

Zur Frage der Celluloseverdauung.

Nach Versuchen von A. Scheunert, W. Grimmer und
A. Hopffe.

Mitgeteilt

von

W. Ellenberger.

Aus dem Physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule zu Dresden.
(Der Redaktion zugegangen am 8. November 1915.)

Die Tatsache, daß im Verdauungsschlauche der herbivoren Haussäugetiere ein nicht unerheblicher Teil der mit der Nahrung aufgenommenen Cellulose (Rohfaser) gelöst wird, bzw. während des Aufenthaltes der Nahrung im Verdauungskanale verschwindet, ist 1855 durch Haubner, damals Professor der Dresdner Tierärztlichen Hochschule, zuerst festgestellt worden. Alle späteren Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, haben die Haubnersche Entdeckung bestätigt und sie in bezug auf die Tierarten, die Cellulose zu verdauen vermögen, und andere Punkte erweitert.

Seit der Haubnerschen Entdeckung ist die Frage der Celluloseverdauung an unserer Hochschule und speziell in unserem Institute bis heute von Zeit zu Zeit Gegenstand der Untersuchung gewesen. Im Nachfolgenden soll in Kürze über einige neue von uns über diese Frage gemachte Beobachtungen berichtet werden. Meine drei Mitarbeiter werden später über die angestellten Untersuchungen und deren einzelne Ergebnisse genau berichten und dabei die mit ihren Untersuchungsergebnissen im Zusammenhang stehenden Beobachtungen anderer Forscher besprechen. Von mir soll aber in der folgenden kurzen Mitteilung auf die «Cellulose-Literatur» nicht eingegangen werden. Nur auf die in unserem Institute früher

vorgenommenen Untersuchungen soll vor Mitteilung unserer neuesten Beobachtungen hingewiesen werden.

Durch die in unserer Hochschule vorgenommenen Untersuchungen und die anderer Forscher war in Ergänzung der ersten Haubnerschen Feststellungen dargetan worden, daß die Wiederkäuer mehr Cellulose «verdauen» als die Einhufer und diese mehr als das Schwein. Es war aber nicht einwandfrei festgestellt worden, daß die Cellulose vom tierischen Organismus als Nährstoff verwertet wird und inwieweit dies geschieht. Erst in den letzten Jahrzehnten ist sicher dargetan worden, daß die Cellulose von den Wiederkäuern in sehr hohem und von den Schweinen in etwas geringerem Maße verwertet wird. Auch für Einhufer dürfte es als einwandfrei feststehend erachtet werden, daß sie die Cellulose gut verwerten. In bezug auf den Menschen herrschen in dieser Richtung noch Zweifel. Die Fleischfresser verdauen, wie in unserem Institut durch Scheunert festgestellt worden ist, keine Cellulose.

Die unter meiner Leitung und Mitwirkung seit 1880 in unserem Institut von Zeit zu Zeit zuerst von W. Hofmeister und dann von Scheunert angestellten Untersuchungen bezogen sich, abgesehen von der allgemeinen, mehrfach neu geprüften Frage, inwieweit Cellulose von den einzelnen Haustierarten (Pferd, Rind, Schaf, Schwein, Hund usw.) verdaut wird, vor allem auf drei Einzelfragen, nämlich 1. auf den Ort der Celluloselösung, 2. auf die bei der Celluloselösung entstehenden Abbauprodukte, 3. auf die Erreger (Fermente) der Celluloseverdauung.

1. In bezug auf die Abschnitte des Verdauungsschlauches, in denen Cellulose gelöst wird, haben wir folgendes festgestellt: Bei den Einhufern ist es besonders das bei dieser Tierart ungemein große, den Inhalt stets lange Zeit beherbergende Caecum und der weite Abschnitt des Colons, in denen die Cellulose gelöst wird; im engen Colonabschnitt findet die Celluloselösung nur geringgradig statt. Beim Schwein sind auch das Caecum und das Colon die Orte der Celluloselösung. Bei den Wiederkäuern kommen in erster Linie die beiden ersten Vormägen (Pansen und Haube), außerdem

aber auch das Caecum und das Colon als Orte der Celluloselösung in Betracht. Die Cellulose, die bei diesen Tieren der Verdauung in Pansen und Haube entgeht, wird z. T. im Dickdarm verdaut. Hier kann die Celluloseverdauung schon deshalb besonders ausgiebig sein, weil ein Teil der Cellulose in den Vormägen für die weitere Zersetzung vorbereitet, gewissermaßen aufgeschlossen («anverdaut») wird und somit in einem leicht verdaulichen Zustande im Dickdarm ankommt und dort der Verdauung verfällt. Diese Verhältnisse erklären es, daß die Wiederkäuer prozentisch mehr Nahrungscellulose verdauen als die anderen Haustiere. Im Magen aller Haustiere (also auch im Labmagen der Wiederkäuer) und im wasserarmen Inhalt der Endabschnitte des Dickdarms und des Psalters der Wiederkäuer ist die Celluloseverdauung ebenso wie im Dünndarm, den der Inhalt verhältnismäßig rasch durchheilt, unbedeutend.

Wir haben diese Tatsachen festgestellt durch a) Untersuchungen über die Aufenthalts- (Durchgangs)zeiten des Inhaltes der einzelnen Abschnitte des Verdauungsschlauches, b) durch Feststellung des Wassergehaltes und der sonstigen physikalischen und chemischen Beschaffenheit ihres Inhaltes und c) durch Verdauungsversuche, die wir in der Weise anstellten, daß wir die durch Auspressen und Kolieren des Inhaltes aller Abschnitte des Verdauungskanales gewonnenen Flüssigkeiten im Thermostaten auf Cellulose (sowohl auf Heu, als auf die von uns aus jungem und altem Grase, sowie aus Heu oder aus dem hafer- und heuhaltigen Mageninhalte hergestellte als auch auf die aus Fabriken bezogene Papiercellulose) und nur so lange einwirken ließen, als die Aufenthaltszeit im Tractus alimentarius beträgt. Diese Versuche bewiesen, wie aus unseren Publikationen ersichtlich ist, daß die Pansen-, Hauben-, Coecal- und Colonflüssigkeiten der betreffenden Tiere Cellulose in reichlichen Mengen lösten, also ein Cellulose lösendes Agens enthalten. Die Magenflüssigkeit wirkte in der Regel nicht, die Dünndarm- und Psalterflüssigkeit nur wenig auf Cellulose ein.

2. In bezug auf die bei der im Verdauungsschlauche ablaufenden Celluloselösung entstehenden Produkte habe ich, wie meine Veröffentlichungen über diese

Frage zeigen, stets den Standpunkt vertreten, daß dabei zuckerartige Stoffe entstehen, die zur Aufsaugung gelangen, und daß daneben auch Cellulosegärungen unter der Entstehung gasiger und anderer Gärungsprodukte ablaufen. Nach meiner Auffassung liegt es mithin bei den die Cellulose betreffenden Vorgängen im Verdauungsschlauche genau so wie bei den anderen Nährstoffen (Eiweißkörper, Stärke, Fette usw.). Auch bei diesen verhält es sich so, daß der Anteil von ihnen, der bei den Verdauungsvorgängen nicht verdaut wird oder nach ihrer Verdauung nicht rechtzeitig zur Aufsaugung gelangt, Gärungs- und Fäulnisprozessen unter Entwicklung der bekannten Gärungs- und Fäulnisprodukte verfällt. Die von Hofmeister und mir angestellten, auf das Vorkommen von dextrin- und zuckerartigen Stoffen bei der Celluloselösung gerichteten Versuche hatten fast stets ein negatives Ergebnis; nur sehr selten konnte aus den Versuchsergebnissen mit einiger Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß bei den betreffenden Verdauungsversuchen tatsächlich zuckerartige Stoffe entstanden waren.

Von anderer Seite (von Tappeiner u. A.) waren inzwischen die unter Einwirkung von Mikroorganismen ablaufenden Gärungen der Cellulose studiert und die Gärungsprodukte festgestellt worden. Dabei hatte es sich herausgestellt, daß bei diesen Gärungsprozessen einerseits Stoffe (Gase), die der Organismus nicht verwerten kann, andererseits aber auch solche Stoffe (organische Säuren) entstehen, die für den Organismus verwertbar sind (Zuntz). Aber auch diese Produkte sind für den Organismus natürlich von viel geringerem Werte, als es die Produkte sein würden, die dann entstehen würden, wenn die Cellulose, ihrem chemischen Aufbau entsprechend, wie ein verdauliches Polysaccharid abgebaut werden würde, wie dies nach meiner Auffassung auch der Fall ist.

3. Um die Erreger der Celluloselösung festzustellen, haben wir zunächst die Cellulose lösenden Flüssigkeiten, die durch Kolieren und Filtrieren des Vormagen- und Dickdarminhaltes gewonnen wurden, mit denselben Methoden (z. B. Behandlung mit Alkohol und anderen Fermentfällungsmitteln) untersucht, die man bei den Verdauungssekreten anwendet,

um die Verdauungsfermente zu gewinnen. Alle unsere Versuche hatten ein negatives Ergebnis, wir konnten in den genannten Flüssigkeiten mit den betreffenden Methoden kein Cellulose verdauendes Ferment finden.

Weiterhin haben wir mit sämtlichen Verdauungssekreten (mit Mundspeichel, einzelnen Speicheldrüsensekreten, Magen-, Darm-, Pankreassaft, Galle) aller Haustiere Verdauungsversuche mit Cellulose angestellt. Sie verliefen sämtlich negativ; ein Celluloseferment ist in ihnen nicht vorhanden.

Damit zusammenhängend haben wir Extrakte aus allen Drüsen des Verdauungsapparates (den Kopfdarmdrüsen, der Leber, dem Pankreas, den 3 Arten der Magendrüsen, den Darm- und Ösophagusdrüsen) und aus der Schleimhaut seiner verschiedenen Abschnitte und speziell aus den cytoblastischen (lymphoiden) Organen derselben (aus den Mandeln, den Zungen- und Gaumenbälgen, den Darmfollikeln) hergestellt und auch mit diesen Verdauungsversuche mit Cellulose gemacht. Auch diese Versuche hatten ein negatives Ergebnis. Es sei ausdrücklich bemerkt, daß die von uns verwendeten Sekrete und Extrakte, um ihre normale Beschaffenheit festzustellen, auch auf ihren Gehalt an anderen Fermenten geprüft und daß nur solche verwendet wurden, die sich als normal erwiesen und die betreffenden sonstigen Fermentwirkungen zeigten.

Aus den Resultaten unserer verschiedenen Versuche war zu folgern, daß weder die Verdauungsdrüsen noch die Schleimhaut des Verdauungsapparates ein die Cellulose lösendes Ferment produzieren und daß das die Lösung der Cellulose bewirkende Agens entweder in oder an den Nahrungsmitteln (als Nahrungsmittelferment) oder in der mit der Nahrung in den Verdauungsschlauch gelangenden Luft (etwa in Form von Mikroorganismen) enthalten ist oder von den im Verdauungskanal angesiedelten Lebewesen geliefert wird, sodaß mithin Mikroorganismen als die Cellulosezerersetzer anzusehen sind.

Das in der Nahrung enthaltene wenig wirksame Celluloseferment kann in Anbetracht der großen Menge Cellulose, die im Verdauungsschlauche zur Lösung gelangt, nicht in Frage kommen. Dies zeigten unsere Versuche.

Alle angestellten Versuche wiesen vielmehr darauf hin, daß die Lösung der Cellulose auch im Verdauungsschlauche (wie die erwähnte Cellulosegärung außerhalb desselben) durch die Wirkung von Mikroorganismen bezw. der von ihnen produzierten Fermente erfolgt.

Seit 1884 haben sich viele Forscher mit der Frage der Cellulosezersetzung durch Mikroorganismen und in neuerer Zeit namentlich über diese Vorgänge im Boden und im Dünger befaßt (die Literatur s. bei Mütterlein, Inaug.-Diss., Studien über die Zersetzung der Cellulose im Dünger und Boden). Die Cellulosezersetzung im Verdauungsschlauche ist aber von den meisten dieser Forscher nicht oder nur nebensächlich behandelt worden. Mit dieser Frage haben wir uns in neuerer Zeit beschäftigt; über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll nachstehend berichtet werden.

Es ist bekannt, daß sich im Vormageninhalte der Wiederkäuer und im Dickdarminhalte der Herbi- und Omnivoren viele Arten aerober und anaerober Bakterien (Bacillen, Kokken usw.) und, besonders in Pansen und Haube der Wiederkäuer und im Caecum des Pferdes, auch viele Protozoen, besonders Infusorien finden.

Unsere von Scheunert und A. Hopffe vorgenommenen und oft wiederholten Versuche, die Rolle der Protozoen bei den Verdauungsvorgängen und insbesondere bei der Cellulosezersetzung festzustellen, blieben bisher resultatlos; wir setzen aber die Versuche (mit Züchtung der Protozoen usw.) fort. Ich bin der Überzeugung, daß die Protozoen des Vormagen- und Dickdarminhaltes eine Rolle bei der Celluloseverdauung spielen, daß sie Cellulose lösen und die Lösungsprodukte assimilieren können. Dadurch, daß sie im Labmagen, wohin sie aus Pansen und Haube mit deren Inhalt gelangen, infolge der Wirkung der Salzsäure und des dortigen Mangels ihrer Lebensbedingungen absterben und hier durch den Magensaft verdaut werden, kommt die von ihnen ihrem Wirt entzogene Cellulose des Pansen-Hauben-Inhaltes ihrem Wirt indirekt doch zugute. Dies ist meine Ansicht. Weitere Untersuchungen müssen jedoch zeigen, ob sie zutreffend ist und ob die Protozoen über-

haupt eine wichtige Rolle bei der Verdauung und speziell bei der der Cellulose spielen.

Um weiter zu prüfen, ob bei der Celluloseverdauung tatsächlich Mikroorganismen tätig sind, stellte Scheunert, nachdem die erwähnten, von Hofmeister und mir angestellten Versuche gezeigt hatten, daß die Cellulose lebhaft lösenden Vormagen- und Dickdarmflüssigkeiten durch Kochen ihre Wirksamkeit auf Cellulose verlieren, neue Versuche mit Coecalflüssigkeit verschiedener Tierarten an. Er prüfte diese, nachdem deren durchaus normale Beschaffenheit durch den Nachweis eines diastatischen, eines proteolytischen, eines invertierenden und eines Milchsäure-Fermentes in ihnen festgestellt worden war, auf ihre Wirksamkeit auf Cellulose in der Weise, daß er sie sowohl in dem Zustande, wie sie beim Kolieren und Filtrieren gewonnen wurde, als auch nach Filtration durch Berkefeld-Filter, auf Cellulose im Thermostaten einwirken ließ. Dabei stellte es sich (bei den vorgenommenen Wägungen) heraus, daß die unfiltrierten, lebende Mikroorganismen enthaltenden Flüssigkeiten die Cellulose in hohem Grade lösten; daß dagegen die durch Berkefeld-Filter filtrierten, keine Mikroorganismen enthaltenden Flüssigkeiten nur in sehr geringem Grade und die gekochten Flüssigkeiten gar nicht auf Cellulose einwirkten.

Nach den Ergebnissen der Scheunertschen Versuche konnte es keinem Zweifel unterliegen, daß die Celluloselösung, wie bereits viele Forscher behauptet hatten, auch im Verdauungsschlauche durch Mikroorganismen (bezw. durch die von ihnen produzierten Fermente) und zwar durch solche Mikroorganismen bewirkt wird, die sich im Tubus alimentarius angesiedelt haben.

Die Versuche behufs Feststellung der bei der Celluloselösung wirksamen Mikroorganismen-Arten wurden von A. Scheunert und A. Hopffe 1912 in Angriff genommen. Von ihnen wurden aus dem Inhalte der beiden ersten Vormägen der Wiederkäuer (später auch aus dem Dickdarminhalte) Reinkulturen der daselbst vorhandenen Mikroorganismen hergestellt. Zu diesen Züchtungen wurden die verschiedensten Nährböden verwendet. Mit den so gezüchteten Mikroorganismen wurden

Versuche in bezug auf ihre Einwirkung auf Cellulose angestellt. Als Cellulosematerial wurde dabei Papiercellulose (Fließpapier) benutzt.

Diese Untersuchungen ergaben, daß sich im Verdauungsschlauche der Herbivoren, insbesondere im Vormagen der ruminierenden Tiere verschiedene Bakterienarten befinden, die sowohl in Reinkulturen als in Symbiose mit anderen Bakterienarten Cellulose angreifen bzw. lösen, die aber offenbar mit den Bakterien nicht identisch sind, die von den Autoren, die über die Cellulosezersetzung im Dünger und im Boden gearbeitet haben, als Cellulose angreifend beschrieben werden.

Die mit den von Scheunert und Hopffe gefundenen Bakterien eintretende Celluloselösung erfolgt verhältnismäßig langsam; auch wurden keine großen Mengen Cellulose gelöst. Bei länger fortgesetzter Reinzüchtung der betreffenden Bakterien nahm deren lösende Kraft auf Cellulose ab.

Das Ergebnis der Scheunert-Hopffeschen Untersuchungen bestand darin, daß im Inhalte des Verdauungskanales der Haustiere verschiedene Bakterienarten aufgefunden, reingezüchtet und identifiziert worden waren, die in gewissen Nährlösungen, wenn auch langsam, Cellulose angriffen. Es war sogar gelungen, einige solcher Stämme aus anderen Laboratorien zu beziehen und nach Übertragung auf die spezifischen Nährböden Celluloselösung durch sie zu erzielen. Trotzdem hatte sich Scheunert zu einer Publikation seiner Versuchsergebnisse noch nicht entschließen können, weil eine gewisse Unbeständigkeit in den Ergebnissen vorlag, die erst behoben werden sollte und als deren Ursache die große Schwierigkeit der Innehaltung der zweckmäßigen Nährbodenzusammensetzung anzusehen war.

Infolge des Ausbruchs des Kriegs und der Einberufung Scheunerts zu den Waffen konnte er seine Untersuchungen nicht fortsetzen. Sie wurden deshalb zunächst abgebrochen. Einige Monate nach Kriegsbeginn habe ich die Versuche jedoch wieder aufnehmen lassen.

Die Institutsassistentin A. Hopffe stellte zu diesem Zwecke neue Kulturen der Mikroorganismen des Pansen- und Hauben-

inhaltes her und stellte mit den gezüchteten Mikroben neue Verdauungsversuche mit Cellulose an. Wir gingen dabei immer wieder auf das Ausgangsmaterial zurück und verschafften uns immer wieder, mehr als 1 Dutzend mal, neuen Vormageninhalt von Wiederkäuern. Später ist auch mehrmals der Inhalt des Pferdecaecums und anderer Darminhalt des Pferdes und der Magen- und Darminhalt des Schweins und der Labmageninhalt der Wiederkäuer, Mageninhalt aller Haustiere und der Darminhalt des Schafs zum Anlegen von Kulturen verwendet worden.

Bei diesen neuen Versuchen wurden die früher gezüchteten Cellulose angreifenden Bakterien wieder gefunden, aber daneben ein anderer Mikroorganismus, der die Cellulose in ungeahnter Weise rasch zersetzte. Dieser Mikroorganismus gehört in die Gruppe der Aspergilleen und wird in bezug auf seine Eigenschaften, seine Züchtung und Wirksamkeit von A. Hopffe in einer späteren Abhandlung genau beschrieben werden. Hier sei vorläufig nur bemerkt, daß er in vielen Generationen fortgezüchtet werden kann, ohne daß er seine Wirksamkeit auf Cellulose einbüßt; diese schien im Gegenteil stets zu wachsen, namentlich nahm sie zu, wenn der Pilz unter Einwirkung auf Cellulose fortgezüchtet wurde. Er verhielt sich also in dieser Beziehung entgegengesetzt zu den von Scheunert und Hopffe gefundenen Cellulose lösenden Mikroorganismen. Er ist imstande, Cellulose zu lösen ohne eine andere Kohlenstoffquelle als Cellulose; er greift die Cellulose in salpeterhaltiger und ammoniakhaltiger Lösung ohne andere Zusätze stets stark an.

Züchtung des Pilzes. Der Pilz wurde auf festen und flüssigen Nährböden gezüchtet. Als Kohlenstoffquellen wurden meist Mannit und Cellulose verwendet. 1prozentigem Agar-Agar wurden 2% Mannit und 0,02% Monokaliumphosphat zugesetzt bei 100 ccm destilliertem Wasser; diese Mischung war neutral oder ganz schwach sauer gegen Lackmus. Nähragar und ähnlich zusammengesetzte Medien eignen sich nicht zum Isolieren und Anreichern. Der Pilz kann aber als Reinkultur auf diesen weiter wachsen. Auch bei Zusatz von Kalium-

nitrat und Dikaliumphosphat gedieh der Pilz gut und löste die Cellulose.

Als vorzüglichste Nährlösung bewährte sich folgende Mischung:

- 1000 g ccm Wasser
- 2,0 » Ammoniumsulfat
- 1,0 » Dikaliumphosphat
- 0,5 » Magnesiumsulfat
- 2,0 » Kochsalz.

In dieser Nährflüssigkeit wuchs der Pilz besonders gut, die Sporenbildung verlief rapid; die Sporen wirkten auf die Cellulose ein unter Mycelbildung. Das Wachstum erfolgte in dieser Nährlösung bei Cellulosezusatz gut, ohne Cellulose (und ohne einen anderen C-haltigen Stoff) wuchs er fast gar nicht; er braucht also eine Kohlenstoffquelle zu seinem Gedeihen. Es ist selbstverständlich, daß bei dem Wachstum des Pilzes der in der Nährlösung vorhandene Ammoniakstickstoff zur Bildung von Körpereiweiß verwandt wurde. Bei einer 50 Tage dauernden Einwirkung des Pilzes auf 2 g Cellulose in der genannten Nährlösung wurden 1,43 % (2,94 mg) des N in der Lösung (die 206 mg Ammoniak-N enthielt) in Eiweißstickstoff übergeführt. Die Lösung enthielt nach Beendigung des Versuchs 18,4 mg Pilz-Eiweiß.

Versuchsverfahren und Versuchsmaterial. Bei den Versuchen behufs Feststellung der Wirkung des Pilzes auf Cellulose wurde längere Zeit, wie bei den früheren Versuchen, nur Filtrierpapier verwendet. Erst später ist auch flockiger Papierstoff, geschabter Papierstoff, gewöhnliches Stroh, aufgeschlossenes (nach Lehmann mit Natronlauge behandeltes) Stroh, Heu, gedörktes Kraut, Cellulose von König in Plagwitz verwendet worden.

Zu allen Versuchen wurden die Glasgefäße, die dazu benutzt wurden (Reagiergläser, kleine Glaskölbchen und größere Kolben) sterilisiert; ebenso wurde das betreffende Cellulosematerial steril gemacht.

Um die Wirkung auf Cellulose zu konstatieren, brachte man in das betreffende sterile Gefäß eine entsprechende Quantität

der erwähnten Nährlösung mit Fließpapier und setzte dazu (impfte) eine Reinkultur des Pilzes, die einer Mannit-Agarplatte entstammte. Später «impften» wir nur mit den Sporen; diese wurden mit einer Platinöse wie ein Pulver übertragen. Das Wachstum des Pilzes erfolgte auch bei dieser Art der Impfung sehr gut.

Stickstoffbedarf des Pilzes. Um festzustellen, ob der Pilz ohne die Gegenwart einer Stickstoffquelle gedeiht, ob er mithin auch den N der Luft bei seinen Assimilationsvorgängen zum Aufbau von Körpereiwweiß benutzen kann, wurden einige Versuche angestellt: Wir setzten den Pilz an: a) mit Leitungswasser und Cellulose; b) mit destilliertem sterilen Wasser und Cellulose; c) mit peptonhaltigem Wasser und Cellulose; d) mit der S. 245 genannten Ammoniumsulfat, Bikaliumphosphat, Magnesiumsulfat und Natriumchlorid enthaltenden Lösung ohne Cellulose.

Das Ergebnis war folgendes: a) Der nur mit Wasser und Cellulose angesetzte Pilz wuchs relativ langsam und zeigte erst nach 9 Tagen Sporenbildung. Das Papier war nach 10 Tagen deutlich angegriffen, seine Ränder aufgefasert und dergl. b) Im destillierten Wasser wuchs der Pilz noch langsamer als im Leitungswasser; immerhin konnte nach 10 Tagen ein Angriff auf das Filtrierpapier festgestellt werden. c) Auf der Peptonlösung bildete sich eine dichte Myceldecke, die Sporenbildung begann erst am fünften Tage. Die Cellulose wurde wenig angegriffen. d) Der Kontrollversuch verlief typisch unter lebhaftem Wachstum des Pilzes.

Aus dem Ergebnis dieser Versuche kann geschlossen werden, daß der Pilz zu seiner Existenz eine besondere N-Quelle nicht nötig hat, daß er aber nur in Gegenwart N-haltiger Körper gut gedeiht, lebhaft wächst und lebhaft Sporen bildet. Er greift mithin Cellulose auch ohne Gegenwart stickstoffhaltiger Körper an, aber in geringerem Grade als bei Gegenwart solcher. Es kommt aber auf die Natur der N-haltigen Körper an. In ammoniakhaltigen Flüssigkeiten greift er Cellulose lebhaft in salpeterhaltigen etwas weniger an; in Gegenwart von Pepton aber wirkt er verhältnismäßig schwach.

Symbiosen. Der Pilz wirkte auch in Gemeinschaft mit anderen Mikroorganismen auf Cellulose ein; einige Arten wirkten günstig auf seine Celluloseverdauungskraft ein, andere waren ohne Einfluß und wieder andere schienen nachteilig einzuwirken. Zu den Symbioseversuchen wurden zunächst nur solche Mikroorganismen benutzt, die zusammen mit ihm in den Inhalten des Verdauungsschlauches gefunden worden waren, also z. B. *Bac. mycoides* und Verwandte, *Actinomyces*, *Bac. mesentericus*, *Bac. subtilis*, *Megatherium*, *Fluorescens* usw.

Erscheinungen der Wirkung des Pilzes. In allen Fällen, gleichgültig, ob man Fließpapier oder flockige Papiermasse und dergleichen verwandte, bildete sich an der Oberfläche der Flüssigkeit eine hautartige Schicht, eine Art Decke: diese war anfangs weiß, hell, zeigte aber bald dunkle Flecken und Flöckchen, die sich mit der Zeit vermehrten und durch die Sporenbildung veranlaßt waren. Diese Decke bestand, wie man mikroskopisch feststellen konnte, aus einer Pilzkolonie (einem Pilzmycel mit verzweigten Hyphen und Sporen) und aus Cellulosefasern. Das stattgehabte Wachstum des Pilzes und die Hautbildung konnte man nach 2—4 Tagen stets sehr deutlich mit dem Auge feststellen.

Das Papier war z. B. nach 2 Tagen schleierartig dünn geworden, seine vorher scharfen Ränder erschienen faserig. Oft konnte man am Fließpapier sehen, daß es durch den Pilz gewissermaßen in 2 Lagen zerlegt wurde, von denen eine Lage als Oberflächenhäutchen eine Unterlage für Pilzsporen bildete, während die andere Lage nach einigen Tagen in Flocken zerfiel.

Der Pilz wuchs **aerob**; bei Luftabschluß wächst er auch, aber weniger gut; er braucht Feuchtigkeit zu seinem Gedeihen und sucht diese auf. Bei einer Temperatur von 36—44° wuchs er besonders lebhaft.

Wurde flockige Papiermasse (eine geschabte Cellulosemasse, die in der Flüssigkeit einen dicken Brei darstellte) verwendet, dann hatte sich schon nach 24 Stunden eine dicke hautartige Schicht an der Oberfläche der Flüssigkeit gebildet, die zunächst noch hell und weiß war (Myceldecke), in der aber schon hier und da ein dunkler Flaum von sporentragenden

Hyphen zu sehen war. Man hatte den Eindruck, als trage der Pilz aus Nahrungs-(Kohlenstoff-)bedürfnis Cellulosefasern nach der Oberfläche, wo er seine günstigsten Wachstums- und Vermehrungsbedingungen findet.

Bei Verwendung von Stroh bildet sich natürlich auch eine Pilzdecke an der Oberfläche. Die Veränderungen des Strohs treten für das Auge nicht annähernd so deutlich hervor, wie die des Papiers; das Stroh zeigt aber gewisse makroskopische und mikroskopische Veränderungen, es wurde durchscheinender, weicher, zerbrechlicher; der Pilz siedelt sich im Stroh an und nistet sich in dasselbe zwischen seine Elemente ein. Man kann ihn mit unbewaffnetem Auge im Stroh in Form dunkler, punktartiger Stellen erkennen, die unter dem Mikroskop als sporentragende Hyphen festgestellt werden.

Wir haben das Stroh in Form einfacher Strohhalme, in Form von Strohhäcksel verschiedener Länge und Art und als Strohmehl zu den Versuchen verwendet. In einem Falle war Strohhäcksel in Wasser mit dem Pilz mehrere Monate stehen geblieben; das Stroh war ganz zerfallen.

Vorkommen des Pilzes. Der Pilz wurde gefunden im Pansen- und Haubeninhalt der Wiederkäuer, weniger in deren Labmageninhalt, ferner in den Faeces des Menschen und verschiedener Tierarten, im Erdboden, am Käse, im Magen, Coecum, Colon des Pferdes, des Schweines und der Wiederkäuer und im Stroh. Er ist also ungemein verbreitet.

Verhalten zum Magensaft. Besonders beachtenswert ist, daß der Pilz der Einwirkung des Magensaftes, bzw. der Salzsäure desselben widersteht. Seine Wirkung auf Cellulose ist allerdings sowohl in Gegenwart von reiner 0,1—0,5% HCl als in saurem, HCl und Milchsäure enthaltenden Magensaft und der Magenflüssigkeit (der aus dem Mageninhalt ausgepreßten Flüssigkeit) herabgesetzt; er ist weniger wirkungskräftig. Kommt der so beeinflusste Pilz aber wieder in günstige Lebens- und Wachstumsbedingungen, wie sie z. B. im Dickdarm herrschen, dann wird er wieder wirkungskräftig. Es kann somit nicht zweifelhaft sein, daß Pilzmycelien und Pilzsporen, die man der Nahrung zusetzen würde, trotz ihres

Aufenthaltes im Magen und der ihre Wirksamkeit schädigenden Beeinflussung durch die Magenflüssigkeit infolge des dem Magenaufenthalte folgenden Passierens des Dünndarms und des daran sich anschließenden Aufenthaltes im Dickdarm in letzterem lebhaft wachsen und kräftig lösend auf Cellulose einwirken können. Auch im Dünndarm trifft man den Pilz in wirksamem Zustande an. Da der Inhalt aber im Dünndarm nur eine verhältnismäßig kurze Zeit verweilt, so kann der Pilz hier eine irgend nennenswerte Wirkung auf Cellulose nicht entfalten; dies findet erst im Dickdarm statt.

Kohlenstoffbedarf. Oben wurde schon erwähnt, daß der Pilz ohne Gegenwart einer Kohlenstoffquelle nicht gedeihen und nicht wachsen kann. Als solche diente bei unseren Versuchen in der Regel Cellulose oder — bei der Züchtung — Mannit. Er kann aber selbstverständlich auch aus anderen C-haltigen Körpern seinen C-Bedarf decken; es lag nahe, dabei an Äthylalkohol zu denken. Wir stellten deshalb mit diesem Versuche an, wobei wir zugleich seine Widerstandskraft gegen Alkohol feststellen wollten. Unsere Versuche zeigten, daß der Alkohol eine sehr gute Kohlenstoffquelle für den Pilz darstellt und daß dieser gegen die Einwirkungen stärkerer Konzentrationen von Alkohol sehr widerstandsfähig ist. Bei Zusatz von Alkohol in steigender Konzentration zeigte sich, daß der Pilz bei 80% noch lebte und gedieh. Brachte man ihn in 96%igen Alkohol, dann entstand durch die abfallenden Sporen eine Trübung; dadurch, daß dann immer mehr Sporen frei wurden, erfolgte eine Zunahme der Trübung und Verdunkelung des Alkohols. Eine Aussaat aus dieser Alkohol-Pilzmischung gedieh auf Mannit-Agarplatten vorzüglich. Wurde diese Alkohol-Pilzkultur mit Cellulosepapier in die S. 245 genannte Lösung gebracht, so wuchs der Pilz und löste Cellulose. Setzte man den Pilz mit Alkohol und Cellulose zusammen an, dann wuchs er zwar sehr gut, löste aber nur wenig Cellulose. Offenbar bezieht er dann seinen C hauptsächlich vom Alkohol und greift deshalb die Cellulose weniger an. Eine Öse Pilzkultur aus 96%igem Alkohol griff in der S. 245 genannten Nährlösung die Cellulose später an als eine aus dieser Nährlösung stammende Pilzkultur.

Die hohe Widerstandskraft dieses Pilzes gegen hohe Konzentrationen von Alkohol, in denen die meisten anderen Bakterien absterben, gestattet, aus Mischkulturen Reinkulturen des Pilzes auf dem Wege der Alkoholpassage herzustellen.

Isolieren des Cellulosefermentes. Um festzustellen, ob das Cellulose lösende Ferment von dem Pilz getrennt werden kann und ob es dann auch auf Cellulose wirkt, wurde folgender Versuch gemacht: Man brachte in sterile Kölbchen die betreffende Nährlösung mit Filtrierpapier, das mit Chloroformdampf sterilisiert war, und setzte Pilzsporen zu. Nach 3 Wochen war unter der inzwischen gebildeten mehrfach erwähnten dunklen, sporenhaltigen Mycel-Faserdecke eine breiige faserige Masse entstanden. Diese Sporen, Mycelien, Hyphen und Cellulosefasern enthaltende Flüssigkeit wurde durch ein Berkefeld-Filter gesaugt. Die filtrierte Flüssigkeit wurde auf Keime geprüft durch Plattenkulturen. Sie erwies sich keimfrei (auch bei mikroskopischer Prüfung). Dies keimfreie Filtrat wurde in 3 sterilen Reagiergläsern verteilt mit Zusatz von Filtrierpapierstreifen. Zum Schutze gegen das Eindringen von Luftkeimen wurde 1 ccm Toluol auf die Oberfläche der Flüssigkeit gebracht. Man ließ diese Filtrierpapier enthaltenden Flüssigkeiten bei 22° C. stehen. Nach 14 Tagen sah man Auffaserung des Papiers, nach weiteren 14 Tagen war das Papier so zerfallen, daß beim Schütteln ein Brei entstand. Irgend ein Pilzwachstum war nicht zu beobachten.

Um jedoch die Pilzfreiheit dieser Masse sicher festzustellen, wurden 3 Platten Mannitagar beimpft. Es trat kein Wachstum ein.

Man muß aus diesen Versuchsergebnissen schließen, daß auch das freie Ferment des in Frage stehenden von A. Hopffe gefundenen Pilzes Cellulose löst.

Größe der Celluloselösung. Um ein Bild von der Menge der während einer bestimmten Zeit durch den Pilz gelösten Cellulose zu gewinnen, wurden Wägungsversuche angestellt. Abgewogene Mengen Cellulose wurden der Einwirkung des Pilzes in der betreffenden Nährlösung während einer bestimmten Zeit ausgesetzt. Dann wurde der Digestionsversuch abgebrochen,

die Digestionsmasse filtriert und nach dem Trocknen gewogen. Man erhielt so das Gewicht der noch vorhandenen ungelösten Cellulose mit Einschluß des Gewichts des Pilzes. Aus der Differenz des Gewichts der angesetzten Cellulosemenge und der ungelöst gebliebenen Substanz ergab sich, wie viel Prozent der Cellulose in der Versuchszeit ungefähr in Lösung übergegangen waren. Das Ergebnis konnte kein ganz genaues sein, weil, wie erwähnt, das unbekannte Gewicht des Pilzes, das aber nur unbedeutend sein konnte, hätte in Abzug gebracht werden müssen, wenn ein ganz genaues Resultat über die Menge der gelösten Cellulose hätte erzielt werden sollen.

Wir führten zunächst zwei Versuchsreihen und zwar jede doppelt durch. Wir setzten

1. 1 g Papierstoff mit 0,9473 Cellulosegehalt und
2. $\frac{1}{2}$ „ „ „ 0,473 „

an und zwar mit je 50 g Nährlösung, die mit Pilzsporen geimpft wurde. Das Ergebnis der vier Versuchsreihen war folgendes:

Es waren gelöst:

in 3 Tagen	1,55—2,58 %;	in 4 Tagen	1,49—2,54 %;
„ 5 „	2,80—3,55 %;	„ 6 „	2,65—3,89 %;
„ 7 „	4,10—5,03 %;	„ 8 „	4,59—5,50 %;
„ 9 „	2,52—6,64 %;	„ 10 „	5,46—5,75 %;
„ 11 „	5,12—6,13 %;	„ 12 „	7,38—9,97 %;
„ 14 „	8,62—8,93 %;	„ 16 „	13,56 %;

der angesetzten Cellulosemenge.

Da die einfachen Wägungsversuche, wie erwähnt, keine ganz einwandfreien Ergebnisse liefern konnten, so stellten wir einen weiteren Versuch an, der in der Weise erweitert wurde, daß außer den Wägungen noch die Bestimmung des Cellulose- und des Eiweißgehaltes des Digestionsrückstandes vorgenommen wurde. Zu diesem Versuche verwandten wir 2 g Papiermasse mit 1,881 Cellulosegehalt und 500 g der mit dem Pilz beschickten Nährlösung. Nach 50 Tagen waren von den 2 g Papiercellulose nur noch 0,8972 g ungelöste Substanz vorhanden, es waren also 52,56% der angewandten Cellulose verschwunden bzw. gelöst. In der ungelösten Substanz fanden wir 0,0823 g Pilzeiweiß und 0,8149 andere Substanzen; also berechnet man 56,91% gelöste Substanz. In einer anderen Probe

wurden im Rückstand 0,7700 Cellulose nachgewiesen; es waren mithin 59,09% der angesetzten Cellulose gelöst worden.

Lösungsprodukte. Behufs Prüfung der bei der Celluloselösung entstehenden Abbau- bzw. Umwandlungsprodukte wurden 2—10 g Cellulose der Einwirkung des Pilzes in größeren, 500 g der erwähnten Nährlösung enthaltenden Kolben ausgesetzt und nach längerer Zeit die Flüssigkeit geprüft auf das Vorhandensein von Salpetersäure, salpetriger Säure, reduzierender und nicht reduzierender gelöster Kohlenhydrate, Jodoform bildenden Substanzen, flüchtigen Fettsäuren und löslichen Eiweißkörpern. Die angewandten Prüfungsmethoden waren folgende:

1. Auf Salpetersäure mit Diphenylaminschwefelsäure.
2. Auf salpetrige Säure mit α -Naphthylamin-Sulfanilsäure.
3. Auf Kohlenhydrate.
 - a) mit Fehlingscher Lösung ohne vorherige Aufschließung mit Salzsäure;
 - b) mit Fehlingscher Lösung nach vorheriger Aufschließung mit Salzsäure;
 - c) mit Molischs Reagens (α -Naphthol-Schwefelsäure);
 - d) durch Erhitzen mit Natronlauge;
4. Auf Jodoform bildende Substanzen durch Erhitzen mit Jodjodkalium und Natronlauge.
5. Auf flüchtige Fettsäuren durch Destillation der mit Phosphorsäure angesäuerten Flüssigkeit.
6. Auf lösliche Eiweißsubstanzen mit den üblichen Eiweißreagenzien (Heller, Biuretreaktion, Millonsche Reaktion usw.)

Die Ergebnisse dieser Methoden zeigt die nachfolgende Tabelle (Seite 253).

Man ersieht aus derselben, daß es sich bei der Cellulosezersetzung durch den von uns gefundenen, im Verdauungskanal wirkenden Pilz um andere Vorgänge handelt als um die vielfach beobachteten unter lebhafter Gasentwicklung stattfindenden Cellulose-Gärungsprozesse, die auch wir früher beobachtet und studiert haben. Auch bei den durch die früher unter Scheunerts Leitung festgestellten Cellulose angreifenden Bakterien hervorgerufenen Prozessen handelte es sich nicht um diese Gärungen.

Prüfung auf	1. nach 16 Tagen		2. nach 21 Tagen		3. nach 28 Tagen		4. nach 28 Tagen		5. nach 40 Tagen	
	in der ursprüngl. Flüssigkeit	in der auf $\frac{1}{10}$ konzentrierten Flüssigkeit	ursprüngliche Lösung	auf $\frac{1}{10}$ konzentriert	ursprüngliche Lösung	auf $\frac{1}{10}$ konzentriert	ursprüngliche Lösung	auf $\frac{1}{10}$ konzentriert	ursprüngliche Lösung	auf $\frac{1}{10}$ konzentriert
Salpetersäure	-	-	-	±	-	-	±	-	+	+
Salpetrige Säure	±	-	±	+	-	-	+	-	+	-
Reduzierende Kohlenhydrate	-	Spuren	-	±	-	-	+	+	-	±
Nach dem Aufschließen reduz. Kohlenhydrate	±	+	-	+	-	-	+	+	±	+
Die Molischsche Reaktion gebende Substanzen										
Durch Alkali sich gelbfärbende Substanzen	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+
Jodoformgebende Substanzen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flüchtige Fettsäuren	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lösliche Eiweißkörper	-	-	-	-	-	-	-	-	±?	±?
Milchsäure	-	-	-	±	-	±	±	-	-	-

Ebenso ist bei den durch Wirkung des *Aspergillus*-Pilzes in Gegenwart der oben erwähnten Bakterien (in Symbiose) eintretenden Cellulosezersetzungen nur geringgradige oder keine Gasentwicklung zu beobachten.

Nach unseren bisherigen Versuchsergebnissen kann es keinem Zweifel unterliegen, daß bei den Cellulosezersetzungen im Verdauungsschlauche, abgesehen von den bei den Cellulosegärungen entstehenden organischen Säuren noch andere verwertbare Produkte entstehen. Im Verdauungsschlauche laufen zweifellos verschiedene Arten von Vorgängen bei der Cellulosezersetzung ab, wie dies auch bei der Zersetzung und Verdauung anderer Kohlenhydrate, der Eiweißkörper und der Fette der Fall ist. Nur ein Teil der Cellulose verfällt den bekannten genau untersuchten, unter Entwicklung von Gasen (CH_4 , CO_2 , H_2 , N_2) und organischen Säuren ablaufenden Gärungen, ein anderer Teil verfällt anderen, den sonstigen Verdauungsvorgängen ähnlichen Umwandlungen.

Wie ich einleitend schon bemerkte, werden meine Mitarbeiter ihre Untersuchungen (die wir übrigens noch fortsetzen) und deren Ergebnisse später schildern und dabei die über das gesamte Gebiet der Cellulosefrage vorhandene reiche Literatur berücksichtigen und den in den vorstehenden kurzen Mitteilungen nicht erwähnten Autoren gerecht werden.
