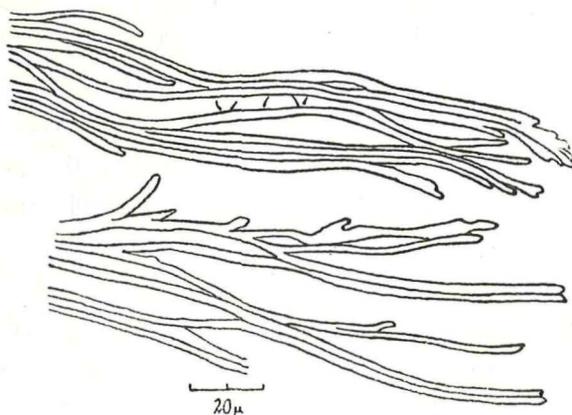


Fig. 6: Verschiedene Submers-Appressorien von *Aspergillus niger* auf Zellophan über Agar, 14 Tage alt, bei Zimmertemperatur. ca 750 : 1.

*ramanniana*, *M. vinacea*, *Aspergillus niger*, *A. repens*. Beobachtet wurden das Wachstum der Pilze und der Angriff des Zellophans: Direkte Lysis durch Hyphenkontakt, Lysis durch Submersappressorien und Herabsetzung der Festigkeit (Reissprobe und Ritzprobe: Ritzt man das nasse Zellophan unter dem Mikroskop mit einer Nadel, so bleibt normalerweise die Ritzspur schmal und  $\pm$  glattrandig, oder sie ist von feinen gebogenen Rissen begrenzt, während in angegriffenem Zustand die Oberfläche grob schollig aufbricht).

Ergebnisse: A) Wachstum: Alle Pilze durchwachsen das Filtrierpapier und breiten sich im darunterliegenden Agar aus: Die *Mortierella*-Arten weiter als auf dem Filtrierpapier zu erkennen ist, die *Aspergillus*-Arten gleich weit. Keiner der getesteten Pilze durchbohrt das Zellophan völlig und gelangt direkt zum Agar.

Wachstum (Durchmesser und Sporulation):

auf	<i>Mort. ram.</i>	<i>Mort. vinac.</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. repens</i>
Zellophan	5 cm reich. spor.	3,5—4 cm sporul. auf 1,5 cm	?, dichter als auf blossem Agar	1,5 cm, auf blossem Agar gleich
Filtrierpap. Oberfl.	1—2 cm	ca 1 cm	6—7 cm, locker	1,5 cm, locker
Agar unter FP.	3—4 cm	3,5—4 cm	6—7 cm	1,5 cm

Lediglich bei dem verwendeten *Aspergillus niger*-Stamm liess sich subjektiv eine Herabsetzung der Reissfestigkeit des trockenen Filtrierpapiers erkennen.

B) Zellophanabbau: Bei *Asp. niger* lässt sich schon nach 9 Tagen durch die Ritzprobe eine Erweichung des Zellophans erkennen. Submersappressorien sind noch nicht mit Sicherheit feststellbar. Nach 14 Tagen sind diese zahlreich zu sehen (Fig. 6), besonders in der Mitte der Kolonie, aber nicht regelmässig verteilt; sie zeigen eine grosse Ausdehnung. Bei kräftiger Behandlung werden sie mitsamt der obersten Zellophanschicht weggewischt. An anderen Stellen sind undeutliche Abdrücke des Hyphennetzwerkes zu beobachten. Die Ritzprobe zeigt, dass das Zellophan angegriffen ist.

Bei *Asp. repens* sind Submersappressorien (Fig. 7) nach 14 Tagen viel spärlicher zu beobachten, nur manchmal in der Kulturmitte vorhanden und viel weniger ausgedehnt. Ihre Äste sind etwa doppelt so breit wie bei *Asp. niger*. Die beiden Abbildungen zeigen Extremfälle dieser Unterschiede. Leichte Abdrücke des Hyphennetzes sind manchmal sichtbar. Die Ritzprobe zeigt schwächere Zersetzung als bei *Asp. niger*. Bei beiden Arten ist die Reissfestigkeit des Zellophans merklich herabgesetzt.

Bei *Mortierella ramanniana* lässt sich das Myzel wegwischen, ohne die leiseste Spur zu hinterlassen. Die Ritzprobe zeigt keinen deutlichen Abbau. Das gleiche gilt für *Mort. vinacea*, nur dass sich hier in der Koloniemitte nach kräftiger Pinselung die oberste Zellophanschicht in schmalen, parallel gerichteten Streifen ablöst. Die Ritzprobe zeigt schwache Zersetzung an.

Auswertung: Der verwendete *Aspergillus niger*-Stamm dürfte zu den echten Zellulolyten gehören. Dass jedoch auch *Asp. repens*, der mit seiner ganzen Verwandtschaft nach Reese und Downing als Nichtzellulolyt gilt, auf Zellophan Submersappressorien bilden kann, beweist, dass auch die Zellophanstreifenmethode zellulolytische Pilze im weiteren Sinne erfasst. Nach dem Fermentschema von Reese et al. kann wohl auch Zellophan von  $C_x$  allein abgebaut werden (was im Falle der beiden *Mortierella*-Arten noch durch genauere Methoden zu beweisen wäre).

#### Methodischer Gewinn.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen drei Vorteile auf: Die Methode der Zellophanstreifen hat sich zur Isolierung von zellulolytischen Bodenpilzen gut bewährt; sie stellt auch eine wertvolle Hilfe dar zur Isolierung sonst meist verborgen bleibender steriler Formen, die wohl im Boden eine beachtliche Rolle spielen. Nährlösung mit CMC ist für orientierende Serientests auf Zellulolyse geeignet, wobei es auf verschiedene fördernde Zusätze ankommt. Beide Methoden erfassen aber mehr als die eigentlichen zellulolytischen

Pilze ss. str. Auf CMC-Agar lassen sich etliche sonst steril bleibende Formen zum Fruktifizieren bringen und bestimmen.

Für Anregungen, Verbesserungen und Ergänzungen bei der Ausarbeitung des Manuskriptes bin ich den Herren Dr. K. Domsch, Kiel, Dr. H. T. Tribe, Cambridge und Dr. R. Moreau, Besançon, herzlichst dankbar.

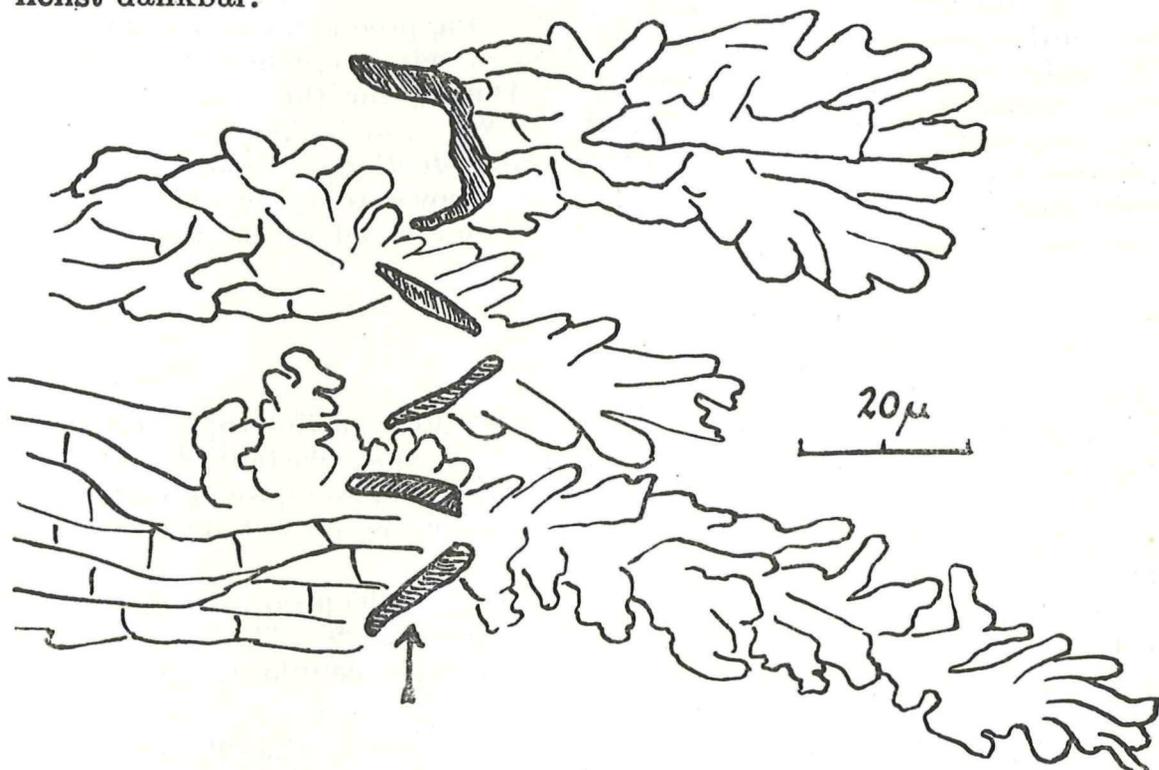


Fig. 7: Dasselbe von *Aspergillus repens*. Der Pfeil unten zeigt Spuren und Richtung der weggewischten Haupthyphe an, von der aus die Appressorien eingesenkt sind.

### Summary

Experiments, both with the previously published method of cellophane strips for the isolation of cellulolytic soil fungi, and with Carboxymethyl-cellulose (CMC) as a nutrient medium, are described.

A. with cellophane strips: 1. Different forms of "rooting branches" (Tribe) are described. They are formed in cellophane buried in the soil as well as in cellophane laid upon the agar medium, and facilitate the microscopic observation of cellulolysis. 2. Observation by the polarization microscope showed that the parallel orientation of the cellulose fibrils. 3. Double or triple cellophane layers may facilitate the isolation of cellulolytic fungi with rooting branches, as recommended by Tribe. 4. Several cellulolytic fungi were isolated with the method from some wooden boxes in which flowers were grown, and from a forest soil, a great deal of which remained sterile.

B. Experiences with CMC: The value of the used CMC-products and the composition of the medium are discussed. The decomposition of CMC is observed by Cl-Zn I-reaction. Of the isolated fungi the well known cellulolytic ones show strong decomposition of CMC, but not all of the

sterile forms. The results have been improved by addition of yeast extract and trace elements to the nutrient solution and might be further improved by other growth factors or small amounts of sugars. — Growth of a fungus on CMC-Agar is no proof of cellulolytic activity, but this medium is of great value in stimulating the sporulation of several otherwise sterile forms.

C. Enzymological part: In a short review of the literature it is pointed out that the CMC method may only indicate the production of the enzyme  $C_x$  splitting the  $\beta$  1—4 glucosidic linkages of cellulose, whilst the proper cellulolytic fungi need also another enzyme  $C_1$  for the first attack of native crystalline cellulose. In experiments with fungi which produce only the enzyme  $C_x$  (*Aspergillus repens*, *A. niger*, *Mortierella ramanniana* and *M. vinacea*) grown upon cellophane it is shown that they utilize this cellulose form readily. This suggests that also the cellophane methods are only indicative for  $C_x$  production.

#### L i t e r a t u r.

- Augier, J. et R. Moreau, 1960: La Microflore amylolytique des sols. Méthode d'étude et interprétation. Ann. Inst. Pasteur. Im Druck.
- Cooke, Wm. Br. & Busch, K. A. 1957: Activity of cellulose decomposing fungi isolated from sewage-polluted water. Sewage & Indust. Wastes, **29**, 210—217.
- Domsch, K. 1960: Das Pilzspektrum einer Bodenprobe. II. Nachweis physiologischer Merkmale. Arch. Mikrob. **35**, 229—247.
- Fåhræus, G. 1946: Enzyme preparations from cellulose decomposing bacteria. Experientia, **2**, 413—415.
- 1947: Studies on the cellulose decomposition by *Cytophaga*. Symb. Bot. Upsal. **IX**, 2: 1—128.
- Gams, W. 1959: Isolierung von Hyphen aus dem Boden. Sydowia **13**, 87—94.
- 1960: Winterliches Pilzwachstum im Boden. Sydowia **14**.
- Hots on, J. W. 1917: Notes on bulbiferous fungi with a key to described species. Bot. Gaz. **64**, 265—284.
- Imschenetzky, A. A. 1959: Mikrobiologie der Zellulose. Akademie-Verlag.
- Jefferys, E. G., Brian, P. W., Hemming, H. G., and Lowe, D. 1953: Antibiotic production by the microfungi of acid heath soils. J. Gen. Microb. **9**, 314—341.
- Kühlwein, H. und E. Gallwitz, 1959: Untersuchungen über den Celluloseabbau durch Myxobakterien. Arch. Mikrob. **34**, 58—64.
- Kuzniar, K. 1950: Nowe metody okreslania aktywnosci gleby lesnej (New methods of determining a forest soil's activity). Sylwan, **XCIV** (IV), 3. Warschau.
- Levinson, H. S., Mandels, G. R. & Reese, E. T. 1951: Products of enzymatic hydrolysis of cellulose. Arch. Biochem. and Biophys. **31**, 351—365.
- & Reese, E. T. 1950: Enzymatic hydrolysis of soluble cellulose derivatives as measured by changes in viscosity. J. Gen. Physiol. **33**, 601.
- Lyr, H. 1959: Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. II. Mitt.: Zellulose als C-Quelle. Arch. Mikrob. **34**, 189—203.

- Norkrans, B. 1950: Studies on growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*, with special reference to mycorrhiza formation. *Symb. Bot. Upsal.* 11, 1—126.
- and B. Rånby, 1956: Studies of the enzymatic degradation of cellulose. *Physiol. Plant.* 9, 198—211.
- Reese, E. T. and Downing, M. G. 1951: Activity of the *Aspergilli* on Cellulose, Cellulose Derivates, and Wool. *Mycologia*, 43, 16—28.
- and H. S. Levinson, 1952: A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. *Physiol. Plant.* 5, 345—366.
- , Levinson, H. S., Downing, M. H., White, W. L. 1950: The Quartermaster culture collection. *Farlowia* 4, 45—86.
- , Siu, R. G. H. and H. S. Levinson 1950: The biological degradation of soluble cellulose derivates and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bact.* 59 (4), 485—497.
- Siu, R. G. H. 1951: Microbial decomposition of cellulose. New York, Reinhold Publishing Corp.
- Sørensen, H. 1957: Microbial decomposition of Xylan. *Acta agric. Scand. Suppl.* 1, 1—86.
- Stanier, R. Y. 1942: A note on elasticotaxis in *Myxobacteria*. *J. Bact.* 44, 405—412.
- Staudinger, H. und Feuerstein, K. 1936: Über hochpolymere Verbindungen. 147. Mitt. Über den Polymerisationsgrad natürlicher und technischer Cellulosen. *Liebigs Ann. Chemie*, 526, 72—102.
- Talboys, P. W. 1958: Degradation of cellulose by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 41, 242—248.
- Traaen, A. E. 1914: Untersuchungen über Bodenpilze aus Norwegen. *Nytt Magazin f. Naturvitenskaberne*, 52, 19—121.
- Tribe, H. T. 1957: Ecology of Microorganisms in soil as observed during their development upon buried cellulose film. In: *Microbial Ecology*, Cambridge 1957.
- 1960: Decomposition of dried Cellulose film, with special reference to the ecology of certain Soil Fungi. *Symb. Ecol. of Soil Fungi*, Liverpool, Univ. Press. 246—256.
- White, W. L., Darby, R. T., Stechert, G. M. and Sanderson, K. 1948: Assay of cellulolytic activity of molds isolated from fabrics and related items exposed in the Tropics. *Mycologia* 40, 34—84.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sydowia](#)

Jahr/Year: 1960

Band/Volume: [14](#)

Autor(en)/Author(s): Gams Walter

Artikel/Article: [Studium zellulolytischer Bodenpilze mit Hilfe der Zellophanstreifen-Methode und mit Carboxymethyl-Zellulose. 295-307](#)