

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Stuttgart.)

Untersuchungen über den biologischen Abbau des Lignins durch Mikroorganismen.

Von
GERHARD FISCHER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. September 1952.)

Im Kreislauf der Naturstoffe haben die Pflanzenrückstände für die Bildung der organischen Bodensubstanzen, wie z. B. der Humusstoffe, große Bedeutung. So gelangen in der Landwirtschaft z. B. mit Ernterückständen und Stalldünger u. a. auch beachtliche Mengen von Lignin-substanzen in den Boden, die nach den Angaben verschiedener Forscher (LÖHNIS, WAKSMAN u. a.) jährlich etwa 1000 kg je Hektar betragen sollen. Ferner findet das Verhalten des Lignins zu holzerstörenden Organismen in den holzverarbeitenden Wirtschaftszweigen sowie im Holzschutz starke Beachtung und wachsendes Interesse.

Nun sind unsere Kenntnisse über die natürlichen Abbauvorgänge der leicht zersetzlichen Anteile der Pflanzenreste (Cellulose, Hemicellulosen, Pectine usw.) wesentlich tiefer und umfassender als diejenigen über die Ligninumwandlung, wenn man unter Lignin einen Naturstoffkomplex versteht, der nach den bisherigen Feststellungen organismisch sehr schwer zerstörbar ist. Dies mag seinen Grund in der schwierigen Isolierung solcher Lignin-substanzen aus den verholzten Zellmembranen der Pflanzen haben.

Die moderne technische Isolierung des Lignins schließt die rücksichtslose Anwendung chemisch stark wirkender Reagentien ein, die wahrscheinlich Veränderungen in dem Ligninkomplex herbeiführen, zum mindesten aber durch Substitution oder Einbau von Atom- bzw. Molekülgruppen der chemischen Aufschlußmittel den nativen Ligninkomplex nur mehr als „Ligninderivat“ erscheinen lassen. Solche technisch gewonnenen Lignine sind in der Natur jedoch nach den bisherigen Erfahrungen nicht anzutreffen. Es entsteht somit die Frage: Welcher Art ist Lignin, das z. B. in der Natur einem bakteriellen Angriff ausgesetzt ist? Ist solches Lignin nativer Art, oder welchen Prozeß der Umwandlung muß es durchmachen, um diesen Organismen als Nährstoffquelle zu dienen?

Die ersten Untersuchungen, in denen Bakterien beim Abbau des Lignins eine Rolle spielen¹, dürften die von H. PRINGSHEIM u. FUCHS (1923) sein. Sie fanden

¹ Wegen der Schwierigkeit der Literaturbeschaffung konnten einige, insbesondere ausländische Arbeiten leider nur als Referat herangezogen werden.

bei der Untersuchung des bakteriellen Abbaus eines selbst dargestellten Lignin-nährbodens eine Abnahme des Methoxylgehaltes des Lignins von 15,5% auf 10,72%. Eine Beteiligung von Bakterien an dem Abbau von Lignin können wir durch die Untersuchungen von BACH (1925), BALKS (1926), FALK (1928), WAKSMAN (1930, 1931) sowie PHILLIPS, WEIHE u. SMITH (1930) annehmen, in denen jedoch keine genauere Beschreibung der beteiligten Organismen gegeben wird. Erst DEMME (1932) beschreibt Bakterien, die er auf Alkalilignin-Nährböden isoliert hatte, und erwähnt eine Abnahme des Methoxylgehaltes. GOTTLIEB u. PELCZAR kommen in ihrem Sammelbericht jedoch zu einem negativen Ergebnis hinsichtlich der Beteiligung von Bakterien am Ligninabbau.

Das Geschick des Lignins in der Zersetzung der Pflanzenreste wurde häufig durch den Wechsel des Methoxylgehaltes erfaßt. Die Zulässigkeit dieser Methode ist jedoch problematisch, da andere Kohlenwasserstoffverbindungen, die in der Pflanze vorkommen, ebenfalls Methoxylgruppen besitzen.

Die wichtigsten Untersuchungen sowie eine Zusammenstellung der bedeutendsten Ergebnisse über den biologischen Abbau von Lignin liefern uns die jüngeren Arbeiten von WAKSMAN u. Mitarb. (1936, 1946) und die von FAHREUS (1944, 1947, 1949), in denen höhere holzerstörende Pilze (auch Cellulosezerstörung) berücksichtigt werden, sowie weitere Zusammenfassungen über Ligninzerstörung von CARTWRIGHT (1943) sowie von GOTTLIEB u. PELCZAR. WAKSMAN u. Mitarb. (1946) geben folgende Zusammenstellung der bisherigen Forschungsergebnisse: „Lignin leistet unter den chemischen Verbindungen der Pflanze den größten Widerstand gegen einen Angriff durch Pilze, Bakterien und Tiere, die in der Erde, in Sümpfen und im Kompost leben. Lignin häuft sich quantitativ nicht in demselben Zustande an, in welchem es in Pflanzen vorkommt, sondern es unterliegt einem langsamen Prozeß der Umwandlung. Gewisse spezifizierte Arten von Mikroorganismen, die reichlich unter den höheren Pilzen gefunden werden, sind fähig, eine aktive Zerstörung des Lignins herbeizuführen, häufig sogar in größerem Umfange als die der Cellulose und Hemicellulosen. Lignin ist der Zerstörung durch diese Organismen unterworfen, sofern es in frischen oder teilweise zerstörten pflanzlichen Geweben vorliegt. Wenn es jedoch in möglichst unveränderter Form hergestellt wird, ist es vollständig widerstandsfähig gegen einen Angriff seitens jener Organismen. Es wird stets entscheidend bleiben, welches der physikalische und chemische Zustand des Ligninkomplexes ist, der durch den Vorgang der Ligningewinnung verändert wurde. Die durch die mikrobiellen Vorgänge der Cellulosezerstörung, der Glucosefermentation und der Nitratbildung ausgelöste Wirkung auf das Lignin ist für den Ligninabbau nicht störend.

Die bisher bekannte Art der Ligninumwandlung besteht aus a) dem Verlust an Methoxylgruppen, b) einer Dunkelfärbung, begleitet von Sauerstoffabsorption, c) einer chemischen bzw. adsorptiven Bindung an Proteine, d) einem Anwachsen der Löslichkeit in Alkalien.“

Dieser kurze Überblick zeigt, daß über den biologischen „modus operandi“ der Ligninzerstörung und die dabei beteiligten Faktoren noch nicht sehr viel bekannt ist. Daher soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden, einen Beitrag zu dem Problem des Ligninabbaus in erster Linie durch biologische Vorgänge zu liefern.

Dazu wurden folgende Punkte untersucht: 1. Welcher Art sind die an Ligninumwandlungen beteiligten Organismen? 2. Welchen Bedingungen unterliegt der Vorgang biologischen Ligninabbaus und welches sind die dabei beteiligten Faktoren? 3. Welcher Art ist ein Lignin, das in der

Natur einem bakteriellen Abbau ausgesetzt war? Ist dieses Lignin nativer Art, oder welche Umwandlung muß es durchmachen, um als Nährstoffquelle für gewisse Organismen zu dienen? 4. Wie vollzieht sich eine solche Umwandlung?

A) Der biologische Abbau des Lignins.

I. Methodische Hinweise.

1. Nährböden.

Zur Anreicherung der ligninzeretzenden Mikroorganismen dienten die bekannten Nährlösungen A und S nach STAPP u. BORTELS, zu denen als C-Quelle 0,2% eines Ligninpräparates hinzugefügt wurden. Nährlösung A: 0,5 Natriumnitrat, 0,25 sec. Kaliumphosphat, 0,1 Magnesiumsulfat ad 1000,0 Aqua dest. Nährlösung S: 0,5 Ammoniumsulfat, 0,25 prim. Kaliumphosphat, 0,1 Magnesiumsulfat ad 1000,0 Aqua dest. Nährlösung S wurde mit Schwefelsäure auf ein p_H von 6,5, Nährlösung A mit Kalilauge auf p_H 7,5 eingestellt.

Die Gewinnung der Reinkulturen, deren Weiterzuchtung sowie die Durchführung der physiologischen Versuche erfolgte meist auf ligninhaltigen Nährmedien folgender Zusammensetzung: 2,0 Ligninpräparat; 0,75 Pepton bzw. 0,5 Ammoniumphosphat; 0,5 sec. Kaliumphosphat; 0,2 Magnesiumsulfat; 0,02 Eisen(III)-chlorid; ad 1000,0 Aqua dest.

2. Gewinnung der Ligninpräparate.

Cuproxamlignin in Folien, nach FREUDENBERG, ZOCHER u. DÜRR (1932), verändert.

Um eine visuelle Beobachtung sowie eine neue zunächst qualitative Bestimmung der bakteriellen Zerstörung des Lignins zu ermöglichen (nach einer Anregung von H. ULLRICH), dienten als Ausgangsmaterial dünne Furnierfolien von $1,5 \times 10$ cm und 0,1 mm Stärke. Zur Verhinderung einer allzu starken Deformierung der Folien durch den Celluloseentzug wurden diese durch Bestreichen ihrer Ränder mittels eines säure- und laugenfesten Klebstoffes auf Objektträgern befestigt. Ein vorheriges Anfräuen der Oberfläche der Objektträger mit Flußsäure empfiehlt sich.

Ammoniak- und Alkalilignin aus Stroh und destruiertem Holz.

Die Gewinnung dieser Ligninpräparate erfolgte im Prinzip nach den Richtlinien der Alkaliligningewinnung nach BECKMANN, LIESCHE u. LEHMANN (1932). Das Ammoniaklignin ist getrocknet und in fester Konsistenz von hellbrauner Farbe und löst sich in der Kälte völlig in Pyridin, Phenol, Eisessig, wenig in Alkohol und Aceton, besser in Mischungen von Alkohol oder Aceton mit Wasser (2:1) und ist nicht löslich in Wasser, Äther und Benzol. Jedoch löst sich dieses Ligninpräparat noch in einer nur 0,0014% ($\sim \frac{1}{1000}$ n) NH_3 enthaltenden wäßrigen Lösung völlig. In seinen Eigenschaften hinsichtlich der Löslichkeitsverhältnisse gleicht es vollständig denen der Alkali-Lignine. Färbungen mit WIESNERS Reagens und mit Anilinsulfat geben keine deutlich erkennbaren Reaktionen.

Phenollignin nach KALB, SCHOELLER u. MASTAGLIO (KLEIN 1932).

3. Bestimmung der Ligninrückstände.

Phenollignin: Die Kulturen wurden mit Äthyllessigäther nach WAKSMAN extrahiert und die Extrakte durch einen Scheidetrichter gewonnen. Dies wurde so lange wiederholt, bis alles Lignin zurückerhalten war. Die Extrakte wurden gesammelt und filtriert, die Rückstände noch mit Aceton ausgewaschen und dem

Filtrat hinzugefügt, hierauf die Extrakte auf einem Wasserbad bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Der Gewichtsunterschied zwischen Kontrolle und Versuch gab die Höhe der Ligninzerstörung an.

Alkali- bzw. Ammoniaklignin: Die Kulturen wurden auf der Nutsche kräftig abgesaugt, die Rückstände mit Wasser gewaschen, die gelösten Ligninrückstände mit 25%iger Salzsäure ausgefällt und 5 min gekocht. Nach wiederholtem Absaugen wurde das Lignin im Trockenschrank bis zu konstantem Gewicht getrocknet. Der Gewichtsunterschied zwischen der Kontrolle und den Versuchen zeigte den Grad der Ligninverminderung an.

II. Isolierung der Mikroorganismen.

Um die an der Ligninzerstörung beteiligten Mikroorganismen zu erfassen, wurde versucht, diese aus zerstörtem Holz (Holzpfähle) und aus Waldböden zu isolieren. Bekanntlich unterliegen Holzpfähle einer mehr oder weniger raschen Zerstörung der Teile, die in das Erdreich eingelassen sind, und hier wiederum die Partien des Pfahles, die sich an der Erdoberfläche befinden. Dies läßt die Annahme zu, daß die Bakterien, die an der Zerstörung des Holzes beteiligt sein können, aerob sein dürften bzw. daß oxydative Vorgänge mitwirken.

Um die zur Holzzerstörung befähigten Organismen zu isolieren, wurden kleine Holzstückchen aus zerstörten Partien von Holzpfählen entnommen, sauber von anhaftenden Erdteilen befreit und in der Reibschale durch vorsichtiges Stoßen zerbröckelt. Die zerkleinerten Holzsplitter wurden dann auf Silicagel-Nährböden, die neben den üblichen Mineralsalzen als C-Quelle Phenollignin enthielten, gestreut. Ein Teil der Splitter wurde in die Nährböden eingedrückt, so daß sie mit diesen in intensivere Berührung kamen.

Nach einer Einwirkungszeit von 8 Tagen und bei einer Temperatur von 28° C entwickelten sich in keinem Falle Bakterien, sondern nur vereinzelt *Penicillium*-Kolonien. Wurde jedoch die anhaftende Erde mit hinzugegeben, so breitete sich bereits nach 48 Std eine reiche Bakterienflora neben *Penicillium* aus. Daraus ergibt sich, daß entweder Bakterien, die fähig sind, Ligninsubstanzen des Holzes abzubauen, in diesem selbst fehlen, oder daß zu ihrer Entwicklung gewisse akzessorische Nährstoffe fehlen. Das Fehlen der Bakterien im Holz möchte sich wohl darauf zurückführen lassen, daß die Zellwandsubstanzen stickstofffrei sind und das Holz als Ganzes stickstoffarm ist (z. B. Fichte 0,1 % N, FINDLAY 1934) und nur unter Ausnutzung der im Boden schon vorhandenen Stickstoffverbindungen sowie von hinzukommenden Wuchsstoffen eine bakterielle Entwicklung möglich ist (siehe auch S. 409). In diesem Zusammenhang sind Arbeiten von FINDLAY (1934), WEHMER (1915) und ZYCHA (1940) erwähnenswert.

Diese Forscher untersuchten den Einfluß von stickstoffhaltigen Substanzen auf das Wachstum holzzerstörender Pilze. FINDLAY fand, daß Holzklötzchen, die mit Asparagin oder Pepton getränkt wurden, eine stärkere Zerstörung erfahren als Klötzchen, die mit Ammonverbindungen oder Nitraten behandelt wurden. Im

Gegensatz hierzu stellte ZYCHA fest, daß in Lehm eingebaute Holzklötzchen ebenfalls erheblich zerstört wurden, wenn der Lehm sowohl mit Nitraten als auch mit Ammonsulfat getränkt worden ist.

Weitere Ursachen für das Fehlen gerade aerober Bakterien im Holz selbst könnten sein, daß die O_2 -Spannung im Holz, besonders in grünem, sehr gering ist (siehe S. 418), ferner, daß diese im allgemeinen durch die Art ihres Wachstums nicht in der Lage sind, in ein festes Substrat tiefer einzudringen, im Gegensatz zu den Pilzen, die über ein ausgesprochenes Spitzenwachstum verfügen.

Nach solchen Feststellungen erfolgte nunmehr die Isolierung der ligninzerstörenden Mikroorganismen aus der Erde nach der Methode von WAKSMAN (1936). Es ließen sich aus Buchenwald- bzw. Fichtenwalderde zahlreiche Bakterien- und *Fusarium*-Arten isolieren, von denen jedoch nur die am stärksten ligninabbauenden, insgesamt 11 Bakterien- und 3 *Fusarium*-Stämme, zu Versuchszwecken berücksichtigt und beschrieben wurden (siehe Tab. 1 und 2). Die Bakterien der Fichtenwalderde erhielten die Bezeichnung *I F*, *II F* usw., die Bakterien der Buchenwalderde *I B*, *II B* usw. Am Ligninabbau sind danach vornehmlich Kurzstäbchen und Bakterien der *Chromogenes*- bzw. der *Fluorescens*-Gruppe beteiligt. Diese Beobachtung ist interessant in bezug auf die Forschungen von LIESKE u. HOFMANN (1928) über die Mikrobiologie der Kohlen und ihrer natürlichen Lagerstätten.

Die Verf. stellten fest, daß die Mikroflora, die auf Braunkohlen und im Innern derselben gefunden wurde, besonders aus Bakterien der *Fluorescens*-Gruppe besteht. Wahrscheinlich wird hier auf einen gewissen Zusammenhang zwischen dem Abbau des Lignins und der Bildung der Kohle durch eine bestimmte Bakteriengruppe geschlossen werden dürfen (vgl. die Arbeiten von FISCHER u. SCHRADER 1922 sowie von WAKSMAN 1946, die auf die Beteiligung von Pilzen und Bakterien an der Entstehung der Kohle hinweisen).

III. Wachstum der Mikroorganismen und ihre Zerstörungswirksamkeit auf verschiedenen Ligninpräparaten.

Zur genaueren Untersuchung des Abbaus bzw. der Zerstörung des Lignins durch Mikroorganismen wurde nunmehr versucht, diese Organismen auf isoliertem Lignin zu kultivieren; dazu wurden verschiedene Ligninpräparate herangezogen. Zu Beginn der Arbeiten wurden solche geprüft, die als Rückstände der Holzverarbeitenden Industrie anfallen, wie die Sulfitablaugen aus Buchen- und Fichtenholz sowie das aus diesen Laugen gewonnene lignosulfosaure Calcium¹, ferner die Ligninrückstände der Zellstoffgewinnung in fester Form. Neben diesen Ligninrückständen der Industrie kamen außerdem Cuproxamlignin, Alkalilignin und

¹ Zu einem späteren Zeitpunkt stellten uns die Aschaffener Zellstoff-Fabriken durch Herrn Prof. Dr. BERNHAUER lignosulfosaures Calcium freundlicherweise zur Verfügung, das noch eine kurze mikrobiologische Untersuchung erfuhr.

Phenollignin zur Verwendung. Diese Ligninpräparate sind durch die rücksichtslose Anwendung chemisch stark wirkender Reagentien ohne Ausnahme chemisch stark beansprucht. Sie sind deshalb nicht als natürliche Derivate des nativen Lignins anzusprechen. Die Ergebnisse, die mit

Tabelle 1. Die Ligninzerstörenden

Kultur	Habitus	Fundort	Gelatine-	
			Verfüssigung	Stichkultur
<i>I F</i> ¹	Kurzstäbchen 1,2 × 0,6 μ nicht sporenbildend	Fichten- walderde	stark	trichter- förmig
<i>II B</i>	dicke Kurzstäbchen 1,2 × 1 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	sehr stark	zylinder- förmig
<i>III B</i>	Doppel-Kurzstäbchen 3,6—4,8 × 1,2 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	schwach	trichter- förmig
<i>IV B</i>	längere Kurzstäbchen 6—10,8 × 1,2 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	keine	entfällt
<i>V B</i>	Doppel-Kurzstäbchen 2,4 × 1,2 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	schwach	schüssel- förmig
<i>VI F</i>	Kurzstäbchen 3 × 1,2 μ nicht sporenbildend	Fichten- walderde	keine	entfällt
<i>VII B</i>	Kurzstäbchen 1,2 × 0,8 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	keine	entfällt
<i>VIII F</i>	sehr kl. Kurzstäbchen 0,8—1,2 × 0,6—0,8 μ nicht sporenbildend	Fichten- walderde	sehr stark	zylinder- förmig
<i>IX B</i>	Kurzstäbchen 1,2 × 0,8 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	schwach	schüssel- förmig
<i>X B</i>	dicke Kurzstäbchen 1,2 × 1 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	stark	zylinder- förmig
<i>XI B</i>	längere Kurzstäbchen 6—8 × 1,2 μ nicht sporenbildend	Buchen- walderde	stark	zylinder- förmig

¹ Systematisch stehen alle isolierten Bakterien mit Ausnahme der Stämme *IV B* und *VI F* der Gruppe der *Chromogenes* am nächsten. Die Stämme *IV B* und *VI F* gehören zur *Fluorescens*-Gruppe. Eine genauere Bestimmung nach BERGEY war nicht möglich, da in seinem System Ligninbakterien nicht erwähnt sind. Die physio-

solchen Stoffen erzielt wurden, sind unter mikrobiologischen Gesichtspunkten interessant, lassen aber auf den Vorgang der Ligninumwandlung unter natürlichen Verhältnissen keine Schlußfolgerung zu, geben uns auch kein klares Bild und keine sichere Vorstellung darüber, in welcher

Organismen: Schizomycten.

Malzagar	Wachstum auf		Zerstörungswirkung in %		
	Bouillon	Kartoffel	Phenol-lignin	Alkali-lignin	Ammoniak-lignin
gut	gut, glänzend	braun, glänzend	52,5	24,0	—
gut	gut, glänzend	rosa, weißer Rand, trocken	75,0	10,1	13,0
gut	gut, glänzend	braun, heller Rand, warzig, glänzend	44,8	26,5	—
schwach	gut, trocken, warzig	hellrot, warzig, glänzend	60,7	15,1	—
gut	gut, glänzend	hellrosa, hellgelber Rand, trock.	28,2	35,4	36,9
schwach	gut, glänzend	rosa, trocken	37,0	22,7	—
gut	gut, glänzend	beige, glänzend	32,0	33,5	—
gut	gut, glänzend	braun, trocken	48,7	24,0	—
gut	gut	hellrosa, glänzend	—	—	46,5
gut	gut	braun, trocken	—	—	37,7
gut	gut	braun, trocken	—	—	50,9

logischen Merkmale der isolierten Bakterien stimmen mit denen der nach BERGEYS System am nächsten stehenden Bakterienarten nicht völlig überein. Eine Zuordnung könnte daher zu Irrtümern führen. Gramfärbung und Cellulosezerersetzung bei allen Formen negativ.

Form sich das Lignin der Pflanze befindet, das z. B. einem bakteriellen Aufschluß unterliegen kann. So wurden als voraussichtlich natürliche Ligninderivate biologisch, d. h. fermentativ erzeugtes Lignin (Destruk-

Tabelle 2. Die ligninzeretzenden Organismen: Pilze.

Organismus	Habitus	Mikroskopie	Zer- störungs- wirkung auf Phenol- lignin in %
<i>Trichoderma lignorum</i> Tode, syn. <i>Tr. viride</i>	in flüssigen Nährmedien Oberflächenmycel wattig, grüne Färbung durch Conidienbildung, Guttation, submerses Mycel von lockerer Konsistenz	Hyphen septiert, Conidien rundlich $3 \mu \varnothing$	34,6
<i>Alternaria tenuis</i> Nees	in flüssigen Nährmedien Oberflächenmycel dicht, wattig, hellbraun. Submerses Mycel flockig	Hyphen septiert, 4—7 μ breit, braune Conidien mehrzellig (3—8), $21-34 \times 8-14 \mu$	29,3
<i>Fusarium solani</i> App. et Wr.	in flüssigen Nährmedien Oberflächenmycel samtig, weiß-rosa, Guttation, submerses Mycel schleimig-zäh	Makrokon. leicht gekrümmt an den Enden zugespitzt, $14-40 \times 4-6 \mu$, Mikrokon. rundlich, septiert, 8 bis $10 \times 4-5 \mu$, Chlamydosp. intercalar u. termin.	37,5
<i>Fusarium nivale</i> Ces	Oberflächenmycel warzig, weiß, Guttation, submerses Mycel schleimig und sehr fest	Makrokon. kleiner, 17 bis $20 \times 3-4 \mu$, septiert, Mikrokon. $4-8 \times 2-4 \mu$, Chlamydosp. nicht vorhanden	57,3
<i>Fusarium spec.</i> (<i>Fus. lateritium</i> Nees ?)	Oberflächenmycel weiß, dicht, Guttation, submerses Mycel schleimig-zäh	Makrokon. gekrümmt, septiert, $24-38 \times 4-5 \mu$, Mikrokon. unseptiert, seltener, $5-8 \times 3-5 \mu$, Chlamydosp. nicht vorhanden	58,6
<i>Fusarium spec.</i> (<i>Fus. Merismoides</i> Cauda ?)	Oberflächenmycel samtig, weiß-rosa, Guttation, submerses Mycel sehr feste Konsistenz	Makrokon. septiert, 16 bis $24 \times 3-4 \mu$, sichelförmig, abgerundet, Mikrokon. selten, septiert, $4-6 \times 3-4 \mu$, Chlamydosp. intercalar	60,0
<i>Fusarium lactis</i> Pir. et Rib.	Oberflächenmycel trat wenig über den Flüssigkeitsspiegel hinaus, rosa, samtig, submerses Mycel schleimig, sehr zähe Konsistenz	Makrokon. kleiner, septiert, $9-24 \times 3-4 \mu$, Mikrokon. $6-10 \times 2-4 \mu$, Chlamydosporen nicht vorhanden	65,3

tion des Holzes durch *Merulius lacrymans*) und ein durch ammoniakalische Behandlung gewonnenes Ligninpräparat untersucht (siehe methodischer Teil S. 399). In Hinblick auf die hier gestellte Aufgabe kann in der vorliegenden Arbeit auf die Verwertung der Ligninrückstände aus der Industrie durch Mikroorganismen nur kurz eingegangen werden.

1. Ligninrückstände der Zellstoffgewinnung, Cuproxamlignin und biologisch erzeugtes Lignin.

Diese Ligninderivate sind unlöslich. Die Ligninrückstände der Zellstoffgewinnung, die etwa 4% an Sulfosäuren der Aufschlußmittel enthalten, ließen nach Neutralisation durch Alkalien und Zugabe von anorganischen Nährstoffen eine Entwicklung von Mikroorganismen nicht zu.

Ebenso ließ sich in keinem Falle ein Angriff von ligninzerstörenden Bakterien auf mit Nährlösung „STAPP A“ getränkte Cuproxam-Ligninfolien beobachten. Auch weitere mit Erdlösungen angesetzte Untersuchungen ließen keine Entwicklung von Ligninbakterien erkennen. Das gleiche gilt für das biologisch erzeugte Lignin (Destruktion des Holzes durch *Merulius lacrymans*), sozusagen ein natürliches Ligninpräparat¹.

Aus einer weiteren Versuchsreihe mit *Trichoderma lignorum* und den *Fusarium*-Arten *moniliforme*, *lactis*, *solani*, *merismoides* und *bulbigenum* ergab sich, daß auch diese keine Entwicklung zeigten². Ein vergleichender Versuch mit einem holzerstörenden höheren Pilz, *Polystictus versicolor*, ergab nur ein mäßiges Wachstum dieses Pilzes auf Cuproxamlignin, jedoch eine deutliche Aufhellung der angegriffenen Stellen.

Die untersuchten Lignine sind somit für biologische Studien nicht geeignet, und ein Nachweis der Ligninzerstörung in diesen Präparaten konnte deshalb auch nicht erbracht werden. Lignin unterliegt nur in löslicher Form einem biologischen Aufschluß, wie wir später noch zeigen werden.

2. Sulfitablaugen aus Buchen- und Fichtenholz, lignosulfosaures Calcium.

Die Untersuchungen mit Sulfitablaugen ließen sich nicht weiter verfolgen, da sich in den Abblaugen neben Lignin noch andere Kohlenwasserstoffverbindungen in angereicherterem Maße vorfanden. So enthalten sie nach SUNDMAN (1949) neben Ligninrückständen noch Hexosen, Pentosen, Uronsäuren und Spuren von unveränderter Cellulose. 85—90% des Hexosegehaltes entfallen auf die Mannose, die den dominierenden Zuckeranteil der Laugen darstellt.

¹ Nach den bisherigen Erfahrungen werden durch *Merulius lacrymans* keine Antibiotica gebildet, die das Wachstum von Bakterien hemmen.

² Die biologisch ausreichende Cu-Entfernung wurde durch Testversuche mit Bakterienkulturen bewiesen.

Eine üppige Organismenentwicklung fand bereits nach 48 Std in einer 1%igen Lauge, die mit einem Zusatz von 0,5% Natriumnitrat und 0,1% prim. Kaliumphosphat versehen wurde, statt. Der Schwefelwasserstoffgehalt wurde durch starke Durchlüftung und Neutralisation mittels Alkalien entfernt.

Das lignosulfosaure Calcium, aus Sulfitablaugen gewonnen, enthält die begleitenden Kohlenwasserstoffverbindungen nicht mehr. Eine Isolierung der Bakterienkolonien, die sich auf Nährböden, die dieses Lignin nebst anorganischem Nährsalz enthielten, entwickelten, wurde nicht vorgenommen, jedoch die Wachstumsintensität verschiedener niederer Pilze auf diesem Ligninmedium untersucht (Tab. 3). Nur *Trichoderma lignorum* und *Fusarium merismoides* ragen durch ihr kräftiges Wachstum aus den untersuchten Organismen hervor und können deshalb als geeignet betrachtet werden, lignosulfosaures Calcium als C-Quelle zu benützen.

Tabelle 3. Wachstum niederer Pilze auf lignosulfosaurem Calcium.

Organismus	Wachstum
<i>Fusarium argillaceum</i>	0
„ <i>aquaeductum</i>	3
„ <i>moniliforme</i>	0
„ <i>nivale</i>	1
„ <i>dimerum</i>	0
„ <i>equiseti</i>	1
„ <i>gramineum</i>	0
„ <i>lactis</i>	3
„ <i>lateritium</i>	0
„ <i>solani</i>	0
„ <i>semitectum</i>	1
„ <i>expansum</i>	0
„ <i>merismoides</i>	4—5
„ <i>bulbigenum</i>	3
„ <i>poae</i>	0
<i>Trichoderma Koningi</i>	1
<i>Trichoderma lignorum</i>	4

Ziffernerklärung: 6 = üppig, 5 = sehr gut, 4 = gut, 3 = mäßig, 2 = schwach, 1 = sehr schwach, 0 = keine Entwicklung.

3. Phenollignin.

a) Eigenschaften des Phenollignins.

Durch die Gewinnung des Lignins aus extrahiertem Holzmehl mittels wasserfreien Phenols wird das Phenol an den Ligninkomplex angelagert bzw. eingebaut. Über die Bindung des Phenols herrscht jedoch noch keine Klarheit.

Nach FREUDENBERG u. DÜRR (1932) kann es sich um Anlagerung des Phenolhydroxylys an (während des Aufschlusses entstandene) Äthylenbildungen des aliphatischen Ligninanteils, aber auch um Kernkondensation mit den aliphatischen Hydroxylgruppen des Lignins handeln. Daß jedoch bei der Bildung von Phenollignin Phenol zweifellos in den Ligninkomplex eintritt, hat JONAS (1921) gezeigt.

Es ergibt sich also die Frage: Wird, falls Phenollignin durch Mikroorganismen verwertet wird, direkt das Ligninmolekül angegriffen oder unterliegt nur das angelagerte bzw. eingebaute Phenol einem biologischen Aufschlusse und kann somit den Organismen als Kohlenstoffquelle dienen? Um dies zu klären, wurden zwei Versuche durchgeführt. MYERS (1928), BARTELS (1940) u. a. beschrieben bereits phenolabbauende Bakterien, so daß zum Vergleich die folgenden Versuche mit Bakterien, die fähig sind, Lignin zu zerstören, ausgeführt wurden.

Tabelle 4. *Farbreaktionen des Phenollignins.*

1. reines Phenollignin	Farbreaktion mit Phloroglucin + Salzsäure = keine Färbung
2. wie bei 1.	Farbreaktion mit FeCl_3 = keine Violett-färbung
3. reines Phenollignin nach Aufschlußversuch mit konz. HCl (erwärmt)	Farbreaktion mit Phloroglucin + Salzsäure = keine Färbung
4. wie bei 3.	Farbreaktion mit FeCl_3 = keine Violett-färbung
5. abgebautes Phenollignin	Farbreaktion mit Phloroglucin + Salzsäure = keine Färbung
6. wie bei 5.	Farbreaktion mit FeCl_3 = keine Violett-färbung
7. abgebautes Phenollignin nach Aufschlußversuch mit konz. HCl (erwärmt)	Farbreaktion mit Phloroglucin + Salzsäure = keine Färbung
8. wie bei 7.	Farbreaktion mit FeCl_3 = keine Violett-färbung

Als erstes untersuchten wir die Farbreaktionen des Phenollignins unter Berücksichtigung des Lignins und des Phenols. Das Ausbleiben der Farbreaktion mittels Phloroglucin-Salzsäure ist bekannt (KLEIN 1932), doch sind auch sie in Tab. 4 der Vollständigkeit halber mit aufgeführt. Es wurden Phenolligninproben untersucht, die sich in frischem, nicht angegriffenem Zustande befanden, und solche, die durch bakterielle Tätigkeit bereits abgebaut bzw. zerstört waren. Weder reines noch abgebautes Phenollignin zeigt eine Farbreaktion (Tab. 4). Alle üblichen Lignin- und Phenolreaktionen blieben aus. Das Phenolmolekül muß demnach fest in den Ligninkomplex eingebaut worden sein und auch die Vanillin-gruppe, die in erster Linie für die Phloroglucinreaktion verantwortlich ist, blockiert haben. Nach FREUDENBERG (1932) reagiert die Aldehyd-gruppe des Hadromalkomplexes mit dem Phenol unter Kernkondensation. Auch der Abbau des Phenollignin-Moleküls muß in einer Weise erfolgen, daß weder die Vanillingruppe noch eventuell frei werdendes Phenol nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer Versuch über das Wachstum der phenolligninabbauenden Bakterien auf Phenol verschiedener Konzentration sollte die Frage

klären, ob reines Phenol in Gegenwart der üblichen Mineralsalze von diesen Organismen als C-Quelle verwertet wird (Tab. 5).

Tabelle 5. *Wachstum Phenollignin abbauender Bakterien auf Phenol verschiedener Konzentration.*

Konzentration des Phenols in %	Bakterien aus Erdlösung	Ligninbakterien
0,2	keine Entwicklung	keine Entwicklung
0,1	keine Entwicklung	keine Entwicklung
0,04	leicht milchige Trübung	keine Entwicklung
0,02	stärkere Trübung, grün-gelbliche Fluoreszenz, leichte Hautbildung	leicht milchige Trübung
0,013	starke Trübung, Fluoreszenz, Hautbildung	stärkere Trübung
0,01	leichte Trübung	leichte Trübung

Die Tabelle zeigt, daß bei einer Konzentration des Phenols von 0,04% in der mit Bakterien aus einer Erdlösung beimpften Nährlösung eine schwache Entwicklung eintritt. Die Phenollignin-Bakterien verwerten jedoch das gebotene Phenol erst von einer Konzentration von 0,02% an. Der Versuch zeigt deutlich, daß in der Erde phenolabbauende Bakterien vorkommen, die erst in Gegenwart von 0,094% Phenol und höher nach BARTELS (1940) als phenolverwertende Organismen anzusprechen sind. Diese Konzentration ist jedoch bedeutend höher als diejenige, bei welcher die Ligninbakterien zur Entwicklung gelangen. Die Phenolligninbakterien können aus diesem Grunde nicht als ausgesprochene Phenolverwerter bezeichnet werden, da sie nicht wie diese eine höhere Konzentration des Phenols als 0,02% vertragen.

b) *Bakterien auf Phenollignin.*

Durch den präparativen Aufschluß des Ligninkomplexes mittels wasserfreien Phenols wird das Lignin in eine lösliche Form übergeführt, die offenbar geeignet ist, mannigfachen Organismen als Kohlenstoffquelle zu dienen. Die aus Walderde isolierten Bakterien (Tab. 1) zeigen in einem Ligninderivat nebst Mineralsalze enthaltenden flüssigen Nährmedium (siehe Methodik S. 399) bei 28°C, dem Temperaturoptimum, eine unterschiedliche Abbautätigkeit, wie Abb. 1 zeigt.

Die Abnahme des Phenollignins geht in Reinkulturen der Bakterien maximal nicht über 75% hinaus. In Mischkulturen jedoch erhöht sie sich — wie später noch gezeigt werden wird — in einem Fall bis auf 91,5%. Der stärkste Abbau erfolgt innerhalb von 14 Tagen und nimmt dann mehr oder weniger rasch ab. Nach 3 Wochen erfolgte im allgemeinen

kein nennenswerter Abbau mehr, und nach Ablauf von 4 Wochen ließ sich in keinem Versuchskölbchen eine Minderung des Ligningehalts mehr nachweisen (Bestimmungsmethode siehe unter methodische Hinweise S. 399). Dabei weisen die aus Buchenwalderde isolierten Bakterien eine größere Streuung auf als die aus Fichtenwalderde stammenden. Letztere verfügen über eine ziemlich einheitliche Zerstörungsintensität bis zu durchschnittlich 44% (siehe Abb. 1).

c) *Einfluß verschiedener Stickstoffquellen.*

Der Angriff ligninzerstörender Bakterien wurde bei den bisherigen Versuchen nach Zugabe einer organischen Stickstoffquelle in Form von Pepton verfolgt. Um das Ligninderivat als einzige Kohlenstoffquelle zu sichern, wurde der Einfluß eines anorganischen N-Salzes in Form von Ammoniumphosphat — $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — auf den Abbau des Lignins untersucht (Tab. 6).

Es zeigte sich, daß Lignin auch nach Zugabe einer anorganischen Stickstoffverbindung angegriffen wird. Pepton wirkt jedoch bei allen angewandten Ligninbakterien etwas besser als Ammoniumphosphat. Die Unterschiede bewegen sich zwischen 0,7 und 4,8% maximal.

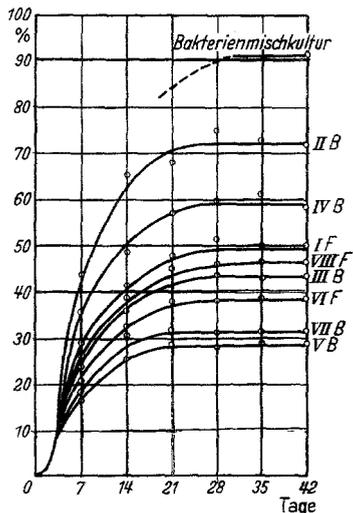


Abb. 1. Zerstörung von Phenol-Lignin durch verschied. Bakterien.

Tabelle 6. *Einfluß einer anorganischen Stickstoffverbindung — $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — auf die Zerstörungsintensität von ligninzerstörenden Bakterien.*
Versuchsdauer 28 Tage, Temperatur 28° C.

Stamm	Kont. mg	Rest mg	abgebaut	
			mg	%
I F	84	43	41	48,7
II B	84	23	61	72,5
III B	84	50	34	40,0
IV B	84	34	50	60,0
V B	84	61	23	27,5
VI F	84	57	27	32,5
VII B	84	60	24	30,0
VIII F	84	45	39	46,2
Mischkultur	84	14	70	82,8

Wir dürfen also annehmen, daß die Zugabe von Proteinen das Wachstum von ligninzerstörenden Bakterien fördert und damit auch eine Steigerung ihrer ligninabbauenden Tätigkeit erreicht wird.

d) *Einfluß verschiedener Holzarten.*

Buchenholz-Lignin und Fichtenholz-Lignin weisen unterschiedliche Zusammensetzung auf. Das drückt sich bereits durch den höheren Methoxylgehalt des Lignins im Buchenholz aus (nach FREUDENBERG besitzt Buchenholz-Lignin 21—22% Methoxylgehalt, Fichtenholz-Lignin 16 bis 17%). Inwieweit können nun die Lignine der verschiedenen Holzarten — im Extrem Laubholztyp (Lignin aus dem Holze von *Carpinus betulus* L.) und Nadelholztyp (Lignin aus dem Holze von *Picea excelsa* Link) — einer unterschiedlichen Zerstörung durch ligninangreifende Bakterien unterliegen? Sind etwa die Ligninbakterien jeweils an eine bestimmte Holzart gebunden oder vermögen sie generell jedes oder nur jedes genuine Lignin anzugreifen? Leider konnten zu dieser Frage bisher nur Versuche mit Phenollignin angestellt werden, das in der Natur nach den bisherigen Erfahrungen nicht auftritt.

Tabelle 7. *Zerstörungsintensität verschiedener Bakteriengemeinschaften in Phenollignin aus Buchen- bzw. Fichtenholz.*

	Ver- suchsdauer Tage	Kontrolle mg	Rest mg	abgebaut	
				mg	%
Bakterienstämme <i>II B, III B, IV B, V B, VII B</i> (aus Buchenwalderde).					
Buchenholz-Lignin . . .	42	83	7	76	91,5
Fichtenholz-Lignin . . .	42	87	18	69	79,3
Bakterienstämme <i>IF, VIF, VIIF</i> (aus Fichtenwalderde).					
Buchenholz-Lignin . . .	42	83	15	64	77,1
Fichtenholz-Lignin . . .	42	87	10	77	88,5

So vermögen auch die folgenden Untersuchungen mit Phenollignin aus Buchen- bzw. Fichtenholz nur Erkenntnisse zu liefern, die technisch von Bedeutung sein können (Tab. 7). Nach 42 Tagen Einwirkungsdauer machte sich eine deutlich unterscheidbare Abbautätigkeit der Bakterien verschiedener Herkunft bemerkbar. Das aus Buchenholz gewonnene Lignin wird durch aus Buchenwalderde isolierte Bakterien stärker abgebaut als durch Bakterien, die in Fichtenwalderde gefunden wurden. Ebenso verwerteten die Bakterien der Fichtenwalderde Fichtenholz-Lignin besser als Buchenholz-Lignin. Die Untersuchungen deuten also darauf hin, daß das nach FREUDENBERG methoxylärmere Lignin (Nadelholztyp mit Guajacylresten) einem geringeren Abbau unterliegen würde als das methoxyreichere Lignin (Laubholztyp mit Syringylresten). Doch dürfte dies eine Folge des verschiedenen Abbaus durch die zu diesen Versuchen herangezogenen Bakterienarten sein. Wir dürfen aus obigen Ergebnissen wohl folgern, daß die einzelnen Arten der Bakterien, die

für fähig befunden wurden, Lignin zu zerstören, spezifiziert sind und somit eine gewisse natürliche Anpassung an die verschiedenen Lignine bzw. Holzarten vorzuliegen scheint.

e) *Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.*

Die Anpassung der Ligninbakterien an verschiedene Lignine erfährt zudem noch eine Unterstützung durch die Wasserstoffionen-Konzentration in den edaphischen Faktoren der Umwelt. Es wurden nämlich bei den Bodenproben, aus denen die beschriebenen und isolierten Bakterien stammen, folgende durchschnittlichen p_H -Werte gemessen: Fichtenwalderde p_H 6,8/6,7; Buchenwalderde p_H 7,44. Die Proben aus Buchenwalderde sind demnach als neutral bis leicht alkalisch zu bezeichnen, die Proben der Fichtenwalderde als neutral bis leicht sauer.

Tabelle 8. *Zerstörungswirkung der Ligninbakterien bei verschiedenen p_H -Werten.*

Lignin von	Versuchsdauer Tage	Stamm	p_H -Wert	Kontrolle mg	Rest mg	abgebaut				
						mg	%			
Buchenholz	28	<i>II B</i>	7,5	80	22	58	72,5			
		<i>III B</i>			48	32	40,0			
		<i>IV B</i>			32	48	60,0			
		<i>V B</i>			60	20	27,5			
		<i>VII B</i>			56	24	30,0			
	28	Mischkultur	7,5	78	11	67	85,9			
		<i>II B</i>			34	48	58,7			
		<i>III B</i>			59	23	28,0			
		<i>IV B</i>			41	41	50,0			
		<i>V B</i>			69	13	15,8			
28	<i>VII B</i>	6,5	82	66	16	19,5				
	Mischkultur			6,5	81	25	56	69,1		
	<i>I F</i>					7,5	81	42	39	48,1
	<i>VI F</i>							55	26	32,1
	<i>VIII F</i>							44	37	45,6
Fichtenholz	28	Mischkultur	7,5			81	17	64	79,0	
		<i>I F</i>		48	36		42,8			
		<i>VI F</i>		61	23		27,3			
	28	<i>VIII F</i>	6,5	84	49	35	41,6			
		Mischkultur			6,5	83	27	56	67,4	

Um die Einwirkung der Wasserstoffionen-Konzentration zu untersuchen, wurden Phenollignine aus Buchen- bzw. Fichtenholz unter Einstellung des p_H -Wertes auf 7,5 als schwach alkalisches und auf 6,5 als schwach saures Medium verwendet (siehe Tab. 8). Die aus Fichtenwalderde isolierten Bakterien besitzen eine geringere Abnahme der Zerstörungswirkung bei einem Übergang vom alkalischen in den sauren

Bereich als die aus Buchenwalderde isolierten. Der Unterschied des prozentualen Abbaus beträgt bei den Bakterien aus Fichtenwalderde nur 4,7—11,6%, bei denen aus Buchenwalderde jedoch 11,6—16,8%. Es kann somit angenommen werden, daß die untersuchten ligninzerstörenden Bakterien, die aus dem schwach sauren Fichtenwaldboden stammen, eine natürliche Anpassung an dieses Milieu besitzen und eine höhere Wasserstoffionen-Konzentration vertragen als die Bakterien, die dem alkalischeren Buchenwaldboden entnommen wurden.

Tabelle 9. Zerörungswirkung Phenollignin abbauender Bakterien in Alkalilignin.

Versuchsdauer Tage	Stamm	Kontrolle mg	Rest mg	abgebaut	
				mg	%
35	I F	158	120	38	24,0
	II B		142	16	10,1
	III B		116	42	26,5
	IV B		134	24	15,1
	V B		102	56	35,4
	VI F		122	36	22,7
	VII B		105	53	33,5
	VIII F		119	39	24,0
	I—VIII		94	74	40,5

f) Einfluß von Phenollignin-Bakterien auf Alkali-Lignin.

Durch Behandeln extrahierten Holzes mittels wasserfreien Phenols tritt dieses mit dem Lignin in Reaktion und führt dadurch zur Bildung von Oxyphenylresten im Ligninmolekül im Gegensatz zum alkalischen

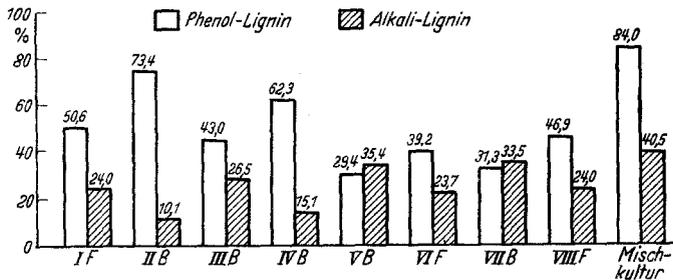


Abb. 2. Vergleich der Lignin-Bakterien auf Phenol- und Alkali-Lignin-Nährböden.

Aufschluß verholzter Fasern, der zur Bildung von vorher nicht vorhandenen Carboxyl- oder Phenolgruppen führt (Ligninsäuren). Es entsteht die Frage: Wie verhalten sich die bisher beschriebenen Phenollignin zerstörenden Bakterien gegenüber Alkalilignin und wie wirkt sich die unterschiedliche Gewinnung und der Charakter dieser löslichen Ligninpräparate aus? Daher wurden Phenollignin abbauende Bakterien

in Alkalilignin untersucht (Tab. 9). Wir sehen, daß die Phenollignin-Bakterien ebenfalls in der Lage sind, wenn auch in geringerem Maße, lösliches Lignin, das durch alkalischen Aufschluß gewonnen wurde, anzugreifen. Eine Spezialisierung derselben scheint jedoch vorzuliegen (Abb. 2), da die am stärksten Phenollignin abbauenden Bakterien Alkalilignin nur schwach verwerten können.

g) *Niedere Pilze und Phenollignin.*

Weiterhin ergab sich die Frage, ob außer Bakterien noch andere das Erdreich bewohnende Mikroorganismen an der Beseitigung der Ligninrückstände beteiligt sind und welche Einwirkung sie auf das Lignin besitzen. Reinkulturen von Bodenorganismen ergaben nach WAKSMAN u. Mitarb. (1931, 1936, 1946) einen Angriff von *Trichoderma* auf Pentosane und Cellulose des Weizenstrohs, nicht aber auf das Lignin. *Actinomyceten* sollen aber neben Cellulose und Fettsubstanzen etwas Lignin angreifen. Weit stärker ist die Zersetzungstätigkeit einer Mischflora (Bodenpopulation); *Fusarium* und *Alternaria* üben auf isoliertes Lignin eine unterschiedliche Einwirkung aus. Etwas Lignin ist in allen Fällen zerstört worden.

Im folgenden sind Untersuchungen an Pilzen (*Fungi imperfecti*), die teils in Walderde, teils auf sich zersetzendem Holz leben, hinsichtlich ihrer Wachstumsfähigkeit sowie ihres Zerstörungsgrades auf isoliertem Lignin mitgeteilt.

Kulturkölbchen, die Phenollignin als C-Quelle neben den üblichen Mineralsalzen (siehe Methodik S. 399) enthielten, wurden mit frischem, lebensfähigem Pilzmycel beimpft und die Ergebnisse nach 35 Tagen Einwirkungsdauer festgestellt (Tab. 10).

Tabelle 10. *Zerstörungswirkung verschiedener Fungi imperfecti auf Phenollignin.*

Organismus	Kontrolle mg	mg Rest	abgebaut	
			mg	%
<i>Stemphylium botryosum</i> var. <i>botrytis</i>	75	56	19	25,3
<i>Stemphylium</i> spec.		67	8	10,6
<i>Alternaria tenuis</i>		53	22	29,3
<i>Macrosporium</i> spec.		61	14	18,6
<i>Trichoderma Koningi</i>		62	13	17,3
<i>Trichoderma lignorum</i>		49	26	34,6
<i>Fusarium</i> spec.		31	44	58,6
<i>Fusarium solani</i>		47	28	37,3
<i>Fusarium dimerum</i>		57	18	24,0
<i>Fusarium</i> spec.		30	45	60,0
<i>Fusarium nivale</i>		32	43	57,3
<i>Fusarium lactis</i>		26	49	65,3

Die Gattung *Fusarium* Link stellt einige Vertreter, die auf Lignin üppiges Wachstum entwickeln. Abb. 3 zeigt auf der rechten Seite Luftmycel von *Fusarium lactis* Pir. et Rib. in einem Versuchskölbchen auf Phenollignin in flüssigem Medium und läßt deutlich eine starke schwarze Pigmentbildung erkennen, die vom Organismus in die umgebende

Nährflüssigkeit abgeschieden wird. Das Luftmycel verfärbt sich dagegen wesentlich schwächer. Entsprechende Beobachtungen konnten bei allen untersuchten Fusarienstämmen gemacht werden, die auf ligninhaltigen Nährböden gezüchtet wurden.

Bemerkenswert ist, daß *Trichoderma lignorum* Lignin in doppelt so starkem Grade abbaut als *Tr. Koningi* (34,6% gegen 17,3%). Trotz der lebhaften Entwicklung von Luft- und submersem Mycel wird Phenollignin nicht so gut verwertet wie von *Fusarium*. Die Abbautätigkeit von *Stemphylium botryosum* var. *botrytis* und *Alternaria tenuis* ist nicht erheblich.

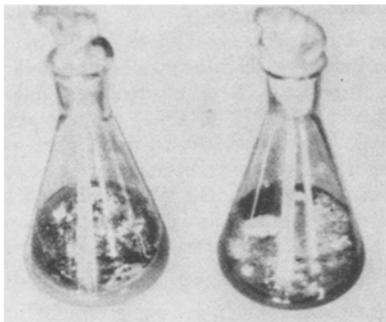


Abb. 3. *Trichoderma lignorum* und *Fusarium lactis* in Phenollignin nach 35 Tagen.

Lignins durch *Fusarium*-Arten ist durch die außerordentlich starke Farbstoffbildung gekennzeichnet.

h) Basidiomyceten (holzzerstörende Hymenomyceten) auf Phenollignin.

Es ist bekannt, daß durch die höheren holzzerstörenden Pilze in der Zerstörung des Holzes zwei Wege beschritten werden. Bei der Weißfäule (nach FALCK Korrosion) bleibt Cellulose zurück, die Ligninbausteine werden wegoxydiert. Bei der Braunfäule (nach FALCK Destruktion) handelt es sich um einen intensiven Humifizierungsprozeß, wobei die Cellulose zerstört wird, während das Lignin mehr oder weniger sekundär verändert zurückbleibt. Die ligninzerstörenden Pilze müssen demnach über Ektoenzyme verfügen, die das genuine Ligninmolekül angreifen und wenigstens bis zu wasserlöslichen, diffusiblen Bruchstücken zerlegen können (siehe S. 419). Solche Enzyme werden besonders von jungen wachsenden Mycelspitzen ausgeschieden (BOSE 1939). *Merulius domesticus* (Normstamm *M 36 Uerdingen*), mit dem im folgenden gearbeitet wurde, verzehrt in erster Linie Cellulose und baut aus der Ligninsubstanz nur den Kohlenhydratanteil (Hemicellulosen) ab. Die polymeren aromatischen Komplexe bleiben zurück (FALCK 1926, KÜRSCHNER 1927). *Merulius* verfügt also über keine Enzyme, die das Lignin anzugreifen vermögen.

Trotz dieser Tatsache wurde das Verhalten des Cellulose zerstörenden *Merulius domesticus* gegen Phenollignin untersucht, das aus von Meruliusfäule destruiertem Holze gewonnen wurde (siehe Methodik S. 399), um die Frage zu klären, inwieweit dieser Pilz in der Lage ist, zurückgelassenes Lignin, sogenanntes „biologisches Lignin“, nachdem es in eine lösliche Form gebracht wurde, weiter zu verwerten. Solches widersteht,

wie bereits festgestellt, in freiem ungelösten Zustande allen Angriffen ligninzerstörender Mikroorganismen. Das Ergebnis übertraf alle Erwartungen, denn die Wuchsfreudigkeit von *Merulius* auf Phenollignin bei Zimmertemperatur (vgl. Abb. 4) war überaus stark und nur wenig schwächer als das einer Kontrolle auf Malzextraktlösung, nämlich je Tag 3,5 gegenüber 4 mm (große Petrischalen von 130 mm Durchmesser). Das

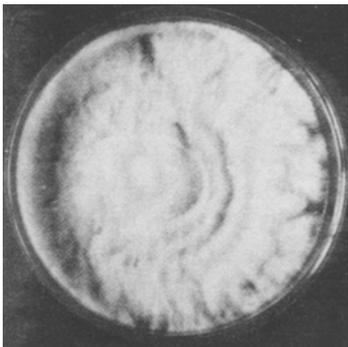


Abb. 4. *Merulius domesticus* auf Phenollignin nach 22 Tagen.

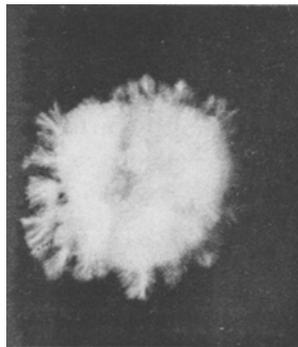


Abb. 5. *Polystictus versicolor* auf Phenollignin nach 15 Tagen.

Trockengewicht des Mycels betrug nach 42 Tagen 249 mg bzw. 298 mg bei 40 cm³ Nährlösung. Der Grad der Ligninzerstörung wurde nicht bestimmt, da der Pilz sich in flüssigem Medium nicht kultivieren ließ, sondern nur auf Agar-Nährböden. Dies mag eine Folge der Benetzbarkeit der Pilzhyphen sein, die ein Untertauchen der Hyphen unter den Flüssigkeitsspiegel der Nährlösung herbeiführt. Weiterhin erschwert die hohe O₂-Bedürftigkeit des Pilzes ein submerses Wachstum.

Zusammenfassend dürfen wir feststellen, daß der Cellulose zerstörende *Merulius domesticus* fähig ist, Lignin zu verwerten, wenn dieser aromatische Komplex in eine lösliche Form übergeführt worden ist.

Ein weiterer holzerstörender Pilz, *Polystictus versicolor* (Stamm P 21 Jahn), ließ nicht ganz dieselbe Wuchsfreudigkeit erkennen wie *Merulius domesticus* (Abb. 5). Die Aufnahme zeigt den Pilz nach einer Entwicklung von 15 Tagen auf Phenollignin. Das tägliche Längenwachstum betrug 2,1 mm, das einer Kontrolle auf 4%iger Malzextraktlösung 2,6 mm; Myceltrockengewicht nach 44 Tagen 104 mg bzw. 128 mg bei 40 cm³ Nährlösung. Dieser Pilz ist somit ebenfalls fähig, Lignin in löslicher Form zu verwerten. PELZAR, GOTTLIEB u. DAY (1950) stellten jedoch fest, daß die Adsorption von Ligninsulfonat durch *Polystictus versicolor* eine Verarbeitung vortäuschen kann.

7. Ammoniaklignin.

a) Allgemeines.

Die in dieser Arbeit verwendeten Ligninpräparate waren, ebenso wie die in früheren Arbeiten von anderen Autoren benutzten, ausnahmslos Stoffe, die im Laboratorium bzw. in der Technik durch die Anwendung chemisch stark wirkender Reagenzien gewonnen wurden. Selbst Cuproxamlignin, das durch Herauslösen der Cellulose aus dem Holzkörper erzielt wird und dem nativen Lignin nahezukommen scheint, ist ein Lignin, das ebenfalls auf dieselbe Art hergestellt wurde. Diese „technischen Ligninderivate“ jedoch sind in der Natur nach den bisherigen Erfahrungen nicht anzutreffen, obwohl einige von ihnen, wie die Alkali- und Phenollignine, einem Angriff von Mikroorganismen unterliegen können. Die letzteren werden zu löslichen Ligninen gerechnet, deren Löslichkeit eine Voraussetzung für die Zerstörung eben durch jene Organismen ist. Welche Umwandlung des nativen Lignins bzw. welcher Wechsel in dem physikalischen oder chemischen Zustand des Ligninmoleküls muß nun während des Abbauvorgangs der ganzen Pflanze in der Natur stattfinden, um einen Angriff von solchen Mikroorganismen zu ermöglichen, die kein das native Lignin lösendes Enzym besitzen? Das genuine Lignin als solches ist ja unlöslich.

Es ist eine auffallende Tatsache, daß frischer Kompost, Stalldünger sowie junge Pflanzen bei ihrer Zerstörung eine verhältnismäßig rasche Abnahme ihres Ligningehaltes aufweisen im Gegensatz zu älteren Pflanzen. So ist auch Lignin der Zerstörung durch Mikroorganismen unterworfen, sofern es in frischen oder teilweise zerstörten pflanzlichen Geweben vorliegt. Wenn es jedoch in reiner Form hergestellt ist, ist es vollständig widerstandsfähig gegen eben diese Organismen (DEMME 1932, NORMANN 1935, WAKSMAN 1931 und 1936).

Ehe wir auf das Verhalten des Lignins im besonderen eingehen, müssen wir die chemischen Umwandlungen im Holz als Ergebnis seiner Zerstörung charakterisieren. ROSE u. LISSE (1917) haben bereits gezeigt, daß mit dem Fortschreiten der Holzerstörung (Abnahme des Cellulosegehaltes) ein Anwachsen des Methoxylgehaltes und des alkalisch löslichen Materials verbunden ist. Es steht fest, daß die Umwandlung des Lignins in der Natur mit einem Anwachsen der alkalischen Löslichkeit und einer Dunkelfärbung durch Absorption von Sauerstoff (siehe auch S. 398) begleitet ist (PRINGSHEIM u. FUCHS 1923). Das Anwachsen der Löslichkeit des Lignins in Alkalien dürfte unter anderem eine Folge der Einwirkung des Luftsauerstoffs sein, da nach FREUDENBERG (1932) durch gelinde Oxydation des Lignins einzelne periphere Carboxylgruppen entstehen, die das Lignin alkalilöslich machen, ohne das gesamte Gefüge nennenswert zu verändern.

Die Zunahme der Löslichkeit des Lignins in Alkalien hat uns nun veranlaßt, Ammoniak in seiner möglichen Eigenschaft als Lösungsmittel für durch die Holzerstörung freigelegtes, genuines bzw. biologisch erzeugtes Lignin (Destruktion des Holzes durch Meruliusfäule) zu unter-

suchen. Es sollte dadurch festgestellt werden, ob Ammoniak, das durch die Verrottung pflanzlicher Gewebe frei wird, in der Lage ist, das Lignin, das ebenfalls in den Zersetzungsprozeß mit einbegriffen ist, zu lösen, d. h. in ein natürliches lösliches Ligninderivat überzuführen, um es so einem Angriff ligninzerstörender Mikroorganismen zugänglich zu machen, die eines den Ligninkomplex auflösenden Enzymapparates ermangeln.

Hierbei konnte die überraschende Beobachtung gemacht werden, daß selbst Spuren von wäßrigen Ammoniaklösungen fähig sind, biologisch erzeugtes Lignin in ammoniakalisches Lignin überzuführen und natives Lignin aus Weizenstroh herauszulösen, das als nunmehrigen ammoniakalisches Ligninderivat durch Salzsäure leicht ausgefällt werden konnte (siehe methodische Hinweise S. 400). So gelang es, mittels Behandeln mit 0,028 % NH_4OH biologisch erzeugtes Lignin und mit 0,0028 % NH_4OH Lignin aus Weizenstroh in Lösung zu bringen.

Versuche, Lignin aus extrahiertem Fichtenholzmehl ohne Druckanwendung und erhöhte Temperatur in Lösung zu bringen, mißlingen. Da nur biologisch erzeugtes Lignin durch Behandeln mit NH_4OH in Lösung geht, dürfen wir annehmen, daß in der Natur durch Zersetzungs Vorgänge zuerst die Zellwandsubstanzen der pflanzlichen Reste, insbesondere die Cellulose und Hemicellulosen angegriffen werden müssen, um so die glykosidische Verknüpfung des Lignins mit den Kohlenhydraten zu trennen, damit eventuell Einwirkungen von ammoniakalischen Lösungen auf das freigelegte Lignin statthaben können.

Wenn diese Vorgänge sich unter aeroben Verhältnissen abwickeln, können dann auf diese Weise die Umbildungen des Lignins zu Humusstoffen verstanden werden, da nach WAKSMAN (1946) Lignin, das mit einer alkalischen Lösung behandelt und einige Zeit der Luft ausgesetzt wird, unter Verlust von Methoxygruppen oxydiert und zu einer dunkel gefärbten Substanz umgewandelt wird, ähnlich in seinen Eigenschaften wie die des „sauren Humus“. Es scheint hier eine Wirkung sowohl des Einflusses des Sauerstoffs der Luft als auch wäßriger ammoniakalischer Lösungen auf das Lignin zu herrschen, die es während seiner Umbildung, wie weiter oben erwähnt, alkalisch löslicher macht.

Eine zusätzliche Erklärung des langsamen Abbaus sich selbst überlassener älterer pflanzlicher Gewebe dürfte neben der Feststellung von WAKSMAN u. HUTCHINGS (1936), die den höheren Methoxygehalt des Lignins älterer Pflanzen dafür verantwortlich machen, die Tatsache sein, daß der Eiweißgehalt des ganzen verholzenden Pflanzenkörpers mit zunehmendem Alter desselben abnimmt und so nur wesentlich kleinere Mengen von Ammoniak bei den Zersetzungs Vorgängen gebildet werden können. Dies trifft jedoch dann nicht zu, wenn ein ammoniakreiches Medium vorliegt, wie wir es beim Kompost und insbesondere beim Stalldünger finden.

Die biologische Zersetzung des Ammoniaklignins durch Mikroorganismen parallel zu seiner Umbildung zu Humusstoffen durch rein physikalisch-chemische Einflüsse bleibt noch zu ermitteln.

b) *Abbau des Ammoniaklignins durch Bakterien.*

Wir dürfen das Ammoniaklignin zu den Alkaliligninen, den sogenannten „sauren Ligninen“, rechnen, die einem bakteriellen Aufschluß unterliegen. So sind auch Bakterien, vornehmlich Kurzstäbchen (Stämme *IX B*, *XB*, *XI B*), die aus Waldböden isoliert wurden (siehe Tab. I, S. 402), imstande, das Ammoniaklignin zu verwerten (Tab. 11). Eine stärkere Nutzung dieser C-Quelle erhalten wir durch eine Bakterien-Rohkultur aus einer Erdlösung (bis zu 67,4%), eine schwächere durch die bisher studierten Phenollignin abbauenden Bakteriengruppen. Bei letzteren ist die Zerstörung des neuen Ligninpräparates graduell ähnlich wie die des Alkalilignins S. 412ff.

Tabelle 11. *Ligninbakterien auf ammoniakligninhaltigem Substrat.*

Versuchsdauer Tage	Stamm	Kontrolle mg	Rest mg	abgebaut	
				mg	%
26	<i>IX B</i>	114	61	53	46,5
	<i>X B</i>		71	43	37,7
	<i>XI B</i>		56	58	50,9
	Rohkultur		30	62	67,4
28	<i>II B</i>	92	80	12	13,0
	<i>V B</i>		58	34	36,9

Wir dürfen aus den bisher erzielten Ergebnissen schließen, daß die Widerstandsfähigkeit des Lignins gegen den Angriff von Mikroorganismen in seiner schweren Hydrolysierbarkeit begründet ist. Wird jedoch das Lignin durch Einführen bzw. Bildung gewisser Atomgruppen löslich gemacht, so kann es einem biologischen Angriff unterworfen werden.

B) Die aerobe Natur der Ligninzerstörung.

Es ist schon lange bekannt, daß die Holzzerstörung unter aeroben Bedingungen wesentlich intensiver ist als unter Sauerstoffausschluß.

Auf den Abbau des Holzes durch höhere holzzerstörende Pilze in Abhängigkeit von O_2 weisen FALCK (1907), MÜNCH u. BAVENDAMM (1928) hin, die zu dem Schluß gelangten, daß O_2 insbesondere von den Saprophyten benötigt wird. Sauerstoff-freies Holz wird von Saprophyten nicht befallen. Lebensfrisches, wassergesättigtes Holz (Splint) ist mehr oder weniger gegen Pilzbefall immun, da das Wasser O_2 verdrängt. Daneben enthält die Luft im Holz mehr CO_2 als atmosphärische Luft (bis 600fache der normalen CO_2 -Spannung nach MACDOUGAL), dessen hauptsächliche Wirkung in der Verdrängung von O_2 besteht. In der aeroben Natur des Kompostes sieht WAKSMAN (1936) die Ursache der verhältnismäßig schnellen Zerstörung von Lignin durch Mikroorganismen.

Auch die Beobachtung an in das Erdreich eingelassenen Holzpfählen, die ihre stärkste Zerstörungszone an der Bodenoberseite aufweisen, sowie die Arbeiten früherer und jetziger Forscher über die Zerstörung pflanzlicher Materialien unter Berücksichtigung des Lignins, ferner die in

dieser Arbeit untersuchte Zerstörung von Ligninsubstanzen durch Mikroorganismen, die ausschließlich unter aeroben Bedingungen erfolgte, lassen die Annahme zu, daß die Bakterien, die am Ligninabbau beteiligt sind, aerob sein müssen.

Durch eine weitere Versuchsreihe sollte untersucht werden, inwieweit Ligninbakterien auch unter anaeroben Verhältnissen in der Lage sind, diesen Naturkörper anzugreifen. Dazu wurden die isolierten Ligninbakterien auf Phenol- bzw. Ammoniakligninnährböden unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Nach einer Einwirkung von 2 Wochen ergab sich, daß in allen Versuchsröhrchen jegliche Entwicklung der Ligninbakterien unterblieben war. Wir können somit folgern, daß die Bakterien, die an der Ligninzerstörung beteiligt sind, Sauerstoff unbedingt benötigen und deshalb als obligat aerob anzusprechen sind.

Wie wir wissen, werden durch die Abbauvorgänge anderer kohlenwasserstoffhaltiger Naturstoffe unter Beteiligung von O_2 in erster Linie neben flüchtigen Säuren CO_2 und Wasser gebildet, im Gegensatz zu den Gärungen unter Sauerstoffausschluß, durch die in erster Linie Säuren gebildet werden. Aus der Beobachtung von WAKSMAN (1936) nun, welcher kein Produkt der Ligninzerstörung isolieren oder demonstrieren konnte, dürfen wir ebenfalls auf den aeroben Charakter der Ligninzerstörung durch die daran beteiligten Bakterien schließen.

C) Der enzymatische Abbau des Lignins.

Die holzerstörenden Pilze müssen über Ektoenzyme verfügen, die den nativen Ligninkomplex angreifen und ihn wenigstens bis zu wasserlöslichen diffusiblen Bruchstücken zerlegen können. Diese Enzyme werden, wie bereits erwähnt, besonders von den jungen wachsenden Mycelspitzen ausgeschieden (BOSE 1939).

Bei der enzymatischen Fermentation des Lignins greift nach FERNANDEZ u. REGUERR (1945/1946) das Ferment von *Auricularia mesenterica* das Lignin unter Bildung von Vanillin an und zeigt somit die Gegenwart einer Lignase an. Holz von *Sophora japonica*, das mit einem Ferment eines anderen Pilzes, *Polyporus hispidus*, behandelt wird, liefert ebenfalls kleine Mengen von Vanillin. Pappelholz von *Populus nigra* gibt dagegen größere Mengen Uronsäure und etwas Vanillin. Welcher Art die wirksame Lignase ist, ist nicht ohne weiteres zu erkennen. Nach den Untersuchungen von GOTTLIEB u. GELLER (1949) an wäßrigen Ligninsuspensionen mittels eines Enzympräparates aus dem Preßsaft von *Agaricus campestris*-Mycel soll das wirksame Ferment mit keiner der bekannten Phenoloxidasen identisch sein. Ein vollständiger Abbau bis zu dem wieder assimilierbaren CO_2 findet anscheinend nicht statt. Das Vanillin ist nach FREUDENBERG ein integrierender Baustein des Ligninmoleküls. WAKSMAN (1936) konnte jedoch im Falle des bakteriellen Abbaus des Lignins keine Produkte der Ligninzerstörung isolieren. Der größte Teil des Kohlenstoffs wird demnach in Zellsubstanzen umgewandelt, besonders unter Berücksichtigung der Beobachtung von WAKSMAN, daß nur sehr wenig CO_2 während der Ligninzerstörung gebildet wird.

Nun kann sich der Abbau des hochmolekularen Lignins unter verschiedenen Bedingungen vollziehen. Einmal liegt das Lignin als unlöslicher Komplex im Holzkörper vor, ein andermal wird es durch das Ein-

wirken bestimmter Atom- bzw. Molekülgruppen unter Aufschluß in lösliche Form übergeführt, die, wie die bisherigen Untersuchungen zeigen, einen Angriff durch Mikroorganismen gestattet. Liegt das Lignin in ungelöstem Zustande im Holz vor, so sind nur die ligninzerstörenden höheren Pilze imstande, es mit Hilfe einer Lignase anzugreifen und bis zu den aromatischen Bausteinen (wie Vanillin) abzubauen. Liegt jedoch das Lignin in löslicher Form vor, so kann es nach den bisherigen Erfahrungen vollständig genutzt werden. Eine Lignase wird also nicht notwendig sein, wenn das Lignin in gelöstem Zustande den Organismen erreicht wird, wie das Beispiel des *Merulius lacrymans* zeigt, welcher normalerweise nur die Cellulose des Holzes angreift und den Kohlenhydratanteil des Ligninkomplexes einschmilzt und die aromatischen Lignin-substanzen zurückläßt. Liegt das Lignin in Form von Phenollignin vor, das in Wasser aufgelöst wurde, so ist auch dieser cellulosezerstörende Pilz in der Lage, das Lignin weiter zu verwerten.

Ob an der Auflösung des Lignins die in den Pilzen vorkommenden Phenoldehydrasen beteiligt sind, läßt sich noch nicht überschauen. Vielleicht darf auch in diesem Zusammenhang die Möglichkeit der Beteiligung von Phenoldehydrasen an der bisher noch ungeklärten Gelbfärbung des *Merulius lacrymans* (vgl. dazu ZÖBERST) angedeutet werden, die durch Hemmung des Wachstums oder Verletzen der Pilzhyphen auftritt. Jedenfalls hat ZÖBERST soeben das Vorkommen von Polyphenolasen in diesem Pilze festgestellt.

Um zu prüfen, inwieweit Phenoldehydrasen in den ligninzerstörenden Bakterien vorkommen, wurde die Bakterienmasse von 10 Petrischalen-Kulturen gereinigt, filtriert und mittels Quarzmehl in der Reibschale zerrieben. Eventuell freiwerdende Phenoldehydrasen können colorimetrisch (nach PUGH) durch Dioxyphenylalanin (Dopa) erfaßt werden (BAMANN u. MYRBÄCK 1941, FREUDENBERG 1949). Es zeigte sich jedoch, daß in Gegenwart von Luft eine Schwarzfärbung erst nach 18 Std eintrat. Wenn reduzierende Substanzen wie die Ascorbinsäure in den Enzympräparaten zugegen sind, die die Entwicklung der Farbe verhindern, kann diese colorimetrische Methode eine Verzögerung erfahren. Doch dürfte nach Verbrauch dieser Stoffe die Farbstoffbildung nicht weiter verzögert werden. Wir können somit annehmen, daß Enzyme, die zur Gruppe der Phenoldehydrasen gerechnet werden, in den untersuchten Ligninbakterien nicht auftreten.

Diskussion.

Vorstehend konnte gezeigt werden, daß Lignin in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forscher eine starke Resistenz gegen jeden Angriff durch Mikroorganismen zeigt. Die Widerstandsfähigkeit in der

Natur beruht auf seiner schweren Hydrolysierbarkeit. Als hochmolekularer Körper besteht Lignin aus einem Gemisch einander äußerst nahe stehender Substanzen, das, als unlösliches Präparat auf technischem Wege gewonnen, von Mikroorganismen nicht angegriffen werden kann, ebenso wie auch das biologisch erzeugte Lignin. Werden „Lignin“-Präparate jedoch in „gelöstem“ Zustande gereicht, so können sie von verschiedenen Bodenorganismen verwertet werden. Es wird deshalb stets entscheidend sein, welches der chemische bzw. physikalische Zustand des Lignins ist, das einem Angriff eben durch jene ligninzerstörenden Organismen unterliegt. Die Untersuchungen haben ergeben, daß die gefundenen Organismen eine unterschiedliche Zerstörungswirkung auf isoliertes Lignin ausüben, die durch die Spezialisierung derselben gekennzeichnet wird.

Die Gewinnung von Lignin aus den verholzten Fasern pflanzlicher Gewebe mittels chemisch stark wirkender Reagentien befriedigt nur teilweise, da die so gewinnbaren Derivate nach den bisherigen Erfahrungen in der Natur nicht anzutreffen sind. Doch geben uns solche Stoffe immerhin Aufschlüsse über die Bedingungen, unter denen der Abbau von Lignin stattfindet. Da Lignin im Holzverband unlöslich ist, mußte die Frage beantwortet werden, welche Umwandlung das native Lignin während des Verrottungsvorganges der ganzen Pflanze in der Natur erfahren muß, um in lösliche Form übergeführt zu werden. Nachdem dies *in vitro* bereits durch Spuren von Ammoniak gelang, ist es nicht unwahrscheinlich, daß Ammoniak als pflanzliches und tierisches Abbauprodukt auch mit dem durch die Zersetzung der pflanzlichen Materialien freigelegten Lignin reagieren und in eine lösliche Form übergeführt werden kann. Bakterien vermögen ein derartiges Ligninderivat in ähnlichem Grade anzugreifen wie die anderen löslichen Alkalilignine. Unter Sauerstoffausschluß leistet Lignin den größten Widerstand gegen einen biologischen Angriff. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß es in keiner Weise gelang, ligninzerstörende Bakterien aus teilweise oder ganz zerstörtem Holze zu isolieren. Natives Lignin vermögen nur die höheren holzerstörenden Pilze mit Hilfe einer Lignase anzugreifen. Dieses Enzym scheint jedoch nicht notwendig zu sein, wie es das Beispiel des cellulosezerstörenden *Merulius domesticus* zeigt, der in der Lage ist, lösliches Lignin in Form von Phenollignin weiter zu verwerten.

Der Abbau von Lignin scheint stufenweise zu erfolgen. Nach der Auffassung von WEHMER legen die höheren holzerstörenden Pilze die erste Bresche in die gegen die Mehrzahl der Mikroorganismen resistente Holzsubstanz und bewerkstelligen dann allein oder in Gemeinschaft mit anderen Kleinlebewesen die Humifizierung. Ohne die Mitwirkung höherer Pilze an der Umwandlung von Lignin kann dieser Prozeß (mit WEHMER)

als eine Folge biologischer und chemischer Einflüsse während des Verrottungsvorganges pflanzlicher Gewebe verstanden werden. Zuerst müssen die leichter zersetzlichen Zellwandsubstanzen, wie Cellulose und Hemicellulosen durch Mikroorganismen angegriffen werden, um so die höchstwahrscheinlich glykosidische Verknüpfung des nativen Lignins mit den Kohlenhydraten zu trennen. Ammoniak, das durch die unter Beteiligung kommensaler Bakterien herbeigeführten Zersetzungs Vorgänge eiweißhaltiger Substanzen erzeugt oder durch Stalldünger hinzugefügt wurde, vermag dann mit dem freigelegten Lignin unter Bildung von löslichem Ammoniaklignin in Reaktion zu treten, das durch Bakterien weiter abgebaut werden kann.

Zusammenfassung.

Spezielle „Lignin“-Bakterien konnten in teilweise oder ganz zerstörtem Holz nicht gefunden werden. Dies mag eine Folge des Stickstoff- und Wuchsstoffmangels der verholzten Zellwandmembranen sein.

Am Ligninabbau sind in der Erde vorkommende, nicht aber aus Holz isolierbare Kurzstäbchen und Bakterien der *Chromogenes*- bzw. der *Fluorescens*-Gruppe beteiligt.

Die Widerstandsfähigkeit des natürlichen Lignins sowie der festen Ligninrückstände von der Zellstoffgewinnung und des Cuproxamlignins gegen den Angriff von Mikroorganismen liegt in seiner schweren Hydrolysierbarkeit begründet. Wird jedoch Lignin durch Einführen bzw. Bildung gewisser Atomgruppen löslich gemacht (lignosulfosaures Calcium, Alkali- und Phenollignine), so kann es einem biologischen Angriff unterliegen.

Die isolierten Ligninbakterien zeichnen sich durch eine gewisse Spezialisierung aus: Sie verwerten Phenol sehr schlecht. Phenollignin läßt sich durch Reinkulturen bis zu 75 %, durch Mischkulturen jedoch bis zu 91 % abbauen. Buchenholzlignin wird durch aus Buchenwalderde isolierte Bakterien stärker abgebaut als durch Bakterien aus Fichtenwalderde; die Bakterien der Fichtenwalderde verwerten Fichtenholzlignin besser als Buchenholzlignin. Die Bakterien aus der schwach sauren Fichtenwalderde vertragen eine höhere Wasserstoffionenkonzentration als die Bakterien aus dem schwach alkalischen Buchenwaldboden.

Ligninbakterien greifen nur bestimmte Ligninpräparate an; Cellulose wird nicht angegriffen. Unter den *Fungi imperfecti* greifen *Fusarium lactis*, *Fusarium nivale* sowie zwei weitere aus Walderde isolierte *Fusarium*-Arten Lignin gut an, *Trichoderma lignorum*, *Alternaria tenuis* und *Stemphylium botryosum* var. *botrytis* etwas schwächer.

An den starken Pigmentbildungen der *Fusarium*-Arten auf Lignin in wäßriger Lösung beteiligen sich wahrscheinlich unter Einwirkung von

Phenoldehydrasen gebildete Chinonderivate, die den Bausteinen des Lignins und den Huminsäuren nahestehen.

Merulius domesticus, der in erster Linie Cellulose zerstört, ist fähig, Lignin zu verwerten, wenn dieses in eine lösliche Form übergeführt worden ist.

Als ein natürliches und lösliches Ligninderivat wurde Ammoniaklignin erachtet, das durch Bakterien in Reinkulturen zu 50,9% und von Rohkulturen bis zu 67,4% genutzt wird.

Der Abbau von Lignin durch Bakterien vollzieht sich nur unter Einwirkung von freiem Sauerstoff.

Phenoldehydrasen wurden in den untersuchten Ligninbakterien nicht gefunden.

Für die Anregung zu vorliegender Arbeit sowie für die Unterstützung bei ihrer Durchführung bin ich Herrn Prof. H. ULLRICH zu großem Dank verpflichtet. Ich danke auch Frau Prof. A. NIETHAMMER für die Überlassung von Pilzkulturen sowie für wertvolle Hinweise, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die verschiedene Einrichtungen zur Verfügung stellte.

Literatur.

- BACH, C.: Landw. Versuchsstat. **103**, 223 (1925). — BALKS, R.: Landw. Versuchsstat. **104**, 245 (1926). — BAMANN, E., u. C. MYRBÄCK: Fermentforschg **7**, 2480 (1941). — BARTELS, R.: Zbl. Bakter. II, **103**, 1 (1940). — BARTON-WRIGHT, E. C., and J. G. BOSWELL: Biochemic. J. **25**, 494 (1931). — BAVENDAMM, W.: Gasversuche, ein Beitrag zur Frage der Krankheitsempfänglichkeit unserer Holzpflanzen. Zbl. Bot. **75/II**, 426, 503 (1928). — BECKMANN, LIESCHE u. LEHMANN: KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse III/2, 1462 (1932). — BOSE, S. R.: Erg. Enzymforschg. **8**, 267 (1939). — CARTWRIGHT, K. S. G., and W. P. K. FINDLEY: Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **18**, 145 (1943). — DEMME, H.: Beiträge über den mikrobiellen Abbau verschiedener Lignine und ihre Bedeutung für die Bildung der organischen Bodensubstanzen Diss. Leipzig 1932. — FAHREUS, G.: Ann. Agr. Coll. Schweden **12**, (1944); Symbol. Botan. Upsalienses **9**, 2 (1947). — FAHREUS, G., R. NILSSON u. G. NILSSON: Sv. bot. Tidskr. **43**, 343 (1949); Roy. Agr. Coll. Schweden **16**, 619 (1949). — FALCK, R.: Hausschwammforschung, Heft 1. Jena: G. Fischer 1907; Cellulosechemie **9**, 1 (1928). — FERNANDÉZ, O., u. B. REGUERR: Farm. nueva II, **57**; III, 169, 223 (1946); Rev. de la real Academia de Ciencia **39**, 331 (1945). — FINDLEY, W. P. K.: Ann. of Bot. **48**, 116 (1934). — FISHER, J. H., W. L. HAWKINS and H. HIBBERT: J. Amer. Chem. Soc. **62**, 1412 (1940); **63**, 3031 (1941). — FREUDENBERG, K., u. H. RICHTZENHAIN: Ber. dtsh. chem. Ges. **76**, 997 (1943). — FREUDENBERG, K., ZOCHER u. DÜRR: KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse III/2, 125, 139, 1467 (1932). — Die Bildung ligninähnlicher Stoffe unter physiologischen Bedingungen. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., 5. Abhdlg., Jahrg. 1949. — GOTTLIEB, S., and J. G. GELLER: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 189 (1949). — GOTTLIEB, S., and I. PELCZAR: Bacter. Rev. **15**, 55 (1951); ref. Ber. Biol. **75**, 155 (1951). — JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Bd. I, 1945. — JONAS, K.: Z. angew. Chem. **34**, 289 (1921). — KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse

III/2; Organ. Stoffe II/2, 1466 (1932). — KÜRSCHNER, K.: Z. angew. Chem. **40**, 224 (1927). — LIESKE, R., u. E. HOFMANN: Brennstoffchemie **9**, 174 (1928). — MYRS, Wm.: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **17**, 449 (1928). — NORMAN, A. G.: Trans. Intern. Congr. Soil Sci., 3rd Congr., III, 105 (1935). — PELZAR, M. J., S. GOTTLIEB u. W. C. DAY: Arch. f. Biochem. **25**, 449 (1950). — PHILLIPS, WEIHE and SMITH: Soil Sci. **30**, 383 (1930). — PLOETZ, TH.: Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 57, 61, 74, 79 (1940). — PRINGSHEIM, H., u. W. FUCHS: Ber. dtsh. chem. Ges. **56**, 2095 (1923). — ROSE, E., and M. W. LISSE: Ind. Eng. Chem. Analyt. Edit. **9**, 284 (1917). — SUNDMAN, J.: Sockerbisulfuernas egenskaper och kvantitatiy bestämning av olika sockerslag, särskilt i sulfitavlut, med tillhjälp av Na-bisulfit. Helsingfors 1949. — WAKSMAN, S. A.: Fortschr. naturwiss. Forschg H. 10 (1930).; Arch. f. Mikrobiol. **2**, 136 (1931). — WAKSMAN, S. A., and I. S. HUTCHINGS: Soil Sci. **42**, 119 (1936); Wood-Chemistry New York, S. 853 (1946). — WEHMER, C.: Experimentelle Hausschwammstudien, H. 3. Jena 1915. — ZOBERT, W.: Arch. f. Mikrobiologie **18**, 1 (1952). — ZYCHA, H.: Holz als Roh- u. Werkstoff **3**, 51 (1940).

Anmerkung bei der Korrektur: Die Arbeit von W. A. KONETZKA, M. J. PELCZAR jr. and S. GOTTLIEB: The biological degradation of lignin. III. Bacterial degradation of alpha-conidendrin. J. Bacteriol. **63**, 771—778 (1952) konnte, da sie nach Drucklegung erst bekannt wurde, leider nicht mehr berücksichtigt werden.