

Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen.

I. Mitteilung.

Die Kultur von Algen in Agar.

Von **Ernst G. Pringsheim.**

(Mit Tafel IX und X.)

Einleitung.

Im Anschluß an frühere Untersuchungen über den Stimmungswechsel bei phototropischen Phanerogamenkeimlingen hatte ich die Absicht, ähnliche Fragen bei phototaktischen Mikroorganismen in Angriff zu nehmen. Dabei sollten die Veränderungen der Reizbarkeit nicht nur durch das Licht selbst, sondern auch durch chemische Einflüsse bewirkt werden.

Bald zeigte es sich dabei, daß das durch Zufall in der Natur oder in Rohkulturen gebotene Material für solche Zwecke fast unbrauchbar ist, weil unübersehbare Nebenumstände hineinspielen, die die erstrebte Beherrschung des Materiales in reizphysiologischer Hinsicht unmöglich machen. Selbst noch so üppige und lange sich entwickelnde Kulturen ändern ihr Verhalten in exakteren Versuchen schon nach kurzer Zeit, sodaß eigentlich nur am selben oder an aufeinanderfolgenden Tagen angestellte Experimente vergleichbar sind. Diesen Fehlerquellen, den „Launen“ des lebenden Materiales auf die Spur zu kommen, sollte aber gerade das Ziel der Untersuchungen sein. Bedingung für das Fortschreiten der Arbeit war daher Beherrschung der Kulturmethodik in dem Grade, daß irgend ein physiologischer Zustand jederzeit wieder hergestellt werden konnte.

Für das Studium chemischer Einflüsse, also in der Hauptsache der Ernährungsbedingungen, war es ferner notwendig, die Gegenwart fremder Organismen auszuschließen, weil deren Stoffwechselprodukte, wie überhaupt die Veränderungen der Nährlösungen durch sie, eine Quelle der größten Störungen bildeten. Es wurde hierbei hauptsächlich an Bakterien und Pilze gedacht. Wie sich aber später zeigte, ist es unter Umständen eben so schwer, Protozoen (Amoeben u. dgl.) fernzuhalten. Jedenfalls konnte ich nur von absoluten Reinkulturen Förderung meiner Bestrebungen erwarten. Von diesen war dann zu

erhoffen, daß die im vorigen Absatz angedeuteten Störungen ausblieben, eine Erwartung, die sich für gewisse Fälle auch bewährt hat.

Zunächst galt es daher, sich nach leicht kultivierbaren Lebewesen umzusehen, am besten solchen, deren Isolierung schon gelungen und über deren Reizbarkeit einiges bekannt ist. Besonders phototaktische Organismen schienen mir Erfolg zu versprechen. Als solche kamen bei der Forderung nach Reinkulturen weniger die Schwärmer höherer Algen in Frage, als die grünen Flagellaten und niederen Volvocineen. Von den ersteren bot sich die von Zumstein¹⁾ rein kultivierte *Euglena gracilis*, über deren Reizphysiologie Frank²⁾ gearbeitet hat, von den letzteren Chlamydomonasarten, über die Frank und Jacobsen³⁾ entsprechende Erfahrungen gesammelt haben, als Erfolg verheißend dar.

Meine Versuche begannen vor nunmehr vier Jahren mit *Euglena gracilis*. Die mannigfach variierten Versuche, hiervon nach der Methode von Zumstein Reinkulturen herzustellen, wollten alle nicht glücken. Über diese Experimente, deren Mißlingen früher schon gemeldet wurde⁴⁾, werde ich in einer von den späteren Mitteilungen berichten, die nebst einigem anderen die Physiologie bestimmter, in Reinkultur gewonnener Arten zum Inhalt haben sollen.

Als die Zumsteinsche Methode so versagte, versuchte ich schließlich, mit dem in Rohkulturen weiter gezüchteten Materiale Agarplatten zu gießen. Die ersten Versuche schlugen fehl, weil bei bloßem Nährsalzzusatz zum Agar das Wachstum der Euglenen zu gering war und in Nährböden mit Zumsteinscher Lösung bei höherer Konzentration der Zitronensäure kein Erstarren des Agars zu erzielen war. Bei Agar mit sehr verdünnter Zumsteinscher Lösung wuchsen zwar die Euglenen ganz gut, gleichzeitig aber die verschiedensten Pilze (ebenso wie in Flüssigkeitskulturen nach der Z. sehen Methode) so üppig, daß ein reines Abimpfen der Flagellaten nicht möglich war. Erst als ich, ähnlich wie das Molisch⁵⁾ für Purpurbakterien empfohlen hat, den mit dem lebenden Material beschickten Agar im Reagenzglas selbst unter Abkühlung mit Wasser erstarren ließ, be-

1) H. Zumstein, Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. Diss. Basel 1899 u. Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., Bd. 34, 1900.

2) Th. Frank, Kultur und chemische Reizercheinungen der *Chlamydomonas tingens*. Botan. Zeitung, Jahrg. LXII. 1904.

3) E. Jacobsen, Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen. Zeitschrift für Botanik, Bd. II. 1910.

4) E. G. Pringsheim, Über die Herstellung von Gelbfiltern nsf. Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch., Bd. XXVIa. 1908.

5) H. Molisch, Die Purpurbakterien. Jena 1907.

kam ich reine Kolonien der Euglenen, deren Abimpfen aber natürlich mühsam war und nicht ohne Infektion gelang.

Auch diese Schwierigkeit wurde schließlich überwunden, als ich die verschiedensten organischen Zusätze zum Agar durchprobierte und in einem Nährboden, der weiter nichts als 2% Agar-Agar und 0,1% Asparagin enthielt, ein für meine Organismen sehr geeignetes Substrat auffand. Ging man von in Wasser ausgeschlüpfen Schwärmern aus, die sich phototaktisch angesammelt hatten, so entwickelten sich nicht allzu-viele Bakterien, d. h. deren Kolonien waren klein und ließen genug freie Stellen zwischen sich, um die bei gutem Lichte bald auftauchenden grünen Fleckchen mit der Platinnadel herausholen zu können. Eine Wiederholung des Verfahrens lieferte bakterienfreie Reinkulturen.

Bei diesen Versuchen waren Erfahrungen verschiedener Art gesammelt worden, die die Isolierung weiterer chlorophyllführender Organismen mit Hilfe des Plattengusses von in Agar verteiltem Materiale als hoffnungsvoll erscheinen ließen. Auch waren manchmal schon fremde grüne Kolonien in meinen Euglenenplatten aufgetreten, deren Art zunächst nicht weiter untersucht worden war. Ferner regte mich die Verfolgung der Meinholdschen Arbeit¹⁾ zur Physiologie der Diatomeen zu erfolgreichen Versuchen an, auch mit diesen Organismen Ausgußplatten zu machen an Stelle der von O. Richter²⁾ empfohlenen Methode das lebende Material auf die Oberfläche des erstarrten Substrates zu bringen. Deshalb beschloß ich, zu versuchen, was etwa in solchen Platten von chlorophyllhaltigen Mikroorganismen zu wachsen imstande ist, und ob die Auffassung, die meisten Algen hielten die 40° des verflüssigten Agars nicht aus, nicht vielleicht unrichtig ist.

Der Erfolg bestätigte meine Hoffnungen insoweit, als in meinen Platten sehr verschiedenartige, teilweise als schwer kultivierbar geltende Organismen auftraten, deren Reinkultur allerdings auf die verschiedenartigsten Schwierigkeiten stieß und daher vorläufig nur bei wenigen Formen geglückt ist³⁾. Im folgenden will ich daher zunächst meine

¹⁾ Th. Meinhold, Beiträge zur Physiologie der Diatomeen. Cohns Beitr. zur Biologie der Pflanzen, Bd. X. 1911.

²⁾ O. Richter, Reinkulturen von Diatomeen. Ber. d. deutsch. bot. Ges., Bd. XXI. 1903. — Zur Physiologie der Diatomeen. Sitzungsber. der kaiserl. Akad. d. Wiss. in Wien. Math.-naturw. Kl., Bd. CXV, Abt. I. 1906.

³⁾ Wie ich später fand, ist A. Tischutkin (Über Agar-Agar-Kulturen einiger Algen und Amöben. Zentrabl. f. Bakt., 2. Abt., Bd. III. 1897.) nach seinen Angaben darin glücklicher gewesen. Er gewann durch Plattenguß mit einprozentiger Lösung von Agar in „gewöhnlichem“ Wasser Reinkulturen von folgenden Algengattungen: *Oscillaria*, *Tolypothrix*, *Aphanocapsa*, *Anacystis*, *Dia-*

allgemeineren Erfahrungen niederlegen, da auch ohne Reinkulturen eine Menge von Beobachtungen und Versuchen möglich sind, und es mich viel zu weit führen würde, alle in meinen Kulturen auftretenden Organismen fortzuzüchten. Im Anschluß daran will ich später in besonderen Mitteilungen über die ausführlicher behandelten Formen, die ich von fremden Lebewesen isolieren konnte, berichten.

Methodik.

Die Methoden, deren ich mich bediente, sind einfach und nicht neu. Die Grundlage bildete das Koehsche Plattenverfahren, das aber für meine Zwecke in Kleinigkeiten modifiziert werden mußte. Verwendet wurden Petrischalen, Reagensgläser usf. von den üblichen Formen.

Als Nährboden wurde 1—2prozentiger Agar-Agar meist nur mit Mineralsalzen angewendet. Nachdem Vergleichsversuche die große Überlegenheit des gewässerten Agars gegenüber dem ungewässerten gezeigt hatten, wurde nur noch der erstere verwendet. Er wurde ungefähr in der von O. Richter¹⁾ empfohlenen Weise bereitet, nämlich durch mehrere Tage unter der Wasserleitung berieselt und dann noch zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Zusatz der Salze wurde er im Autoklav bei 2 Atmosphären gelöst und durch entfettete Verbandwatte filtriert. Danach war er fast völlig klar und farblos. Papierfiltration ist sehr langwierig und meist überflüssig.

Als Salzzusatz wurde nur das Notwendigste gegeben, und zwar als Stickstoffquelle 0,1% KNO_3 , NH_4NO_3 oder $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Letzteres erwies sich von den Ammonsalzen als das geeignetste. Das Ammoniumnitrat wurde nur verwendet, wenn sowohl den Nitrat- wie den Ammon-Algen Gelegenheit zur Entwicklung gegeben werden sollte. In den Bedürfnissen an die Stickstoffquelle zeigten sich große Verschiedenheiten zwischen den verschiedenen Organismen. Saure Phosphate wie überhaupt saure Reaktion wirkten fast überall vernichtend. Auf den Ammonplatten wuchsen mehr Pilze als auf den Nitratnährböden. Diese waren hinderlicher als Bakterien. Neben der Stickstoffquelle

toma, Nitzschia, Navicula, Gomphonema, Pleurococcus, Raphidium, Cosmoeladium, Protoecoccus, Scenedesmus, Penium, Closterium, Cosmarium, Oedogonium, Stigeoclonium und einigen nicht bestimmten. Mangels genauerer Angaben möchte ich freilich nach meinen Erfahrungen die absolute Bakterienfreiheit seiner Kulturen bezweifeln. Doch hat er jedenfalls das Verdienst, auf die Möglichkeit des Plattengusses hingewiesen zu haben.

¹⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen, Leipzig 1911. S. 31.

wurde überall 0,025% Magnesiumsulfat und 0,025% sekundäres Kaliumphosphat gegeben.

Ein vollständiger Algenagar enthielt also auf 1000 ccm dest. W.:

10—20 g gewässerten Agars,
 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder KNO_3 oder NH_4NO_3 ,
 0,25 g MgSO_4 ,
 0,25 g K_2HPO_4 .

Weitere Zusätze wurden selten gegeben. Ca- oder Fe-Mangel war wohl auch kaum zu befürchten. Organische Nährstoffe wurden meist erst zugesetzt, wenn Reinkulturen erzielt waren.

Mit der Fortzüchtung der auf den Agarplatten oft recht üppig gedeihenden Organismen in Flüssigkeiten hatte ich große Schwierigkeiten. Von Nährlösungen erwies sich ein im Autoklav hergestellter Auszug aus Gartenerde, der noch mit der entsprechenden Stickstoffverbindung versehen wurde, manchmal als sehr günstig. Doch wuchsen viele von den Versuchsubjekten darin nicht und ebensowenig in den verschiedenartigsten Nährsalzgemischen, die auch da, wo sie Vermehrung gestatteten, fast überall nur kümmerliches Gedeihen ergaben. Ich hatte deshalb den Eindruck, daß diese Algen in der Natur irgendwelche organischen Stoffe, vielleicht in minimalen Mengen, zur Verfügung haben, die vielfach durch im Agar vorhandene Substanzen ersetzbar sind. Eine wirkliche Bearbeitung dieser Frage ist natürlich nur mit Reinkulturen möglich, doch glaube ich gewisse Schlüsse auch schon aus den erwähnten Erfahrungen ziehen zu dürfen.

Da der gewässerte Agar ohne besondere Stickstoffquelle kaum irgend welche Vermehrung erlaubte, auch die Art des Stickstoffsalzes, ob Ammon oder Nitrat, von großer Bedeutung war, so kann es sich kaum darum handeln, daß den Algen in anorganischen Nährlösungen etwa eine organische Stickstoffquelle fehlte, die im Agar enthalten wäre. Ganz ausgeschlossen ist diese Möglichkeit freilich nicht, da eventuell neben einer anorganischen Stickstoffverbindung eine organische in sehr kleinen Mengen förderlich sein könnte. Doch kann man diesem Erklärungsversuche nicht viel Wahrscheinlichkeit beimessen, da etwas ähnliches bisher nicht bekannt geworden ist. Wahrscheinlicher, und bei dem Kohlehydratreichtum des Agarnährbodens einleuchtender, ist es wohl, daß die Algen neben der Kohlensäureassimilation irgend welcher organischen Kohlenstoffquellen, vielleicht Zuckerarten, bedürfen, um einigermaßen zu gedeihen. Freilich scheint auch diese Auffassung zunächst paradox, da noch weniger als bei den Stickstoffverbindungen einzusehen ist, warum die fraglichen Organismen sich ihren Bedarf an Kohlehydraten nicht selbst herstellen sollen. Doch muß das bis auf weitere Untersuchungen noch offen bleiben. Von einer sog. Reizwirkung organischer Stoffe

zu sprechen scheine ich mich deshalb, weil mir dieser Ausdruck nicht viel zu sagen scheint. Er kann höchstens andeuten, daß ein unbekannter Zusammenhang zwischen der Gegenwart eines Stoffes und der Förderung des Wachstums besteht, der durch einfache Verwendung im Bau- oder Betriebsstoffwechsel nicht einleuchtend erklärt werden kann. Aber irgendwie in die chemischen Umsetzungen im Organismus eingreifen muß ja jeder Stoff, der eine Wirkung ausübt. Ob z. B. in dem für viele meiner Objekte sehr günstigen Erdeauszug sich leicht verwertbare Stoffe befinden, scheint mir sehr zweifelhaft, da eine Bakterienentwicklung darin nur in geringem Maße auftrat. Auch behielten solche ausgefaulten Extrakte ihre Wirksamkeit. Eine Förderung des Wachstums von Organismen durch sogen. Humusstoffe ist ja oft genug festgestellt worden, ohne daß diese die Stelle der eigentlichen Nährstoffe zu vertreten vermocht hätten. Wenn man das als „Reizwirkung“ bezeichnen will, so ist schließlich nicht viel dagegen zu sagen. Doch ist die Sache damit nicht erklärt.

Um eine Nährlösung mit den wirksamen Stoffen des Agars herzustellen, die vielleicht allen in meinen Platten gewachsenen Organismen Vermehrung erlauben sollte, versuchte ich einmal, sehr geringe Mengen von Agar-Agar, etwa 0,1%, zu verwenden. Es entsteht dann eine nur eben noch ganz schwach gallertige Masse, die sich leicht zu einer opalisierenden Flüssigkeit zerschütteln läßt. Der Erfolg war bis jetzt gering, doch läßt sich das Resultat wegen des ohnehin sehr mangelhaften Wachstums im Winter noch nicht übersehen. Weiterhin stellte ich dann durch Hydrolyse von Agar-Agar mit verdünnter Schwefelsäure in der Hitze und Neutralisieren mit pulverisierter Kreide eine bräunlich gefärbte, völlig flüssige und klar durch Papier filtrierende Lösung her, die offenbar reich an Zuckern war und Fehlingsche Lösung reduzierte. Sie kam in sehr verdünntem Zustande mit den notwendigen Nährsalzen in Verwendung, ohne bisher irgend welches Algenwachstum zu erlauben. Auch als Verunreinigung auftretende Pilze gediehen darin sehr schlecht. Eine Methode, die im Agar gewachsenen Algen in Flüssigkeit sicher weiter zu kultivieren, ist also bisher nicht gefunden¹⁾.

Die Kulturen wurden zum größten Teil an dem nach Norden gelegenen Fenster meines Arbeitsraumes untergebracht, wobei ich mich der von O. Richter²⁾ empfohlenen Anordnung bediente. Die Petrischalen standen in hohen Stößen unter Glaszylindern auf dem Fensterbrette. Wurde auf diese Weise der Staub abgehalten und die Ver-

¹⁾ Wie sich später zeigte, beruhen die Mißerfolge mit Nährsalzlösungen z. T. auf giftigen Beimengungen des destillierten Wassers. Vergl. S. 327.

²⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911. S. 153.

dunstung herabgesetzt, was sich bei der langen Dauer der Versuche als notwendig erwies, so lief oft das durch Temperaturdifferenzen im Deckel angesammelte Wasser zwischen Schale und Deckelrand herunter. Noch störender aber erwies sich zuerst das Auftreten von Pilzen (*Penicillium*) auf den gummierten Papieretiketten in dem feuchten Raume. Dadurch wurde manche schöne Kulturplatte infiziert. Die Pilze wuchsen mit Vorliebe gerade auf den Algenkolonien, in denen sie offenbar mehr Nährstoffe fanden als im Agar. Die Algen gingen dann unter Verfärbung zugrunde. Erst versuchte ich die Pilze mit Hilfe eines in Alkohol getauchten Pinsels zu entfernen. Später benutzte ich mit mehr Glück eine desinfizierende Lösung, und zwar der Sichtbarkeit wegen eine solche von Kaliumbichromat, zum Ankleben der Etiketten, womit diese Schwierigkeit behoben war. Es gelang mir so, manche Platten über ein Vierteljahr zu erhalten.

Beim Plattengießen wurden die Röhrechen mit etwa 10 ccm des geschmolzenen Agars in einem Wasserbade auf genau 40° C. gebracht, dann wurde etwas von einer Algenaufschwemmung hinzugegan und gewöhnlich noch mit etwa 0,5 ccm der ersten Mischung eine Verdünnungsplatte angelegt. Die Petrischalen hatten 10 cm Durchmesser.

War etwas gewachsen, dann wurde eine geeignete Kolonie unter dem Mikroskope ausgesucht, wobei ich mit Leitz-Objektiv 4 und Comp. Okular 12 bis zu 304facher Vergrößerung kam. Die beste Stelle zum Weiterimpfen wurde auf der Rückseite der Schale mit einem Tintenkreis bezeichnet, dann die Schale nun mit dem Deckel nach oben auf den Mikroskoptisch gestellt und bei der Beleuchtung von unten ohne Kondensor, die eine besonders gute Unterscheidung erlaubte, ein Agarstückchen mit der betreffenden Kolonie herauspräpariert. Dazu dienten mir an Stelle der gewöhnlichen Impfnadeln aus Platindraht solche aus 25prozent. Platiniridium, die ich mir von Heracus in Hanau kommen ließ. Sie besitzen eine beträchtliche Steifheit und Elastizität, was sie für unseren Zweck geeignet macht, und sind nicht viel teurer als Platin¹⁾. Man kann sie leicht an der Spitze breit klopfen und zu einer scharfen Schneide zurechtschleifen. Die mechanischen Eigenschaften sind ungefähr dieselben wie die von hartem Messingdraht.

Das Agarstückchen wurde vorsichtig an der Innenwand des Reagenzglases verrieben und nach dem Mischen die Platte gegossen.

Ein Auftragen der Impfmasse auf die Oberfläche des erstarrten Agars bewährte sich sehr viel schlechter und war erst nach Zurückdrängung der Bakterien mit einigem Erfolge möglich, weil diese sich

¹⁾ Platiniridiumnadeln empfiehlt auch A. Meyer in seinem Praktikum der botan. Bakterienkunde.

sonst auf dem Substrate so stark ausbreiteten, daß sie die Algen bald ganz und gar überwucherten. Sind sie dagegen unter der Oberfläche des Agars festgehalten, so werden sie an der räumlichen Verbreitung verhindert. Sie entwickeln sich dann meist nur zu sehr winzigen Kolonien, die das Aussehen einer Platte nicht sehr beeinträchtigen und die Algen kaum schädigen. Viel störender sind die bald große Flächen einnehmenden Pilze.

Oft sah eine Platte oder doch Partien von ihr unter dem Mikroskope so völlig rein aus, daß es aussichtsvoll erschien, davon in Sehröhrchen oder in organische Flüssigkeiten zu impfen. Das brachte aber gewöhnlich Enttäuschungen. Nur eine sehr häufige Wiederholung des Plattengießens unter stetiger mikroskopischer Kontrolle kann schließlich zu bakterienfreien Kulturen führen. Deshalb sind meine Untersuchungen noch nicht so weit gediehen wie ich anfangs hoffen durfte.

Im allgemeinen scheint die Bakterienfreiheit bei den „kriechenden“ Formen viel leichter zu erreichen zu sein als bei den unbeweglichen. Zu den ersteren gehören die metabolischen Flagellaten, die meisten Conjugaten: Mesotaeniaceen, Desmidiaceen und Zygnemaceen, dann Diatomeen und Oscillatoriaceen, also eine stattliche Anzahl der hier in Betracht kommenden Formen. Die Beweglichkeit führt die Individuen von selbst nach bakterienfreien Stellen im Agar, läßt sie außen ansitzende Keime abstreifen und erlaubt ihnen bessere Vermehrung als sie bei den meist in dicken Klumpen wachsenden unbeweglichen Arten möglich ist. In solchen dichten Kolonien vermehren sich die Bakterien auf irgend welchen abgeschiedenen Schleimstoffen und dergleichen, ohne daß man mit schwächeren Vergrößerungen etwas davon sieht.

Mit der leichteren Verschiebbarkeit in der Agargallerte mag es z. T. zusammenhängen, daß kleine Formen leichter kultivierbar sind als große, denn die nach der Teilung zusammengepreßt bleibenden relativ größeren Zellen werden von einander und von Bakterien mehr zu leiden haben als sich weiter ausbreitende kleine Formen. Es scheint mir aber noch ein innerer Grund hinzuzukommen, eine größere Empfindlichkeit der großzelligeren Formen, wenigstens bei verwandten Organismen. Vielleicht liegt hier im kleinen etwas Ähnliches vor wie bei der Regel, daß in den verschiedensten Reihen der Lebewesen die Riesen Endglieder darstellen, die dem Kampfe ums Leben nur unter ganz bestimmten, eng umschriebenen Bedingungen gewachsen sind.

E. G. Pringsheim, Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. 314

(Nitrat u. Ammon)	Bacillariaceae	Arten von Nitzschia, Navicula, Gomphonema, Cymbella, Fragilaria u. a.
(Nitrat u. Ammon)	Volvoeales	Chlamydomonadaeeen, u. zw. Chlamydomonasarten, Haematococcus pluvialis. Volvoeaeen, Gonium.
(Nitrat u. Ammon)	Protococeales	Protococeaeen, Pleurococeaeen, Scenedesmaceen, Hydrodietyaeen, Pediastrum.
(Ammon)	Ulotrichales	Coleochaetaeeen.
(Nitrat)	Siphonales	Vaucheriaeen.
(Ammon)	Bryophyten	Moosprotonemen.
(Ammon)	Pteridophyten	Farnprothallien.

Ferner von farblosen Organismen: Bakterien, Pilze, Amoeben, Myxomyeeten, Flagellaten, Infusorien, Nematoden.

Auffallend war es, daß bei der Verwendung von Kleinalgen-Gemischen zu Rohkulturen in Nährsalzlösungen mit und ohne Erdenauszug sehr bald die weniger interessanten, weil häufigen Formen, vorherrschten, nämlich Oseillarien, Diatomeen, Protococeaeen und Scenedesmaceen. Wurden dagegen die Keime von einander getrennt, indem von dem frischen Material, das in der Ursprungsflüssigkeit ohne Gefahr 3—4 und mehr Tage aufbewahrt werden konnte, Platten gegossen wurden, so erschienen oft eigenartigere Formen. Freilich wuchsen auch dann oft andere Arten, als sie bei mikroskopischer Prüfung bald nach dem Fange vorherrschend gefunden worden waren. Immerhin glaube ich in der so einfachen Plattengußmethode mit gewässertem Mineralsalzagar ein Hilfsmittel der Algenforschung empfehlen zu dürfen, das manches interessante Resultat verspricht, ganz abgesehen von den Aussichten, bakterienfreie oder wenigstens artreine Kulturen zu gewinnen. Vielleicht läßt sich diese Methode zu einer Art von biologischer Analyse der Gewässer ausbauen, in ähnlicher Weise, wie das für ganz heterotrophe Organismen mit Hilfe von Bouillon- und Peptonnährböden gelungen ist. Für diesen Versuch spricht auch der Umstand, daß viele im Objektträgerpräparat zu unförmlichen Knäueln zusammengeballte Algen im Agar ihre schönen Verzweigungssysteme,

wie es scheint, ganz ungestört entfalten, jedenfalls aber Zellteilung und Kolonienanordnung sich sehr elegant darstellen, wofür die Abbildungen Belege sein mögen.

Selbstverständlich weiß ich wohl, daß die unnatürlichen Bedingungen in solchen Kulturen mancherlei in der Natur nicht vorkommende Abnormitäten zeitigen werden. Aber ist denn das bei der Züchtung von Algen in Nährlösungen oder in künstlichen Pilzkulturen nicht auch der Fall? Und beide erscheinen uns heute als unentbehrliche Hilfsmittel der Forschung.

Die Erkennung, d. h. Bestimmung von Algen in Agarplatten wird anfänglich Schwierigkeiten machen, weil ihr Anblick in dieser Weise vielfach Neues bietet. Hat man aber erst eine Sammlung von leicht herstellbaren Mikrophotographien der Kolonien zur Verfügung, so werden zu den bekannten neue Merkmale hinzukommen, die die Bestimmung erleichtern. Anfangs erschien mir der Vorschlag von O. Richter¹⁾, die Kolonieförmigen kleiner Diatomeen als Hilfsmittel der Diagnose zu verwenden, wenig aussichtsvoll. Jetzt aber habe ich mich durch den Augenschein davon überzeugt, daß etwas derartiges gewiß möglich ist, wenn man sich auf ein bestimmtes Rezept für die Herstellung des Nährbodens einigt, wie das ja für die Wasseranalyse u. dgl. auch geschehen mußte. Ich schlage zu dem Zwecke die von mir verwendeten so einfachen Mischungen vor. Man kann das Material leicht in sterilen Sammelröhrchen heimbringen und dann Platten davon gießen, deren Entwicklung neben der direkten mikroskopischen Kontrolle helfen wird die Verbreitung bestimmter Formen zu studieren und vor allem die Spezifität der Standorte, ein so sehr interessantes Problem, aufzuklären, was bei Algen sicherlich leichter ist als bei irgend welchen anderen Organismen.

Für das Verständnis der charakteristischen Form der Kolonien ist es ebenso wichtig, die aus einer Teilung hervorgegangenen Zellen dauernd beisammen gehalten zu sehen als die durch Wachstumsverschiebungen, Schleimausscheidung oder Kriechbewegung bewirkte Auflockerung der aus einer Zelle hervorgegangenen Familie zu verfolgen. Dabei spielt wieder die Form der Zellen und ihr Widerstand im gallertigen Substrate eine große Rolle, worauf ich noch zurückkomme.

Schließlich scheint mir die Farbe der Kolonien, wie sie besonders bei Beleuchtung von unten auf dem Mikroskopisch, d. h. bei Beobachtung auf dunklem Grunde, deutlich wird, nicht ohne Bedeutung zu sein. So haben die Konjugaten ein anderes Grün als die Volvocaceen und wieder ein anderes als die Scenedesmeaceen. Vielleicht

¹⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911. S. 131.

kann man diese Differenzen auf exakte Basis stellen und als systematisches resp. algologisches Hilfsmittel in gewissen Fällen verwenden. Nur die Schizophyceen scheinen sich durch sehr verschiedenartiges Mischungsverhältnis ihrer drei Farbstoffe, des Chlorophylls, Cyanophycins und Carotins auszuzeichnen, und ähnliches kommt bei einzelnen Peridineen und Cryptomonasarten vor. Soweit ich aber bisher sehen konnte, ist eine bestimmte Tönung für die einzelnen Arten charakteristisch, solange sie sich vermehren. Erst wenn ihr Wachstum gehemmt ist, finden Änderungen statt. Eine Wiederholung der Gaidukow'schen Untersuchungen über komplementäre chromatische Adaption mit sicheren Speziesreinkulturen habe ich unternommen, ohne bisher irgend welche positiven Resultate zu erzielen. Überhaupt scheint mir für diese im Agar so gut wachsenden Organismen, die sich auch leicht weiter kultivieren lassen, unsere Methode in der Hand eines erfahrenen Algologen sehr viel zu versprechen. Denn was wir über die Artabgrenzung wissen, ist sehr wenig. Meine Sache wird es sein, die Ernährungsverhältnisse einem eingehenden Studium zu unterziehen.

Einzelbeobachtungen.

Im folgenden soll von den in meinen Kulturen beobachteten Organismen, soweit sie überhaupt näher verfolgt wurden, dasjenige mitgeteilt werden, was meine Aufmerksamkeit erregte. Die Ergebnisse, die mit gelungenen Reinkulturen erzielt wurden, sollen einer späteren Veröffentlichung vorbehalten bleiben. Es ist das bisher nur mit wenigen Arten geglückt, die aber doch schon manches interessante versprechen, nämlich mit einigen Scenedesmaceen, Protococcaceen und Chlamydomonasarten, mit *Haematococcus pluvialis*, *Euglena gracilis*, einem *Nostoc* und zwei *Oscillaria*arten.

Natürlich wurden nicht alle beobachteten Algenarten bestimmt, was wohl auch große Schwierigkeiten gehabt hätte. Besonders die oft auftretenden winzigen Arten von Diatomeen, *Oscillarieen* und grünen kugeligen Algen wurden nicht weiter verfolgt. Zwar könnte sicher die Unterscheidung gerade dieser Formen, die möglicherweise im Naturhaushalte eine größere Rolle spielen als man heute weiß, durch Kulturversuche viel gewinnen, doch bot diese Art der Arbeit vorläufig nicht genug Interesse, weil andere Aufgaben drängten. Deshalb wurde die Aufmerksamkeit zunächst den größeren und leichter erkennbaren Arten zugewandt.

Zygnemaceen.

Von Conjugaten wuchsen die Zygnemaceen im Agar nicht sehr gut, wie sich das denken läßt. Doch traten *Mesocarpus*, *Zygnema* und eine kleine *Spirogyra*art mit sehr engen Schraubenbändern in Platten auf, die mit Material aus einem klaren Gebirgsbache bei Tölz in Oberbayern beschickt worden waren. Hierin herrschte bei mikroskopischer Prüfung des frischen Materials *Zygnema* und *Fragilaria* vor. *Mesocarpus* wuchs in einer Petrischale mit ungewässertem Ammonphosphat-Agar, *Zygnema* und *Spirogyra* in gewässertem, alle drei also mit Ammonstickstoff. Sie sahen dabei in den primären Platten sehr frisch und gesund aus und bildeten vielfach Schlingen, die durch das interkalare Wachstum auf der Agaroberfläche entlang geschoben wurden. Keine der drei Fadenalgen wuchs in den von der ersten Kultur angelegten weiteren Agargüssen. Vielleicht können nur Zygoten die Erwärmung überstehen. Beim Übertragen auf die Oberfläche des erstarrten Agars wuchs *Zygnema* auf neutralem Ammoniumphosphat-Agar weiter, während es auf schwach sauerem, mit KH_2PO_4 versetztem Agar in abgerundete mehrzellige Stücke zerfiel, die noch Teilungen der Zellen aufwiesen und lange lebten (Figur 1, Tafel IX). *Zygnema* und *Mesocarpus* konnten auch in verdünnter Erdbabkochung mit 0,1% KNO_3 , wenn auch nicht sehr üppig, weitergezüchtet werden, was bei *Spirogyra* nicht gelang. Wasser aus einem Bassin des botanischen Gartens mit 0,1% NH_4NO_3 erlaubte *Zygnema* kein Wachstum. Eingehendere Versuche wurden mit diesen Algen nicht angestellt, weil für die Reinkultur wenig Hoffnung vorlag und an Rohkulturen genug Erfahrungen gesammelt worden sind.

Desmidiaceen.

Über Kulturversuche mit Desmidiaceen liegen wenig Mitteilungen vor. „Man kann verschiedene Desmidiaceen, z. B. die widerstandsfähigen *Cosmarium*-Arten, Desmidien u. a. längere Zeit im Laboratorium vorrätig halten und sogar zur Vermehrung bringen, wenn man sie in dem Originalwasser ihrer Fundorte beläßt“ (Andreesen)¹⁾. „Klebs²⁾ konnte namentlich *Cosmarium botrytis* in Wassergefäßen über Lehm an kühlen Plätzen des Laboratoriums lange in Entwicklung erhalten“ (Küster)³⁾. Ich selbst fand Erdeschlamm mit destilliertem Wasser für einige Formen brauchbar.

¹⁾ A. Andreesen, Beiträge zur Kenntnis der Desmidiaceen. Flora 1909, Bd. 99. S. 1.

²⁾ G. Klebs, Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena 1896.

³⁾ E. Küster, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Leipzig und Berlin 1907. S. 113.

Eine Aufschwemmung von Gartenerde wurde durch Schlämmen vom Sande befreit. Der abgesetzte schwarze Schlamm mit wenig Wasser erlaubte *Closterium Lunula* gute Vermehrung. Um den nach neun Wochen (11. November 1911 bis 16. Januar 1912) eintretenden Stillstand aufzuheben, wurde mit 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ gedüngt. Hierauf gingen die Kulturen sehr zurück. Vor der Düngung hatten die Zellen sehr viel Stärke angehäuft, besaßen aber sehr wenig Gipskristalle, beides offenbar aus Mangel an Nährsalzen.

Doch sind mit Lösungen bekannter Zusammensetzung bisher nur geringe Erfolge erzielt worden. Denn anorganische Salzlösungen scheinen den meisten Arten nicht zu genügen, und organische ließen sich wegen des Mangels an bakterienfreien Reinkulturen nicht verwenden. Man weiß deshalb nicht, woher es kommt, daß manche Desmidiaceen sich unter gewissen Umständen ziemlich plötzlich sehr stark vermehren können, wie z. B. *Closterium Lunula* und *Pleurotaenium Ehrenbergi* im November 1911 in verschiedenen Becken des Münchener Viktoriahauses, wo Tausende von Individuen mit einem Gefäß herausgeschöpft werden konnten (briefliche Mitteilung von Herrn Dr. O. Richter). Ebenso wenig weiß man bisher, weshalb gewisse Standorte, wie Moirlachen, Sphagnumpolster, von vielen Arten so sehr bevorzugt werden.

Freilich ist es Andreesens eigens hierauf gerichteten Bemühungen gelungen, in einer bestimmten Nährsalzmischung, nämlich in alkalisch gemachter Knopscher Lösung, bei *Cosmarium botrytis* eine leidliche Vermehrung zu erzielen, auch dann, wenn das Kaliumnitrat durch Nitrit ersetzt war. Doch schlugen Versuche mit anderen von den gebräuchlichen Nährlösungen durchaus fehl, und für *Closterium moniliferum* wurde gar kein positives Resultat erzielt. O. Richter¹⁾ irrt daher, wenn er sagt: „Andreesen benutzte bei seinen Desmidiaceenkulturen sowohl die Lösung von Knop und Varianten derselben als auch die von Beijerinck und die von Oehlmann mit gutem Erfolge.“ Erwies sich doch sogar die übliche Knopsche Lösung wegen ihrer sauren Reaktion als direkt tödlich.

Auf Andreesens Ergebnisse mit organischen Stoffen komme ich gelegentlich zurück. Im ganzen gewinnt man den Eindruck, daß solche für manche Formen unentbehrlich sind, oder doch ohne sie die Vermehrung gering ist.

Andreesen benutzte zur Isolierung einzelner Individuen Kapillarpipetten. Er sagt: „Die übliche Methode, mit Hilfe der Kochschen Platten einzelne Zellen zu isolieren, konnte nicht in Frage kommen, da die Desmidiaceen heißer, flüssiger Gelatine nicht widerstehen, ganz abgesehen davon, daß die Gelatine selbst schon ein Nährmedium un-

¹⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911. S. 100.

genügend bekannter Zusammensetzung darstellt und eine Kultur mit Hilfe genau kontrollierbarer Nährmittel illusorisch macht“ (a. a. O. S. 2). Auf Grund welcher Versuche dieses Urteil abgegeben wird, läßt sich nicht ersehen. „Heiß“ braucht ja die Gelatine nicht zu sein, da sie bis zu 30° C. herunter flüssig bleibt. Ich konnte mich leicht davon überzeugen, daß verschiedene Formen diese Temperatur und sogar die 40° des flüssigen Agars vorübergehend gut vertragen.

Es wurde ein Wasserbad von 42° C. hergestellt. In diesem befanden sich kleine, 10 mm dicke Reagensgläser mit Wasser derselben Temperatur. Aus zwei Rohkulturen, von denen die eine *Closterium Lunula* und *Pleurotaenium Ehrenbergi*, die andere *Closterium Ehrenbergi* enthielt, wurde Material in je zwei Reagensgläschen pipettiert. Diese wurden während einer Minute in dem Wasserbade gerührt, dann ebenso in kaltem Wasser. Zum Vergleich kamen je zwei Proben in ebensolche Röhrchen mit kaltem Wasser. Nach einem, zwei und sieben Tagen zeigten sich keine Schädigungen an den Desmidiaceen, die sogar Teilungen eingingen. Ebenso blieben Infusorien, Diatomeen, Rotatorien etc. durchaus gesund. Bei geschickter Anwendung des Plattenverfahrens werden die Organismen der Wärme keinesfalls länger ausgesetzt als bei diesem Versuche. Außerdem hat Tischutkin¹⁾ lange vor Andreesen Agarkulturen auch von Desmidiaceen, und zwar von *Penium*, *Closterium* und *Cosmarium* mit Hilfe des Plattengusses hergestellt, was schon manche von Andreesens Schlüssen widerlegt.

Größere Formen, wie *Closterium Lunula* und *Pleurotaenium Ehrenbergi* gingen freilich, in Agar eingeschmolzen, bald zugrunde, aber wie es schien, mehr weil sie sich darin nicht bewegen konnten und deshalb von Bakterien stark belästigt wurden, als wegen der Schädigung durch die Temperatur des flüssigen Agars. Diesen Eindruck erweckte wenigstens das mikroskopische Bild. Anders ist es mit kleinen Arten. Das beweisen die folgenden Versuche.

Ende April 1911 wurde Algenmaterial aus einem kleinen Tümpel bei Trotha, nördlich von Halle, geholt. Das kleine, mitten im Felde gelegene Wasserbecken war durch hineingeworfenes Kartoffelstroh reichlich mit organischen Stoffen gedüngt. Auf seiner Oberfläche war eine Haut von kräftig grüner Farbe entwickelt, die sich bei mikroskopischer Kontrolle als zusammengesetzt aus *Euglena viridis* und einer *Chlamydomonas*art (wohl *Chl. de Baryana*) erwies.

Davon wurden Anfang Mai Platten gegossen, und zwar mit gewässertem und mit ungewässertem Agar, der entsprechend dem früher gegebenen Rezept (s. S. 309) Ammoniumphosphat als Stickstoffquelle enthielt. Er soll im folgenden als gew. resp. ungew. Amph. Ag. bezeichnet werden. Mitte Juli fand ich bei mikroskopischer Kontrolle der

1) A. Tischutkin, Über Agar-Agar-Kulturen einiger Algen und Amöben. Zentrabl. f. Bakt., 2. Abt., Bd. III. 1897.

mit gewässertem Agar beschickten Petrischalen zwischen mancherlei anderem dichte grüne Kolonien eines scheinbar aus zwei Kugeln zusammengesetzten Lebewesens, das sich bei stärkerer Vergrößerung als ein sehr kleines *Cosmarium* entpuppte.

Die Form, von der ich eine Photographie beifüge, scheint mir dem *C. laeve* Rabenhorst zu entsprechen (vgl. Wolle¹⁾, S. 72a und Figur 2, Tafel IX). Sie hat dessen kleine Dimensionen und die glatte Zellwand. Auch die Form der Zellhälften stimmt befriedigend. Länge etwa 130—140 μ , Breite 125—130 μ .

Ferner fielen mir lockere frischgrüne Kolonien auf, die von einem gleichfalls recht kleinen *Closterium* gebildet wurden. Die Spezies ganz sicher zu bestimmen, ist wegen der in den Diagnosen betonten Variabilität nicht möglich gewesen. Nach Wolle (a. a. O., Tafel VII) würde *Cl. strigosum* Ehrb. gut stimmen. Nur sind die Endbläschen bei meiner Art nicht so nahe der Spitze. Bei Cohn²⁾ und de Wildemann³⁾ ist nur ein *Cl. strigosum* Bréb. verzeichnet, das offenbar schmaler als meine Form ist. Doch ist damit ungefähr die Stellung meiner Art gekennzeichnet. Über den Artwert besonders der kleinen Formen scheinen nur Kulturversuche Sicherheit geben zu können. Wie später gezeigt werden soll, kann auch das von mir kultivierte *Closterium* längere Zellen bilden als sie gewöhnlich gefunden werden. Es nimmt dann auch die Zahl der Pyrenoïde zu, sodaß die Diagnose auch von *Cl. strigosum* Bréb. ganz gut passen würde. (Figur 3, Tafel IX.)

Bei den meisten Exemplaren ist die Länge 160—180 μ , die Breite 20—25 μ .

Diese beiden *Desmidiaceen* mußten also den Prozeß des Platten gießens mit der allerdings nur kurz dauernden Einwirkung von 40° C. überstanden und sich von den im gewässerten Ammoniumphosphatagar enthaltenen Stoffen ernährt haben, denn offenbar gingen die Kolonien von einer Zelle aus, die sich auf das Vielhundertfache vermehrt hatte.

Da in dem Ausgangsmaterial von *Desmidiaceen* nichts bemerkt worden war, lag die Vermutung nahe, daß sie darin in Form der vielleicht ganz vereinzelt widerstandsfähigen Zygoten enthalten gewesen waren, und daß nur diese die Anlage der Agarplatten aushalten könnten. Dann wäre von einer Weiterzüchtung in Agar nicht viel zu hoffen gewesen. Deshalb wurden am 25. Juli Flüssigkeitskulturen angelegt, und zwar zunächst in Erdeauszug mit Ammonsulfat einerseits und Kalisalpeter andererseits. Denn rein anorganische

¹⁾ Fr. Wolle, *Desmids of the United States*, Betlehem U. S. A. 1892.

²⁾ *Kryptogamenflora von Schlesien*. Algen von Oscar Kirchner. Bd. II. 1. Hälfte. 1878, S. 139.

³⁾ E. de Wildemann, *Flore des Algues de Belgique*. Bruxelles-Paris. 1896. S. 127.

Flüssigkeiten waren ja nach den vorliegenden Erfahrungen nicht günstig und organische konnten nicht verwendet werden, da schon der Augenschein das Vorhandensein kleiner Bakterienkolonien zwischen denen der Algen im Agar lehrte.

I. 25. Juli 1911 Cosmarium und Closterium aus noch nicht artreinen Kolonien in Erlenmeyerkölbchen mit sterilisierten Lösungen geimpft.

1. Zwei Kölbchen mit hellgelblichem Erdeauszug + 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,025% MgSO_4 + 0,025% K_2HPO_4 .

2. Zwei Kölbchen mit ähnlicher Lösung, die anstatt Ammonsulfat KNO_3 enthielt.

Ergebnis am 5. Oktober 1911:

Cosmarienkulturen. 1a. Wenig *Euglena viridis*. 1b. Ebenso, daneben aber auch Cosmarium. 2a. und b. Vereinzelte Cosmarien mit sehr viel Stärke, daneben kleine Diatomeen.

Closteriumkulturen. 1a. Verschiedene Algen, hauptsächlich Hormidium. 1b. Ebenso, Hormidium, Scenedesmus, Diatomeen. 2a. Chlamydomonas, Scenedesmus, Diatomeen. 2b. Ebenso, auch Hormidium.

Die Versuche zeigten also nur für Cosmarium Vermehrung, und zwar in Erdeauszug mit Ammonstickstoff, welcher letzterer auch in den Ausgangsplatten die Stickstoffquelle dargestellt hatte. Ammonphosphat war mit Erdeauszug wegen des Niederschlages von Calciumphosphat nicht gut zu verwenden.

Dieses Resultat ist nicht sehr günstig. Glücklicherweise hatte sich inzwischen schon gezeigt, daß die beiden Desmidiaceen sich durch Plattenguß von dem in den Ausgangsschalen gewachsenen Material weiterzüchten ließen.

Closterium.

II. Am 26. Juli 1911 wurden je zwei Platten mit folgenden Agarmischungen hergestellt:

1. Ungewässerter Agar mit 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,025% MgSO_4 und 0,025% K_2HPO_4 .

2. Ebenso, aber dazu wenig Erdeauszug.

3. Gewässerter Agar mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 und K_2HPO_4 (gew. Amph. Ag.).

Ergebnis am 11. September 1911.

1. u. 2. Keine Closterien, aber verschiedene andere Algen und Bakterien.

3. Gute Kolonien von Closterium, andere Algen und kleine Bakterienkolonien.

Es erwies sich also wieder der gew. Amph. Ag., der schon die ersten Kolonien geliefert hatte, als gut geeignet, nicht aber die anderen Mischungen. In den Platten zeigten sich beim Älterwerden am 14. Oktober Monstrositäten, ähnlich, aber doch nicht ganz gleich denen, die Andreesen (a. a. O. S. 26 ff.) und de Wildemann (Andreesen S. 41)

beobachtet haben. Sie kommen durch das Ausbleiben der Zellteilungen bei fortgesetztem Längenwachstum zustande, wodurch lange, schlauchartige Bildungen entstehen, die niemand für Closterien halten würde. Ihr Aussehen ergibt sich aus der Photographie Figur 4, Tafel IX besser als aus Beschreibungen. Man sieht, daß sie durch alle Übergänge mit den normalen Formen verbunden sind. Auch sind vielfach an der Zellwand seitlich von der Kernhöhle abstehende Läppchen zu erkennen, wohl die Reste der beim Zellwachstum gesprengten äußeren Wandseichten. Ferner ist in der Photographie 4 ein Kopulationsstadium festgehalten, das aber nicht zur Bildung einer Zygote führte. Weder diesen Vorgang noch die schlauchartigen Monstrositäten konnte ich in späteren Kulturen wieder erhalten. Ich weiß also nicht, welche Bedingungen zu ihrer Entstehung nötig sind.

III. Um zu entscheiden, ob bei dem bisher allein brauchbar gefundenen gew. Amph. Ag. das Wässern des Agar-Agars von Bedeutung für den Erfolg ist, wurden am 14. September Platten mit sonst ganz gleich zusammengesetztem Nährboden der alten Art ohne Vorbehandlung des Agars angelegt.

Geimpft wurde wieder in den flüssigen Agar, und zwar aus einer Platte vom 26. Juli.

Ergebnis am 14. Oktober:

Gew. Amph. Ag. Sehr gut gewachsen, manche Kolonien sehen recht rein aus. Eine kleinere davon zeigt die Photographie 5, Tafel IX. Durch die schwache Biegung der Zellen gehen die Kriechbewegungen im Bogen vor sich, was die eigenartige, bezeichnende Form der Kolonien bedingt.

Ungew. Amph. Ag. Sehr viel unreiner und auch schlechter gewachsen. Immerhin an manchen Stellen Vermehrung der Closterien, die sich aber weniger weit voneinander entfernen und schon deshalb mehr unter den auch stärker wachsenden Bakterien zu leiden haben.

Am 26. Oktober:

Gew. Amph. Ag. Weiter sehr gute Vermehrung, obgleich sich jetzt doch viele Bakterienkolonien zeigen.

Ungew. Amph. Ag. Etwas mehr als früher, aber recht unrein.

Am 24. November:

Gew. Amph. Ag. Sehr hübsch gewachsen, dieke grüne Kolonien, in denen die Individuen wohl zu vielen Hunderten eng gehäuft beieinander liegen, ohne Störungen im Wachstum und in der Zellform zu zeigen.

Ungew. Amph. Ag. Sind außerordentlich zurück, da seit vier Wochen kaum Vermehrung, auch an den verhältnismäßig reinen Stellen viele degenerierte Individuen mit unregelmäßigen Formen, aber ohne Schlauchbildung.

Am 6. Januar 1912:

Gew. Amph. Ag. Über und über voll Closterien, aber eingetrocknet.

Ungew. Amph. Ag. Immer noch der alte Zustand ohne weitere Vermehrung. Keine Zerrformen.

Der Versuch zeigt, daß im Agar-Agar irgend welche für Desmidiaceen schädliche Stoffe enthalten sind, die durch Wässern entfernt werden können.

Die weiteren Impfungen wuchsen langsam an, wohl wegen des schlechten Lichtes im Winter, auch zeigten sie nichts neues und führten nicht zu Reinkulturen, da immer wieder, wenn auch winzige, Bakterienkolonien auftraten.

Ein Versuch wurde noch gemacht, um zu sehen, ob Nitratstickstoff an Stelle von Ammonstickstoff verwertet werden könne.

IV. Am 15. Oktober wurden mit Material aus gew. Amph. Ag. vom 14. September 4 Schalen angelegt, zwei mit gew. Amph. Ag., zwei mit gew. KNO_3 -Ag.

Ergebnis am 25. November:

Gew. Amph. Ag. Sehr gutes Wachstum, manche Kolonien schön rein, locker und weit ausgebreitet.

Gew. KNO_3 -Ag. Keine Vermehrung. Die Individuen, die mit dem Mikroskop aufgefunden werden konnten, sehen krank aus und haben sich offenbar garnicht geteilt.

Aus diesem Versuche darf man wohl schließen, daß Nitratstickstoff ungeeignet ist und daß auch nicht etwa im Agar vorhandene Stickstoffquellen, vielleicht organischer Natur, das Wachstum in den Ammonphosphat-Kulturen bedingten, denn eine Giftwirkung der geringen Salpetermengen ist unwahrscheinlich.

Was die Bewegungsercheinungen der Closterien im Agar betrifft, so ist das Auseinanderkriechen der Individuen offenbar für den Erfolg von Bedeutung. Denn dadurch wird einmal gar zu große Häufung vermieden. Vor allem aber streifen sich die Zellen dabei den größten Teil der Bakterien ab. Die Bewegung schien auch in dem zweiprozentigen, also ziemlich derben Agar noch nicht sehr gehemmt zu sein, wenn sie auch nie unter dem Mikroskop verfolgt werden konnte oder bei den Photographien, die bis zu einer Minute Expositionszeit brauchten, eine Verwischung der Contouren bewirkt hätte.

Die Spuren der Kriechbewegung waren teilweise bei günstiger Beleuchtung so deutlich zu sehen, daß sie photographisch festgehalten werden konnten (Figur 6, Tafel IX). Man sieht auf der Photographie an zwei oder drei Stellen, wie durch die Teilung der Zellen eine Verzweigung der Kriechspuren zustande kommt und die Individuen dann in einen spitzen Winkel auseinanderführende Wege einschlagen.

Von Phototaxis wurden nur Andeutungen gefunden, in der Weise, daß die Kolonien sich hauptsächlich nach dem Lichte zu ausdehnten und die Kriechspuren vorzugsweise, aber nicht durchaus vorherrschend, die betreffende Richtung zeigten.

Cosmarium.

V. Ähnlich wie mit Closterium wurde mit Cosmarium vorgegangen.

Am 26. Juli 1911 wurden je zwei Platten mit folgenden Agarmischungen gegossen:

1. Ungewässerter Agar mit 0,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,025 % MgSO_4 und K_2HPO_4 .

2. Ebenso, aber dazu wenig Erdeauszug.

3. Gewässerter Agar mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 und K_2HPO_4 .

4. Wie 1, aber an Stelle von Ammonsulfat Asparagin.

5. Ungew. Agar mit einer bis zur Geruchlosigkeit ausgefauten Abkochung von Maiskörnern.

Ergebnis am 11. September 1911.

1. und 2. zeigen keine Cosmarien.

3. Sehr viele gelbgrüne Kolonien von Cosmarium, die fast rein aussehen auf beiden Platten. Üppiges Wachstum, Kolonien nach der Lichtseite ausgezogen, daher eiförmig mit dem spitzen Ende nach dem Fenster. Keine fremden Algen, keine Degenerationsformen.

4. Keine Cosmarien.

5. Sehr unrein, auch falsehe Algen, aber daneben doch Cosmarien.

Wiedrum erwies sich also der gew. Amph. Ag. als sehr geeignet, die anderen Mischungen dagegen wenig oder gar nicht.

Es mußte aber erst wieder entschieden werden, ob das Ergebnis nicht zum Teil auf das Wässern des Agars zu schieben war und ob dieses zur Erzielung guten Wachstums erforderlich ist.

VI. Am 14. September je zwei Platten mit gewässertem und ungewässertem Ammoniumphosphatagar von dem Material aus einer gew. Amph. Agar-Platte vom 26. Juli gegossen.

Ergebnis am 26. Oktober:

Gew. Amph. Ag. Cosmarien gut gewachsen, daneben aber viel Bakterienkolonien, obgleich die Ursprungskolonien rein ausgesehen hatten.

Ungew. Amph. Ag. Auch viel Bakterien. Cosmarien weniger ausgebreitete und viel individuenärmere Kolonien bildend; doch immerhin leidliches Wachstum, das offenbar weniger gehemmt wird als das der Closterien in dem ungew. Ag. Später jedoch macht sich die Hemmung wieder stärker bemerkbar.

Am 24. November:

Gew. Amph. Ag. Sehr üppige Kolonien, gegen die die Bakterien bei Betrachtung mit bloßem Auge durchaus zurücktreten (Figur 1, Tafel X).

Ungew. Amph. Ag. Viel mehr Bakterien. Cosmarien haben sich in den letzten vier Wochen so gut wie gar nicht vermehrt.

Am 6. Januar 1912 keine wesentlichen Veränderungen.

Also auch bei Cosmarium Schädigung durch auswaschbare Stoffe des Agars.

Die weiteren Plattengüsse zeigten auch hier nichts neues und führten bisher leider nicht zu Reinkulturen, obgleich noch viermal, immer von den reinsten Stellen, weiter geimpft wurde.

Die Kriechbewegung der Cosmarien ist geringer als die der Closterien, so daß die Kolonien sehr dicht werden. Unter günstigen Umständen und bei weniger derbem Agar (1—1,5%) kriechen die Cosmarien aber doch ziemlich weit, vielleicht das Hundertfache ihrer Länge. Entsprechend der schon erwähnten stärkeren Phototaxis¹⁾ weisen die Kriechspuren, die hier gleichfalls gut verfolgt werden können, alle mehr oder weniger geradlinig nach dem Fenster. Wird die Platte gedreht, so wird ein Bogen beschrieben. Auch hier wieder die Gabelung der Spur nach der Teilung (Figur 7, Tafel IX). Die Schwesterindividuen kriechen aber oft eine Strecke weit genau parallel, resp. es wird von jeder der noch zusammenhängenden Hälften der die Spur bildende Schleim ausgesondert, bis dann die Trennung erfolgt. Man kann daraus schließen, daß das Kriechen von Cosmarium quer zur Teilungsebene erfolgen kann, was aber sicher nicht stets der Fall ist.

Monstrositäten oder Kopulationsformen wurden nicht beobachtet, können mir bei der Kleinheit der Art aber auch entgangen sein.

Flüssigkeitskulturen.

Die Versuche, meine beiden kleinen Desmidiaceen, die in Agar so hübsch wuchsen, auch in Flüssigkeiten oder auf anderen festen Unterlagen zu kultivieren, schlugen anfangs fehl.

Schon oben wurde gesagt, daß in Erdeaufguß mit zugesetztem Ammonstickstoff eine schwache Vermehrung von Cosmarium zu bemerken war, während Closterium nicht wuchs. Als ich später von den schon gereinigten Kolonien aus Agarplatten abimpfen konnte, wurde die Vermehrung fremder Algen verhindert, und es konnte bemerkt werden, daß in der erwähnten Lösung sich Closterium wenigstens lange am Leben hielt, allerdings ohne merkliche Vermehrung, während Cosmarium allmählich zu üppigen Kulturen heranwuchs.

Wurden mit einer ähnlichen Flüssigkeit, die aber den Stickstoff in Form von sekundärem Ammoniumphosphat enthielt, Gipsblöcke ge-

¹⁾ Vergl. Abb. 1, Tafel X.

tränkt, die in Schalen sterilisiert wurden, so trat darauf bei *Cosmarium* eine Vermehrung auf. Die Kriechbewegung war offenbar gering. Es ergab sich hier die Möglichkeit, die Algen lange zu erhalten, da der aufgeschliffene Deckel die Verdunstung verhinderte. *Closterium* wuchs nicht merklich und starb schließlich ab.

Das *Cosmarium* vermehrte sich monatlang, wenn auch langsam, sodaß es schließlich schleimige, durch Gasblasen aufgetriebene, Lager auf dem Gips bildete, die frisch grün aussahen und in denen lebhaftige Teilung erfolgte (Figur 8, Tafel IX). Mikroskopisch sahen die Zellen normal und gesund aus. Etwas weniger, aber immerhin in langen Zeiträumen sehr deutlich, war die Vermehrung auf Gipsblöcken mit Wasser aus einem auszementierten Pflanzenbecken im Garten, das gleichfalls 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zugesetzt bekam. Hier sahen die Algenlager weniger saftig aus. Die einzelnen Individuen erwiesen sich bei mikroskopischer Kontrolle als vollgepropft mit Stärke, sahen auch nicht so frisch grün aus wie in Erdabkoehung. Der Versuch dauerte bisher vom 16. Juni 1911 bis 31. Mai 1912. Das Wachstum hält noch an¹⁾.

Recht nahe lag es, Torf zur Kultur zu verwenden, der ja die Wohnstätte so vieler *Desmidiaceen* bildet. Aber weder auf rohen mit destilliertem Wasser angefeuchteten, noch auf sterilisierten Torfziegelstücken konnte eine Vermehrung konstatiert werden.

Ganz vergeblich waren auch zunächst die Versuche, in rein unorganischen Salzlösungen eine irgend bemerkenswerte Vermehrung zu erzielen, obgleich die verschiedensten Versuche gemacht wurden. Es wurden für die *Desmidiaceen* folgende Lösungen vergeblich versucht:

1. 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,025% MgSO_4 + 0,025% KHCO_3 .
 2. 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,025% MgSO_4 + 0,025% K_2HPO_4 .
 3. 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + Erdabkoehung.
 4. 0,1% KNO_3 + Erdabkoehung.
 5. Wie 1 + kohlensaure Magnesia.
 6. Teichwasser + NH_4MgPO_4 .
 7. Knopsehe
 8. Sachssehe
 9. Pfeffersche
- } Lösung, mit Soda neutralisiert.
10. Humussäure²⁾ in 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + wie 2.
 11. Erdaufguß filtriert und sterilisiert.

¹⁾ Jetzt Ende August in beiden Kulturen der Gips ganz und gar von der grünen schleimigen Masse bedeckt.

²⁾ Dargestellt durch Auslangen von Gartenerde mit Ammoniak und Füllen mit Schwefelsäure, sowie reichliches Dekantieren und Auswaschen im Filter. Davon löst sich in der schwach alkalischen Lösung 2. ein klein wenig.

Closterium hielt sich in keiner dieser Lösungen. Comarium vermehrte sich in 2. und 6. etwas, in 3. gut, in allen anderen hielt es sich mehr oder weniger lange ohne sichtbare Vermehrung.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß etwa im destillierten Wasser Giftstoffe enthalten wären, etwa Spuren von Schwermetallsalzen, wurde ein neuer Versuch angesetzt, in dem Wasser zur Verwendung kam, das mit Hilfe eines Glaskühlers noch einmal destilliert war. Gleichzeitig wollte ich prüfen, ob das Vorhandensein von Calcium und Eisen, die früher nicht absichtlich zugesetzt worden waren, die Nährlösung brauchbar mache. Schließlich kam ich auf die Idee, durch Verwendung des sehr schwer löslichen Magnesiumammoniumphosphates eine Nährlösung herzustellen, die nur Spuren von Salzen enthielt, in der diese kleinen Mengen aber nach Verbrauch regeneriert werden konnten. Dieses letztere Verfahren brachte dann den erhofften Erfolg. Leider war inzwischen durch die ungünstigen Verhältnisse im Winter das Closterium eingegangen, sodaß ich mich auf Cosmarium beschränken mußte. Es wurden folgende Nährlösungen verwendet:

1. 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02% MgSO_4 , 0,02% K_2HPO_4 .

2. Ebenso + Spur Gips.

3. Ebenso + Spur $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$.

4. Ebenso + Spur $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$ + Spur Gips.

5. Wie 1, aber NH_4NO_3 anstatt des Phosphates.

6. Spur NH_4MgPO_4 + 0,025 K_2SO_4 je 50 ccm in Erlenmeyerkölbchen.

Geimpft aus Gipskultur vom 16. November 1911 am 24. April 1912.

Ergebnis am 18. Mai 1912. Bei 4. sehen die Eisenphosphatstückchen grünlich aus, die anderen Kulturen zeigen kein Wachstum.

23. Mai 1912. Bei 6. Entwicklung in hellgrünlichen lockeren Kolonien am Boden des Gefäßes, die ziemlich fest sitzen, so daß die Anordnung durch sanftes Schaukeln nicht zerstört wird. Bei 4. kein deutlicher Fortschritt.

31. Mai 1912. Ebenso weiter.

25. August 1912. 4. hat sich gut entwickelt.

Hiermit hatte ich also das erstmal eine rein anorganische Nährlösung gefunden, die dem Cosmarium Wachstum erlaubte. Der Erfolg ist wohl auf die niedere Konzentration der Nährstoffe zurückzuführen. Bei Gegenwart kolloidaler Substanzen wie Agar-Agar oder Humaten könnte die Schädlichkeit der höheren Konzentration durch Adsorption oder dergleichen ausgeglichen werden. Doch bleibt das weiter zu verfolgen.

Zur Ergänzung dieses Versuches wurde nun noch der folgende angesetzt:

1. Käufliches destilliertes Wasser + Spur NH_4MgPO_4 + 0,025% K_2SO_4 .

2. Regenwasser aus einem Sammelbecken an den Gewächshäusern + wie 1.

3. Mit Glaskühler noch einmal destilliertes Wasser (dopp. dest. W.) + wie 1.
4. Wie 3 + Spur CaSO_4 .
5. Wie 3 + Spur $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$.
6. Wie 3 + Spur $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$ + Spur CaSO_4 .
7. Dopp. dest. W. + 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Spur MgCO_3 + 0,01% einer Mischung von 100 Teilen K_2HPO_4 und 15 Teilen KH_2PO_4 , die gegen Nilblau neutral war.

Geimpft am 8. Juni 1912 aus Gipskultur vom 28. Nov. 1911.

Ergebnis am 24. Juni 1912.

1. — tot. 2. und 3. Wenig Zellen aus dem Impfkümpchen herausgekrochen. 4. Ähnlich, etwas am Glase in die Höhe gekrochen. 5. Ähnlich, lockere Kolonien am Boden des Gefäßes. 6. Grünliche Wölckchen. 7. Wahrscheinlich Entwicklung, schleimige grüne Klümpchen.

Am 1. Juli 1912.

1. Tot. 2. Unverändert. 3. Der ganze Boden des Kölbchens ganz dünn bedeckt. 4. Viel grünliche Flöckchen. 5. Ähnlich, aber mehr. 6. Ziemlich viel, hübsch grün. 7. Wenig dünne grüne Flöckchen. (5. am besten.)

Am 10. Juli 1912.

2. Nichts zu sehen. 3. Hübsch weiterentwickelt. 4. Ähnlich, aber heller. 5. Etwas mehr und grüner. 6. Dichter, ähnlich. 7. Nicht schleimig aussehend, grüner Belag ganz locker. Mikroskopisch, viel Stärke, Teilungen.

Am 25. August 1912.

3.—6. etwa gleich, 3. etwas zurück gegen 4., 5. und 6. Die weißlich grüne Beschaffenheit rührt von vielen leeren Zellhäuten her. In allen Kölbchen ziemlich viel Cosmarien, die den Boden des Gefäßes ganz bedecken und etwas in die Höhe gekrochen sind. 7. Grüner Niederschlag, weniger weißlich, mehr körnig aussehend, aber auch viel leere Zellen. Die lebenden Zellen sehen auffallend abgerundet aus gegenüber den polyedrischen, wie sie Abb. 2, Tafel IX, zeigt.

Damit ist also gezeigt, daß eine rein anorganische Lösung mit Ammonsalzen als Stickstoffquellen bei möglichst neutraler Reaktion und Zusatz von Calcium und Eisen gute, wenn auch langsame Entwicklung erlaubt, vorausgesetzt, daß das Wasser keine schädlichen Beimengungen enthält, wie sie das gewöhnliche destillierte Wasser und ohne besondere Vorsicht aufgesammeltes Regenwasser enthalten. Diese schädlichen Substanzen werden aber durch kolloidale Stoffe gebunden, wie es auch der nächste Versuch zeigt.

Kultur auf Kieselgallerte.

Das SiO_2 -Gel wurde durch Vermischen von Wasserglas mit Salzsäure hergestellt, in Petrischalen erstarren gelassen, in Leitungswasser ausgewaschen und durch Übersiehichten mit einer Lösung von 0,1%

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02% K_2HPO_4 und 0,02% MgSO_4 in gewöhnlichem destilliertem Wasser gedüngt. Dann wurden die Schalen im Dampftopf sterilisiert. Die Cosmarien wurden aus der Gipskultur vom 28. Nov. 1911 entnommen, in sterilem Wasser aufgeschwemmt und über die Oberfläche ausgeschüttet. Nach einigen Minuten wurde der Überschuss der Flüssigkeit unter vorsichtigem Auseinanderspreizen der Schalenhälften abgegossen. Es blieben genug Zellen haften. 30. Juli 1912.

Ergebnis am 28. August 1912. Zahlreiche hübsch hellgrüne, schleimige Kolonien mit vielen Teilungen, die noch lebhaft im Wachstum begriffen sind. Verhältnismäßig schnelle und tüppige Entwicklung, besser als Flüssigkeitskulturen, obgleich dieselbe Nährlösung ohne Kieselgallerte keine Entwicklung erlaubt. Bakterien oder Pilze nicht zu sehen.

Dieselbe Methode erlaubte auch Euglenen, *Closterium Lunula*, *Gonium pectorale*, *Pediastrum* und anderen Algen gute Vermehrung und hat zur Reinkultur von *Oscillarien* geführt. Sie dürfte besonders empfehlenswert sein, da weniger Bakterien wachsen als auf Agar und fast alle Vorteile desselben gewahrt bleiben. Wurden jedoch nach derselben Methode Platten von *Gymnodinium* und *Cryptomonas* angelegt, so zerflossen die Zellen im Momente, wo sie „aufs Trockene“ gesetzt wurden.

Kulturen in Flüssigkeiten mit irgendwie erheblichen Mengen organischer Substanz hatten natürlich bei der Anwesenheit von Bakterien von vornherein nicht sehr viel Aussicht auf Erfolg, doch wurden immerhin folgende geprüft:

1. 0,5% Leucin + 0,05% MgSO_4 + 0,05% K_2HPO_4 .
2. 0,1% Leucin + 0,05% MgSO_4 + 0,05% K_2HPO_4 .
3. 0,2% weinsaures Ammon + 0,05% MgSO_4 + 0,05% K_2HPO_4 .
4. Spur Albumin aus Eigelb + 0,05% MgSO_4 + 0,05% K_2HPO_4 .
5. Erbsenabkochung.
6. 0,2% Galaktose + 0,1% KNO_3 + 0,05% MgSO_4 + 0,05% K_2HPO_4 .
7. 0,2% Galaktose + 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,05% MgSO_4 + 0,05% K_2HPO_4 .
8. Mit H_2SO_4 zerkochter und mit CaCO_3 neutralisierter Agar¹⁾ + 0,1% NH_4NO_3 + 0,05 MgSO_4 + 0,05 K_2HPO_4 .

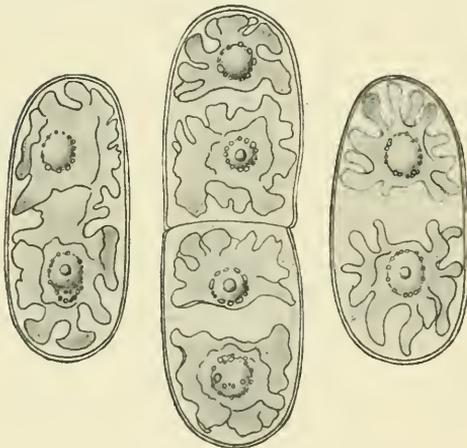
Closterium wuchs auch in keiner dieser Lösungen. *Cosmarium* vermehrte sich in 5. ziemlich lebhaft und bildete schließlich einen gelblich-grünen Satz, in dem aber natürlich viele Bakterien waren. Auch 2. zeigte, wenn auch schwache, Vermehrung. Das Resultat ist nicht sehr ermutigend.

¹⁾ Es konnten möglicherweise Produkte der Hydrolyse des Agars dessen günstige Wirkung bedingen. Deshalb wurde durch Kochen mit Schwefelsäure eine vollkommen flüssige Agarlösung erzielt und deren Wirkung geprüft. (Siehe oben S. 310.)

Im ganzen ist es mir nicht gelungen, für *Closterium* überhaupt, außerhalb des Agars eine deutliche Vermehrung zu erzielen, während *Cosmarium* unter Umständen, besonders in Erdabkochung, sowie in stark verdünnter Lösung mit giftfrei destilliertem Wasser wuchs und sich auch in faulenden Lösungen zu vermehren vermochte. Die Frage, weshalb gerade der Agar so günstig ist, bleibt noch offen.

Neben den genauer verfolgten traten auch noch einige andere Desmidiaceen im Laufe der Zeit in meinen Kulturen auf, immer aber relativ kleine Formen, so eine andere kleine *Closterium*-Art und ein *Cosmarium*. Ferner auf einer Platte mit gew. Amph. Agar, die mit einer Algenprobe aus Tölz in Oberbayern beimpft war, eine Form, die dem *Staurostrum pygmaeum* Bréb. gleicht (Wille 1892, Tafel LIII) und die die Photographien 2 und 3, Tafel X, veranschaulichen.

Schließlich möchte ich hier eine *Mesotaeniacee* anschließen, *Cylindrocystis Brébissonii* Ralfs, die zuerst in ungewässertem Agar



[*Cylindrocystis Brébissonii*.]

mit Ammonphosphat gewachsen ist. Geimpft worden war aus einer kleinen Algenprobe, die aus einem klaren Bache bei Tölz in Oberbayern stammte.

In der ersten Petrischale, die am 14. September 1911 angelegt worden war, kamen bis 20. Januar 1912 einige Protozoen, *Englena viridis*,

Scenedesmus, *Raphidieen*, *Cyanophyceen* etc. Daneben zeigten sich lebhaft maigrüne rundliche Kolonien, von denen eine in Figur 9, Tafel IX ab-

gebildet ist. Bei stärkerer Vergrößerung boten die Zellen das in Fig. 4, Tafel X wiedergegebene Bild, erwiesen sich also als *Cylindrocystis Brébissonii*. Da die Figuren von de Bary¹⁾ die eigenartige Form der Chromatophoren nur unvollkommen wiedergibt, füge ich eine stark vergrößernde Zeichnung bei.

In den Platten, die von diesem Material gegossen worden waren, zeigte sich lange keine Vermehrung, die aber schließlich doch eintrat. Freilich bekam ich nicht mehr so große und auch nicht mehr so gleichmäßig ausgebildete Kolonien wie in der Ausgangsschale.

¹⁾ A. de Bary, Untersuchungen über die Familie der Conjugaten. Leipzig 1858.

Von der ersten Platte in ungew. Amph. Agar vom 14. September wurden am 20. Oktober zwei weitere mit derselben Agarmischung gegossen. Am 6. Januar in der einen nichts grünes, in der anderen neben zahlreichen winzigen Bakterienkolonien auch *Cylindrocystis*. Kolonien klein, vielleicht 20 Individuen, nicht kreisrund wie die ersten.

Wieder von der ersten Platte vom 14. September 1911 wurde am 20. Oktober in gew. Agar mit 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,025% MgSO_4 und 0,05% KH_2PO_4 geimpft, der also schwach sauer war. Am 6. Januar 1912 nur Diatomeen. Von derselben am 4. November 1911 in schwach alkalisch gemachten gewässerten Agar mit Ammonphosphat. Am 6. Januar 1912 nur Pilze. Von derselben am 19. Dezember 1911 in neutralem gew. Amph. Ag. geimpft. Am 6. Januar 1912 ist nichts gewachsen. Von derselben am 23. Januar 1912 zwei Verdünnungen a und b mit neutralem gew. Amph. Agar gegossen. Am 16. Februar 1912 zeigen sich kleine gut aussehende Kolonien, die sich bis jetzt (31. Mai 1912) langsam weiter entwickelt haben. Eine davon gibt die Photographie Figur 5, Tafel X wieder.

Das Wachstum ist also sehr langsam, aber anhaltend. Die Zellen sehen dabei normal aus. Kulturen in verschiedenen Flüssigkeiten und auf Gips mit Erdabkochung und Ammoniumphosphat sind bisher nicht angegangen.

Dagegen wuchs auch *Cylindrocystis* in dopp. dest. W. mit Ammoniummagnesiumphosphat. Der Versuch wurde wie der für *Cosmarium* vom 8. Juni am selben Tage angestellt und geimpft aus einer Petrischale mit gew. Ammonphosphatagar vom 23. Januar 1912.

Am 1. Juli 1912 hat sich nun in dem Kolben mit $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CaSO}_4 + \text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$ in dopp. dest. Wasser etwas entwickelt, und zwar sehr kleine, schöngrüne Kolonien am Boden des Gefäßes.

Am 25. August 1912 ist diese Kultur sehr hübsch gewachsen. Etwas von den Algen als kleine Häutchen an der Wasseroberfläche, das meiste am Boden. Mikroskopisch zeigen sich die Zellen vollgepfropft mit Stärke und viele unter ihnen sind in verschiedenen Stadien der Kopulation, worüber noch berichtet werden soll. Entsprechend verhielten sich andere, ebenso hergestellte Kulturen.

Im ganzen sind leider bei den Kulturversuchen mit Desmidiaceen die positiven Resultate noch nicht sehr groß. Es gelang weder die absolute Reinkultur noch die Auffindung einer für alle Arten brauchbaren Nährlösung, die aber möglicherweise mit der letzterwähnten gegeben ist. Ob mit anderen Lösungen ein schnelleres Wachstum erzielt worden wäre, bleibt fraglich. Die Langsamkeit der Vermehrung aber ist wohl der Grund, daß die völlige Trennung von anderen Organismen nicht gelang.

Insofern stimme ich mit Andreessen¹⁾ überein, als eine Zufuhr organischer Stoffe wohl für viele Arten nützlich für das Ge-

¹⁾ A Andreessen, Beiträge zur Kenntnis der Desmidiaceen. Flora 1909, Bd. 99, S. 40.

deihen sein dürfte. Die von jenem Autor gefundene Förderung durch Amide konnte ich nicht konstatieren, dagegen erwiesen sich bei *Cosmarium* Humusstoffe als stark fördernd, ferner bei den im Agar ge-
deihenden Arten Stoffe aus diesem. Für die verwendete *Cosmarium*art konnten verschiedene gut brauchbare Kulturflüssigkeiten angegeben werden, für *Cylindrocystis* wenigstens eine. Die Versuche werden fort-
gesetzt.

Über die übrigen im Agar gewachsenen grünen Formen ist nicht viel zu sagen. Sehr häufig und üppig traten *Hormidium*-Formen auf, über die früher Klebs¹⁾ berichtet hat. Sie wachsen auch in allerlei Nährlösungen und werden durch Erdauszug gleichfalls gefördert. Ähnlich allerlei grüne Algen, die in Agar verzweigte Kolonien bilden. Eine davon war wohl *Microthamnium Kützingianum* Nägeli, eine andere *Pleurococcus vulgaris*. Die Kolonieformen dieser Algen im Agar sind sehr charakteristisch.

Sehr häufige Gäste waren *Chlamydomonas*arten, von denen eine stark schleimbildende weiter verfolgt und rein kultiviert wurde. Dasselbe gilt für *Haematococcus pluvialis*, über welche beiden später berichtet werden soll. Alle diese *Volvoeinen* wachsen gut in Erdauszug mit Kalisalpeter oder Ammonsulfat.

Mit den massenhaft wachsenden Diatomeen habe ich mich nicht weiter beschäftigt, weil die Arbeiten von O. Richter das Wesentliche aufgeklärt haben.

Über die rein gezüchtete *Euglena gracilis* wird in der nächsten Mitteilung berichtet werden. Neben den genauer verfolgten Formen, nämlich *Euglena gracilis*, *viridis* und deses wuchsen auch verschiedene andere Arten, unter anderem ein *Phaeus*, jedenfalls *Ph. pleuroneetes*, und verschiedene *Euglenen*, so *E. variabilis*. Sie scheinen alle ähnliche Kulturbedingungen zu fordern, nur daß sie in verschieden hohem Maße der Verarbeitung organischer Stoffe angepaßt sind. *Phaeus pyrum* wuchs z. B. in Erdabkoehung, in der sich übrigens auch eine *Gymnodinium*art vermehrte.

Damit wären meine bisherigen Erfahrungen bis auf die in Reinkultur gezüchteten Algen, über die später berichtet werden soll, niedergelegt. Die Versuche haben trotz vieler darauf verwendeter Mühe zum größten Teile nicht zum Ziele der Reinkultur geführt. Vielleicht können die hier mitgeteilten Ergebnisse aber doch einen Wert für spätere Untersuchungen haben. Deshalb wollte ich sie nicht ganz unterdrücken.

¹⁾ G. Klebs, Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena 1896.

Figurenerklärung.

Siehe den Text.

Tafel IX.

Figur 1, zu Seite 317.	Leitz, Obj. 4, Comp. Oc. 8.	Vergrößerung 195.
" 2, " "	320. (Zur Diagnose.) Leitz, Immers. $\frac{1}{12}$ a, Comp. Oc. 8	Vergr. 1070.
" 3, " "	320 (Zur Diagnose.) Zeiß, Apochr. 2 mm, Comp. Oc. 4.	" 550.
" 4, " "	322. Reichert, Obj. 3, Oc. 5.	Vergrößerung 110.
" 5, " "	322. Reichert, Obj. 3, Oc. I.	} = 50.
" 6, " "	323. Reichert, Obj. 3, Oc. I.	
" 7, " "	325. Reichert, Obj. 3, Oc. I.	} = 50.
" 8, " "	326. $\frac{2}{3}$ der natürl. Größe.	
" 9, " "	328. Reichert, Obj. 3, Oc. I.	= 50.

Tafel X.

Figur 1, zu Seite 324.	Schwach vergr., seitlich beleuchtet auf dunklem Hintergrunde.	
" 2, " "	328. Reichert, Obj. 3, Oc. I.	Vergrößerung 50.
" 3, " "	328. Leitz, Obj. 4, Comp. Oc. 8.	" 195.
" 4, " "	329. Leitz, Obj. $\frac{1}{12}$ a, Comp. Oc. 8.	" 1070.
" 5, " "	329. Leitz, Obj. 4, Oc. 1.	" 104.

Beiträge zur Biologie der Pflanzen.

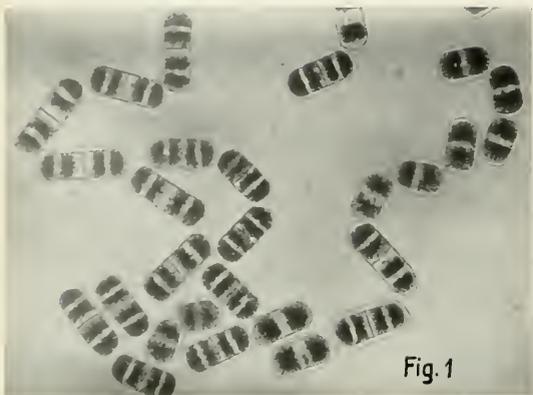


Fig. 1



Fig. 3

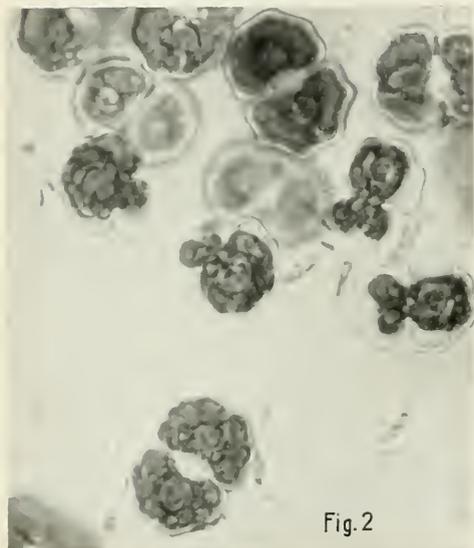


Fig. 2



Fig. 8

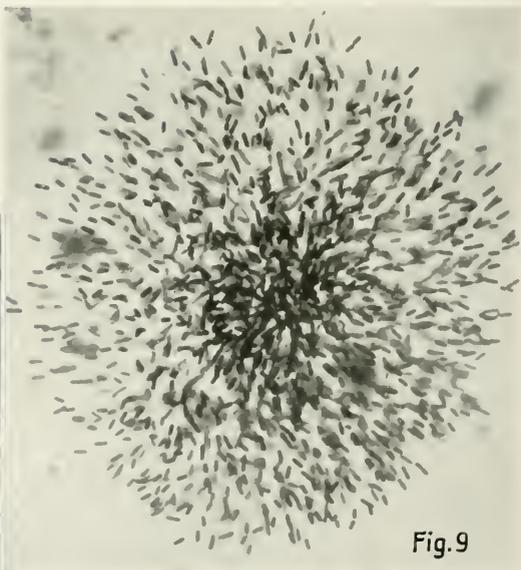
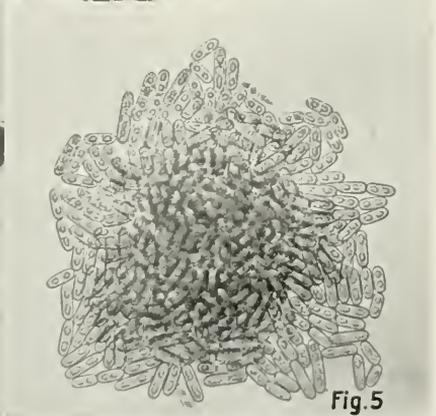
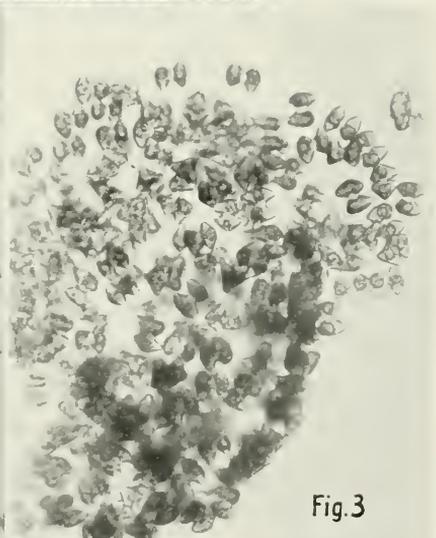
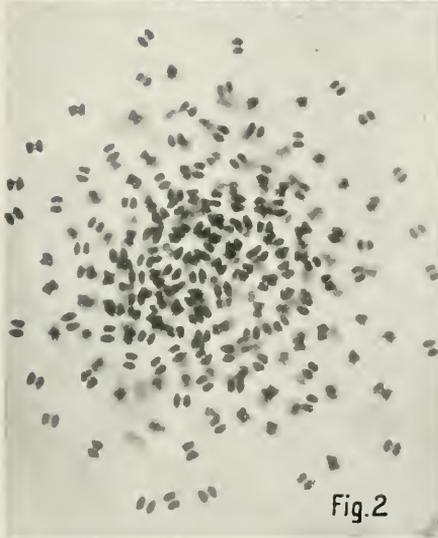
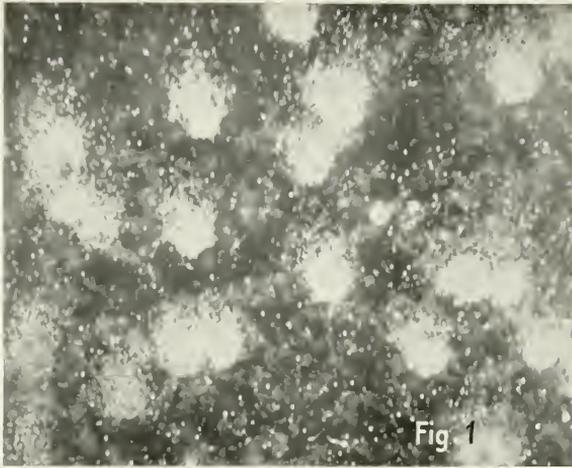


Fig. 9





ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Beiträge zur Biologie der Pflanzen](#)

Jahr/Year: 1912

Band/Volume: [11_2](#)

Autor(en)/Author(s): Pringsheim Ernst Georg

Artikel/Article: [Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen 305-333](#)