

Die spezifische Beeinflussung zellulolytischer Prozesse durch das Herbizid 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure

Autor(en): **Ellgehausen, Holm**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **80 (1970)**

PDF erstellt am: **22.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-56314>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Die spezifische Beeinflussung zellulolytischer Prozesse durch das Herbizid 2,4-Dichlor-phenoxybuttersäure

Von Holm Ellgehausen

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Manuskript eingegangen am 8. Mai 1970

Inhalt

Einleitung. – Methode. – Vorversuche. – Hauptuntersuchungen. Zellulaseaktivität von *Aspergillus terreus*. Einfluss von Hemmstoffen auf Zellulaseaktivität und Wachstum. – Diskussion. – Zusammenfassung. – Literatur.

Einleitung

Wir haben heute von den verschiedensten zellulolytischen Prozessen Kenntnis: Sie können sowohl in der lebenden Pflanze ablaufen als auch an zellulosehaltigen Materialien (Mandels, 1963; Fan et al., 1967, oder Siu, 1951). Leider sind die Ansichten über den fermentativen Abbau noch nicht einheitlich, indem einige Forscher (Siu, 1951; Reese, 1952; Selby, 1963 u. a.) der Multienzymtheorie, andere (Whitaker, 1953; Thomas und Whitaker, 1958; van Haga, 1958; G. Pettersson, 1968, und Eriksson und B. Pettersson, 1968) der Unienzymtheorie den Vorrang geben. Ebenso ist man sich über die Art und Weise, wie die Zellulose abgebaut wird, noch nicht klar (Nisizawa, 1963, oder King, 1963). Seit den Arbeiten von Pettersson und Eaker (1968) kennt man die Aminosäurezusammensetzung des Zellulasetyps, der bei *Penicillium notatum* vorkommt. Aufgrund dieser Kenntnisse und durch Sedimentationsuntersuchungen in der Ultrazentrifuge wurde ein Molekulargewicht von 34 500 bestimmt, ein Ergebnis, das nicht unerheblich von früheren Angaben (Whitaker, 1963) für die Zellulase von *Myrothecium verrucaria* abweicht. Es soll sich bei der *Penicillium*-Zellulase um eine durch eine Disulfidbrücke verbundene Polypeptidkette handeln, die nach Eriksson und G. Pettersson (1968) einen α -Helixanteil von 20–30% aufweist.

Über die Bildungswege dieser Enzyme kann man kaum etwas aussagen. Um Klarheit zu gewinnen, sind geeignete Inhibitoren der Synthesewege unerlässlich. Man muss also wissen, welches Enzymsystem gehemmt wird und wo diese Hemmung stattfindet.

Die meisten Hemmversuche wurden bisher an Enzympräparationen durchgeführt, um mehr über den Aufbau und den Funktionsmechanismus zellulolytischer Fermente zu erfahren (z. B. Mandels und Reese, 1963, oder Eriksson und G. Pettersson, 1968). Die Enzymbildungswege kann man nur klären, wenn man in vivo experimentiert und dann den Angriffsort lokalisiert. Dieser Frage ist bisher noch wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden. Meistens wurde nur mit löslichen Zellulosen gearbeitet, deren Handhabung wesentlich einfacher ist als die der wasserunlöslichen. Es liegen jedoch auch hier keine Ergebnisse vor, die auf eine spezifische Hemmung der Fermentbildung schliessen lassen.

In meiner Arbeit habe ich mich hauptsächlich mit der Wirkung von Hemmstoffen auf den Abbau verschiedener Zellulosen befasst. Mir lag besonders daran, nach Auffinden eines geeigneten Inhibitors den Ort der Hemmung zu lokalisieren und seine Wirkung bei Verwendung wasserlöslicher beziehungsweise wasserunlöslicher Zellulosen zu vergleichen.

Methoden

Versuchsobjekt

Durch Voruntersuchungen auf Papier- und Wattestreifen in Kulturröhrchen mit rein mineralischer Nährlösung wurde eine Reihe von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten auf ihre zellulolytische Aktivität geprüft. Dabei griff *Aspergillus terreus* Thom 1960 die verwendeten Substrate am stärksten an, deshalb wurde dieser Organismus für die weiteren Versuche ausgewählt.

Nährlösung

Als günstig erwies sich eine mineralische Nährlösung mit folgender Zusammensetzung:
 NH_4NO_3 : 2,0 g. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,7 g. KH_2PO_4 : 1,6 g. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,08 g. A-Z-Lösung (nach Hoagland) 1,0 ml. Aqua dem. ad 1000 ml.

Es wurde Ionenaustauscherwasser mit einem spezifischen Widerstand von $10^7 \Omega$ verwendet.

Die Zusammensetzung der Nährlösung wurde so gewählt, dass sich ein pH-Anfangswert von 5 ergab, ein Wert, der sich als optimal für die zellulolytische Aktivität bei den verschiedensten Organismen bzw. Enzympräparationen erwiesen hat (z.B. Hanstein, 1960; Mandels und Reese, 1963; Halliwell, 1963). Auf eine stärkere Pufferung musste verzichtet werden, da für diesen pH-Bereich alle Puffer ausser dem Phosphatpuffer organischer Natur sind und folglich vom Pilz als zusätzliche C-Quelle verwendet werden könnten. Diese geringere Pufferkapazität hat sich kaum störend bemerkbar gemacht; das pH blieb während der Versuche in den Grenzen zwischen 3 und 5 und hielt sich somit durchaus innerhalb des optimalen Bereiches.

Kohlenstoffquellen

Die hier getroffene Auswahl von Kohlenstoffquellen lässt sich in drei Gruppen zusammenfassen. In der ersten befinden sich die wasserunlöslichen Zellulosen mit mehr oder weniger nativem Charakter, der zweiten gehören die substituierten, löslichen Zellulosen an, während sich in der dritten Gruppe die Mono- bzw. Disaccharide befinden.

- I. a) *Rundfilter* (Fa. Schleicher und Schüll, Nr. 589², Aschengewicht 50 γ und \varnothing 9 cm) wurden ohne weitere Behandlung als Substrat verwendet.
- b) *Watte* (hydrophile Verbandswatte) wurde nochmals mit einem Äther-Alkohol-Gemisch (1:1) entfettet, in Ionenaustauscherwasser gewaschen und anschliessend getrocknet.
- c) *Baumwolle* (Rohlinters «Sidney», vgl. auch Hanstein, 1960) ist durch Behandlung mit H_2O_2 (3%) + NH_3 (2-3%) (Fuchs, 1926) von Lignin gereinigt worden. Anschliessend wurde gründlich gewaschen, entfettet und getrocknet.
- d) *Weisses Löschpapier* («Sihl-Blotting», Fabrikat der Papierfabrik Sihl in Zürich) wurde nach kurzem Aufkochen in dest. Wasser mit einem Äther-Alkohol-Gemisch entfettet und getrocknet.
- II. *Carboxymethylzellulose* (CMC 70, mittelviskös, 100% rein, ein Produkt der Hercules Powder Company) konnte ohne Weiterbehandlung verwendet werden.
- III. a) *Cellobiose*
- b) *Glukose*

Pilzaufzucht

Die Stammkulturen wurden im Kühlraum bei 12 °C auf Bierwürze-Schrägagarröhrchen aufgezogen, Vor- und Versuchskulturen im dunklen Thermostaten bei 30 ± 1 °C als Standkulturen gehalten.

Ausführung der Versuche

Vorkultur

Von den Stammkulturen wurde auf die Vorkulturgefäße überimpft. (Alle Prozesse sind in der Impfkammer unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt worden.) Als Vorkulturgefäße wurden 100-ml-Erlenmeyerkolben benutzt, in deren Hals mittels Watte eine weitlumige Pipette eingelassen war. Kultiviert wurde auf «Sihl-Blotting»-Papier, welches aufrecht in die mineralische Nährlösung gestellt wurde. Die Nährlösungsmenge betrug 35 ml.

Nach 14tägiger Vorkultur kamen 10 ml einer 1:100 verdünnten Tween-80-Lösung hinzu, und alles wurde kräftig durchmischt. Der erhaltene Papier-Myzel-Brei wurde nun durch Watte filtriert. Dadurch erhielt ich eine von Myzel- und Papierresten freie Sporensuspension.

Durch diese Vorkultur war ein gleichmässiges Ausgangsmaterial erreicht, das zudem noch eine gewisse enzymatische Adaption erfahren hatte.

Versuchskulturen

Die *Grosskulturen*, die quantitativen Untersuchungen dienten, sind in 500-ml-Fernbachkolben mit 150 ml mineralischer Nährlösung durchgeführt worden. Die C-Quellen richteten sich nach den jeweiligen Versuchserfordernissen. Pro Bedingung verwendete ich – wenn nicht anders angegeben – 5 Kolben. Diese Anzahl war völlig ausreichend, weil die Streuung relativ gering war (10%). Von der Sporensuspension wurden je Kolben 6 Tropfen überimpft.

Hängetröpfchenkulturen erfuhren die gleiche Behandlung wie die Grosskulturen. Als C-Quellen dienten hier jeweils 5–8 100 μ lange Faserstücke der jeweiligen Zellulosesorte. Von der Sporensuspension wurde 1 Tropfen in 25 ml Nährlösung gegeben und von dieser dann jeweils 1 Tropfen unter ein steriles Deckglas gebracht, welches man vorsichtig auf einem Hohlschliffobjektträger aufsetzte. Zum Abdichten diente ein Vaseline-Paraffin-Ring zwischen Deckglas und Objektträger.

Vorversuche für die Pilzauswahl habe ich in Kulturröhrchen mit 5 ml mineralischer Nährlösung durchgeführt und als C-Quellen Watte oder Löschpapierstreifen (13mal 3 cm) dazugegeben. Überimpft wurde hier direkt von den Stammkulturen.

Bei allen Versuchen dienten Kulturen ohne C-Quelle und solche, die nur 0,45% Glukose enthielten, als Kontrollen.

Kulturgefäße und Inhalt wurden jeweils vor Versuchsbeginn und zum Versuchsabbruch im Autoklav $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 1 Atü sterilisiert.

Messung der zellulolytischen Aktivität

Wasserlösliche Zellulosen

Die gebräuchlichsten Methoden, die Aktivität gegenüber diesen Substraten zu messen, basieren auf Viskositätsmessungen bzw. auf der Bestimmung reduzierender Gruppen. Über den gesamten Grad des Abbaus geben diese Methoden keine genaue Auskunft.

Wasserunlösliche Zellulosen

Hier haben wir generell drei Möglichkeiten, die Zellulaseaktivität zu messen:

1. Chemische Bestimmung der Abbauprodukte.
2. Physikalische Messungen (Reissfestigkeit und Viskosität).
3. Gravimetrische Bestimmung des Gewichtsverlustes der vorgegebenen Zellulose.

Für die chemischen Bestimmungen gelten dieselben Bedenken wie oben bei den wasserlöslichen Zellulosen, weil nicht alle Abbauprodukte erfassbar sind. Dann entzieht sich noch ein grosser Teil des Abbaus dadurch der Bestimmung, dass viele Abbauprodukte im Energiehaushalt der Zelle umgesetzt werden. Da bei Verwendung wasserunlöslicher Zellulosen das Myzel meistens nicht mehr gut genug vom Substrat getrennt und quantitativ bestimmt werden kann, ergeben sich notgedrungen Ungenauigkeiten bei der Abbaubestimmung.

Die zweite Gruppe der Bestimmungsmethoden gibt ebenfalls keine genaue Auskunft.

So bleibt eigentlich nur die dritte Methode, die immer dann den anderen beiden überlegen ist, wenn man Pilz und Substrat quantitativ voneinander trennen kann. Die Praktik, durch Auswaschen des Organismus zum Ziel zu gelangen, wird diesem Ziel jedoch nicht gerecht, weil einmal Substratverluste auftreten und zum anderen ein Teil Myzel im Substrat verbleibt.

Da nun aber Substrat und Pilz chemisch ganz verschiedener Natur sind, sollte eine chemische, analytische Trennung möglich sein.

Hier bietet sich der Stickstoffgehalt des Pilzmyzels (Chitin) geradezu an, wenn er folgende Bedingungen erfüllt:

1. Unter Normalbedingungen (ohne Hemmstoffe), muss eine Proportion zwischen Myzelgewicht und Stickstoffgehalt bestehen.
2. Diese Proportionalität muss in den verschiedenen Wachstumsphasen erhalten bleiben.
3. Sie darf nicht vom verwendeten Substrat (C-Quellen) abhängen.
4. Bei Verwendung von Hemmstoffen müssen entweder die drei ersten Bedingungen erhalten bleiben oder die Veränderungen auf verschiedenen C-Quellen prozentual gleich sein, das heisst, sie dürfen nur vom Hemmstoff, aber nicht vom Substrat abhängen.

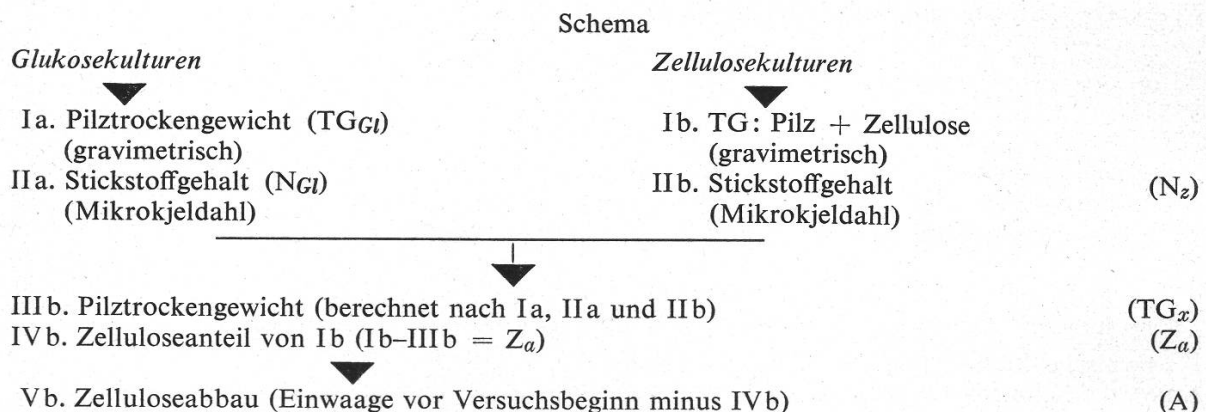
Diese Forderungen konnten erfüllt werden (vgl. S.410–411). Deshalb kann gesagt werden: Der Stickstoffgehalt des Pilzmyzels (bezogen auf das Trockengewicht) ist bei Glukose- und Zellulosekulturen gleich.

Damit kann man jederzeit das Trockengewicht des Pilzes auf irgendeiner wasserunlöslichen Zellulose ausrechnen, wenn man vorher den Stickstoffanteil analysiert hat (Mikrokjeldahl nach Parnas und Wagner, 1938). Man braucht dann nur diesen Stickstoffgehalt (N_z) in Beziehung zu dem von Glukosekulturen gleicher Bedingung (N_{Gl}) zu setzen, um über das Myzeltrockengewicht (TG_{Gl}), das bei Glukosekulturen leicht bestimmbar ist, das gesuchte Pilztrockengewicht der Zellulosekulturen zu erhalten (TG_x).

Das ergibt dann folgende Proportion:

$$\frac{N_z}{TG_x} = \frac{N_{Gl}}{TG_{Gl}}$$

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Stickstoffgehalt zu Pilztrockengewicht wurde der Pilz auf 0,45 % Glukose kultiviert, und zwar unter denselben Bedingungen wie auf Zellulose. Bei Versuchsabbruch sind diese Kulturen auf aschefreie, gewogene Rundfilter abgenutscht, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und dann bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden. Nach Bestimmung des Trockengewichts wurde der Stickstoffgehalt analysiert. Genauso wurde mit den Zellulosekulturen verfahren und wie oben angegeben das Myzelgewicht bestimmt. Der Abbau, als Mass der zellulolytischen Aktivität, ergab sich als Differenz aus eingewogener Zellulose und Pilztrockengewicht.



Zum Beweis der eingangs dieses Abschnitts aufgestellten Behauptung möchte ich die Teilergebnisse zweier Versuche betrachten.

In einer zeitlichen Untersuchung der Zellulaseaktivität wurde der Stickstoffgehalt (in % zum Trockengewicht) von Glukose- und Zellulosekulturen verglichen (Tab. 1). Hier habe ich vorsichtig den über dem Rundfilter stehenden Myzelanteil abdekantiert und separat analysiert. Es liess sich natürlich nicht vermeiden, dass geringe Papierreste verschleppt wurden. Der Vergleich dieses Stickstoffgehaltes, bezogen auf das Trockengewicht, ergab dieselben prozentualen Anteile, wie sie bei den auf Glukose gezogenen Kulturen gefunden worden sind (keine signifikanten Unterschiede). Weiter zeigte sich, wie man der Tabelle entnehmen kann, ein konstanter Stickstoffgehalt während der verschiedenen Wachstumsphasen. Diese Konstanz lässt sich bis zum 6. Tag (einschliesslich) verfolgen. Es soll noch darauf aufmerksam gemacht werden, dass sich die Kulturen auf Glukose und die auf Papier in völlig verschiedenen Wachstumsphasen befanden und trotzdem in ihrer prozentualen Stickstoffzu-

Tabelle 1

Aspergillus terreus: Zeitliche Untersuchung des Zelluloseabbaus (aschefreie Rundfilter). Prozentualer Stickstoffgehalt des Pilzes bei 0,3 % Glukose oder Papier als C-Quelle. % N_K : Prozentualer Stickstoffgehalt der Glukosekontrollen. % N_P : Prozentualer Stickstoffgehalt des freien Myzels der Papierversuche. ΔN : Fehler der mittelbaren Grössen

Tage	% N_K	$\pm \Delta N$	% N_P	$\pm \Delta N$
21	4,5	0,2	5,0	0,6
28	4,7	0,5	4,9	0,5
33	4,5	0,4	4,1	0,4

sammensetzung übereinstimmten. Später, bei der Besprechung des ganzen Versuches, wird auf diesen Sachverhalt noch einmal eingegangen werden.

Eine andere Frage ergab sich bei der Verwendung von Hemmstoffen. Auch hier war der Stickstoffgehalt, trotz Hemmstoff und verschiedenen Wachstumsphasen, zwar nicht konstant, aber zu gleichen Zeiten bzw. Hemmstoffkonzentrationen, bei Verwendung verschiedener Substrate, gleich. Dieser Beweis soll hier indirekt geführt werden, durch Vergleich der Hemmung des Papierabbaus, die auf zwei verschiedenen Wegen berechnet wurde. Dazu sollen Ergebnisse eines Zeitversuchs mit dem Hemmstoff 2,4-DB herangezogen werden (Tab. 2).

Tabelle 2

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DB (18 ppm) auf den Zelluloseabbau (aschefreie Rundfilter). IA+: Abbauehemmung, berechnet aus der Differenz von Substrat-Einwaage und dem Gewicht des Substratpilzgemisches nach Versuchsende. IA-: Abbauehemmung, errechnet nach der Stickstoffbestimmungsmethode (vgl. Schema)

	6 Tage	9 Tage	12 Tage	16 Tage	20 Tage
IA + %	71 \pm 2,5	70 \pm 2,7	63 \pm 3,5	55 \pm 4,4	56 \pm 3,0
IA - %	80 \pm 6,5	73 \pm 3,5	60 \pm 3,6	54 \pm 2,7	56 \pm 2,5

Einmal ist der Abbau durch Wägung des Substrat-Pilz-Gemisches (Schritt Ib im Schema) und anschliessende Differenzbildung mit der Substrateinwaage bestimmt worden (IA+). Bezogen wurde auf die unbehandelten Kontrollen, deren Abbau auf demselben Wege berechnet worden ist. Im anderen Fall wurde die Hemmung nach dem angegebenen Schema (Schritt Ia-Vb) gewonnen (IA-).

Das Plus- bzw. Minuszeichen bei den Symbolen soll in dem einen Fall auf die Anwesenheit bzw. die Abwesenheit des Pilzes bei der Gewinnung der zellulolytischen Hemmwerte hinweisen.

Die Tabelle zeigt nun eindeutig, dass diese auf verschiedenen Wegen gewonnenen Werte gleich sind. Daraus kann man entnehmen, dass die Beeinflussung des Stickstoffgehaltes durch den Hemmstoff substratunabhängig ist. Dieser Sachverhalt hat sich auch für andere Inhibitoren und Substrate herausgestellt.

Stickstoffbestimmung

Der Stickstoffgehalt wurde mit der Mikrojeldahlmethode nach Parnas und Wagner (Parnas, 1938) bestimmt. Der Prozessgang war derselbe, wie er von Müller (1963), Schulke (1970) beschrieben wurde. Als Indikator bei der Titration der Salzsäurevorlage habe ich eine Variante mit folgender Zusammensetzung benutzt:

40 mg Methylrot
10 mg Methylenblau
gelöst in 50 ml Alkohol (95 %).

Fehlerrechnung und Statistik

Der Auswertung der Ergebnisse und Fehlerberechnung liegt die Gauss'sche Fehlertheorie zugrunde. Viele Mittelwerte wurden mittelbar berechnet.

Wenn aber das Versuchsergebnis «F» eine Funktion einer oder mehrerer Variablen also

$$F = F(X_1, X_2 \dots X_n),$$

dann bestimmte sich der Fehler dieser Funktion zu

$$\Delta F = \pm \sqrt{\sum_{n=1}^n \left(\frac{\delta F}{\delta X_i} \times \Delta X_i \right)^2}$$

\overline{TG}_{Gl}

Handelte es sich um unabhängig gewonnene Werte, so ist die Streuung des Mittelwertes zu

$$\overline{S} = \pm \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

berechnet worden.

\overline{TG}_x

Das Pilztrockengewicht der Zellulosekulturen berechnete sich aus der Proportion

$$\overline{TG}_x = \frac{\overline{TG}_{Gl}}{\overline{N}_{Gl}} \times \overline{N}_z$$

und der Fehler ergab sich durch partielles Differenzieren dieser Funktion

$$\overline{\Delta TG}_x = \pm \sqrt{\left(\frac{\overline{TG}_{Gl}}{\overline{N}_{Gl}} \right)^2 \times (\Delta \overline{N}_z)^2 + \left(\frac{\overline{N}_z}{\overline{N}_{Gl}} \right)^2 \times (\Delta \overline{TG}_{Gl})^2 + \left(\frac{\overline{N}_z \cdot \overline{TG}_{Gl}}{(\overline{N}_{Gl})^2} \right)^2 \cdot (\Delta \overline{N}_{Gl})^2}$$

Verhältnisse:

Mussten Verhältnisse gebildet werden, so wurde folgender Ansatz gemacht und ebenfalls differenziert:

$$V = \frac{m_1}{m_2} \cdot F \quad \longrightarrow \quad \overline{\Delta V} = \pm \sqrt{\left(\frac{\delta V}{\delta m_1} \times \Delta m_1 \right)^2 + \left(\frac{\delta V}{\delta m_2} \times \Delta m_2 \right)^2}$$

Hierbei sollen m_1 und m_2 die zu vergleichenden Mittelwerte sein. «F» bedeutet in diesem Fall einen Faktor.

$$\longrightarrow \quad \overline{\Delta V} = \pm \sqrt{\left(\frac{F}{m_2} \times \Delta m_1 \right)^2 + \left(\frac{m_1 \cdot F}{m_2^2} \times \Delta m_2 \right)^2}$$

Die Fehler der Hemmwerte sind nach derselben Formel bestimmt worden, nur hatte «F» den bestimmten Wert von 100.

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem t-Test durch Vergleich der Mittelwerte (Fisher, 1946; Lindner, 1951, und Haseloff, 1965). Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit P von 1 % wurden als signifikant angesehen und auch nur solche in der Arbeit diskutiert.

Die Striche an den Kurvenpunkten geben die Streuung an. Wo keine Striche an den Symbolen vorkommen, lag der Fehler unterhalb der Grösse des Kurvenpunktes. Dieselbe Bedeutung kommt auch den Strichen an den Blockdiagrammen zu.

Genauigkeit der Methode

Im Grunde kamen für den methodischen Fehler nur zwei apparative Fehlerquellen in Betracht.

Der Wägefehler

Er hielt sich als Summe der Fehler, die beim Trocknen, Abkühlen (über Nacht im Exsikkator) und beim Wägevorgang selbst entstanden, in den Schranken von 1–2 mg.

Fehler bei der N-Bestimmung

Da sich die Stickstoffbestimmung im wesentlichen aus den vier Schritten: Veraschen, Verdünnen, Destillation und Titration, zusammensetzt, stellen diese auch die methodischen Fehlerquellen dar.

Die Streuung des mittleren Stickstoffgehaltes lässt sich somit in einen apparativen und einen biologischen Anteil aufspalten.

$$N_{\text{Gesamt}} = N_{\text{Biol.}} + N_{\text{App.}}$$

Bei der Fehlerberechnung wurde immer der Gesamtfehler betrachtet. In der Regel lagen die analysierten Stickstoffmengen zwischen 0,5 und 0,1 mg. Hierfür ist ein maximaler, apparativer Fehler von 1,8 % ermittelt worden. Müller (1963) gibt für die gleichen Apparaturen einen Fehler von 1 % an. Er verwendete aber auch viel höhere Stickstoffmengen.

Vorversuche

Teste der zellulolytischen Aktivität verschiedener Pilze

Über die zellulolytisch aktiven Organismen existiert heute schon ein ganzer Katalog (Siu, 1951; u. a.). Auch die von mir untersuchten Pilze sind keine Unbekannten mehr (Schaefer, 1957).

Nun herrscht aber hinsichtlich der Substrate eine enorme Heterogenität, so dass es unerlässlich ist, die eigene Auswahl auf die Aktivität gegenüber den eigenen Substraten zu prüfen. Eine Standardisierung der Zellulose Typen würde eine wesentliche Hilfe aus zwei verschiedenen Gründen bedeuten. Zum einen wäre die Auswahl geeigneter Versuchsorganismen mit weniger Zeitaufwand belastet, und zum anderen gäbe es keine Missverständnisse hinsichtlich der untersuchten oder gefundenen Fermente.

Die Benennung der Zellulasen nach den verwendeten Substraten macht die ganze Sache unübersichtlich. Um nicht noch mehr Unklarheit in die Nomenklatur dieser Enzyme zu bringen, möchte ich mich in meiner Arbeit dem Vorschlag von Halliwell (1963) anschliessen und Fermente, die unlösliche Zellulose Typen angreifen, mit dem Ausdruck «Zellulasen» belegen und solche, die lösliche Zellulosen abbauen, 1:4- β -Polyglukosidasen nennen.

In den Vorversuchen wollte ich innerhalb meiner Pilzauswahl Klarheit über die Organismen haben, die sowohl Papier (Sihl-Blotting), einen stärker behandelten Zellulose Typ, wie auch Watte, mit weitgehend nativem Charakter, im gleichen Masse angreifen.

Die Einteilung der Organismen erfolgte in Klassen, wobei mit 3 die stärkste, mit 1 schwache und mit 0 fehlende Aktivität bezeichnet wurde. Als Mass für die Aktivität galten sowohl Wachstum als auch der visuell sichtbare Abbau (Tab. 3).

Tabelle 3

Zellulaseteste an Arten von *Aspergillus* und *Penicillium*
 Versuchsdauer 21 Tage. C-Quellen: Papier- und Wattestreifen. Temperaturbedingungen: *Aspergillus*-Arten (A) bei 30 °C, *Penicillium*-Arten (P) bei 25 °C

Substrat: «Sihl-Blotting»		Substrat: Watte	
Organismus	Klasse	Organismus	Klasse
<i>A. flavus</i> Link	2	<i>A. flavus</i> Link	0
<i>A. fumigatus</i> Fres.	2	<i>A. fumigatus</i> Fres.	1
<i>A. giganteus</i> Wehmer	1		
<i>A. niger</i> v. Tieghem A ₂	2	<i>A. niger</i> v. Tieghem A ₂	1
<i>A. niger</i> v. Tieghem A ₇	2		
<i>A. terreus</i> Thom 1960	3	<i>A. terreus</i> Thom 1960	3
<i>P. chrysogenum</i> Thom	0		
<i>P. citrinum</i> Thom 806	2	<i>P. citrinum</i> Thom 806	1
<i>P. patulum</i> Bainier NCTC	1	<i>P. patulum</i> Bainier NCTC	0
<i>P. patulum</i> Bainier P 189	1		

Der Tabelle kann man entnehmen, dass bei Verwendung von Watte das Wachstum bzw. die Fähigkeit, diese C-Quelle abzubauen, teilweise rapide nachlässt. *Aspergillus terreus* war sowohl im Wachstum als auch beim Abbau beider C-Quellen am aktivsten.

Die Klassifizierung der *Aspergillus*-Arten deckt sich weitgehend mit der von Schaefer (1957), bei den betrachteten *Penicillien* konnte ich keinerlei Übereinstimmung feststellen. (Schaefer kultivierte auf Filtrierpapierstreifen und stellte eine weit höhere Aktivität fest.)

Da nun Watte schon eine relativ natürliche Zelluloseform darstellt und eine weitgehende Übereinstimmung des Wachstums und Abbaus auf Watte und Löschpapier für *Aspergillus terreus* zu erkennen war, muss dieser Organismus ein Fermentsystem besitzen, das den anderen Pilzen weitgehend fehlt oder nur schwach ausgeprägt ist.

Für die quantitativen Versuche wurde auf die Verwendung von Watte verzichtet, weil sie sich nicht gut für gravimetrische Untersuchungen eignet.

Um abschliessend noch ein anschauliches Bild von der zellulolytischen Aktivität des oben genannten Pilzes zu geben, wurden Mikrophotographien an Hängetröpfchenkulturen im Durchlicht gemacht (400fache Vergrösserung). Die hier verwendete Zellulose bestand aus kurzen Faserstücken aschefreier Rundfilter (Schleicher und

Schüll, Nr. 589²). Schon nach 8 Tagen (Abb.1 a) war eine starke Korrodierung der Faser festzustellen, die nach 21 Tagen (Abb.1 b) zur fast vollständigen Auflösung der Zellulosefaser führte. Im Gegensatz dazu erzielte *Penicillium citrinum* (Abb.2) nach 21 Tagen noch keinen nennenswerten Abbau und nur mässiges Wachstum etwa in der Form wie bei den Kulturröhrchen auf Watte.

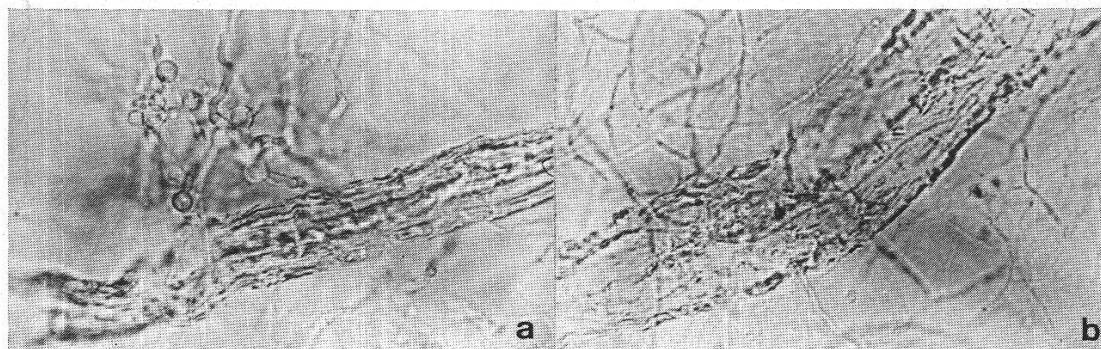


Abbildung 1

Aspergillus terreus: Zelluloseabbau an Hängetröpfchenkulturen. Mikroskopische Vergrößerung 400. C-Quelle: Fasern aschefreier Rundfilter. Inkubationsdauer: a 8 Tage, b 21 Tage

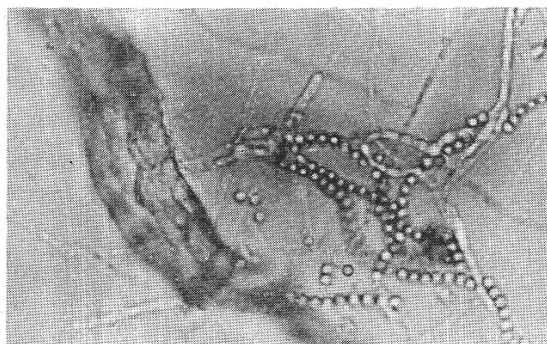


Abbildung 2

Penicillium citrinum: Zelluloseabbau an Hängetröpfchenkulturen. Mikroskopische Vergrößerung 400. C-Quelle: Fasern aschefreier Rundfilter. Inkubationsdauer 21 Tage

Auswahl des Hemmstoffes

Da heute in immer grösserem Umfang zur Bekämpfung von «Unkräutern» Herbizide eingesetzt werden, ist die Frage berechtigt, ob sich ihre Wirkung nur auf die Organismen beschränkt, gegen die sie eingesetzt werden. Eine Beeinflussung der Bodenmikroorganismen ist durchaus möglich. In welcher Form solche Einflüsse möglich sein können, soll hier nicht diskutiert werden; es sei nur darauf hingewiesen, dass schon eine einfache, unspezifische Wachstumshemmung gewisser zellulolytisch aktiver Mikroorganismen nicht überschaubare Folgen haben kann; siehe auch Lembeck et al. (1967).

In Tabelle 4 sind die von mir untersuchten Herbizide aufgeführt. Über die wachstumshemmende Wirkung dieser Herbizide gibt Abbildung 3 Auskunft. Bei diesen Testversuchen wurde eine Nährlösung verwendet, die neben den mineralischen Komponenten nur noch Glukose in einer Konzentration von 0,3% enthielt. Die Wirkstoffe wurden der Nährlösung in den auf der Abszisse angegebenen Konzentrationen vor Versuchsbeginn zugegeben und zusammen mit ihr sterilisiert. Auf der Ordinate sind die Myzeltrockengewichte aufgetragen, wie sie sich nach 14tägiger Inkubierung ergaben.

Tabelle 4
Getestete Herbizide
Organismus: *Aspergillus terreus*. I-50 = Inhibitorkonzentration für 50% Hemmung

Gruppe	Name	Chemischer Name	Lösungsmittel der Stammlösung	I-50
Wachsstoffherbizide	2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Wasser	130 ppm
	2,4-DB	2,4-Dichlorphenoxybuttersäure	Aceton	65 ppm
	2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure	Aceton	70 ppm
Harnstoffherbizide	Diuron (DCMU)	N,N-Dimethyl-N-(3,4-dichlorphenyl)-Harnstoff	Aceton	90 ppm
	Monuron (CMU)	N,N-Dimethyl-N-(4-chlorphenyl)-Harnstoff	Aceton	180 ppm
	Fenuron (PDU)	...-Phenylharnstoff	Aceton	1000 ppm
Triazinherbizid	Prometryn		Aceton	—
	PCP	Pentachlorphenol	Aceton	20 ppm

Hemmstoffe wie das Fenuron zeigten keine nennenswerten Hemmungen und waren für eine weitere Betrachtung uninteressant, wie sich bei späteren Untersuchungen noch zeigen sollte. Von vornherein konnte das PCP für weitere Versuche ausgeschlossen werden, weil seine wachstumshemmende Wirkung auf Glukose viel zu stark war.

In Betracht kamen also nur die Stoffe, die eine mittlere Hemmung ergeben hatten (I-50 bei etwa 70 ppm). Der Grund ist einfach, wenn man bedenkt, dass eine Differenzierung zwischen reiner Wachstumshemmung und vielleicht möglicher Zellulasehemmung dann nicht mehr möglich ist, wenn die Hemmwerte auf Glukose und Zellulose annähernd gleich sind. Es sind nur solche Stoffe bedeutsam, die auf Glukose eine mittlere und auf Zellulose eine starke Hemmwirkung erzielen. Hiermit war der Kreis der betrachteten Herbizide auf die Harnstoff- und Wachsstoffherbizide eingengt. Die nachfolgenden Hauptuntersuchungen werden sich hauptsächlich mit diesen Stoffen auseinandersetzen haben.

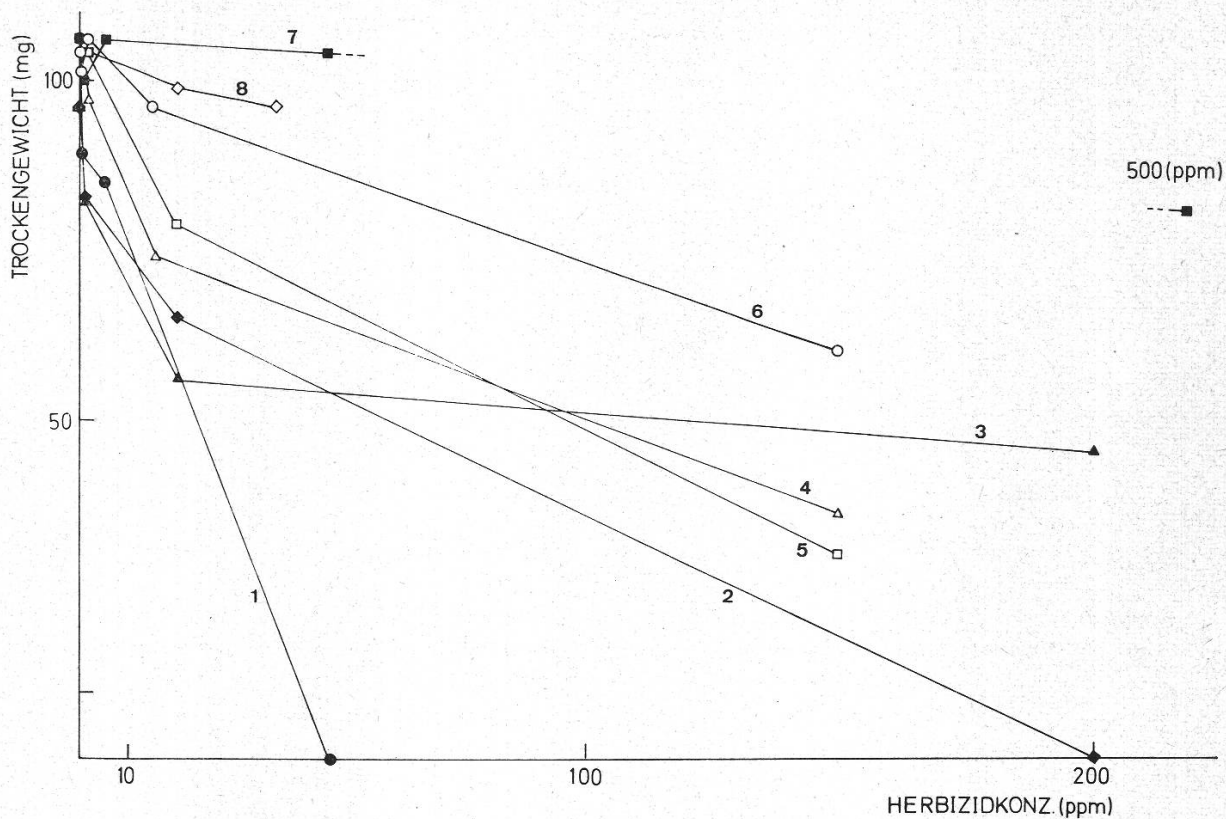


Abbildung 3

Aspergillus terreus: Wirkung verschiedener Herbizide. C-Quelle: Glukose (0,3%). Versuchsdauer 14 Tage

- | | |
|-----------------|-------------|
| 1 PCP-Na-Salz | 5 Diuron |
| 2 2,4-DB | 6 Monuron |
| 3 2,4-D-Na-Salz | 7 Fenuron |
| 4 2,4,5-T | 8 Prometryn |

Hauptuntersuchungen

Zellulaseaktivität von Aspergillus terreus

Es hatte sich ja schon im Vorversuch gezeigt, dass *Aspergillus terreus* beträchtliche Zellulaseaktivität besitzen musste. Die quantitative Untersuchung bestätigte diese Vermutung (Abb. 4). Innerhalb einer Versuchsdauer von 33 Tagen zeigte der Pilz einen fast 50prozentigen Abbau der vorgegebenen aschefreien Rundfilter. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf des Abbaus und des zugehörigen Myzelwachstums, so wird aufgrund des linearen Verhaltens die zeitliche Proportionalität dieser Prozesse deutlich. Von den ersten 6 Tagen ist natürlich abzusehen. Zwischen Wachstum und Abbau besteht keine Proportionalität, was aus der Verschiedenheit des Kurvenanstiegs hervorgeht. Eine weitere Feststellung betrifft die Verschiedenheit der Wachstumsphasen für die beiden Substrate Glukose und Papier. Bei der ersten C-Quelle werden sämtliche Phasen bis zur Autolyse durchlaufen, während der Pilz mit der zweiten C-Quelle nur sehr unscharf ausgeprägte Phasen zeigt. Einen den Wachstumskurven fast völlig ähnlichen Kurvenverlauf zeigten die Stickstoffgehalte des Myzels (Abb. 5). Der Stickstoffgehalt ist also dem Trockengewicht direkt proportio-

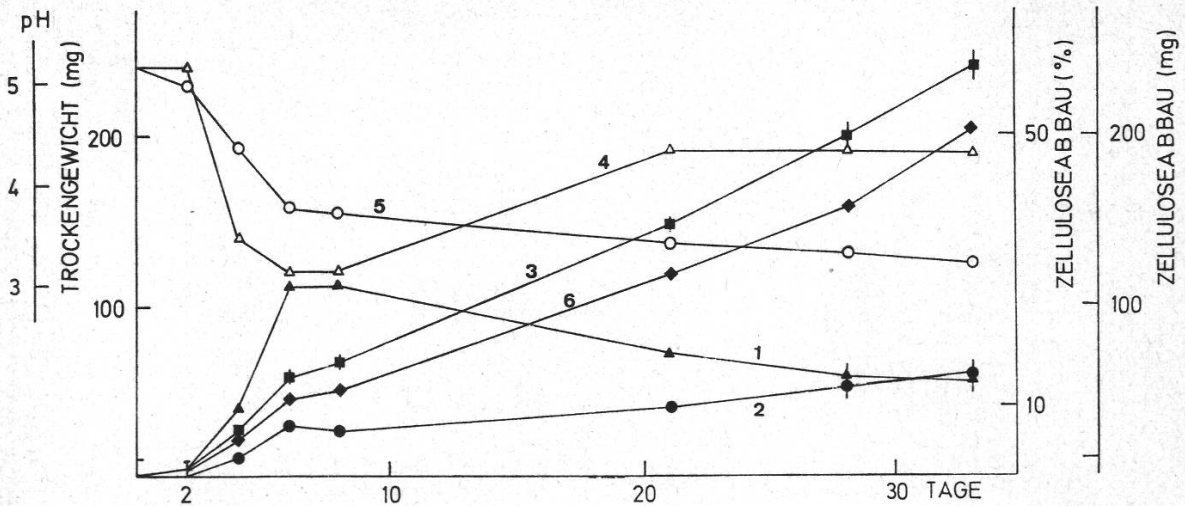


Abbildung 4

Aspergillus terreus: Wachstum, Zelluloseabbau (aschefreie Rundfilter) und pH-Verlauf. Wachstum (1) und pH-Verlauf (4) auf Glukose (0,3%). Wachstum (2) und pH-Verlauf (5) auf Zellulose. Zelluloseabbau in mg (3) und in % (6)

nal, und dies gilt, gleichgültig in welcher Wachstumsphase sich der Pilz befindet. Anders ausgedrückt, er ist zeitlich konstant, wie es der Kurvenverlauf für den Stickstoffgehalt in Prozent zum Trockengewicht wiedergibt. Der Beweis für die Gleichheit der prozentualen Stickstoffwerte wurde schon an anderer Stelle (Methode) erbracht.

Zum pH-Verlauf (Abb.4) sei nur soviel bemerkt, dass das anfänglich starke Absinken auf eine möglicherweise vermehrte Aufnahme von Ammoniumionen beruhen kann. Später mag aufgrund der Nitrataufnahme das pH wieder ansteigen. Die

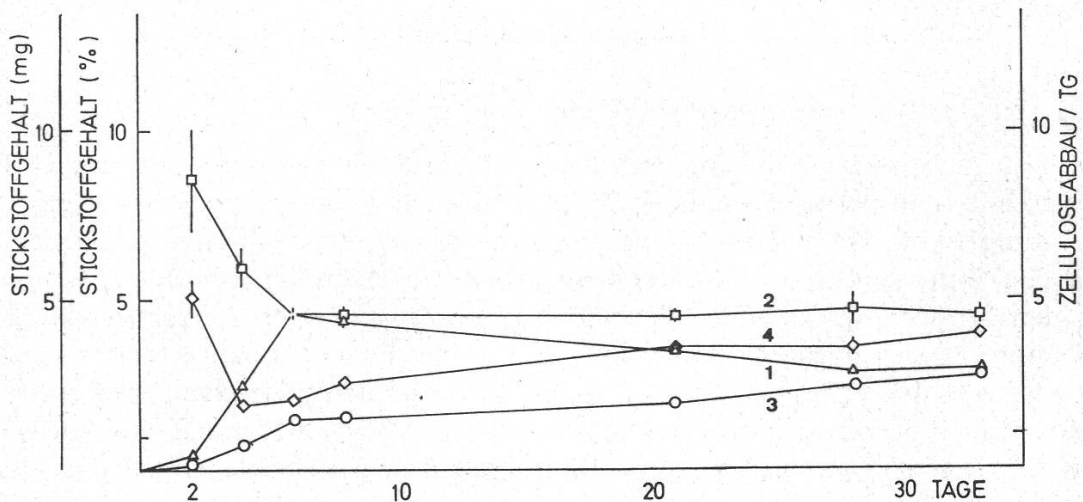


Abbildung 5

Aspergillus terreus: Stickstoffgehalt (N) und Zelluloseabbau im Verhältnis zum Trockengewicht (TG). N auf Glukose (0,3%) in mg (1) und in % (2) des TG. N auf Zellulose (aschefreie Rundfilter) in mg (3). Zelluloseabbau zu Pilztrockengewicht (4)

pH-Werte der Zellulosekulturen sanken ebenfalls innerhalb der ersten 6 Tage recht stark, erreichten aber nicht dieselbe Tiefe wie die Glukosekulturen und stiegen auch innerhalb der Versuchsdauer nicht an. Die einzige Bedeutung, die den pH-Werten zukommt, ist die Tatsache, dass sie innerhalb des für den Pilz und die Zellulase optimalen Bereiches blieben.

Einfluss von Hemmstoffen auf Zellulaseaktivität und Wachstum

Hemmwirkung des Harnstoffderivates Monuron

Aufgrund der Voruntersuchungen kamen nur noch die Harnstoff- und Wuchsstoffherbizide für eine nähere Untersuchung in Betracht. Monuron hatte dort eine I-50-Konzentration von 180 ppm ergeben.

Nun zeigte sich, dass die zellulolytische Hemmwirkung dieses Stoffes nur gering war (Tab. 5). Die I-50 betrug hier nur 60 ppm, was ausschliesslich auf die kurze Versuchsdauer von 7 Tagen zurückzuführen ist. Das Verhältnis von Papierabbau zu Myzeltrockengewicht war konstant. Diese Ergebnisse beschränkten den Kreis der Herbizide auf jene mit Wuchsstoffcharakter.

Tabelle 5

Aspergillus terreus: Wachstums- und Zellulasehemmung durch Monuron

Versuchsdauer 7 Tage. C-Quellen: 0,3 % Glukose oder aschefreie Rundfilter. TG_{Glukose}: Myzeltrockengewicht auf Glukose. TG_{Papier}: Myzeltrockengewicht auf Papier. Abbau: Papierabbau

Inhibitions- konzentration ppm	TG _{Glukose} mg	TG _{Papier} mg	Abbau mg	Abbau/TG
0	101 ± 5,9	35 ± 1,3	68 ± 3,1	2,3
5	73 ± 3,9	27 ± 2,8	53 ± 4,9	2,0
10	62 ± 2,9	25 ± 1,5	56 ± 3,7	2,1
20	54 ± 1,3	23 ± 2,3	50 ± 4,4	2,1
40	46 ± 2,3	23 ± 2,5	47 ± 4,0	2,1
60	47 ± 2,7	25 ± 1,1	51 ± 2,4	2,0

Hemmwirkung der Wuchsstoffherbizide 2,4-D und 2,4-DB

In ihrer physiologischen Wirkungsweise sind diese Stoffe der IES ähnlich. Während die Indolylessigsäure durch Bodenmikroorganismen sehr rasch abgebaut wird, sind das 2,4-D und ähnliche Stoffe durch den Einbau von Chlor wesentlich widerstandsfähiger (Hawker et al., 1962, oder Tielecke, 1967). Man weiss sehr gut (Davies, 1964), dass nur solche Phenolderivate, deren Seitenkette eine gerade Zahl von Kohlenstoffatomen trägt, Wuchsstoffwirkung zeigen. Eine im Pflanzenreich weitverbreitete, überdies bei Karbonsäuren leicht mögliche β -Oxydation der Seitenkette würde diesen Tatbestand erklären. Dadurch würde nur dann das aktive Essig-

säurederivat entstehen, wenn Geradzahligkeit der Seitenkette vorliegt. Eine gewisse Übereinstimmung mit dieser Auffassung war in meinen Versuchen auch festzustellen. Beide Verbindungen, die dem geradzahligen Typus angehören, waren physiologisch aktiv (Tab. 6). 2,4-D zeigte auf Glukose- und auf Zellulosekulturen wachstumshemmende Wirkung. Auf dem letzten Substrat war sie um rund 18% stärker. Die Zellulasehemmung war dagegen wieder wesentlich schwächer (von der gleichen Größenordnung wie die Wachstumshemmung auf Glukose). Demnach darf für die 2,4-D von einer spezifischen Beeinflussung des zellulolytischen Enzyms keine Rede sein. Die Trockengewichtshemmung auf Glukose ist für beide Inhibitoren gleich. Im Wachstum auf Papier und im Abbau dieser C-Quelle tritt nun aber eine Hemmung auf, die ungleich viel stärker ist als bei 2,4-D. Die Wachstumshemmung auf Glukose bzw. auf Papier ist für 2,4-DB derart verschieden, dass an eine spezifische Beeinflussung der Zellulase gedacht werden muss.

Tabelle 6

Aspergillus terreus: Zellulasehemmung durch 2,4-D und 2,4-DB

Versuchszeit 14 Tage. C-Quellen: 0,42% Glukose bzw. aschefreie Rundfilter. Inhibitorkonzentration 0 oder 20 ppm. $TG_{Glukose}$: Trockengewicht auf Glukose. TG_{Papier} : Trockengewicht auf Papier. $I_{Glukose}$: Hemmung des Trockengewichts auf Glukose. I_{Papier} : Hemmung des Trockengewichts auf Papier. Abbau: Papierabbau. I_{Abbau} : Hemmung des Papierabbaus

Inhibitor-konzentration	$TG_{Glukose}$ mg	$I_{Glukose}$ %	TG_{Papier} mg	I_{Papier} %	Abbau mg	I_{Abbau} %
0	112 ± 2,6		45 ± 2,6		122 ± 3,8	
20 ppm 2,4-D	89 ± 2,2	20 ± 2,8	28 ± 1,5	38 ± 4,7	95 ± 3,2	22 ± 3,7
20 ppm 2,4-DB	93 ± 0,8	18 ± 2,3	17 ± 0,8	62 ± 3,0	38 ± 2,8	69 ± 2,4

Hemmung des Wachstums und Papierabbaus als Funktion der 2,4-DB-Konzentration

Die Wachstumshemmung auf Papier ist für alle Konzentrationen 2–3mal stärker als auf Glukose (Abb. 6); dasselbe gilt für die Abbauhemmung. Es besteht, wenn man von der kleinsten Konzentration absieht, zwischen den Hemmkurven auf den beiden Substraten ein prozentualer Unterschied von 30–40%. Die Hemmung der Stickstoffwerte fügt sich ebenfalls in diesen Sachverhalt ein. Man kann sagen, dass hier spezifisch zellulolytische Prozesse gehemmt werden. Den grössten Effekt erzielte eine Konzentration von 5 ppm, bei der die Zellulasehemmung 45% und die dazugehörige Wachstumshemmung 38% betrug, während auf Glukose nur Wachstumshemmung von 10% auftrat. Für die höheren Konzentrationen gewinnt 2,4-DB an Toxizität. Der prozentuale Unterschied bleibt zwar erhalten, aber die Hemmung auf Papier hat dann nicht mehr den 4fachen Wert, sondern ist nur noch doppelt so hoch. Das bedeutet, dass sich der Anstieg geändert hat und für alle weiteren Konzentrationen gleich dem der Glukosekurve ist. Dies geht deutlich aus Abbildung 6 hervor.

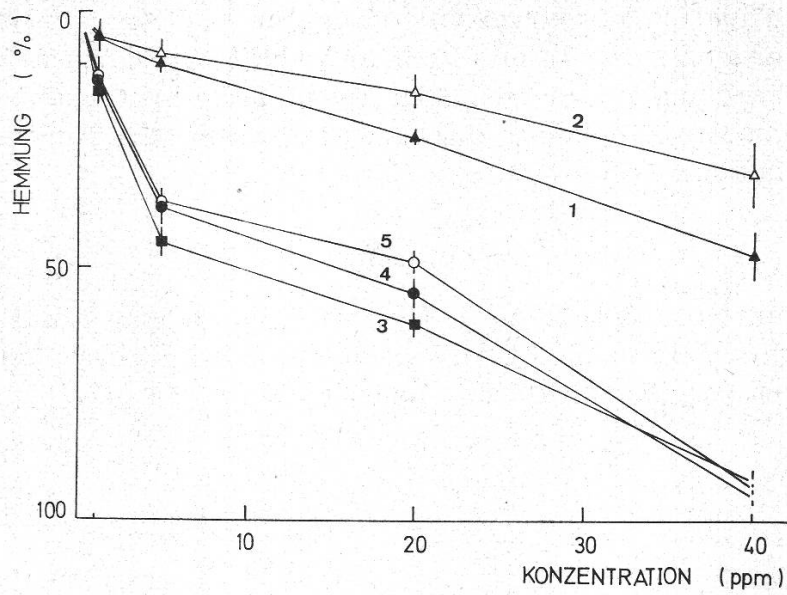


Abbildung 6

Aspergillus terreus: Hemmung von Wachstum, Zelluloseabbau und Stickstoffgehalt (N) durch 2,4-DB. C-Quelle: Glukose (0,45 %) und aschefreie Rundfilter. Versuchsdauer 14 Tage. Wachstum auf Glukose (1) und Zellulose (4). N auf Glukose (2) und Zellulose (5). Zelluloseabbau (3)

Die Pilztrockengewichte der Kontrollen betragen für Glukose als Substrat 130 mg, für Papier 40 mg. Der Papierabbau der Kontrollversuche betrug 120 mg. Die gefundenen Stickstoffwerte (Abb.7) zeigen dieselben Charakteristiken wie die Hemmkurven. Trägt man den Prozentgehalt (bezogen auf das Trockengewicht) des

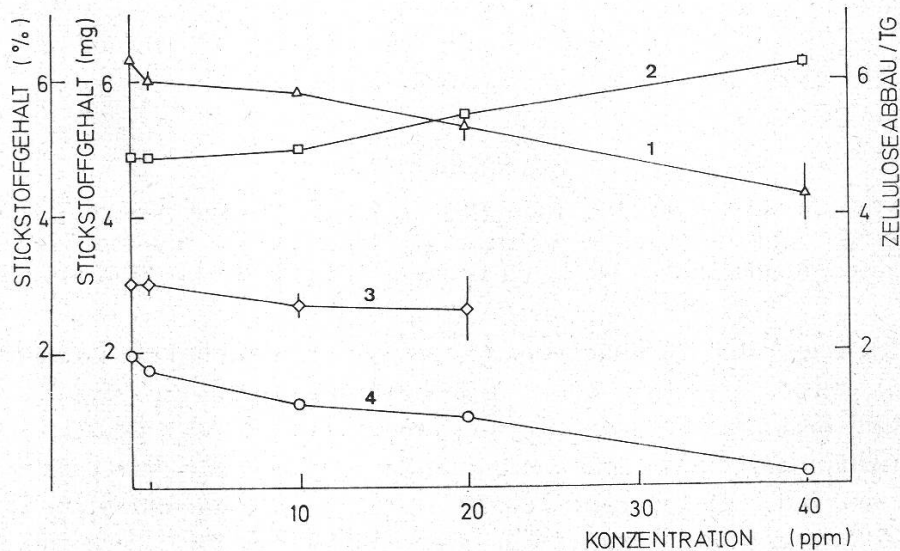


Abbildung 7

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DB auf den Stickstoffgehalt und das Verhältnis von Zelluloseabbau zu Pilztrockengewicht (TG). C-Quellen: Glukose (0,45 %) und aschefreie Rundfilter. Versuchsdauer 14 Tage. Stickstoffgehalt auf Glukose in mg (1) und in % des TG (2). Zelluloseabbau zu TG (3). Stickstoffgehalt auf Zellulose in mg (4)

Stickstoffs gegen die Inhibitorkonzentration auf, so ist dieser der Hemmstoffkonzentration proportional (Abb.7). Das Verhältnis von Papierabbau zu Pilztrockengewicht (Abb.7) wird durch den Hemmstoff nicht beeinflusst und beträgt 3. Das heisst, dass dreimal soviel Zellulose abgebaut wird, wie für den Aufbau an Pilztrockensubstanz benötigt wird.

Zeitliche Hemmwirkung von 2,4-DB

Beim Monuron hatte sich schon gezeigt, dass die Hemmwirkung eines Stoffes zeitlich abhängig sein kann. Es hatten sich dort für den 7tägigen Versuch (Tab.5) andere Hemmwerte ergeben als für den 14tägigen Test (Abb.3).

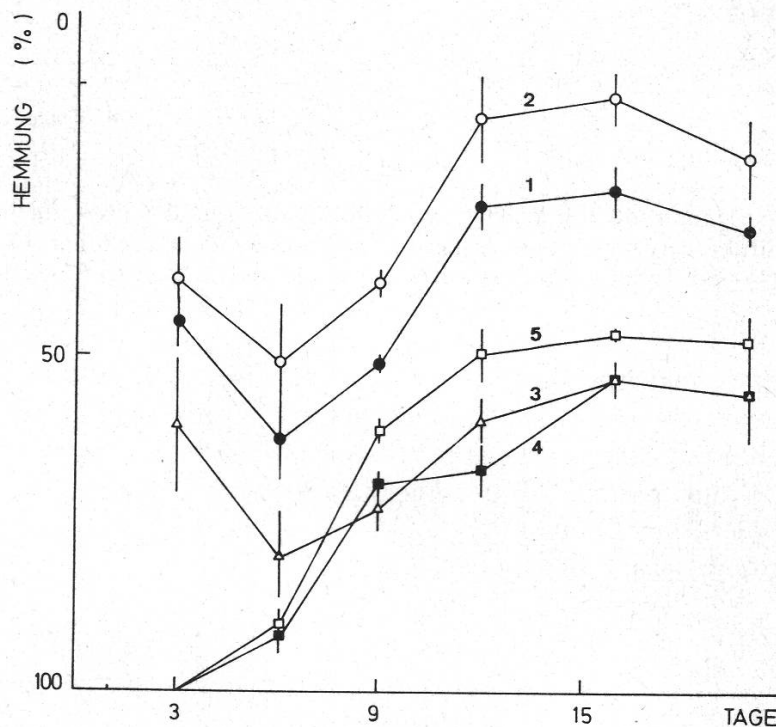


Abbildung 8

Aspergillus terreus: Hemmung von Wachstum (W), Zelluloseabbau und Stickstoffgehalt (N) durch 2,4-DB. C-Quellen: Glukose (0,45 %) oder aschefreie Rundfilter. Inhibitorkonzentration 18 ppm. W auf Glukose (1) und Zellulose (4). N auf Glukose (2) und Zellulose (5). Zelluloseabbau (3)

Für 2,4-DB ergibt der Vergleich der Hemmwerte ebenfalls kein einheitliches Bild (Abb.8), das heisst, dass hier keine zeitliche Proportionalität besteht. Für beide C-Quellen sind Wachstum, Stickstoffgehalt und Abbau von der gleichen Charakteristik. Die zueinander gehörenden Wertepaare (Stickstoff und Wachstum für beide C-Quellen) sind über den ganzen Zeitraum um 25–40 % voneinander verschieden, wobei die Zellulosekulturen immer die höheren Hemmwerte aufweisen. Ihr Maximum erreichen sie am 6.Tag, zwischen dem 12. und 16.Tag sind sie am niedrigsten. Das Bild, das sich im Kurvenverlauf zeigt, ist das einer Funktion 3. Grades mit zwei Extremwerten. Allerdings ist der zweite noch nicht signifikant ausgebildet. Die Erklärung für den maximalen Hemmbereich kann leicht gegeben werden, wenn man dazu die Trockengewichte (Abb.9) vergleicht.

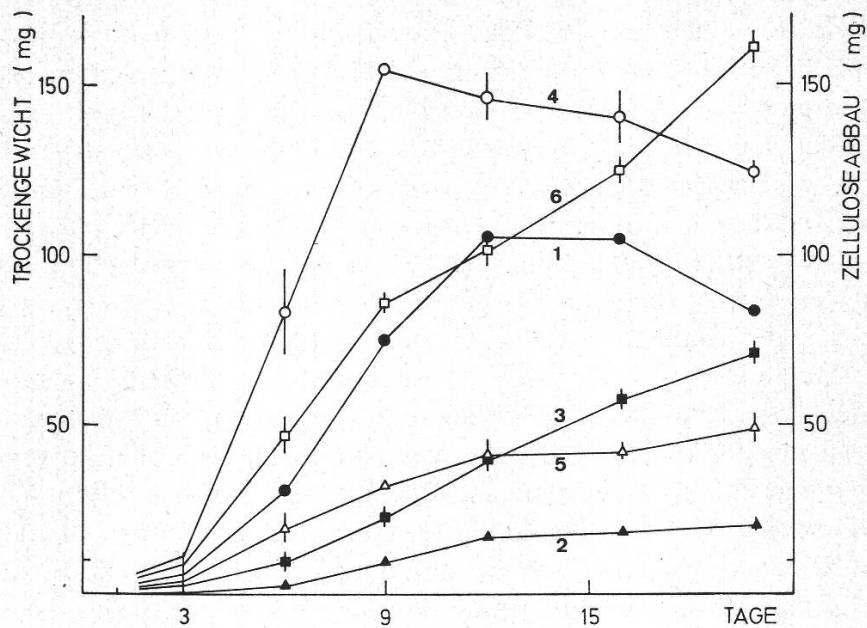


Abbildung 9

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DB auf Trockengewicht (TG) und Zelluloseabbau. C-Quellen: Glukose (0,45%) und aschefreie Rundfilter. Inhibitorkonzentration 18 ppm
 TG auf Glukose mit (1) und ohne Hemmstoff (4)
 TG auf Zellulose mit (2) und ohne Hemmstoff (5)
 Zelluloseabbau mit (3) und ohne Hemmstoff (6)

Offensichtlich fällt dieser Extremwert in den zeitlichen Bereich der Exponentiellen Phase, und gerade hier muss sich ein Hemmstoff, gleich welcher Beschaffenheit, be-

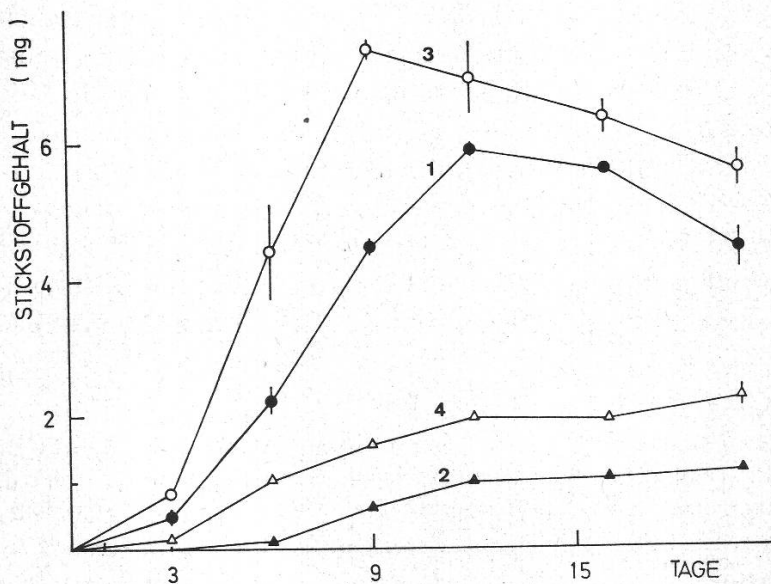


Abbildung 10

Aspergillus terreus: Wirkung von 2,4-DB auf den Stickstoffgehalt (N). C-Quellen: Glukose (0,45%) oder aschefreie Rundfilter. Inhibitorkonzentration 18 ppm
 N auf Glukose mit (1) und ohne Inhibitor (3)
 N auf Zellulose mit (2) und ohne Inhibitor (4)

sonders störend bemerkbar machen. Bedeutsam ist, dass auch nach 21 Tagen immerhin noch 50–60% Hemmwirkung auf Papier erhalten bleiben. Im ganzen gesehen zeigt dieser Wirkstoff eine 2- bis 3mal stärkere Hemmung des Abbaus und Wachstums der Kulturen auf Zellulose als auf Glukose. Hier liegt also nicht nur eine einfache Wachstumsbeeinflussung vor, sondern diese Effekte beruhen auf einer spezifischen Zellulasehemmung. Einen Überblick über den Einfluss des Herbizids auf den Stickstoffeinbau gibt Abbildung 10. Ein Vergleich mit Abbildung 9 zeigt die Ähnlichkeit des Kurvenverlaufes der einander entsprechenden Kurven. Ein rechnerischer Vergleich des Stickstoffgehalts, bezogen auf das Pilztrockengewicht (auf Glukose als C-Quelle), ergibt ab dem 9. Tag einen konstanten Stickstoffgehalt von 5,5%. In der Exponentiellen Phase liegt am 3. Tag ein Stickstoffgehalt von 8,5% vor, der dann im Verlauf des weiteren Wachstums auf den oben angegebenen Wert absinkt. In allen Fällen ist der Stickstoffgehalt der unbehandelten Kontrollen um 1% tiefer. Dasselbe darf für die Zellulosekulturen angenommen werden aus Gründen, die auf Seiten 410–411 erörtert wurden. Das Verhältnis Papierabbau zu Pilztrockengewicht ergab unter dem Einfluss des Wuchsstoffherbizides genau dieselben Werte wie für die Kontrolle. Die Werte waren zwar nicht ganz konstant, hielten sich jedoch zwischen 2,5 und 3,3. Auch hier ist natürlich die Exponentielle Phase auszuklammern. Drückt man diese Beobachtung in anderen Worten aus, so heisst das, dass das Wachstum unter der Wirkung des Hemmstoffes genau im selben Mass zurückgeht wie der Abbau. Über die primäre Ursache werden die weiteren Versuche berichten.

Einfluss von 2,4-DB auf das Wachstum bei verschiedenen Glukose- bzw. Cellobiosekonzentrationen

Das Pilzwachstum war unter Normalbedingungen (kein Inhibitor) etwa halb so stark auf Papier wie auf Glukose (Abb. 4), oder es betrug nur den dritten Teil (Abb. 9), je nach der verwendeten Glukosekonzentration. Bei restloser Umsetzung der abgebauten Zellulose in Glukose stünden dem Pilz auf Papier 150 mg Glukose zur Verfügung, was einer Anfangskonzentration von 0,1% Glukose entsprechen würde. Es war also zu prüfen, ob nicht die stärkere Wachstumshemmung auf Papier ihre Ursache im geringeren, durch den Abbau zur Verfügung stehenden Glukosegehalt hatte. Von diesem Gedanken ausgehend, wurde die Wachstumshemmung des Pilzes auf verschiedenen Glukosekonzentrationen untersucht (Abb. 11). Die Ergebnisse schliessen diese Möglichkeit aus. Der analoge Versuch auf Cellobiose (Tab. 7) führt zu dem gleichen Resultat.

Tabelle 7

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DB auf das Wachstum auf Cellobiose
Versuchsdauer 14 Tage. TG: Pilztrockengewicht. P: Irrtumswahrscheinlichkeit. I: Wachstumshemmung. IK: Inhibitorkonzentration. F: Förderung des Wachstums

0,45 % Cellobiose				0,10 % Cellobiose			
IK	TG	I	P	IK	TG	F	P
ppm	mg	%	%	ppm	mg	%	%
0	122 ± 2,3			0	25 ± 0,7		
5	122 ± 0,6	0 ± 1,9	—	5	30 ± 0,6	20 ± 4,1	0,05

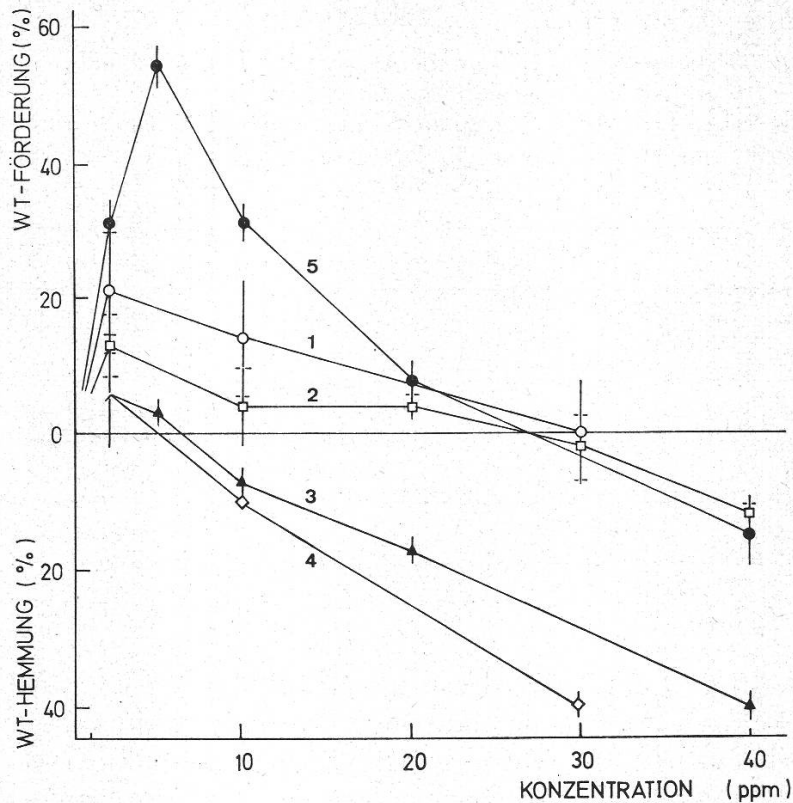


Abbildung 11

Aspergillus terreus: Hemmender und förrender Einfluss von 2,4-DB auf das Wachstum (WT).
C-Quellen: Glukose und CMC. Versuchsdauer 14 Tage

1	0,05 % Glukose	(Trockengewicht der Kontrolle 14 mg)
2	0,10 % Glukose	(Trockengewicht der Kontrolle 26 mg)
3	0,45 % Glukose	(Trockengewicht der Kontrolle 114 mg)
4	0,60 % Glukose	(Trockengewicht der Kontrolle 156 mg)
5	0,45 % CMC	(Trockengewicht der Kontrolle 13 mg)

Der Einfluss von 2,4-DB auf das Wachstum bei Verwendung von CMC

Nachdem nun feststand, dass zellulolytische Prozesse beeinflusst wurden, musste geklärt werden, welche der möglichen Enzyme beeinträchtigt wurden. Durch Verwendung löslicher Zellulose (CMC) konnte hierfür eine Antwort gefunden werden.

Die Anwendung des Hemmstoffs ergab auf CMC eine starke Förderung des Wachstums (Abb. 11). Das Optimum lag bei 5 ppm. Erst höhere Konzentrationen (über 30 ppm) wirkten sich toxisch aus und ergaben eine geringe Hemmung. Für Glukose ergab sich für 1 ppm ebenfalls eine Förderung, die aber weit geringer war als die auf CMC (vgl. auch Abb. 11). Über die Absolutbeträge und die Statistik dieser Ergebnisse gibt ein weiterer Versuch (Tab. 8) Auskunft. Es handelte sich, wie man sieht, um relativ geringe Trockengewichte.

Zwischen der Hemmwirkung auf Papier und der Förderung auf CMC bei 5 ppm besteht also ein prozentualer Unterschied von 100%. Was daraus zu entnehmen ist, soll erst später diskutiert werden. Die Wachstumsförderung braucht nun nicht unbedingt mit einer Abbauförderung der CMC und einer vermehrten Enzymproduktion zusammenzuhängen. Es ist ja auch denkbar, dass nur eine bessere Verwertung des Substrates unter dem Einfluss des Wirkstoffes vorliegt. Um hier eine Entscheidung fällen zu kön-

Tabelle 8

Aspergillus terreus: Wirkung von 2,4-DB auf das Wachstum auf 0,45 % Glukose bzw. 0,45 % Carb-oxymethylzellulose (CMC)

Versuchsdauer 14 Tage. TG: Pilztrockengewicht. IK: Hemmstoffkonzentration. I: Wachstums-
hemmung. F: Förderung des Wachstums. P: Irrtumswahrscheinlichkeit für übereinanderstehende
Werte

Glukose			CMC		
IK ppm	TG mg	I %	IK ppm	TG mg	F %
0	124 ± 2,3		0	10,5 ± 0,3	
5	120 ± 2,0	3 ± 2,4	5	18,2 ± 0,6	73 ± 7,5
P	0,15			0,0005	

nen, wurde die Atmung des Pilzes, die sicherlich als Mass für den CMC-Abbau gelten darf, mit der Mikrogaswechselform nach Warburg bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der Pilz in einer für die Warburgmethode geeigneten und CMC-haltigen Nähr-lösungsmenge (3 ml) in Kulturröhrchen herangezogen und quantitativ in die Warburg-gefäße übertragen. Die Atmung wurde nach der indirekten Methode unter Verwen-dung von 0,3 ml KOH (8%) bzw. 0,3 ml KH₂PO₄ (m/15) im Einsatz der Gefäße be-stimmt. Geschüttelt wurde mit 110 Schwingungen pro Minute. Die Vorperiode be-trug eine halbe Stunde. Die Temperatur des Thermobades wurde auf 30 °C gehal-ten. Die Versuchsergebnisse ergaben eine klare Förderung der Atmung durch 2,4-DB (Tab.9). Sauerstoffverbrauch und CO₂-Abgabe sind um das Zwei- bis Dreifache ge-steigert; der Atmungsquotient war nahezu 1.

Tabelle 9

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DB auf den Sauerstoffverbrauch und die CO₂-Abgabe auf CMC

Messdauer im Warburgapparat 3 Stunden. Alter der Kulturen 5 und 6 Tage. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je 3 Parallelkulturen. IK: Inhibitorkonzentration. X_{o₂}: Sauerstoff-
verbrauch. X_{co₂}: CO₂-Abgabe. OF: Förderung des Sauerstoffverbrauchs. CF: Förderung der
CO₂-Abgabe. P: Irrtumswahrscheinlichkeit für übereinanderstehende Werte

IK ppm	5 Tage alte Kulturen				6 Tage alte Kulturen			
	X _{o₂} cmm	X _{co₂} cmm	OF %	CF %	X _{o₂} cmm	X _{co₂} cmm	OF %	CF %
0	15,2 ± 1,8	16,1 ± 5,6			18,9 ± 0,8	13,0 ± 2,3		
5	45,8 ± 5,3	49,8 ± 9,0	200 ± 50	198 ± 110	46,4 ± 2,5	36,3 ± 5,0	146 ± 14	180 ± 63
P <	0,005	0,025			0,0005	0,005		

Mit Hilfe der in 3 Stunden gemessenen Mikroliter CO_2 lässt sich der Abbau an CMC überschlagsmässig berechnen. Für 5 Tage ergab sich für die Kontrolle ein Umsatz von etwa 0,9 mg Glukose, unter dem Einfluss des Wirkstoffs betrug er zirka 2,8 mg. Pro Kultur wurden 13,5 mg CMC eingewogen, so dass sich für die Kontrolle ein Abbau von 7%, für die mit 2,4-DB behandelten Kulturen einer von zirka 20% ergab.

Dadurch steht fest, dass die Wachstumsförderung (Abb.11) unbedingt mit einer Abbauförderung zusammengeht. Die relativ grossen Fehler ändern an diesem Sachverhalt nichts. Ihre Ursachen liegen darin, dass innerhalb der 5- bis 6tägigen Kultur geringe Unterschiede in den Flüssigkeitsmengen der Kulturröhrchen auftreten, die sich bei Mikrogaswechselfmessungen störend bemerkbar machen können.

Einfluss der 2,4-DB auf Pilzwachstum und Abbau von Baumwoll-Linters

Baumwoll-Linters ist wieder vom selben Zellulosetypus wie das aschefreie Filtrierpapier. Eine vergleichende Betrachtung dieser beiden C-Quellen (Abb.12) ergibt in Abbau und Wachstum keine signifikanten Unterschiede. Offenbar erfährt hier dasselbe Fermentsystem eine Hemmung durch die 2,4-DB. Konsistenzmässig handelt es sich beim Baumwoll-Linters um lose und kurze Faserstücke und nicht um ein fest gepresstes Material wie bei den Rundfiltern.

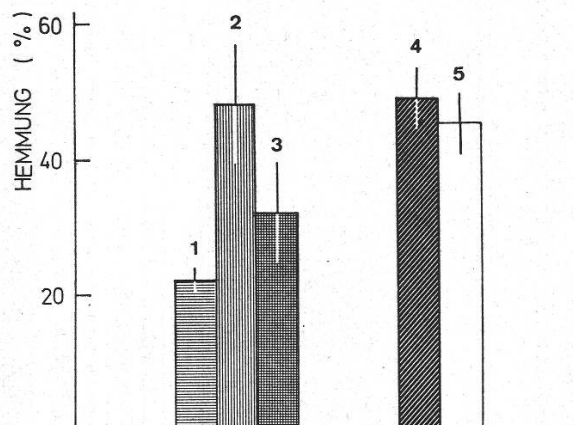


Abbildung 12

Aspergillus terreus: Wachstum und Zelluloseabbau unter dem Einfluss von 2,4-DB. C-Quellen: Glukose (0,45%), aschefreie Rundfilter und Baumwolle (Rohlinters). Versuchsdauer 14 Tage. Hemmung des Wachstums auf Glukose (1), Rundfiltern (2) und Baumwolle (3). Hemmung des Zelluloseabbaus mit Rundfiltern (4) und Baumwolle (5)

Hemmung des Zelluloseabbaus durch 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP)

Da nun eindeutige Hinweise auf eine spezifische Beeinflussung zellulolytischer Systeme vorlagen, war die Frage zu klären, wo der Angriffsort der 2,4-DB lag. Zu diesem Zweck wurde der Pilz nach einer gewissen Vorkulturzeit mit einem geeigneten Hemmstoff am weiteren Wachstum gehindert und dann der Einfluss der 2,4-DB auf die Zellulaseaktivität geprüft. Im 2,4-Dinitrophenol bot sich ein solcher Stoff an. Man weiss von diesem Hemmstoff, dass er als «Entkoppler» den Vorgang der

Phosphorylierung vom Elektronentransport trennt und damit die Phosphorylierung unterbindet (Davies et al., 1964; Karlson, 1966, oder Rose, 1965). Mit diesem Eingriff sind weitere Syntheseleistungen der Zelle nicht mehr möglich. Um nun diesen Stoff einsetzen zu können, musste zuerst seine Wirkung auf diesen speziellen Organismus untersucht werden. In einem Konzentrationsversuch ergab sich die völlig unspezifische Hemmung sämtlicher Wachstumsprozesse, und zwar gleichgültig, welche C-Quelle dem Pilz angeboten wurde (Abb.13). Ebenso zeigen die Papierabbaukurven den gleichen Hemmverlauf wie die Wachstumskurven. Bei 30 ppm Inhibitorkonzentration sind schon kaum mehr Syntheseleistungen zu vermerken. Bedeutend für den Versuchsgedanken war, dass die Zellulaseproduktion völlig blockiert wurde. Im Verhältnis Papierabbau zu Pilztrockengewicht zeichnete sich kein signifikanter Unterschied ab. Man darf also sagen, dass aufgrund der Phosphorylierungsblockade das Wachstum und die Fermentbildung gleichermassen zurückgehen. Die Stickstoffeinlagerung ist von diesem Verhalten nicht ausgeschlossen (Abb.13), ihr prozentualer Anteil am Trockengewicht bleibt annähernd konstant.

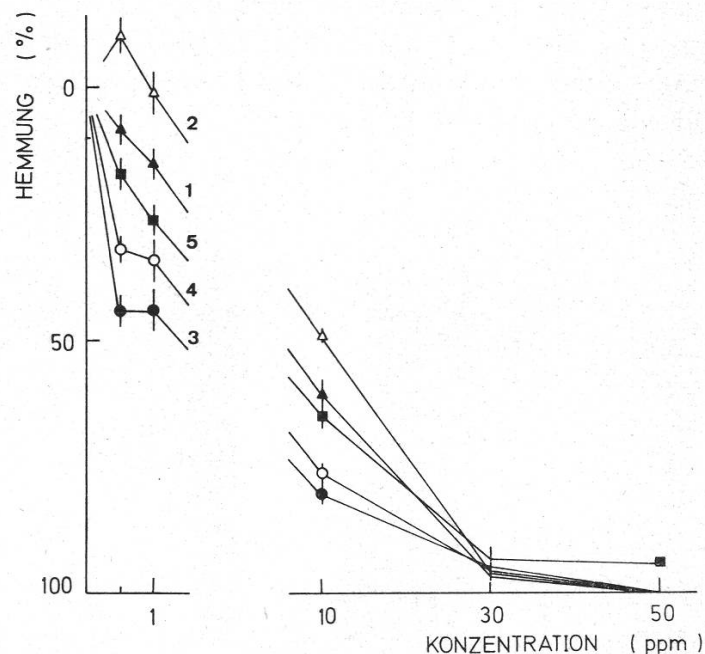


Abbildung 13

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DNP auf Wachstum (W), Zelluloseabbau und Stickstoffgehalt (N). C-Quellen: Glukose (0,45%) und aschefreie Rundfilter. Versuchsdauer 14 Tage. Hemmung des W auf Glukose (1) und Zellulose (3). Hemmung des N auf Glukose (2) und Zellulose (4). Hemmung des Zelluloseabbaus (5)

Lokalisation des Angriffsortes der 2,4-DB

Mit Hilfe des 2,4-DNP konnte eine Entscheidung darüber gefällt werden, ob das freie (extrazelluläre) Enzym oder dessen Bildung durch die 2,4-DB beeinflusst wird. Dazu wurde der Pilz auf Glukose und aschefreien Rundfiltern kultiviert. Nach einer hemmstofffreien Vorkulturzeit von 6 Tagen wurden Kontrollen derselben Versuchsreihe bestimmt und den übrigen Versuchskulturen unter sterilen Bedingungen die

Hemmstoffe zugegeben. Da 2,4-DB in acetonischer Lösung (1 ml) zugegeben werden musste, wurden die Kontrollen mit der gleichen Menge Aceton beschickt. Hiermit kamen folgende Inhibitoren oder deren Kombination zur Anwendung:

1. Aceton p.a. (0,66%)
2. 2,4-DB (18 ppm)
3. 2,4-DB (18 ppm) + 2,4-DNP (55 ppm)

Den Ergebnissen (Abb.14) lässt sich entnehmen:

1. Aceton beeinflusst in den angewandten Mengen keinen der untersuchten Prozesse, so dass es als Lösungsmittel für irgendeinen Hemmstoff ohne weiteres genommen werden durfte.
2. Die zellulolytischen Prozesse werden, wenn die Hemmstoffzugabe (2,4-DB) nach 6 Tagen erfolgt, nicht mehr beeinträchtigt.
3. Der Wirkstoff 2,4-DB zeigt weiterhin wachstumshemmende Wirkung, jedoch ist diese auf Papier nicht mehr spezifisch anders als auf Glukose.

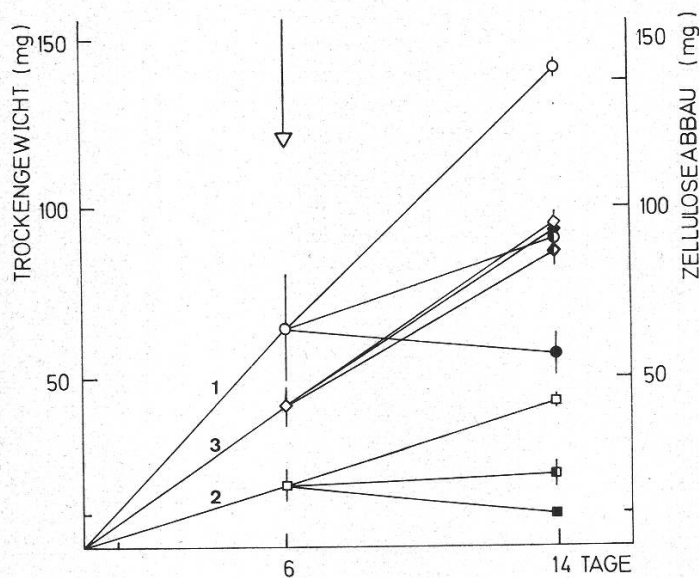


Abbildung 14

Aspergillus terreus: Wachstum und Zelluloseabbau unter der Wirkung von 2,4-DB und 2,4-DB zusammen mit 2,4-DNP. Wachstum auf Glukose (0,45%) (1) und aschefreien Rundfiltern (2); Zelluloseabbau (3). Dünn umrandete Symbole: Kontrollen. Halbvolle Symbole: Kulturen mit 18 ppm 2,4-DB. Volle Symbole: Kulturen mit 18 ppm 2,4-DB und 55 ppm 2,4-DNP. Pfeil: Zeitpunkt der Hemmstoffzugaben

Um den letzten Punkt klarer darstellen zu können, sind die Hemmwerte in einem Blockdiagramm aufgetragen worden. Aus diesem Diagramm (Abb.15) geht hervor, dass die Wachstumshemmung auf Papier und Glukose nicht mehr signifikant verschieden ist. Die Abbauehemmung war, wie man hier besser sieht, für beide Inhibitoren nicht nennenswert. Zur Berechnung der Hemmwerte wurde auf die 14tägigen Kontrollen bezogen. Dadurch kommt für die mit 2,4-DNP behandelten Kulturen

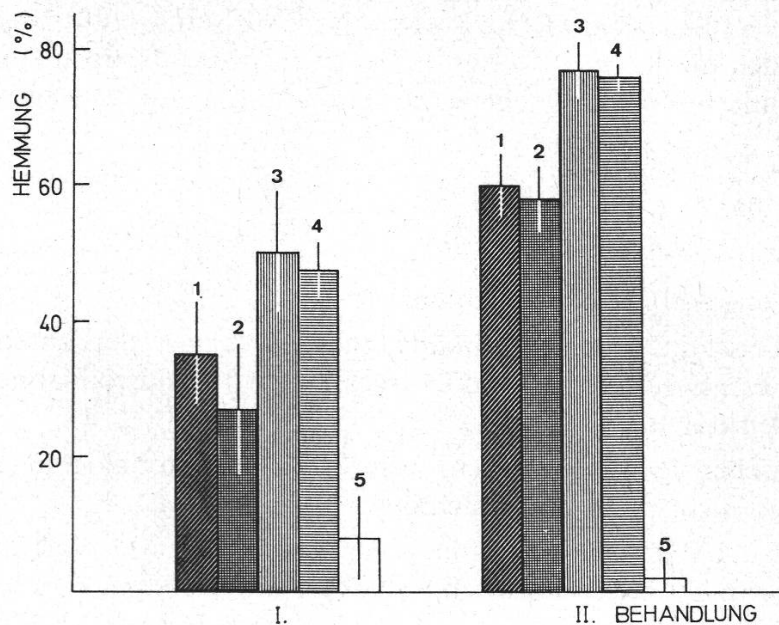


Abbildung 15

Aspergillus terreus: Hemmung von Wachstum, Stickstoffeinbau und Zelluloseabbau unter der Wirkung von 2,4-DB und 2,4-DB + 2,4-DNP. C-Quellen: Glukose (0,45 %) und aschefreie Rundfilter. Hemmstoffzugabe nach Ablauf des 6. Tages. Inkubationsdauer 8 Tage. I. Behandlung: Zugabe acetonischer 2,4-DB-Lösung (Endkonzentration 18 ppm). II. Behandlung: Zugabe acetonischer 2,4-DB-Lösung (Endkonz. 18 ppm) + wässrige 2,4-DNP-Lösung (Endkonz. 55 ppm)

- 1 Wachstumshemmung auf Glukose
- 2 Hemmung des Stickstoffeinbaus auf Glukose
- 3 Wachstumshemmung auf Zellulose
- 4 Hemmung des Stickstoffeinbaus auf Zellulose
- 5 Hemmung des Zelluloseabbaus

nur eine 80prozentige Hemmung zum Ausdruck. Betrachtet man aber die Darstellung der Trockengewichte (Abb. 14), so sieht man, dass eine eindeutige, totale Hemmung aller Wachstumsprozesse eingetreten ist.

Reversibles oder adaptives Verhalten gegenüber 2,4-DB

Aufgrund aller vorangegangenen Versuche stand fest, dass 2,4-DB auf die Fermentbildung Einfluss nimmt. Deshalb war es natürlich interessant, zu wissen, inwieweit daraus dauernde Schädigungen resultierten.

Dies lässt sich gut an der Nachkommenschaft des inhibierten Materials feststellen. Deshalb habe ich die Kulturen wie üblich dem Einfluss der 2,4-DB ausgesetzt, die Wachstums- und Abbauehemmungen analysiert (Abb. 16, I) und von einem weiteren Teil derselben Versuchsreihe sterile Sporenfiltrate angefertigt. Mit einer Spritze wurde von diesen Filtraten jeweils 1 ccm auf neue Kolben mit hemmstofffreier Nährlösung übertragen. Nach weiteren 14 Tagen erfolgte wieder eine Analyse der Hemmungen (Abb. 16, II), und eine dritte 14tägige Phase schloss sich an, die nach dem gleichen Schema wie bei den anderen Schritten durchgeführt wurde.

Diese letzte Nährlösung enthielt wieder die 2,4-DB in der anfänglichen Konzentration.

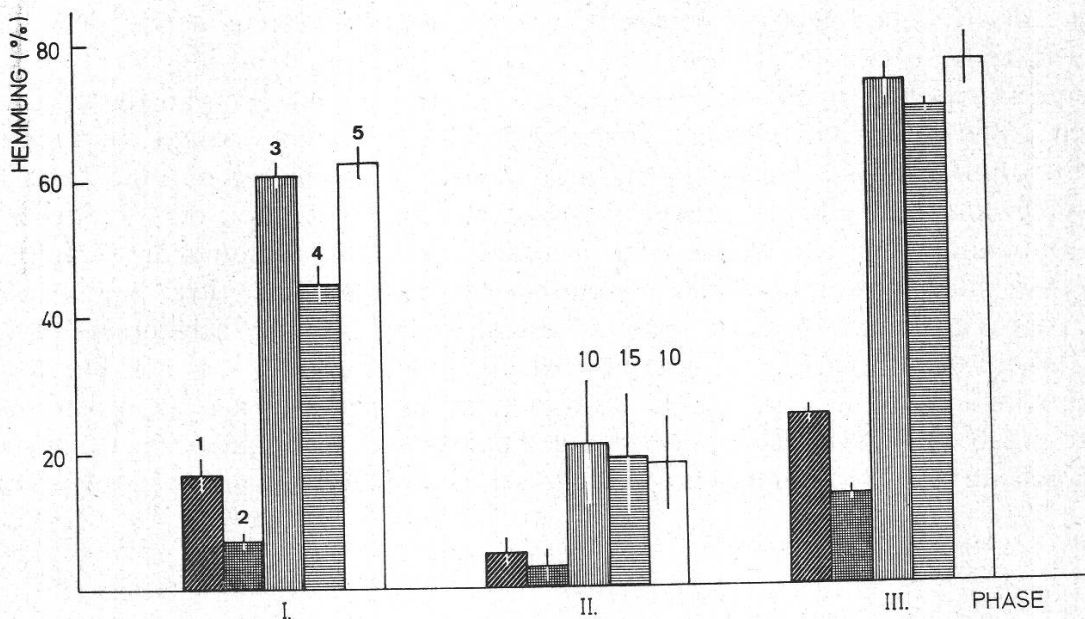


Abbildung 16

Aspergillus terreus: Reversibilitäts- und Adaptionstest. C-Quellen: Glukose (0,45%) oder asche-freie Rundfilter. 2,4-DB-Konzentration: 18 ppm. Inkubationszeit: 14 Tage je Phase. I. Phase: In-kubierung. II. Phase: Reaktivierung. III. Phase: Adaption

- 1 Wachstumshemmung auf Glukose
- 2 Hemmung des Stickstoffeinbaus auf Glukose
- 3 Wachstumshemmung auf Zellulose
- 4 Hemmung des Stickstoffeinbaus auf Zellulose
- 5 Hemmung des Zelluloseabbaus

Zahlen über den mittleren Blöcken: Irrtumswahrscheinlichkeit in % gegenüber der Wachstums-hemmung auf Glukose

Die erste Phase (Abb.16, I) gibt die schon bekannten Hemmwerte wieder. In der zweiten Phase tritt nur eine geringe und unerhebliche Resthemmung auf, die eher ihre Ursache in der geringeren Sporendichte der Sporensuspension hatte, da das Ausgangsmaterial ja immerhin 20 bzw. 60% gehemmt gewesen war. Interessant ist jedoch, dass die Hemmungsunterschiede auf Glukose und auf Papier keine Signifi-kanz mehr aufweisen. Die Trockengewichte bewegten sich in den normalen Grös-senordnungen. Aus diesen Gründen darf eine Schädigung der Nachkommenschaft ausgeschlossen werden. Adaption an die 2,4-DB erfolgte nicht (Abb.16, III). Die Hemmwerte erreichten wieder die ursprüngliche Höhe der ersten Phase. Die etwas höheren Werte dürften auch hier wieder auf die geringere Sporendichte der Sporen-suspension zurückführbar sein. Allerdings ist hier zu betonen, dass dies nur für die betrachtete Versuchsdauer gilt. Wie die Verhältnisse bei längerer Anwendung ausse-hen, kann nicht vorausgesagt werden.

Hemmung des Wachstums und der Zellulase durch 2,4-DB unter dem Einfluss von Ammonium- oder Nitratmangel

Die zellulolytische Aktivität ist nicht unabhängig von der verwendeten Stickstoffquelle (Siu, 1951). Man weiss, dass das Nitrat- bzw. Ammoniumbedürfnis durchaus für die verschiedenen Mikroorganismen anders sein kann (Rose, 1965; Davies et al., 1964, und Hawker et al., 1962).

Somit ist von Fall zu Fall zu untersuchen, welche N-Quelle am günstigsten ist. In meinen Untersuchungen habe ich immer NH_4NO_3 verwendet, womit weitgehendst dem Stickstoffbedürfnis des Pilzes Rechnung getragen wurde. Ob nun die Zellulasehemmung durch 2,4-DB nicht doch in gewissem Masse auch von der N-Quelle abhängig, konnte bisher nicht entschieden werden. Eine Untersuchung der zellulolytischen Aktivität und von deren Hemmung bei Abwesenheit von Nitrat bzw. Ammonium führte zu keinen Aktivitätsunterschieden. Lediglich die Wachstumshemmung auf Glukose war durch die 2,4-DB bei Nitratmangel grösser (Abb.17). Die Stickstoffaufnahme ist auf Glukose bei Ammoniummangel schwach gefördert. Auf Papier ergab sich sekundär natürlich auch eine starke Hemmung der Stickstoffwerte. Abbau und Hemmung wurden auch bei diesem Versuch auf zwei verschiede-

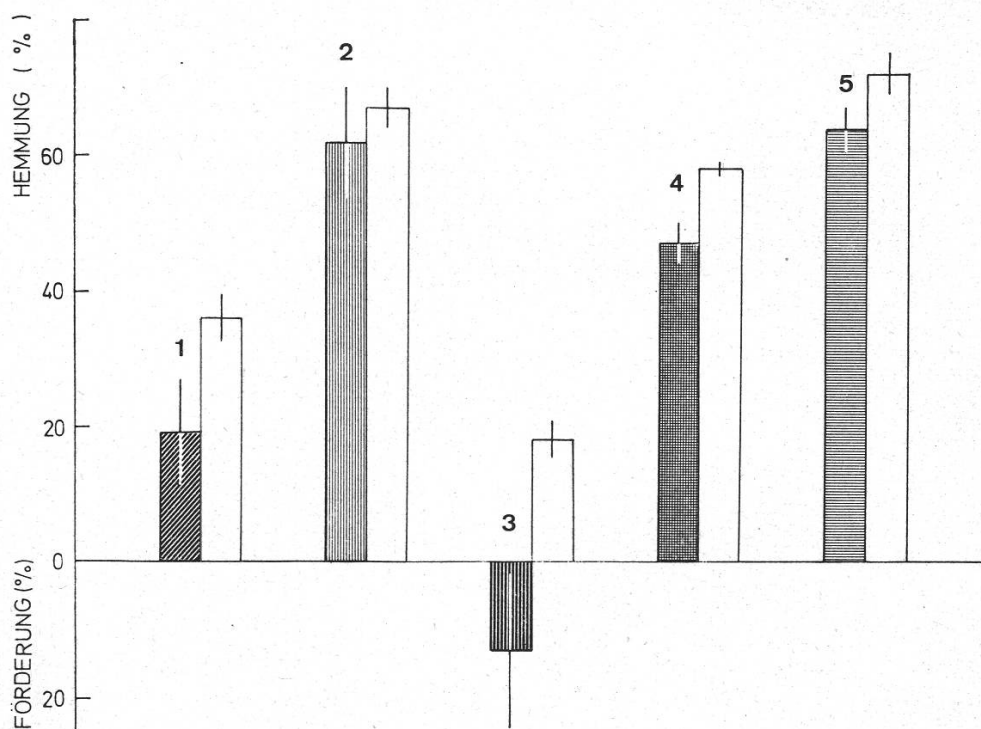


Abbildung 17

Aspergillus terreus: Einfluss von 2,4-DB auf Wachstum, Stickstoffgehalt (N) und Zelluloseabbau bei Ammonium- bzw. Nitratmangel. C-Quellen: Glukose (0,45%) oder aschefreie Rundfilter. Versuchsdauer 14 Tage. Weisse Blöcke: Nitratmangel. Schraffierte Blöcke: Ammoniummangel

- 1 Wachstumshemmung auf Glukose
- 2 Wachstumshemmung auf Zellulose
- 3 Hemmung des N auf Glukose
- 4 Hemmung des N auf Zellulose
- 5 Hemmung des Zelluloseabbaus

nen Wegen berechnet, ergaben aber dieselben Werte (vgl. «Methodischer Teil»). Das bedeutet, dass der prozentuale Gehalt an Stickstoff, bezogen auf das Trockengewicht, auch auf Papier höher ist, wenn nur Nitrat vorgegeben wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Ammoniummangel sämtliche Hemmwerte um etwa 5–20% niedriger sind.

Diskussion

Mit den Vorversuchen war schon auf die zellulolytische Aktivität von *Aspergillus terreus* hingewiesen worden. Eingehende Untersuchungen (vgl. Abb.4 und 9) ergaben einen Papierabbau, der 3- bis 4mal höher als die Pilztrockensubstanz war. Somit werden zwei Drittel bis drei Viertel der abgebauten C-Quelle im Energiehaushalt der Zelle umgesetzt. Ein Vergleich der Trockengewichte der Glukosekulturen mit der eingewogenen Menge Glukose ergab ebenfalls nur eine Trockengewichtsfixierung von einem Viertel der vorgegebenen C-Quelle. Diese doch ziemlich gleiche Verwertung beider C-Quellen scheint darauf hinzuweisen, dass für sämtliche Intermediärprodukte genügend Enzyme vorhanden sind, die für eine rasche und vollständige Verarbeitung der ersten entstandenen Abbauprodukte sorgen.

Begrenzender Faktor des Wachstums auf Zellulose ist wahrscheinlich die Reaktionsgeschwindigkeit der zellulolytischen Enzyme und nicht deren Menge, wenn man von einem enzymatischen Mindestgehalt absieht. Als Hinweise dafür können die Proportionalität zwischen Wachstum und Abbau (vgl. Abb.5) und die Resultate des 2,4-DNP-Versuches (Abb.14) angesehen werden. Im letzten Fall hatte es sich gezeigt, dass es unwesentlich für den normalen Abbau ist, wenn nach einer gewissen Anlaufzeit keine Fermentsynthese mehr erfolgt.

Da durch 2,4-DB keine Verschiebung des Abbautrockengewichtsverhältnisses zustande kommt und ihre hemmende Wirkung auf Glukose viel schwächer ist, muss ihr Wirkungsmechanismus ganz spezifisch mit den zellulolytischen Fermenten verknüpft sein. In welcher Weise das möglich ist, dafür kann man sich drei Möglichkeiten denken:

1. Inaktivierung durch direkte Wechselwirkung zwischen Hemmstoff und Ferment,
2. Blockierung der Enzymsynthese oder
3. Inaktivierung zellulolytischer Enzyme zusammen mit anderen Enzymen.

Bevor hier nun eine Entscheidung getroffen werden soll, ist noch etwas über die 2,4-DB an sich zu sagen. Ihrem Wesen nach darf sie zu den Wuchsstoffen gezählt werden (Tielecke, 1967, und Davies et al., 1964). Über die mögliche Wirkungsweise kann man sich schon ein grobes Bild machen, wenn man in Arbeiten von Fan et al. (1967) nachliest, der mit β -Indolylessigsäure eine 12- bis 16fache Steigerung der Zellulasesynthese im Epikotyl von *Pisum sativum* feststellte.

Obwohl es sich bei meinen Versuchen um einen gänzlich anderen Organismus handelte, war doch ein Zusammenhang zwischen Wuchsstoff und Zellulasesynthese nicht von der Hand zu weisen. Tatsächlich konnte ich zeigen – und damit komme ich wieder auf die eingangs angedeuteten Möglichkeiten zurück –, dass die 2,4-DB spezifisch in die Synthesewege eingreift (vgl. Abb.14 und 15). Die Versuche mit dem 2,4-DNP und der 2,4-DB hatten ergeben, dass es entscheidend ist, wann der Wirkstoff hinzugegeben wird, da er nur auf die Fermentproduktion Einfluss nimmt. Kam

die 2,4-DB später hinzu (nach 6 Tagen), so zeigte sie nur noch unspezifische Wachstumshemmung je nach der Toxizität der verwendeten Konzentration (Abb.15). Wie speziell die Wirkungsweise der 2,4-DB war, hatten Versuche mit anderen C-Quellen gezeigt. Für CMC konnte eine eindeutige Förderung mit der optimalen Wirkstoffkonzentration von 5 ppm erreicht werden. Für Glukose und Cellobiose zeigte sich ebenfalls eine, jedoch wesentlich geringere Wachstumsförderung. Die optimale 2,4-DB-Konzentration betrug hier zweifelsfrei 1 ppm. Mit den verschiedensten Saccharidkonzentrationen wurde geprüft, ob die Wachstumsförderung auf CMC bzw. Glukose und Cellobiose nicht gleichen Ursprungs war, das heisst, dass die Wachstumsförderung auf CMC durch Wachstumsförderung aufgrund der durch den Abbau gebildeten Saccharide entstanden war. Die grundverschiedenen Resultate – optimale Inhibitorkonzentrationen, absolute Trockengewichte und Höhe der Wachstumsförderung (%) – schlossen diese Möglichkeit aus. Damit stand fest, dass *Aspergillus terreus* über drei verschiedene Fermente bzw. Fermentsysteme verfügte:

1. Zellulase
2. Polyglukosidasen
3. Glukosidasen bzw. Cellobiase

An anderer Stelle wurde schon erwähnt, dass verschiedene Autoren zur Unienzymtheorie neigen. Whitaker (1953) fand in seinen Untersuchungen mit *Myrothecium verrucaria* nur ein zellulolytisches Enzym. Er stützte seine Auffassung damit, dass er ein homogenes Material während der Elektrophorese und in der Ultrazentrifuge fand. Als ein weiteres Indiz sah er es an, dass die Aktivitätszunahme während der Reinigung seiner Enzympräparationen gegenüber fünf verschiedenen Substraten gleich war. Kooiman et al. (1953) stützten die Unienzymtheorie aufgrund der ähnlichen Thermostabilität der Zellulaseaktivitäten, die sie bei allen ihren Enzympräparationen gegenüber einer ganzen Anzahl von Substraten fanden. Thomas und Whitaker gingen sogar soweit (1958), die Vielfalt der Zellulasekomponenten, die von anderen Autoren gefunden worden waren, dahingehend zu interpretieren, dass ein und dasselbe Enzym Komplexe mit verschiedenen Polysacchariden bilden würde. Sie zeigten, dass Enzympräparationen, die vorher heterogen erschienen, wenn sie von Polysacchariden befreit wurden, elektrophoretisch nur noch als ein einziger Peak auftraten. Ähnliche Ergebnisse hatten Eriksson und B. Pettersson (1968) bei *Stereum sanguinolentum*. Andererseits gibt es viele Autoren, die die Multienzymtheorie bevorzugen. Hier wären Gilligan und Reese (1954), Hash (1957), Jermyn (1952, 1952a) und Miller et al. (1956) zu nennen. Neuere Arbeiten von Selby (1963) berichten wieder vom Vorkommen mehrerer Zellulasekomponenten. Auch Johansson (1966) und Bell et al. (1966) stehen auf dem Standpunkt der Multienzymtheorie. Aufgrund dieser vielfältigen Beobachtungen hat die Unienzymtheorie wahrscheinlich nur in einer beschränkten Anzahl von Fällen Bedeutung.

Auch meine Beobachtungen weisen deutlich auf das Vorhandensein von mindestens zwei Zellulasekomponenten hin. Dadurch, dass die 2,4-DB in die Synthesewege eingreift, wurde klar, dass diese Komponenten auf verschiedenen Wegen gebildet werden und nicht durch Umwandlung eines Zellulasetyps durch Komplexbildung mit Polysacchariden, Denaturierungs-, Oxydations- und andere mögliche Prozesse entstanden, wie sie Whitaker (1963) angibt. Ein weiteres Kriterium für zwei Komponenten zeigt sich in der ganz anderen Trockengewichtsfixierung. Auf CMC

wurde weit weniger Trockensubstanz gebildet als auf Papier. Gäbe es nur eine Zellulasegrundkomponente, dann müsste auch das Umwandlungsprodukt, das für den Abbau der CMC verantwortlich ist, durch die 2,4-DB gleichermassen gehemmt werden. Das war aber nicht der Fall. Der zweite Zellulasetyp, der auf CMC arbeitet, war wiederum verschieden von der Glukosidase bzw. Cellobiase, wie aus dem Verhalten gegenüber 2,4-DB hervorging.

Fasst man alle Beobachtungen zusammen, so kann man sagen, dass durch die 2,4-DB die Zellulaseproduktion gehemmt wird, die Polyglukosidasebildung aber gefördert ist. Anhand eines Trockengewichtsvergleiches (vgl. Abb.9 und Tab.8) lässt sich das Komponentenverhältnis (Zellulase zu Polyglukosidase) unter Normalbedingungen mit 4:1 und unter dem Einfluss der 2,4-DB mit 1:1 angeben. Diese Verschiebung geht also zugunsten der Polyglukosidase.

Aufgrund der Untersuchungen von Pettersson und Eaker (1968) konnten erstmals nähere Angaben über den Aufbau eines zellulolytischen Enzyms gemacht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen, so meine ich, klar auf den Zusammenhang dieser Enzymgruppe mit der Proteinsynthese hin. Aus diesem Grund dürften als zentrales Steuerungssystem die Ribosomen bzw. als übergeordnete Einheiten die m-RNS in Betracht kommen.

Die Arbeiten von Fan et al. (1967) zeigen mögliche Zusammenhänge zwischen Wuchsstoffen, RNS und Zellulase auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen in diesen Zusammenhang zu passen. Da durch die 2,4-DB, wenn sie in einer Konzentration von 5 ppm angewendet wird, die allgemeinen stoffwechselphysiologischen Prozesse nicht stark beeinflusst werden und da diesem Stoff Wuchsstoffcharakter zukommt, dürfte sein Angriffsort mit der Proteinsynthese zellulolytischer Fermente verbunden sein. Es wäre dabei an Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und den Ribosomen oder mit der m-RNS zu denken. Das würde dann auch gut die beinahe gleiche Wachstumsförderung (prozentuale) auf CMC erklären. Fällt nämlich ein Teil der Information (z. B. m-RNS) durch die 2,4-DB aus, so ist die Förderung anderer Informationen (z. B. Polyglukosidasebildung) aufgrund der auch in der Zelle geltenden Gleichgewichtsbedingungen denkbar.

Zusammenfassung

1. Der untersuchte Organismus (*Aspergillus terreus*) war gegenüber wasserlöslichen und wasserunlöslichen Zellulosen zellulolytisch aktiv.
2. Von den untersuchten Herbiziden beeinflusste 2,4-Dichlor-phenoxybuttersäure die zellulosespaltenden Enzyme spezifisch.
3. Auf aschefreien Rundfiltern konnte mit 2,4-Dichlor-phenoxybuttersäure (2,4-DB) eine *spezifische Hemmung* der Zellulase erzielt werden. Für 18 ppm betrug diese 50%.
4. Carboxymethylzellulose (CMC) wurde unter dem Einfluss von 2,4-DB stärker abgebaut. Optimale Wachstums- und Abbauförderung konnte mit einer 2,4-DB-Konzentration von 5 ppm erreicht werden.
5. Auf Glukose und Cellobiose wurde ebenfalls ein fördernder Effekt mit der 2,4-DB erzielt. Er war aber prozentual wesentlich geringer als auf CMC. Die optimale Konzentration betrug hier 1 ppm ($= 4 \times 10^{-6}$ Mol).

6. Die 2,4-DB griff in die Fermentsynthese ein.
7. Der Einfluss des Wuchsstoffherbizids war bezüglich der Nachkommenschaft (Sporenmaterial) reversibel, keine Nachwirkung.
8. Eine Adaption an den Wirkstoff konnte nicht beobachtet werden.
9. Nitrat- bzw. Ammoniummangel änderte nichts an der zellulolytischen Aktivität und deren Beeinflussung durch die 2,4-DB.
10. Neben Glukosidase und Cellobiase müssen mindestens zwei zellulolytische Enzyme angenommen werden.
11. Unter Normalbedingungen ist das Komponentenverhältnis von Zellulase und Polyglukosidase 4:1, und unter dem Einfluss der 2,4-DB beträgt es bei 5 ppm nahezu 1:1.

Die vorliegende Arbeit wurde im *Botanischen Institut der Universität Basel* unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber durchgeführt. Für sein Interesse an meiner Arbeit und für die grosszügige Überlassung der Institutsmittel danke ich ihm bestens. Mein weiterer Dank gilt Herrn cand. G. Schulke für die bereitwillige Hilfe, die er mir beim Ansetzen der Versuche geleistet hat.

Literatur

- Bell M.K. und J.H. Burnett. 1966. Cellulase activity of *Polyporus betulinus* (Basidiomyc.). *Ann. Appl. Biol.* **58** (1), 123–130.
- Davies D.D., J. Giovanelli, AP, und E.T. Reese. 1964. *Plant biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Adlard & Son Ltd., Bartholomew Press, Dorking.
- Eriksson K.E. und B. Pettersson. 1968. Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. II. Purification of the cellulase. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 142–148.
- und G. Pettersson. 1968. Studies on cellulolytic enzymes. V. Some structural properties of the cellulase from *Penicillium notatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 160–166.
- Fan Der-Fong und G.A. MacLachlan. 1967. Massive synthesis of RNA and cellulase in the pea epicotyl in response to IES (indolylacetic acid) with and without concurrent cell division. *Plant Phys.* **42** (8), 1114–1122.
- 1967a. Studies on the regulation of cellulase activity and growth in excised pea epicotyl sections. *Can. J. Bot.* **45** (10), 1837–1844.
- Fisher R.A. 1946. *Statistical methods for research workers*. 10. Auflage. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Fuchs W. 1926. *Die Chemie des Lignins*. Springer, Berlin.
- Gilligan W. and E. T. Reese. 1954: Evidence for multiple components in microbial cellulases. *Canad. J. Microbiol.* **1**, 90–107.
- Van Haga P.R. 1958. Complex forms of cellulase. *Nature* **182**, 1232–1233.
- Halliwell G. 1963. Measurement of cellulase and factors affecting its activity. In: *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials* (E.T. Reese, ed.). Pergamon Press, London.
- Hanstein E. 1960. Untersuchungen über die zelluloseabbauenden Enzyme von *Irpex lacteus* Fr. und *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **70**, 315–352. (Diss. Basel.)
- Haseloff O.W. und H.J. Hoffmann. 1965. *Kleines Lehrbuch der Statistik*. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Hash J.H. 1957. Cellulolytic enzyme systems of *Myrothecium verrucaria*. Th. D. Thesis, Va. Poly Inst., Blaksburg, Va.
- Hawker L.E., A.H. Linton, B.F. Folkes und M.J. Carlite. 1962. *Einführung in die Biologie der Mikroorganismen*. G. Thieme, Stuttgart.
- Jermyn M.A. 1952. Fungal cellulases. I. General properties of unpurified enzyme preparations from *Aspergillus oryzae*. *Austral. J. Sci. Res.* **5**, 409–432.
- 1952a. Fungal cellulases. II. The complexity of enzymes from *Aspergillus oryzae* that split β -glucosidic linkages, and their partial separation. *Austral. J. Sci. Res.* **5**, 433–443.

- Johansson M. 1966. A comparison between the cellulolytic activity of white and brown rot fungi. I. The activity on insoluble cellulose. *Phys. Plant.* **19** (3), 709–722.
- Karlson P. 1966. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 5. Auflage. G. Thieme, Stuttgart.
- King K.W. 1963. Endwise degradation of cellulose. In: *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials* (E.T. Reese, ed.). Pergamon Press, London.
- Kooiman P., P.A. Roelofsen und S. Sweeris. 1953. Some properties of cellulase from *Myrothecium verrucaria*. *Enzymologia* **16**, 237–246.
- Lembeck W.J. und A.R. Colmer. 1967. Effect of herbicides on cellulose decomposition by *Sporocytophaga myxococcoides*. *Appl. Microbiol.* **15** (2), 300–303.
- Lindner A. 1951. *Statistische Methoden*. 2. Auflage. Birkhäuser, Basel.
- Mandels M. und E.T. Reese. 1963. Inhibition of cellulases and β -glucosidases. In: *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials* (E.T. Reese, ed.). Pergamon Press, London.
- Miller G.L. und R. Blum. 1956. Resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **218**, 131–137.
- Müller E.P. 1963. Nichtsymbiontische Fixierung des Luftstickstoffs durch *Pisum sativum* L. und *Zea Mays* L. unter dem Einfluss von Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂). *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **67**, 218–270. (Diss. Basel.)
- Nisizawa K. und T. Kobayashi. 1953. Cellulose-splitting enzymes. Part 2. Mode of action of *Irpex*-cellulase upon its substrates. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **27**, 239–242.
- Parnas J.K. 1938. Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Modifikation nach Parnas und Wagner. *Zschr. f. analyt. Chemie* **114**, 261–275.
- Pettersson G. 1968. Studies on cellulolytic enzymes. III. Isolation of a cellulase from *Penicillium notatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 307–311.
- und L. Andersson. 1968. Influence of hydrogen ions on the stability and structure of a cellulase from *Penicillium notatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 497–503.
- und D.L. Eaker. 1968. Studies on cellulolytic enzymes. IV. Chemical and physicochemical characterization of a cellulase from *Penicillium notatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 154–159.
- Reese E.T. und H.S. Levinson. 1952. A comparison study of the breakdown of cellulose by microorganisms. *Physiologia Plantarum* **5**, 345–366.
- Rieder H. 1951. Über die Zuckeraufnahme von Hefezellen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **61**, 539–622. (Diss. Basel.)
- Rose A.H. 1965. *Chemical microbiology*. Butterworth & Co., London.
- Schaefer A. 1957. Über die Bildung und Wirkung eines zellulosespaltenden Fermentes aus Schimmelpilzen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **67**, 218–270. (Diss. Basel.)
- Schulke G. 1970. Über den Einfluss des Herbizids Prometrin auf das Wachstum und den Gehalt an Stickstoff von *Pisum sativum* L. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **80**, 341–373 (Diss. Basel.)
- Selby K. 1963. The effect of cellulolytic enzymes on some properties of cotton fibers. In: *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials* (E.T. Reese, ed.). Pergamon Press, London.
- Siu R.G.H. 1951. *Microbial decomposition of cellulose*. Reinhold, New York.
- Thomas R. und D.R. Whitaker. 1958. Zone electrophoresis of *Myrothecium* cellulase. *Nature* **181**, 715–716.
- Tielecke H. 1967. *Pflanzenschutzmittel*. 2. Auflage. Akademie-Verlag, Berlin.
- Whitaker D.R. 1953. Purification of *Myrothecium verrucaria* cellulase. *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 253–268.
- 1963. Criteria for characterizing cellulases. In: *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials* (E.T. Reese, ed.). Pergamon Press, London.