

Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen.

III. Mitteilung.

Zur Physiologie der Schizophyceen.

Von **Ernst G. Pringsheim.**

(Mit Tafel II.)

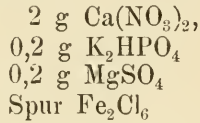
I. Einleitung.

„Unsere Kenntnis von den Lebens- und Kulturbedingungen der Cyanophyceen ist sehr lückenhaft“. Mit diesem Bekenntnis beginnt Küster¹⁾ die Wiedergabe der vorliegenden Erfahrungen über die genannte Algengruppe. Seit Jahren hatte ich mir deshalb vorgenommen, sie zu ergänzen. Und aus demselben Grunde will ich die im folgenden zu machenden Angaben veröffentlichen, obgleich sie noch nach mehreren Seiten zu ergänzen sind.

Die Standorte der genannten Organismen sind bekanntlich sehr mannigfaltig, sodaß eine Einheitlichkeit in den Ernährungsbedürfnissen nicht erwartet werden kann. Selbst innerhalb der Gattung *Oscillaria* finden wir so verschiedene Fundorte angegeben, wie sie etwa steriler Sand einerseits, Schmutzwasser andererseits darstellen. Auch das Vorkommen in Flechten und in Hohlräumen höherer Pflanzen deutet auf die „Anpassungsfähigkeit“ der Schizophyceen als Ganzes betrachtet. Daraus erklärt sich wohl auch z. T. die von Küster hervorgehobene Ungleichheit der Angaben über Kulturerfahrungen bei verschiedenen Autoren.

¹⁾ E. Küster, Kultur der Mikroorganismen. Leipzig und Berlin 1907, S. 110.

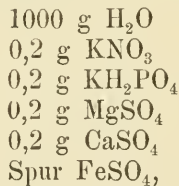
Die ersten Kulturversuche mit einer Nährlösung von einigermaßen bekannter Zusammensetzung stellte wohl Ad. Richter¹⁾ an. Seine Kulturflüssigkeit enthielt auf 1 l „Brunnenwasser“ 5 ccm einer Lösung von



in 200 ccm Wasser. Darin wuchs eine *Oscillaria* 6 Monate hindurch. Was das „Brunnenwasser“ enthielt, ist leider nicht zu ersehen. Die wichtigsten Merkmale der Nährlösung sind aber trotzdem deutlich. Sie bestehen in der Gabe des Stickstoffs als Nitrat, dem Calcium- und Eisen-Gehalt, der schwach alkalischen Reaktion und dem höchstens minimalen Gehalt an organischen Stoffen.

Die Versuche von F. A. Marx²⁾ seien nur kurz erwähnt, weil es diesem Autor nicht auf das Gedeihen der Blaualgen, sondern nur auf die Feststellung morphologischer Veränderungen in verschiedenen Nährlösungen ankam. Bemerkenswert ist das Ertragen einer schwach sauren Reaktion durch die *Oscillarien*, wie sie durch 0,05% KH_2PO_4 hervorgerufen wurde.

Durch Verwendung sehr sorgfältig gereinigter Substanzen zu Nährlösungen von genau bekanntem chemischen Gehalt zeichnet sich die Arbeit von Molisch³⁾ aus, in der auch *Oscillaria*-Arten als Versuchsobjekte Verwendung fanden. Er sagt (1896, S. 634): „Bringt man *Spirogyra*, *Vaucheria*, *Cladophora*, *Oedogonium* oder *Oscillaria*-Arten in eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung:



so gehen die Algen nach 1—3 Tagen entweder zugrunde oder beginnen zu kränkeln. Diese Lösung reagiert nämlich schwach sauer. Ersetzt man in derselben nur das sauer reagierende Monophosphat durch das alkalisch reagierende Dikaliumphosphat, so erhält die Lösung

¹⁾ Ad. Richter, Über Anpassung der Süßwasser-algen an Kochsalzlösung. Flora. Bd. 75, 1892.

²⁾ F. A. Marx, Untersuchungen über die Zellen der *Oscillarien*. Inaug.-Diss. Erlangen 1892.

³⁾ H. Molisch, Zur Ernährung der Algen (Süßwasser-algen). Sitzungsber. d. Kaiserl. Ak. d. Wissensch. zu Wien, Math., naturw. Kl. 1896, Bd. 104 Abt 1, und 1897, Bd. 105 Abt. 1.

hierdurch schwach alkalische Reaktion und die Algen bleiben gesund.⁴ Ob sie gut wachsen, ist aus der angeführten Stelle nicht zu ersehen. Die Lösung stimmt in den oben genannten wesentlichen Punkten, wie auch in der geringen Konzentration der Stickstoffquelle mit der von Ad. Richter überein.

Daß neben dem Stickstoff aus Nitraten auch der aus Ammonsalzen verwendet werden könne, soll nach O. Richter¹⁾ aus den Versuchen von Bouilhac²⁾ hervorgehen. Da aber keine Reinkulturen vorlagen, ist dieser Nachweis nicht ganz genügend. Es könnte ja Nitrifikation eingetreten sein.

Tischutkin³⁾ gibt an, neben vielerlei anderen Algen auch Oscillarien in Reinkulturen gewonnen zu haben, wenn er nach der Kochschen Methode Agarschalen mit ihnen beschickte. Das Material wurde mechanisch zerkleinert, gut ausgewaschen und in sterilem Wasser mehrfach verdünnt. Da genauere Angaben fehlen, ist die Feststellung, ob wirklich absolute Reinkulturen vorgelegen haben, nicht möglich. Auch unterblieb deren einzig fruchtbare Verwendung zu Ernährungsversuchen vor allem mit organischen Stoffen. Jedenfalls aber ist der Autor im Recht, wenn er sagt: „Ich stelle das Ergebnis fest, daß einprozentige Agarwasserlösung sich als sehr tauglich für den Wuchs und die Vermehrung der verschiedensten Algen erwiesen hat.“

Über das Nährsalzbedürfnis von Oscillarien sammelte Benecke⁴⁾ einige Erfahrungen, die aber im Hinweis auf wohl nicht erfolgte spätere Veröffentlichung nur knapp mitgeteilt wurden. Er stellte fest (a. a. O. S. 87), daß *Oscillaria tenuis* auf schwach alkalische Reaktion angewiesen ist, und fand ferner, daß seine Blaualgen im Gegensatz zu den grünen Vergleichsobjekten merkwürdigerweise ebensogut wuchsen, wenn alles Kali durch Natronsalz ersetzt war. Die sonstige Zusammensetzung der Nährlösung kann ich aus der kurzen Bemerkung nicht ersehen. Vielleicht liegt nur eine besondere Anspruchslosigkeit der Oscillarien vor, die sich für die unbekannte Hauptfunktion der Alkalien im Stoffwechsel mit Spuren von Kalisalzen begnügten, während sich die Hauptmasse der erforderlichen Alkalien durch Natron ersetzen ließ.

1) O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911, S. 57.

2) R. Bouilhac, Sur la fixation de l'azote atmosphérique par l'association des algues et des bacteries. Comptes rendues 1896.

3) N. Tischutkin, Über Agar-Agarkulturen einiger Algen und Amöben. Centralbl. f. Bakteriologie. II. Abt. Bd. II. 1897.

4) W. Benecke, Über Kulturbedingungen einiger Algen. Botan. Zeitung, Bd. 56, 1898.

Im selben Jahre berichtete Bouillhae¹⁾ von Reinkulturen (?) von *Nostoc punctiforme*. Er will sie einfach durch wiederholte Überimpfung aus einer Nährlösung in die andere gewonnen haben, was unmöglich zu bakterienfreien Kulturen führt.

Bouillhae zog *Nostoc punctiforme* mit stickstoffbindenden Bakterien zusammen in einer Nährlösung, die auf

1000 ccm H₂O
 0,2 g K₂SO₄
 0,2 g MgSO₄
 0,2 g K₂HPO₄
 0,1 g CaCO₃

und eine Spur Eisenchlorid enthielt. Auch sie ist schwach alkalisch und enthält Calcium und Eisen. Den Stickstoff mußten die Bakterien liefern oder er wurde in Form von 0,1% Ca(NO₃)₂ zugesetzt. In derselben Lösung wuchs auch *Schizothrix lardacea*, das aber den von Bakterien gebundenen Stickstoff nicht auszunutzen vermochte.

Schließlich hat derselbe Autor seinen *Nostoc* mit Zucker auch in völliger Dunkelheit kultiviert, woraus auf eine Ausnutzung organischer Substanzen im Stoffwechsel geschlossen wird. Vielleicht war es der Zucker selbst, der verarbeitet wurde. Sicher ist dies wegen der Anwesenheit von Bakterien in der Kultur nicht, auf die möglicherweise selbst die festgestellte Gewichtsvermehrung allein zu schieben ist.

Beijerinck²⁾ gelang die Anhäufung unbeweglicher Cyanophyceen, vor allem *Anabaena*-Arten, in Wasser mit 0,02% K₂HPO₄, dem auf 1500 ccm Lösung 1—2 g Gartenerde beigegeben war³⁾. Er nimmt an, daß die betreffenden Formen den Stickstoff der Luft assimilieren, da die genannte Kulturflüssigkeit nur Spuren davon und noch dazu in schwer aufnehmbarer Form enthielte. Ob aber nicht, die Anspruchslosigkeit der betreffenden Formen für das Ergebnis verantwortlich zu machen ist, oder N-bindende Bakterien mitgeholfen haben, wurde nicht untersucht. Die genannten Arten wurden auch auf festem Substrate in Reinkultur gebracht, und zwar durch Ausstrich auf einen Agar, der in der Petrischale sehr sorgfältig ausgewaschen worden war und der dann durch Übersichten mit der

¹⁾ R. Bouillhae, Recherches sur la végétation de quelques algues d'eau douce. Thèse de Paris 1898. Ebenso comptes rendus de l'académie des sciences, Paris. t. 123, 1896 II und t. 125, 1897 II.

²⁾ M. W. Beijerinck, Über oligonitrophile Mikroben. Centralbl. f. Bakteriologie, II. Abt., Bd. VII. 1901.

³⁾ Ein genau nach Beijerincks Vorschrift angestellter Versuch lieferte dasselbe Resultat. Es traten auch *Nostoc*- und *Cylindrospermum*arten auf. Über die letzteren wird von anderer Seite berichtet werden.

0,02proz. Kaliumphosphatlösung gedüngt, aber nicht mit Stickstoff versehen wurde.

Die beweglichen Formen der Oscillarien wachsen nach Beijerinck weder in den beschriebenen Rohkulturen ohne Stickstoff, noch auf den Agarplatten. Sie konnten aber von seinem Schüler van Delden in Reinkultur gebracht werden, wenn der Agar mit Hilfe von destilliertem Wasser noch sorgfältiger ausgewaschen und dann mit Ammonitrat gedüngt wurde. Leider ist über die Reinkulturen der verschiedenen beweglichen und unbeweglichen Cyanophyceen nichts genaueres mitgeteilt worden, Versuche mit organischen Stoffen wurden nicht angestellt, sodaß an der Bakterienfreiheit der Kulturen zu zweifeln ist.

Die Notwendigkeit, den Agar für Oscillarien so sorgfältig auszuwaschen, hat sich weder in den zitierten Versuchen Tischutkins ergeben, noch wird sie durch meine Erfahrungen bestätigt. Van Delden muß also eine besonders empfindliche Art benutzt haben.

Einige Beobachtungen an Kulturen von Blaualgen hat auch O. Richter¹⁾ (1908 und 1911) veröffentlicht. Reinkulturen sind ihm nicht gelungen. Er verwendete gewässerten Agar mit KNO_3 , CaSO_4 , FeSO_4 , sowie sekundärem Phosphat, also schwach basischer Reaktion.

Ganz neuerdings haben Magnus und Schindler²⁾ Angaben über Kulturen von *Phormidium autumnale* und *Oscillatoria formosa* gemacht, die sie auf Agar und Gipsplatten mit Nährlösungen zogen. „Als Nährlösung wurde eine etwas modifizierte Knopsche und die Molischsche mit und ohne Calciumsulfat verwendet. Auf diesem Nährmedium gedeihen bei alkalischer Reaktion die Oscillarien ausgezeichnet“. Über die beobachtete Farbenänderung und die Stellung der genannten Autoren zu der Gaidukowschen „chromatischen Adaptation“ komme ich weiter unten zurück. Es gelang, die Speziesreinkulturen frei von anderen Algen und Pilzen zu halten, jedoch nicht, sie frei von Bakterien zu bekommen. Ammonsalze scheinen die Nitrate als Stickstoffquellen ersetzen zu können, doch wurde das nur in bezug auf die Fähigkeit das Ergrünen herbeizuführen untersucht. Calcium war wohl auch da, wo es nicht zugesetzt wurde, genügend vorhanden.

Im ganzen kann man aus allen diesen Versuchen den Schluß ziehen, daß Cyanophyceen gut auf Agar gedeihen. Ob sie auch in Nährsalzlösungen ganz ohne organische Stoffe wachsen, ist nicht für alle Formen, aber nach Ad. Richters und Molischs Ergebnissen doch

1) O. Richter, Reinkulturen von Diatomeen. Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 21, 1903 und „Die Ernährung der Algen“. Leipzig 1911.

2) W. Magnus u. B. Schindler, Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien. Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1912, Bd. 30, S. 314.

für einige erwiesen. Überall war Nitrat zugegen, das also als N-Quelle geeignet ist. Ob Nitrit- und Ammonstickstoff auch verarbeitet werden können, ist nicht entschieden. Aus Beijerincks und Bouilhaes Befunden kann auf die Ausnutzbarkeit des von Bakterien gebundenen Stickstoffmaterials durch gewisse Cyanophyceen geschlossen werden. Ob er aber in Form von organischen Verbindungen aufgenommen wird, ist daraus nicht zu ersehen. Schwach basische Reaktion wird bevorzugt. Schwach saure ist tödlich, ohne daß über die Grenzen genaueres bekannt wäre.

Ob Calcium nötig ist, kann nicht klar ersehen werden, da es überall zugegen war. Das Gleiche gilt für das Eisen. Daraus ergeben sich also schon eine Anzahl Fragen. Noch richtiger wäre aber die Klärung des Verhaltens zu organischen Stoffen, sowohl stickstoffhaltigen wie stickstofffreien. Hiermit hänge dann auch die Möglichkeit ganz heterotropher Ernährung zusammen. Zu solchen Versuchen sind aber Reinkulturen nötig. Wenn auch die Gewinnung solcher von Beijerinck, Tischutkin und Bouilhae behauptet worden ist, so sind doch in den betreffenden Arbeiten keine Beweise für die Bakterienfreiheit der Kulturen enthalten, und noch weniger sind die oben gestellten Fragen in Angriff genommen worden. Es bleibt also noch manche Frage offen.

II. Erzielung der Reinkulturen.

Wie man aus der Übersicht im vorigen Kapitel ersieht, haben wir einige Anhaltspunkte für die Ernährungsphysiologie von Blaualgen, meistens Oscillarien. An diese galt es anzuknüpfen; doch war ich mir gleich darüber klar, daß eine Verallgemeinerung der an einer Form gemachten Beobachtungen auf die ganze Gruppe der Cyanophyceen bei deren biologischer Mannigfaltigkeit nicht erlaubt ist.

Bevor aber die Anpassung an so verschiedene Standorte wie verschmutzte Rinnsteine, heiße, schwefelwasserstoffhaltige, sonst reine Quellen, Auftrieb der Meere, nackte Felsen, Hohlräume in anderen Pflanzen, Flechten u. s. f. untersucht wird, muß man erst einmal an wenigen, leicht kultivierbaren Formen eingehende Studien machen. So nahm ich denn eine größere Anzahl von Arten in Kultur, die von verschiedenen Standorten stammten, indem ich die aus schmutzigen Gewässern bevorzugte, weil ich glaubte, daß sie weniger empfindlich sein würden. Es waren 16 Arten, unter denen Oscillarien vorherrschten, aber auch einzellige Formen sich befanden. Ferner waren dabei zwei *Nostoc*-Arten, ein *Cylindrospermum* und eine *Schizothrix*.

Von dem Material, das aus dem hiesigen zoologischen Garten, aus Schlamm aus der recht schmutzigen Saale in Halle, aus Tümpeln

im botanischen Garten und außerhalb, auch von feuchter Erde usw., stammte, stellte ich Rohkulturen an, die ich möglichst mit Wasser vom Ursprungsorte ansetzte. Die beweglichen Formen krochen am Glase empor und konnten so schon einigermaßen von der großen Masse anderer Algen getrennt werden. Nur die sich ähnlich verhaltenden Diatomeen waren auf diese Weise nicht zu entfernen.

Mit den zunächst zur Weiterzüchtung verwendeten gebräuchlichen Nährsalzlösungen hatte ich auch bei schwachbasischer Reaktion nicht viel Glück. Als sich eine auffallende Förderung durch Erde ergab, benutzte ich fernerhin einen im Autoklav hergestellten Auszug von Gartenerde. In diesem vermehrten sich die meisten Arten recht gut. Doch wurden sie schon nach relativ kurzer Zeit gelb und mißfarbig und stellten das Wachstum ein. Zwar konnte kurz nach der Verfärbung von solchem Material noch mit Erfolg weiter geimpft werden, doch waren die Kulturen nie sehr schön. Ich schloß daraus, daß irgend etwas fehlte und fand auch bald, daß ein Zusatz von 0,1% Kalisalpeter das Gedeihen wesentlich verbesserte. Mit dieser Nährlösung, die ich im folgenden als „Erdabk. + KNO_3 “ bezeichnen will und die meist noch durch 0,02% MgSO_4 und 0,02% K_2HPO_4 ergänzt wurde, hatte ich ein Mittel in der Hand, von allen verwendeten Formen in relativ kurzer Zeit hübsche Kulturen zu erlangen.

Um nun die in dem Material gemischten Arten von einander und von Diatomeen zu trennen, benutzte ich zwei feste Nährböden, die sich ergänzten, nämlich zunächst mit Nährlösung getränkte Gipsblöcke und dann Agar in Petrischalen.

Die ersteren waren für den Anfang sehr günstig, weil auf ihnen die Oscillarien sich gut ausbreiteten und weniger aneinander klebten als in Flüssigkeitskulturen, so daß einzelne Fäden abgeimpft werden konnten, und weil die Diatomeen auf ihnen viel langsamer krochen als die Blaualgen, also hinter ihnen zurückblieben. Die Gipsblöcke wurden durch Eingießen des Breies in glasierte Porzellanschalen gewonnen. Sie waren also auf einer Seite gewölbt, auf einer flach. Die gewölbte Seite kam in den als Kulturgefäße benutzten Deckelschalen nach unten, die flache wurde möglichst glatt geschabt und nach dem Sterilisieren beimpft. Als Nährlösung diente die oben erwähnte (Erdabk. + KNO_3). Sie reichte etwa bis zur halben Höhe der oberen Fläche des Gipsblockes. Auf der weißen Gipsunterlage hoben sich die blau- oder graugrünen Cyanophyceenlager schön und charakteristisch ab, wobei jede Art ihren eigenen Habitus bewahrte. Pilze und Bakterien konnten sich dabei kaum vermehren.

Diese Gipskulturen lieferten dann auch meist das Ausgangsmaterial für die Agarplatten. Der Agar wurde anfangs mit der oben genannten Erdenährlösung angemacht. Es zeigte sich aber bald, daß

die Erdabkochung hierbei ohne Schaden fortgelassen werden konnte und daß das insofern besser war, als dann die Pilze weniger gut gediehen. Überhaupt waren zuerst die Verunreinigungen sehr störend, solange ich versuchte, nach der O. Richterschen Methode auf die Oberfläche des erstarrten Agars zu impfen. Hierbei zeigte es sich erst, wieviel fremde Organismen noch in den scheinbar so reinen Gipskulturen zugegen waren. Nachdem mit Hilfe dieser die Diatomeen und Grünalgen entfernt waren, störten auf dem Agar hauptsächlich Pilze, Bakterien und Amöben. Besonders auch die letzteren, die sich weit über die Oberfläche ausbreiteten¹⁾, waren sehr schädlich und konnten auch bei Verbesserung der Methode nur langsam zurückgedrängt werden. Auffallenderweise vermehrten sie sich auch dann noch stark, wenn von Bakterien kaum etwas zu sehen war und wenn auch die Cyanophyceen ganz spärlich wuchsen. Bei großen Formen der letzteren schien es zudem fast unmöglich, daß die Amöben von ihnen lebten. Ob hier nun doch Bakterien die Nahrung lieferten oder ob nicht vielleicht ungeformte oder doch leblose Nährstoffe aufgenommen wurden, habe ich nicht untersucht.

Die erwähnte Verbesserung des Isolierungsverfahrens bestand darin, daß ich zum Kochschen Plattengußverfahren überging. Eine kleine Menge des Impfmateriales wurde an der Innenwand eines Röhrchens mit geschmolzenem und auf 40° abgekühltem Agar mit der Platin-Iridiumnadel möglichst fein verrieben und mit dem Agar vermischt. Dabei blieben immer genug Zellen lebendig, die dann den Ausgangspunkt junger Kolonien bildeten. Wurden mehrere „Verdünnungen“ hergestellt, indem etwa ein Kubikzentimeter der ersten Mischung in ein neues Röhrchen übertragen wurde, so war man sicher, später gut isolierte Fäden zu erhalten, die unter dem Mikroskop herausgesucht und abgeimpft werden konnten. Auf diese Weise konnten schließlich auch aus jedem beliebigen Organismengemisch die Oscillarien herausgezüchtet werden, die, abgesehen von den Diatomeen, sich stets lebhafter als alle anderen Algen vermehrten, offenbar weil sie durch ihr Bewegungsvermögen die ganze Agarmasse ausnutzen konnten. Ich erhielt so in den mit geeignetem Cyanophyceanmaterial gegossenen Schalen Kolonien von sehr verschiedenen Arten, die in allen Farben spielten, darunter auch sehr kleine bakterienähnliche Stäbchen, feinste Fädchen von sehr blaßgrünlicher Farbe sowie rosa-rote. Aber nur einige Formen zeigten ein so rasches Wachstum, daß die Weiterkultur lohnend schien. Die anderen, die bald zurückblieben, müssen späteren Untersuchungen vorbehalten werden.

¹⁾ M. W. Beijerinck, Über oligonitrophile Mikroben. *Centralbl. f. Bakteriologie*, Abt. II, Bd. VII, S. 570 ff.

Indem ich nun von den Agarplatten, die durch Guß erhalten waren und nur wenige kleinbleibende Bakterienkolonien zeigten, wiederholt neue Verdünnungen herstellte, hoffte ich schließlich zu bakterienfreien Reinkulturen zu gelangen. Trotz sehr langwierigen Versuchen, die mit Beharrlichkeit fortgeführt wurden, und trotzdem ich auch gewässerten Agar¹⁾ verwendete, der sich in meinen früheren Versuchen ebenso wie in denen O. Richters bewährt hatte, gelang es mir, so wenig wie diesem Forscher, mit der geschilderten Methode die Bakterien loszuwerden. Auch dann, wenn scheinbar ganz reine Kolonien vorlagen, erwiesen sie sich bei der Überimpfung in Agar mit Pepton oder Heydennährstoff als bakterienhaltig. Übrigens konnten die Bakterien auch direkt in den Petrischalen bei günstiger Beleuchtung und Betrachtung mit Obj. 4 von Leitz und Comp.-Ok. 12 gesehen werden. Sie machten sich nämlich durch ihr lebhaftes Wimmeln bemerkbar. Dabei erfüllten sie die von den Oscillarien gebahnten Schleimkanäle, von denen auch O. Richter²⁾ spricht, und drangen stets selbst bis an die Spitze eines vorwärts kriechenden Fadens vor.

Schließlich kam ich in der Zurückdrängung der Spaltpilze wenigstens so weit, daß ich die Oscillarien auf die Oberfläche des erstarrten Nitratagars impfen konnte, und daß sie sich darauf üppig vermehrten, ohne von Bakterien überwuchert zu werden. Ein weiterer Fortschritt war so nicht zu erzielen. Ich glaubte schon, es sei überhaupt unmöglich, Reinkulturen zu erzielen, weil die Bakterien in den Schleimhüllen saßen und so eine mechanische Trennung vereitelten. Auch ihre Abtötung, etwa durch Gifte, durch Hitze oder dergleichen schien ohne Vernichtung der Cyanophyceen bei der Empfindlichkeit der Blaualgenzelle kaum möglich. Schließlich aber gelang die Aufgabe doch bei einigen Arten, und zwar mit Hilfe der kolloidalen Kieselsäure. Nach diesen und anderen Erfahrungen kann ich der Bemerkung O. Richters³⁾ nicht beistimmen, der gewässerte Agar leiste dasselbe wie die Kieselgallerte.

Die Herstellung des Kieselsäuregels geschah nicht in der üblichen Weise mit Hilfe der Dialyse eines flüssigen Gemisches von Wasserglas und Salzsäure. Diese umständliche Methode hätte bei

¹⁾ Das Ausfaulenlassen des Agars (E. Küster a. a. O. S. 38) brachte mir wenig Erfolg, da das Erstarrungsvermögen dabei sehr stark litt, offenbar durch Hydrolyse der Gelose. Ob diese unmittelbar der Tätigkeit besonderer Bakterien zuzuschreiben ist, oder nur als Folge der Entstehung irgendwelcher Stoffwechselprodukte aufgefaßt werden muß, bleibt zu untersuchen.

²⁾ O. Richter, Reinkulturen von Diatomeen. Ber. d. deutsch. bot. Ges., Bd. 21, 1903, S. 496.

³⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911, S. 32.

dem großen Bedarf an Schalen kaum zum Ziele geführt. Ich mischte vielmehr die auf Grund des spezifischen Gewichtes entsprechend verdünnten Lösungen¹⁾ und goß sie in die Petrischalen. Über Nacht erstarrte die Mischung zur Gallerte und wurde nun ausgewaschen, indem die offenen Petrischalen mit Hilfe dazwischen geschobener Glasstreifen in einem großen Akkumulatorengefäß aufgebaut und mit Leitungswasser überrieselt wurden. Nach zwei bis drei Tagen war die Säure und das Kochsalz entfernt. In derselben Weise ist schon Beijerinck²⁾ vorgegangen. Warum Stahel³⁾ der Meinung ist, daß dies nur ein ungenügender Ersatz für die Winogradskysche Methode sei, kann ich nicht ersehen. Sein eigenes, umständliches Verfahren zeigt, wie wertvoll die Umgehung der Dialyse ist. Auch sind Nachteile kaum zu finden. Anfangs zeigten sich auf der Oberfläche der Gallerte bei mikroskopischer Betrachtung immer schwarzbraune Fädchen, deren Herkunft unklar war. Schließlich kam ich auf den Gedanken, sie möchten aus dem Leitungswasser stammen. Daher wurde dieses beim Auswaschen durch ein Wattefilter geschickt, das dann bald gelbbraun wurde. Diese Farbe rührte von verschiedenen Arten von Eisenbakterien her, wie die Betrachtung mit stärkeren Objektiven zeigte. Nun blieben die „Kieselplatten“, wie ich sie der Kürze halber nennen will, rein.

Es war nur noch die Schwierigkeit der Sterilisation zu überwinden. Denn die Versorgung mit Nährsalzen war nach Überschichtung mit der betreffenden Nährlösung durch Diffusion leicht zu erreichen. Nach dem Abtropfen der überschüssigen Lösung versuchte ich die Sterilisation im Autoclav. Es ging auch, doch waren Risse und Blasen in der Schicht nicht zu vermeiden. Weniger stark war diese Störung beim Sterilisieren im Dampftopf, so daß sie zu einem bloßen Schönheitsfehler herabsank. Durch zweimalige Erhitzung war vollkommen sichere Abtötung aller Keime zu erreichen. Es scheint aber, daß auch einmalige Behandlung im Dampftopf genügt, vorausgesetzt, daß die Schalen in diesem langsam erkalten, sodaß keine neuen Keime eingesaugt werden können. Das ist auch begreiflich, denn in dem Kieselsäuregemisch werden alle lebenden Keime durch die Salzsäure getötet, und im Leitungswasser befinden sich kaum Sporen von Bakterien. Auch waren die Vermehrungsbedingungen für Bakterien und Pilze in solchen Schalen mit Kieselgallerte sehr ungünstig. Erst wenn Algen gewachsen waren, traten zuweilen durch nachträgliche Infektion „Schimmelpilze“,

¹⁾ E. Küster, Kultur der Mikroorganismen. Leipzig u. Berlin 1907, S. 32.

²⁾ M. W. Beijerinck, Das Assimilationsprodukt der Kohlensäure in den Chromatophoren der Diatomeen. Rec. trav. bot. néerland, Bd. I, 1904. S. 28.

³⁾ G. Stahel, Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff. Jahrb. f. wissensch. Bot. Bd. 49. 1911, S. 585.

d. h. meist Penicillien auf, die sich aber fast ganz auf die Algenkolonien beschränkten, während in gewässertem Agar noch manche Pilzarten ganz gut gedeihen¹⁾.

Als Nährlösung wurde anfangs Erdabkochung mit Salpeter neben der reinen Salzlösung benutzt, die also 0,1 % KNO_3 , 0,02 % MgSO_4 und 0,02 % K_2HPO_4 enthielt. Calcium und Eisen waren jedenfalls, falls sie notwendig sein sollten, vom Leitungswasser her genug vorhanden. Bald zeigte sich, daß bei den „Kieselplatten“ die Erdabkochung keine Förderung des Wachstums der meisten Blaualgen bewirkte und durch die Begünstigung von Pilzen sogar schädlich war. In der Folge wurde also nur die reine Salzlösung der Kieselgallerte durch Diffusion einverleibt. Später wurde dann an Stelle des Salpeters auch Ammoniumphosphat $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ benutzt.

Auf solchen salpeterhaltigen Nährböden von kolloidaler Kieselsäure gedeihen die Blaualgen vortrefflich. Das meist zu einem Klümpchen geballte Impfmateriale von beweglichen Formen breitete sich im Laufe weniger Stunden zu einem zierlichen Netzwerke aus, das je nach der Art eine mehr oder weniger große Fläche überzog. Manche Formen konnten auf dem Kieselsäuregel weniger gut kriechen als auf Agargallerte. Sie zerbrachen dann in kurze Stücke, die durch langsame Ausbreitung einen vollkommen kreisrunden Bezirk besiedelten, und zwar so, daß die Peripherie dichtere Fadenmassen kurzer Stückchen aufwies, während die Innenfläche, die wahrscheinlich durch den ausgeschiedenen Schleim schlüpfrig geworden war, lange Fäden zeigte. Diese bildeten dann die für die meisten Oscillatoriaceen bezeichnenden Wirbel und Schleifen. Das Ganze bot schließlich durch sein seidiges Aussehen und die frisch blaugrüne oder graublau bis schwärzliche Farbe einen hübschen Anblick.

Andere Arten nahmen durch lebhaftes Kriechen gleich im Anfang die ganze Fläche in Besitz, die sie zunächst mit einem ganz lockeren Netzwerk überzogen. Die Fäden schoben sich in feinen Mäandern zusammen, oft zu mehreren nebeneinander. Auch entstanden wieder Wirbel, Schleifen und vollkommene Spiralen. All diese Bildungen wiederholten sich in ganz ähnlicher Weise bei den einzelnen Arten, und auf dem Agar ebenso wie auf dem Kieselsäuregel. Nur daß letzteres ein Eindringen offenbar schwer gestattete, und daß auch die beim Agar oft vorkommende Besiedelung der Glasflächen unterblieb. Es mag das daran liegen, daß das kapillare Aufsteigen von Wasser hier nicht wie beim Agar eintrat. Die Kieselgallerte fühlt sich auch viel trockener an, sie nimmt das beim Sterilisieren ausgeschiedene „Kondenswasser“ bald wieder auf.

¹⁾ Vgl. auch G. Stahel, a. a. O.

Vielfach konnte man in der Kieselgallerte Kriechspuren erkennen, ähnlich wie auf Agar. Die Erschwerung des Gleitens wurde aber dadurch deutlich, daß die Oberfläche kleine dreieckige Einreißstellen zeigte. Hier waren also die Fäden offenbar hängen geblieben und hatten durch mechanischen Zug im Vorwärtsgleiten die geringe Elastizität der Kieselgallerte zu stark beansprucht.

Durch wiederholtes Überimpfen einzelner möglichst isolierter Fäden unter stetiger mikroskopischer Kontrolle gelang es so, die Bakterien allmählich zurückzudrängen, sodaß nur noch ab und zu ganz wenig Bakterien bei der Überimpfung auf Agar mit organischer Stickstoffquelle auftraten. Als solcher wurde hauptsächlich Heydenagar verwendet. Dieser, der sich für Algen sehr bewährte, war nach dem für Wasserbakterien empfohlenen Rezept hergestellt, d. h. er erhielt keine Zusätze als 0,2—0,8% Heydennährstoff, der mit 1,5—2% Agar-Agar in destilliertem Wasser im Autoklav gekocht wurde. Die Mischung wurde durch einen Pfropf von entfetteter Watte gegossen und dann durch Faltenfilter geklärt.

Bald hatte ich die Freude, in den Petrischalen mit Heydenagar bakterienfreie Fäden der erst in Angriff genommenen Oscillarienart sich ausbreiten zu sehen. Die Anwesenheit von Spaltpilzen verriet sich ja jetzt sofort durch deren üppiges Wachstum. Von den Heydenplatten wurde in Schrägröhrchen mit dem gleichen Agar geimpft, dann auch in Pepton-, Bouillon- usw. Nährlösungen. Die Kulturen blieben rein. So war also das Ziel erreicht, freilich auf einem umständlichen Wege: Rohkultur, Gipsblöcke, Salpeteragar, Kieselgallerte und Heydenagar, also fünf Stufen. Ich überzeugte mich später, daß es möglich ist, den Plattenguß mit Salpeteragar zu umgehen, doch ist gerade dieser zur Isolierung und Auffindung der einzelnen Arten sehr angenehm. Die Gipsblöcke sind natürlich nicht notwendig, wenn man direkt auf Kieselgallerte impft. Es blieben dann nur drei Stufen: Rohkultur, Kieselgel, Heydenagar. Letzterer läßt sich durch Agarmischungen mit anderen organischen Nährstoffen ersetzen, wie wir noch sehen werden; doch kaum mit Vorteil.

Merkwürdig mag es wohl erscheinen, daß trotz der Benutzung der Kieselgallerte wirkliche Reinkulturen erst auf Heydenagar erzielt wurden. Die Ursache dafür liegt darin, daß zwar auf dem anorganischen Gel alle äußerlich anhaftenden Bakterien abgestreift wurden, einzelne in der Gallerthülle sitzende aber nicht erkannt werden konnten. Die Weiterkulturen auf Heydenagar erlaubte dann die Auffindung und Auslese der zufällig bakterienfreien Fäden. (Vgl. Anhang S. 89.)

Ich bin mir darüber klar, daß dieser etwas komplizierte Gang der angewandten Methode keine bequeme Handhabe für spätere Reinzüchtungen bietet, wie sie etwa das bekannte Rezept zur Gewinnung

von Azotobakterreinkulturen aus Erde liefert. Das liegt zum Teil an den „historischen“ Zufällen einer solchen Arbeit, zum Teil an der Schwierigkeit der Aufgabe, die, wie ich von verschiedenen Seiten hörte, nicht nur O. Richter mißlungen ist. Die Blaualgen bieten eben gerade wegen der geringen Spezifität ihrer Ernährung wenig Handhaben für die Trennung von anderen Organismen. Als die Reinzüchtung einiger Arten geglückt war, hatte ich mit deren Ernährungsphysiologie soviel zu tun, daß eine systematische Durchprüfung weiterer Kulturmöglichkeiten zum bloßen Zwecke der vereinfachten Reinzüchtung nicht in Angriff genommen werden konnte. Doch glaube ich, in der Kombination von Agarplattenguß, Kieselgelkultur und Heydenagarnachprüfung den vorläufig besten Weg gezeigt zu haben. Daß er nicht bei allen Arten zum Ziele führt, habe ich schon zu meinem Leidwesen erfahren.

In Agarplatten mit Nitrat oder Ammonsalzen (siehe weiter unten S. 70 ff.) wachsen wohl so ziemlich alle Arten, wenn auch mit recht verschiedener Geschwindigkeit¹⁾. Doch ist die Kieselgallerte nur für die beweglichen Formen bequem brauchbar²⁾. Auch wachsen auf dem Heydenagar nicht alle Arten gut, obgleich auf diesem noch besser als auf anderen Agarmischungen mit organischen Stoffen, die vielfach stark schädlich sind. Zwar ist das Wachstum in organischen Substanzen an sich nicht Bedingung für die Reinkultur, doch erleichtert es die Erkennung der bakterienfreien Fäden sehr. Deshalb begnügte ich mich zunächst mit den auf die beschriebene Weise von Bakterien trennbaren Arten, wobei freilich vielleicht eine ökologische Gruppe bevorzugt worden ist. Daher dürfen auch Schlüsse auf die Lebensbedingungen der nicht weiter verfolgten Arten nur mit Vorsicht gezogen werden. Soweit ohne Reinkultur eine Prüfung der Ernährungsverhältnisse möglich ist, soll das an einer größeren Zahl von Arten von anderer Seite geschehen.

III. Die reinkultivierten Arten.

Wenn auch für die rein physiologischen Gesichtspunkte dieser Arbeit die Identifizierung der zu den Versuchen herangezogenen Cyanophyceen-Arten nicht von einschneidender Bedeutung ist, so mußte

¹⁾ Die sich langsam vermehrenden Arten wurden schon auf dieser Stufe von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

²⁾ Die unbeweglichen Formen lassen sich gut impfen, indem man eine Aufschwemmung von ihnen in sterilem Wasser auf die Oberfläche der Gallerte schüttet und nach einiger Zeit die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgießt. Reinkulturversuche mit dieser letzteren Methode sollen noch unternommen werden.

mir doch daran liegen, wenigstens die systematische Gruppe zu kennzeichnen, der sie angehören. Wie bekannt, ist die Bestimmung von Blaualgen schwierig, und zwar wegen deren Formenreichtum und der, im Gegensatz etwa zu den gleichfalls so vielgestaltigen Diatomeen und Desmidiaceen, geringen Anzahl der morphologischen Merkmale. Man kann sie, wie mir scheint, in der Beziehung am ehesten mit den Spaltpilzen vergleichen. Es dürften in den Bestimmungsbüchern überhaupt nur die häufigeren oder irgendwie charakteristischen Formen zu finden sein. Daneben gibt es eine Menge untereinander sehr ähnlicher und noch dazu größtenteils sehr kleiner Arten, die sich nicht zu größeren Lagern vereinen und deshalb dem Sammler meist entgehen. Das ist natürlich kein Vorwurf gegen die so sorgfältigen Arbeiten verschiedener Autoren. Man denke nur, wie es um die Bakteriensystematik stünde, wenn wir noch heute auf bloße Beobachtung an mehr oder weniger natürlichen Standorten angewiesen wären.

Daraus ergibt sich aber auch gleich die Forderung, daß die einzelnen Arten der Spaltalgen an mindestens speziesreinen Kulturen zu verfolgen sind, um die Konstanz der systematisch benutzten Merkmale zu prüfen und neue Unterscheidungsmittel ausfindig zu machen. Voraussichtlich werden dann die Arten weiter zerlegt werden müssen. Es wird aber bei solehem Verfahren, wie ich das in der ersten Mitteilung anführte, auch die Schaar der einzeln lebenden oder sehr kleinen, besonders auch der einzelligen Arten zu ihrem Rechte kommen, die auf Gallertsubstraten charakteristische Kolonien bilden. Auf ähnliche Kennzeichen hat man auch hisher schon achten müssen. Man zieht die Gestalt und Farbe der natürlichen Blaualgenlager zur Bestimmung heran. Diese Merkmale sind aber bei der Verschiedenheit der Lebensbedingungen recht schwankend und unzuverlässig. Durch Kultur unter bekannten, leicht herstellbaren Bedingungen ließe sich diese Schwierigkeit beheben.

In der vorliegenden Arbeit, in der es auf die physiologischen Eigenschaften der Arten ankam, mußte schließlich auch damit gerechnet werden, daß von morphologisch scheinbar völlig einheitlichen „Arten“ physiologische Rassen bestehen, daß also eine Nachprüfung am scheinbar gleichen Material andere Ergebnisse zeitigt. So ist es ja z. B. mit dem von mir kultivierten Stamme von *Euglena gracilis* gegangen, der sich anders verhielt als es Zumstein angegeben hatte. (Vgl. 2. Mitteilung, diese Beiträge 1912 S. 35 ff.) Ich möchte deshalb betonen, daß meine Ergebnisse sich nur auf die kultivierten Formen beziehen, und ich eine Garantie für die Übereinstimmung mit den Originalarten oder späteren Isolierungen nicht übernehmen kann.

Was nun meine Bestimmungsversuche betrifft, so dienten dazu neben der neuesten Bearbeitung der Cyanophyceen durch Lemmer-

mann¹⁾ die ausführlicheren Artenbeschreibungen von Gomont²⁾. Herbarmaterial stand mir leider nicht zur Verfügung.

1. Die in den Protokollen als *Oscillaria* IV. geführte Art ist ziemlich feinfädig, von kräftig blaugrüner Farbe. Die Dicke der Fäden beträgt 4,5—5 μ . Die einzelnen Zellen sind $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ so lang als breit. Das Ende der Fäden ist nur schwach verjüngt, die Spitzenzelle rundlich. An den Querwänden, an denen die Fäden schwach eingeschnürt sind, erkennt man deutlich zwei Reihen von Körnchen. Darnach stimmt die Diagnose Lemmermanns für *Oscillaria tenuis* Ag., für die dieser Autor eine Dicke von 4—10 μ angibt. Bei mir sind die Fäden viel einheitlicher in der Dicke. Auch die Beschreibung und die Abbildungen bei Gomont (a. a. O. Tafel VII, Fig. 2 und 3) passen gut auf die von mir kultivierte Art.

2. Die zweite, provisorisch als *Osc. X* gekennzeichnete, in Reinkultur gewonnene Art ist etwas dicker, die einzelnen Fäden unter dem Mikroskop von mattgraugrüner Farbe, während größere Lager tiefschwarzgrün aussehen. Die Fäden sind 5,5—6 μ dick, die Zellen etwa halb so lang wie breit. Die Trichome sind zugespitzt. Die Endzelle ist wie die spitze Hälfte eines Eies gestaltet und mit dickere Wänden versehen. Die Querwände sind nicht granuliert, auch sind keine Einschnürungen zu erkennen. Der Mangel der Granulation ist der einzige Unterschied gegenüber Lemmermanns Diagnose für *Oscillaria brevis* Kütz. (a. a. O. S. 115), für die er eine Breite der Zellen von 4—6,5 μ , eine Länge von 1,5—3 μ angibt. Doch dürfte auch er nicht ausschlaggebend sein, da Gomont (a. a. O. S. 203) das Fehlen der Körnchen betont. Auch sind dessen Angaben über die ziemlich plötzliche Zuschärfung der Spitze und den Mangel einer Kappe an der Endzelle so bezeichnend für meine Form, daß ich bei *Oscillaria brevis* Kütz. bleiben möchte.

3. Die Identifizierung der *Nostoc*-Arten ist schwieriger als die der *Oscillarien*. Da der Habitus des Thallus als wichtiges Merkmal verwendet wird, war eine regelrechte Benutzung der Bestimmungstabelle nicht möglich³⁾. Doch dürfte, den sonstigen Kennzeichen nach, meine Art dem *Nostoc cuticulare* (Bréb.) Bornet et Flahault entsprechen. Masse und Aussehen stimmen recht gut. Die Farbe ist ein schönes, helles Blaugrün. Auch Standort und Aussehen der Lager stimmen mit den Angaben überein. Doch will ich vorsichtshalber die Art nicht mit dem genannten Speziesnamen bezeichnen.

¹⁾ E. Lemmermann, Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. Algen I. Leipzig 1910.

²⁾ M. Gomont, Monographie des Oscillariées, Ann. des sc. nat. sér. VII. Bot. T. XV.

³⁾ Vgl. Lemmermann a. a. O. S. 161.

IV. Entwicklung und Habitus der Kulturen.

Bevor ich dazu übergehe, die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit, nämlich die Kulturerfahrungen mit Agarmischungen und mit Nährlösungen bekannter Zusammensetzung darzulegen, will ich einiges über den Habitus der Kulturen und seine Veränderungen im Laufe der Zeit vorausschicken.

Die große Zahl der auf ihren Nährwert zu prüfenden Stoffe, machte eine quantitative Bearbeitung des Erntematerials unmöglich. Denn dazu hätten viel größere Flüssigkeitsmengen gehört, die die verfügbaren Mittel in bezug auf Chemikalien, Kolben und Raum nicht zuließen. Aus diesem Grunde habe ich mich darauf beschränkt, die an den Kulturen vom Tage der Impfung an bemerkbaren Veränderungen, soweit sie der Beobachtung zugänglich waren, in Pausen aufzuzeichnen. Aus den Protokollen soll im Anhang das Wesentliche mitgeteilt werden, wobei zugleich die Wiedergabe verschiedener Erscheinungen möglich wird, die quantitativ nicht faßbar wären.

Hierher gehört vor allem die Tatsache, daß manchmal Kulturen, die nach der Impfung zuerst keine oder nur schwach merkliche Entwicklung zeigten, sich später erholten und dann noch recht gut wurden. Das Gegenstück ist der noch häufigere Fall, daß eine Nährlösung im Anfang stark das Wachstum fördert, auf die Dauer aber nicht günstig ist. Folgt auf anfängliche Vermehrung ein Stillstand, so ist dieser stets endgültig, falls nicht neue Nahrungsstoffe zugeführt werden. Meist war er bei den kultivierten Arten äußerlich kenntlich an der Verfärbung der Algenmasse ins gelbliche bis rötliche, wie das Magnus und Schindler¹⁾ vor kurzem geschildert haben. Der *Nostoc* verhielt sich in der Beziehung genau wie die Oscillarien. Die Verfärbung ist im allgemeinen um so intensiver, je üppiger vorher das Wachstum war. Daher kommt es, daß eine anfangs sehr gut aussehende Kultur oft später schon einen kränklichen Anblick gewährt, wenn eine langsamer herangewachsene noch üppig grünt. Außer dem allgemein beobachteten Einfluß des Nahrungsmangels fördern auch gewisse organische Stoffe und helles Licht das Gelbwerden.

Neben der Verschiedenheit der Färbung ist auch der sonstige Habitus der Kulturen bei ein und derselben Art je nach der Zusammensetzung der Nährlösung verschieden. Bald sind die Fäden über den verfügbaren Raum ausgebreitet, bald drängen sie sich zu Klumpen zusammen oder sammeln sich phototaktisch in gewissen Be-

¹⁾ W. Magnus und B. Schindler, Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien. Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 30, 1912.

zirken des Kulturgefäßes. Deshalb ist die relative Schätzung der jeweils gewachsenen Algenmasse oft schwierig. Es blieb somit nichts anderes übrig, als ihr Aussehen kurz zu schildern, wobei gewisse oft wiederkehrende Habitusbezeichnungen verwendet wurden. Diese sollen im folgenden erklärt werden.

Wird eine kleine Menge Material von fädigen Blaualgen aus einer Flüssigkeitskultur entnommen, so wird es durch die Oberflächenspannung des Wassers zusammengeballt, weil die Fäden zu weich sind, um das Abrundungsbestreben des Tropfens zu überwinden. Wird ein solches „Impfklümpchen“ in Wasser übertragen, so gleichen sich die gewaltsamen Krümmungen der Fäden elastisch aus. Auch heften sich die Fäden durch ihre Gallertscheiden an der Glaswand fest¹⁾. Gleichzeitig beginnen die bekannten schwingenden Bewegungen der Spitzen, nach denen die Oscillarien ihren Namen haben. Dadurch kommt allmählich die strahlige Anordnung der freien Enden zustande, während die Fäden in der Mitte zunächst noch verschlungen bleiben. Mein *Nostoc* verhielt sich auch hierin wie die Oscillarien, nur daß die Bewegungen und später auch die Vermehrung langsamer vor sich gingen. Der Zustand, in dem die Fäden in der Mitte noch vereinigt, außen aber radiär angeordnet sind, wird im folgenden als „Strahlung“²⁾ bezeichnet. Er kommt sowohl auf gallertartigem Untergrunde wie auch in Flüssigkeit unter günstigen Umständen nach kurzer Zeit zustande. Nach weniger als einer Stunde kann er schon mit bloßem Auge gut kenntlich sein.

Ist die Nährlösung irgendwie schädlich, z. B. durch saure Reaktion oder Schwermetallspuren, so unterbleibt die Festheftung am Glase und die Strahlung ganz, das Impfklümpchen bleibt zusammengeballt. Das letztere kann nun aber auch dann vorkommen, wenn die Nährlösung eine Vermehrung erlaubt, so daß Ausbreitung und Gedeihen nicht immer parallel gehen. Die Oscillarienmasse wächst dann zu einem dicken kugeligen Gebilde heran, das frei am Boden liegt, und aus dem nur die äußersten Fadenenden herausragen. Ich bezeichne das als „Klumpen“. Diese Erscheinung trat besonders in peptonhaltigen Nährlösungen auf. Sollte die Erscheinung vielleicht mit der Verminderung der Oberflächenspannung durch das Pepton zusammenhängen? Ein Vergleich der Erntemenge mit der anderer Kulturen, in denen die Oscillarien ausgebreitet waren, war unter diesen Umständen kaum möglich.

¹⁾ Vgl. C. Correns, Über die Membran u. die Bewegung der Oscillarien Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch. Bd. XV, 1897, S. 139.

²⁾ Vgl. Tafel 2, Fig. I, 6.

Meist folgt nun aber auf die Strahlung das weitere Auseinanderstreben der Fäden unter Lockerung des Knäuels und Fortstreben von der Mitte. Bei dieser „Ausbreitung“ ist zweifellos eine chemotaktische Reizbarkeit im Spiele, auf Grund deren die Fäden sich gegenseitig fliehen. Sie bleiben dementsprechend bei der Ausbreitung noch eine Zeitlang annähernd radiär angeordnet (vgl. Tafel 2, Fig. I, 7), wobei aber, besonders auf gallertigem Untergrunde, durch den Reibungswiderstand schon vielfach Krümmungen und Schleifen entstehen. Gleichzeitig macht sich unter normalen Umständen die Vermehrung durch interkalares Wachstum der Fäden bemerkbar. Die Ausbreitung kann aber auch bei Nahrungsmangel erfolgen, der ein merkliches Wachstum unmöglich macht, also etwa in reinem Wasser oder auf nährsalzfreier Kieselgallerte, sowie im Dunkeln. Das Fehlen von Nahrungsstoffen verhindert demnach nicht, wie die Gegenwart schädlicher Stoffe, das Kriechen.

Oft breitet sich das Impfmateriale schon am ersten Tage völlig aus, sodaß die Fäden etwa in gleichem Abstände über die verfügbaren Oberflächen des Glases in der Flüssigkeit oder des Agars verteilt sind. Erst später beginnt dann ein Dichterwerden des so entstandenen Faden-„Netzes“ durch Vermehrung der Algen. Nur selten aber erhält sich die gleichmäßige Anordnung. Abgesehen davon, daß zuweilen ein Teil des Impfkümpchens zusammengeballt bleibt, so daß nur einzelne Fäden herauskriechen und den Grundstock zu einem Netz ergeben (Vgl. Tafel 2, Abb. III, 1), finden wir andere Störungen der regelmäßigen Verteilung. Ihre Ursachen möchte ich wieder in der Reizbarkeit der Fadencyanophyceen sehen.

Ganz klar liegt das bei der Phototaxis, die entgegen der die Ausbreitung fördernden negativen Chemotaxis, ein Zusammendrängen an günstig beleuchteten Stellen verursacht. In Flüssigkeitskulturen finden wir demnach die Oscillarien nach einiger Zeit meist an der Fensterseite des Meniscus angesammelt, wobei sie vielfach über den Flüssigkeitsspiegel emporkriechen, die Nährlösung kapillar nachsaugend. Auf festweichem Substrat macht sich ein derartiger Einfluß des Lichtes nicht bemerkbar. Der *Nostoc* zeigt eine besonders ausgesprochene Lichtreizbarkeit. Seine Fäden schieben sich im Anfange einer Kultur in der Richtung des Lichteinfallens am Boden des Gefäßes hin, wie das in Tafel 2, Fig. III, 2, zu sehen ist. Später sind die *Nostoc*-Trichome meist genau parallel zu einander und nahezu gradlinig an der dem Fenster zugekehrten Glaswand angeordnet. In anderen Fällen sammeln sie sich dagegen wie die Oscillarien an der hellsten Stelle an. Welche Ursachen dieses verschiedene Verhalten in verschiedenen Nährlösungen hat, das läßt sich vorläufig nicht sagen. Man kann nur den engen Zusammenhang zwischen einem bestimmten

Habitus und den betreffenden Kulturbedingungen betonen. Der *Nostoc* zeigt seine Phototaxis auch auf Agar in Petrischalen und, den komplizierten Lichtberechnungsverhältnissen entsprechend, weniger klar in Reagenzglasern.

Zu der Chemo- und Phototaxis kommt als bestimmender Faktor bei der Anordnung der Fäden wohl noch eine Stereotaxis, d. h. das Bestreben, sich der Oberfläche fester Körper anzulegen. Sicher ist das Vorhandensein dieser Reizbarkeit freilich nicht. Beim Wachstum auf Erde, auf Agar, Kieselgallerte usf. könnte schon die Oberflächenspannung des Wassers genügen, ein Erheben in die Atmosphäre unmöglich zu machen. In Flüssigkeitskulturen fällt dieser Faktor fort, und doch bleiben die Fäden der Oberfläche des Glases zunächst angeschmiegt. Darin möchte ich den Einfluß der Stereotaxis sehen. Doch kann auch die Konsistenz des abgeschiedenen Schleimes, also seine Kohäsion und die Adhäsion am Glase, zur Erklärung ausreichen. Sieht man freilich das so verschiedene Verhalten unter differenten Bedingungen, so ist man eher geneigt, es einem Wechsel in der Reizbarkeit, resp. im Vorherrschen einer bestimmten Sensibilität zuzuschreiben, denn die physikalischen Bedingungen können, etwa in Nährsalzlösungen, kaum derartig verschieden sein. Man vgl. dazu die Fig. II und III auf Tafel 2.

Derselben Ursache, die für das Kriechen an festen Körpern verantwortlich zu machen ist, dürfte jedenfalls auch der Umstand zuzurechnen sein, daß die anfangs durch negative Chemotaxis auseinandergetriebenen Fäden sich später meist zu „Strängen“ aneinanderhängen. Der Anfang zu solchen Aggregaten läßt sich mikroskopisch verfolgen. Er besteht darin, daß die Fäden nicht auf unbesiedeltem Boden kriechen, sondern an ihresgleichen entlang gleiten. Da man auf Agar und Kieselgallerte vielfach sieht, daß die früher schon „begangenen Straßen“ auch dann vorgezogen werden, wenn der erste Faden schon weiter gekrochen ist, darf man wohl annehmen, daß die oft sichtbare oder durch Saffraninfärbung sichtbar zu machende Schleimspur die Ursache für dieses Nachkriechen ist. Ob aber die Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit rein physikalisch oder durch eine spezifische Reizbarkeit wirkt, läßt sich bei dem Mangel einschlägiger Versuche und der Rätselhaftigkeit des Bewegungsmechanismus nicht entscheiden.

Mit bloßem Auge erkennt man die Wirkungen des geschilderten Haftens der Fäden aneinander eben an der „Strangbildung“, die zuweilen soweit fortschreitet, daß der größere Teil der Algenmasse zu wurstartigen Gebilden geballt wird. Von den oben geschilderten Klumpen oder Kugeln unterscheiden sie sich durch ihre unregelmäßige Gestalt und das Haften an der Glaswand. Als Beispiel diene

Abb. II, 2, und für *Nostoc* Abb. III, 3 im Gegensatz zu 2, wo die Fäden meist einzeln liegen.

In guten Kulturen wird das dem Boden anliegende Netz mit oder ohne teilweise Strangbildung immer dichter, bis es bei günstiger Beleuchtung schließlich durch reichlich ausgeschiedene Sauerstoffblasen emporgehoben wird. Es schwebt dann, teilweise noch festgeheftet, als zarter „Schleier“, der sich aber zuweilen noch aus unbekanntem Gründen zusammenballt, in der Flüssigkeit.

Neben den der Glaswand angeschmiegtten Fäden sieht man schließlich in üppigen Kulturen auch welche, die an dem Oberflächenhäutchen des Flüssigkeitsspiegels ihren Halt finden. Sie bilden in späteren Stadien der Kultur eine mehr oder weniger dichte „Haut“. Eine solche zeigt sehr schön den Zusammenhang der Fadenaggregate, der gar nicht unbeträchtlich ist. Darauf gestrente lösliche Substanzen bleiben lange Zeit trocken, Tropfen gefärbter Lösungen vereinigen sich nicht mit der Kulturflüssigkeit, selbst wenn die Haut scheinbar so locker gewebt ist, daß große Maschen in ihr frei bleiben. Es mag das durch ausgeschiedenen Schleim und durch die Oberflächenspannung des Tropfens bedingt sein.

Die Haut ist der Regel nach am Rande des Meniscus dichter, sie bildet einen „Rand“, der auch dann vorhanden sein kann, wenn die Mitte der Wasseroberfläche unbesiedelt ist. Er bildet auch den Ausgangspunkt für die Haut. Ein Beispiel für eine ältere Kultur mit losgelöster Haut mit Rand zeigt Fig. II, 1. Es ist der Typus einer normalen, gut gewachsenen *Oscillarien*-kultur.

Schließlich noch wenige ergänzende Worte über das Verhalten auf gallertigen Substraten, wie Agar, Gelatine und Kieselgallerte. Auf diesen breiten sich die *Oscillarien* usw. ganz ähnlich aus, wie in Flüssigkeiten, wobei sie sich auf dem Agar am leichtesten entlang schieben. Der Widerstand des klebrigen Untergrundes bewirkt die Bildung zahlreicher Schleifen, die schließlich zu vollkommenen, kreisrunden Spiralwirbeln werden können. Neben der Besiedelung des eigentlichen Nährbodens findet, besonders bei Verwendung von Agar, auch ein Wachstum auf den Innenwänden der Glasgefäße statt, wie es Abb. I, 1, 2 zeigt. Manchmal sind hier sogar üppigere Algenmassen zu finden als auf dem Agar selbst. Gleichzeitig kriechen die *Oscillarien* auch zwischen Glas und Agarmasse hinein, da deren Zusammenhang stets nur locker ist. Die geringe Viscosität des Agars und die Ausscheidung des sogenannten Kondenswassers mögen das bewirken. Ist der sonst verfügbare Raum schon besiedelt, so findet an dieser Stelle nach schwacher Volumverminderung des Agarklotzes durch Wasserverlust oft noch ein neues Aufblühen der *Oscillarien*-vegetation statt, wie es Abb. I, 8 zeigt, auf der ein Agarröhrchen von

der Rückseite zu sehen ist. In Kulturen mit Kieselgallerte und Gelatine bleiben die Glaswände fast ganz frei von Algen. Weitere Beobachtungen dieser Art sind weiter unten auf S. 68 mitgeteilt.

V. Kultur auf Nährgallerte.

Wie schon aus den früheren Angaben verschiedener Forscher und aus dem oben Gesagten hervorgeht, sind Agarmischungen mit Nährsalzen für die Kultur von Blaualgen sehr geeignet. Das gilt nicht nur für *Oscillarien*, sondern auch für zwei von mir herangezogene *Nostocarten*, für eine *Schizothrix* und für einige einzellige Cyanophyceen. Für das Wachstum bot gewässerter Agar bei keiner Art einen Vorteil gegenüber dem ungewässerten, abgesehen von der etwaigen Störung durch fremde Organismen, wie Pilze, Bakterien, Amöben und Infusorien. Umgekehrt schien manchmal die Vermehrung in ungewässertem Agar üppiger, wie das bei *Euglena gracilis* in viel höherem Maße hervortrat. Ein Zusatz von Erdbarkochung, der bei anorganischen Lösungen so sehr förderlich sein kann, hatte kaum irgendwo erheblichen Einfluß. Auch die Konsistenz des Agars war zwischen 1 und 2% gleichgültig. Überall erwies sich ein Agar, der 0,1% KNO_3 , 0,02% MgSO_4 und 0,02% K_2HPO_4 enthielt, als geeignet.

Neben dieser Mischung wurden noch einige andere Nährsalzzusätze zum Agar versucht. Sehr günstig war auch hier sekundäres Ammoniumphosphat, desgleichen neutrales Ammoniumsulfat. Wurde dem Agar anstatt des sekundären Kaliumphosphates primäres in der Konzentration von 0,2% zugesetzt, so war das Wachstum schlechter, manchmal blieb es auch ganz aus.

Ganz ähnlich war der Befund in Kulturen mit Kieselsäuregallerte; nur war hier bei Verwendung von Kalisalpeter der Zusatz von Erdeauszug öfters förderlicher als vergleichsweise bei Agar. Eine Form, nämlich *Schizothrix* spec., blieb auf Kieselgallerte mit Salpeternährlösung im Wachstum ganz erheblich zurück, wenn der Erdeauszug fortgelassen wurde, sodaß die kreisförmig sich ausdehnende Kolonie hier nicht wie sonst immer schließlich zur gänzlichen Bedeckung der Kulturschale kam.

Gelatine enthält an sich soviel aufschließbare Stoffe, daß sie schon mehr zu den Agarkulturen mit organischen Stoffen überleitet. Es wurde eine, ohne weitere Zusätze mit Ammoniak vorsichtig neutralisierte 10prozentige Gelatine verwendet. *Oscillaria tenuis* und *brevis* breiteten sich darauf gut aus und wuchsen, obgleich nicht sehr schnell, zu schönen Kulturen heran. Eine Verflüssigung der Gelatine trat in Reinkulturen nie ein, auch dann nicht, wenn eine größere Menge

Material auf die Oberfläche des schräg erstarrten Nährbodens gebracht wurde. Dagegen wurde unter solchen Umständen eine andere Erscheinung bemerkbar. Von der beim Impfen zusammengeballten Oscillarienmasse strebte eine große Menge Fäden radiär nach allen Seiten, ähnlich wie bei der Ausbreitung in Wasser. Sie drangen dabei gradlinig in die Gelatine ein und umgaben den Impfkumpen „wie die Strahlen die Sonne“¹⁾. Daneben schoben sich natürlich auch Fäden auf der Oberfläche entlang.

Bei kleiner Impfmenge trat das Eindringen in die Gelatine erst nach reichlichem Wachstum ein, immer aber stärker als bei Agar, wo die Oscillarien hauptsächlich die Oberfläche und die Grenzschicht gegen das Glas besiedelten oder gar bei Kieselgallerte, wo ein Eindringen kaum beobachtet wurde.

Die Ausbreitung überhaupt und das Einbohren in die Gelatine muß wohl einer negativ chemotaktischen Reizbarkeit zugeschrieben werden. Daß eine solche besteht, wurde deutlich, wenn in die Nähe einer sich ausbreitenden Oscillarienmasse auf Agar oder Kieselgallerte ein saurer Stoff, z. B. das schwer lösliche saure weinsaure Kalium (Weinstein) gebracht wurde. Alle nach der betreffenden Seite herausstrebenden Fäden wurden dann zur Umkehr gezwungen und die seitlichen im Bogen abgelenkt. Auch geschah die Besiedelung der Randpartien einer Petrischale, nach reichlicher Entwicklung in der Mitte, zuweilen deutlich in geradlinigen Strahlen. Am deutlichsten war das bei *Oscillaria brevis* auf Asparaginagar. Endlich konnten Bakterienkolonien eine anziehende oder abstoßende Kraft ausüben. Die positive Chemotaxis scheint aber bei Oscillarien nicht sehr ausgebildet zu sein, da Versuche mit einigen Nährstoffen auf Agar und Kieselgallerte erfolglos blieben.

Wir kämen nun zu den Versuchen auf Agar mit organischen Zusätzen in Schrägröhrchen. Diese wurden, wie oben gemeldet, teilweise zur Erprobung, teilweise zur Gewinnung der Reinkultur angestellt. Bald nach Erreichung dieses Zieles aber wurden sie auch auf andere Mischungen als die zuerst verwendeten, und zwar einige gebräuchliche Bakteriennährböden, ausgedehnt, um einen ersten Überblick über die Wirkung organischer Stoffe zu bekommen, bevor die systematischen Versuche mit organischen Lösungen in Angriff genommen wurden.

Von den Nährgarmischungen, die verwendet wurden, bewährten sich nur diejenigen mit geringen Mengen organischer Stoffe. Der

¹⁾ Vgl. Tafel 2, Abb. I, 5, unten.

oben oft genannte Heyden-Agar war sehr günstig. Er wurde hergestellt¹⁾ durch Kochen von 0,8% Nährstoff Heyden mit 2% Agar-Agar im Autoclav und Filtrieren. Dabei löst sich nur ein Teil der Albumose. Durch Verdünnen mit bloßem Wasseragar wurde ein besonders für den *Nostoc* noch besseres Substrat erzielt. Von Asparagin wurde 0,1% oder 0,025% nebst den nötigen Nährsalzen, von Pepton 0,5 oder 0,2% und von neutralisiertem Fleischextrakt 0,2% verwendet. Ferner kamen noch in Gebrauch: Agar mit Erbsenwasser, Mannitagar [wie für *Azotobakter*, also 2% Mannit, 0,1% K_2HPO_4 ohne eigens zugesetzten Stickstoff], Spirillenagar nach Arthur Meyer, d. h. Fleischwasser-Peptonagar und ein Agar mit Maiskörner-Faulflüssigkeit²⁾.

Es soll nun die Wirkung dieser Substrate auf die verschiedenen Arten geschildert werden, und zwar an ausgewählten Beispielen, denen die übrigen entsprachen, wo nicht anders vermerkt. Überall schräg erstarrter Agar in Reagenzgläschen.

Oscillaria I, eine tief graugrüne Art, der *Osc. brevis* ähnelnd, nicht in völliger Reinkultur gewonnen, Bakterien aber in der Stammkultur in geringer Menge. Die Versuche werden absichtlich angeführt, als Beispiele für die Art des Wachstums bei Gegenwart von Bakterien.

Asparaginagar: Erst viel Bakterien, dann gute Ausbreitung und Wachstum. Nach vier Wochen sehr üppig, tief graugrün.

Heydenagar: Bakterien um die Impfstelle, aber gute Ausbreitung und Wachstum. Nach zwölf Tagen schon recht üppig, die ganze Oberfläche bedeckend.

Peptonagar: Ähnlich.

Erbsenagar: Gute Ausbreitung, aber Wachstum durch Bakterien gestört.

Fleischextraktagar: Wie Asparagin- und Heydenagar.

Mannitagar: Bakterien reichlich, Oscillarien wachsen schlecht, werden gelb (Stickstoffmangel).

Oscillaria tenuis in Reinkultur.

I. Am 25. Juni 1912

geimpft aus Heydenagarröhrchen vom 28. Mai in:

1. Peptonagar 0,5 %.
2. Fleischwasserpeptonagar.
3. Asparaginagar 0,025 %.
4. Mannitagar.
5. Heydenagar 0,8 %.

Ergebnis am 27. Juni:

1. u. 2. nicht, alle anderen schön strahlend.

¹⁾ Nach Arthur Meyer, Praktikum der bot. Bakterienkunde. Jena 1903.

²⁾ E. G. Pringsheim, Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. 2. Mitt. *Euglena gracilis*. Diese Beitr. Bd. XII, S. 13.

2. Juli:

1. u. 2. nicht gewachsen. 3. Weit ausgebreitet, auf dem Agar Fäden teilweise Wirbel bildend. Fäden auch am Glase. 4. u. 5. Fäden ausgebreitet, bei 5. auch am Glase.

17. Juli:

1. u. 2. Wohl tot? Frisch beimpft mit größerer Menge Material. 3. Entsprechend weiter entwickelt. 4. Ähnlich, aber wenig Wirbel. 5. Sehr üppig, über und über blaugrün.

22. Juli:

1. u. 2. zeigen keine Ausbreitung der noch lebenden Oscillarien. 3. Hübsche Kultur, frisch grün. 4. Fäden über die ganze Fläche, aber ganz ockerfarben (Stickstoffmangel). 5. Sehr üppig, schön blaugrün.

II.

Am 22. Juli 1912

aus Heydenagarröhrchen vom 28. Mai in:

1. Peptonagar 0,2 %.
2. Erbsenwasseragar.
3. Fleischextraktagar 0,2 % neutralisiert.
4. Gewässerter Agar mit Ammonphosphat.
5. Agar mit Maisfaulflüssigkeit.

Ergebnis am 1. August:

1. Gut. 2. Tot, frisch beimpft. 3. u. 4. Weniger als 1, aber gewachsen. 5. Gelblich, schlecht.

12. August:

1. Grasgrün, recht gut. 2. Wenig Oscillarien in den am Glase kondensierten Tröpfchen. 3. Etwas weniger als bei 1, aber mehr blaugrün. 4. Nicht sehr gut, gelblich. 5. Nicht sehr gut gewachsen, grasgrün.

6. September:

Auf Pepton- und Fleischextraktagar hell geworden, viele Zellen tot.

III.

Am 29. Juli

aus der Mannitkultur vom 25. Juni, die ganz gut gewachsen ist, aber nur gelbe Fäden aufweist: 1. In dieselbe Mischung; 2. in Heydenagar geimpft.

31. Juli:

1. Schon grüner als in der Stammkultur. 2. Weniger grün als 1. Später wachsen beide ganz gut weiter, wobei: 1. anfangs die gute Farbe wiedererhält, aber schließlich doch wieder gelb wird, während 2. schön blaugrün wird.

IV. Auf Gelatine breitet sich *Oscillaria tenuis* gut aus. Von größeren Impfmassen aus oder nach reichlicher Entwicklung dringt sie tief in die Gelatine ein, im ersteren Falle etwa wie die Borsten einer Bürste, im letzteren mehr diffus. Die Fäden sind dann kurz und viel mehr verteilt als auf Agar, sodaß keine Wirbel und Stränge auftreten.

Alle diese Impfungen wurden mindestens einmal wiederholt.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß Heyden- und Asparagin-

agar ein sehr gutes Wachstum bewirken, während Peptonagar bei 0,5% unbrauchbar ist, bei 0,2% zwar anfänglich gute Entwicklung erlaubt, schließlich aber die Oscillarien degenerieren läßt. Das letztere gilt auch für den Fleischextraktagar. Fleischwasserpeptonagar und Erbsenwasseragar enthalten offenbar gleichfalls zu viel organische Stoffe. Maisfaulagar bewirkt eine schnelle Verfärbung. Der ohne besondere Stickstoffquelle hergestellte Mannitagar erlaubt nicht wie bei *Azotobakter* reichliche Entwicklung. Zwar vermehren sich die Oscillarien anfangs, wohl auf Kosten der geringen Stickstoffmengen des Agars, bald aber nehmen sie die gelbe Farbe an, die für den Mangel an geeigneten N-Quellen bezeichnend ist¹⁾. Sie sind dann noch nicht tot, können sogar, in ein neues, gleiches Röhrchen gebracht, wieder ergrünen, werden aber bald wieder entfärbt.

Oscillaria brevis in Reinkultur.

1. Mannitagar. 29. Juli bis 23. August 1912. Wenig Entwicklung. Fäden hauptsächlich am Glase, gelblich. Am 6. September. Kaum Wachstum.
2. Heydenagar. 12. bis 23. August 1912. Gut ausgebreitet, ziemlich viel gewachsen, aber gelblich. Am 6. September. Gut, aber gelb.
3. Peptonagar 0,2%. 12. bis 23. August 1912. Ähnlich, aber besser, dringen mehr in den Agar ein, auch mehr graugrün. Am 6. September. Gleichfalls gelb.
4. Gelatine 10% mit NH_3 neutralisiert. 14. bis 23. August 1912. Gute Ausbreitung, bald auch senkrecht zur Oberfläche eindringend. Am 4. September schön grasgrün und gut, wenn auch nicht sehr üppig gewachsen.
5. Asparaginagar. 14. bis 23. August 1912. Gut ausgebreitet und gewachsen, aber gelbgrün. Am 6. September nicht sehr viel gewachsen, gelblich.
6. Fleischextraktagar 0,2% neutral. 20. bis 23. August 1912. Wenig ausgebreitet. Am 6. September schlechte Ausbreitung, Wachstum?

Daraus ist für diese Art die geringe Widerstandsfähigkeit gegen organische Stoffe im Agar zu ersehen. Sie wächst zwar in manchen Mischungen anfangs ganz gut, nimmt aber mehr oder weniger schnell eine gelbliche Farbe an und hält dann mit der Vermehrung ein. Im Gegensatz dazu ist hier Gelatine, die ohne weitere Zusätze mit Ammoniak neutralisiert wurde, leidlich für das Wachstum geeignet. Jedenfalls bekommen die Oscillarien hierin schöne Farbe, auch wenn sie aus einer ganz gelben Kultur geimpft worden sind. Dieses Ergrünen ist schon nach 1—2 Tagen deutlich. Ebenso, wenn gelbe Oscillarienmassen auf Kalisalpeteagar übertragen werden. Wie hier gleich betont sei, ist auffallenderweise die *Oscillaria brevis* in Lösungen nicht empfindlicher gegen organische Stoffe als *Oscillaria tenuis*.

¹⁾ Vgl. Magnus und Schindler, Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien. Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1912. S. 314 ff.

Nostoc spec. in Reinkultur.

Diese Form ist besonders auf festen Substraten, aber, wie wir später sehen werden, auch in Flüssigkeiten schwerer zu kultivieren als die Oscillarien. Sie breitet sich weniger oder jedenfalls viel langsamer aus als jene und vermehrt sich auch nicht so rasch. Sonst sind die Unterschiede nicht beträchtlich.

1. Mannitagar. Gutes, wenn auch nicht so üppiges Wachstum wie in Kalisalpeteagar. Bald gelb werdend, aber zwischen Glas und Agar noch lange grün weiterwachsend.

2. Heydenagar. Sehr gutes Wachstum, wenngleich auch hier langsam sich ausbreitend, schließlich dickes, tiefblaugrünes schleimiges Lager, das aber nie den ganzen Agar bedeckt.

3. Peptonagar 0,2 %. Sehr wenig Ausbreitung und geringes Wachstum.

4. Gelatine. Lebt lange, ohne zu wachsen oder sich auszubreiten.

5. Asparaginagar 0,25 %. Ähnlich wie Heydenagar.

6. Fleischextraktagar 0,2 % neutral. Sehr langsame Ausbreitung. Anfangs Wachstum, dann Stillstand und Entfärbung von den Spitzen her.

7. Erbsenwasseragar. Keine Ausbreitung, stirbt sehr bald ab.

Alle diese Versuche wurden mehrfach wiederholt und zeigen, daß größere, immerhin noch recht geringe Mengen von Peptonen (Pepton Witte, Fleischextrakt, Erbsenwasser) schädlich wirken, und auch Gelatine keine Entwicklung erlaubt. Asparagin- und Heydenagar erweisen sich wieder als recht günstig, wenn sie auch nicht den Agar ohne organische Stoffe übertreffen.

Nach Beendigung des Wachstums zerfällt der *Nostoc* in der bekannten Weise in angeschwollene Dauerzellen mit dicker Membran. Mangelt es an Stickstoff, so wird er gleichzeitig mehr oder weniger entfärbt, gelb bis bräunlich. Impft man aus solchen Kulturen weiter, so ist das Anwachsen verzögert, tritt aber auch nach längerer Zeit noch sicher ein.

VI. Kultur in Mineralsalz-Lösungen.

Über die rein autotrophe Ernährungsweise der kultivierten Blaualgen habe ich nicht sehr zahlreiche systematische Versuche angestellt, da das meiste mit nur artreinem bakterienhaltigem Material auch erledigt werden könnte und der Einfluß organischer Stoffe am meisten interessierte. Doch wurden teilweise nebenher einige Erfahrungen gemacht, die die in der Einleitung aufgezählten älteren Befunde ergänzen, teilweise mußten auch als Grundlage für die Versuche mit organischen Stoffen und als Vergleichskulturen Impfungen in anorganische Lösungen vorgenommen werden. Denn ohne die Kenntnis möglichst günstiger

„mineralischer“ Nährlösungen konnte eine eventuelle Förderung durch Kohlenstoffverbindungen nicht sicher nachgewiesen werden.

Mit der Feststellung der notwendigen Elemente und der optimalen Konzentration der Lösungen habe ich mich nicht beschäftigt, weil das von anderer Seite geschehen soll. Die Fragen, die mir vorschwebten, waren vielmehr folgende:

1. Ist rein autotrophe Ernährung zur Erzielung guter Kulturen ausreichend?

2. Kann der Nitratstickstoff durch den aus Nitriten oder Ammonsalzen ersetzt werden?

3. Welche Reaktion der Lösung ist am günstigsten?

Die erste und zweite Frage waren verhältnismäßig leicht zu beantworten und zwar in bejahendem Sinne. Welche Stickstoffquelle die beste ist, kann dagegen nicht einmal für eine bestimmte Art allgemein gesagt werden, da offenbar recht verwickelte physikalisch-chemische Verhältnisse vorliegen. Noch schwieriger ist die dritte Frage zu lösen.

Wie man aus der Einleitung ersehen möge, ist die Verwendbarkeit von Nitraten so vielfältig festgestellt, daß daran, sowie an der Möglichkeit der rein autotrophen Ernährung überhaupt nicht gut gezweifelt werden kann. Was die Brauchbarkeit der verschiedenen Salze der Salpetersäure anbelangt, so ist sie in der oft erörterten Weise von der Art des Kations abhängig, das in der unveränderten Lösung vorhanden ist und nach Verbrauch des Nitrat-Anions mit der Kohlensäure der Luft entweder zu unlöslichem oder zu dissoziiertem, daher alkalisch reagierendem Karbonat zusammentritt.

Stark von der Neutralität abweichende Reaktion ist aber jedenfalls schädlich. So ist es begreiflich, daß das aus den angeführten Gründen „physiologisch neutrale“ Calciumnitrat besonders günstig wirkt. Ammoniumnitrat kann gleichfalls physiologisch neutral wirken, falls nämlich das Ammon- und das Nitrat-Jon in gleicher Weise verbraucht werden. Die Blaualgen scheinen aber das Nitrat-Jon vorzuziehen, und freies Ammoniak ist gefährlich. So möchte ich es erklären, daß Ammoniumnitrat nicht sehr günstig wirkt, und daß die Lösung gewöhnlich nach einiger Zeit alkalisch reagiert.

Bei Kaliumnitrat wird die Sache schon verwickelter. Bei *Oscillaria brevis* macht sich das zwar nicht sehr bemerkbar, da sie ziemlich unempfindlich gegen die Reaktion der Lösung ist. *Oscillaria tenuis* dagegen vermag sich nur innerhalb enger Grenzen der H- und OH-Jonenkonzentration anzupassen. Damit dürfte es zusammenhängen, daß diese Art nur dann mit Kalisalpeter ernährt werden kann, wenn die Lösung annähernd neutral ist. Zwar verträgt sie etwas Basizität, aber sie macht die Lösung stärker alkalisch und geht dann ein, wenn sie auch anfangs gut gedieh. Daher dürfen nicht zu wenig H-Jonen

in der Lösung sein; zuviel aber erst recht nicht, da diese noch giftiger wirken als die OH-Jonen. Alles dies gilt nur für künstliche Kulturen ohne organische Stoffe und ohne Colloïde. Aber auch die Gegenwart von Calciumsalzen ändert das Bild. Ist z. B. schwerlösliches tertiäres Calciumphosphat oder Calciumsulfat zugegen, so wirken diese ausgleichend auf zu starkes Ansteigen der Basizität, weil sich nun teilweise neutrales Kaliumsulfat oder -Phosphat und ausfallendes Calciumcarbonat bildet. Man bekommt dann den Eindruck, daß das Calcium unter gewissen Umständen zu den notwendigen, unter anderen zu den entbehrlichen Elementen gehört. Hier ist also Vorsicht in den Schlußfolgerungen am Platze.

Was die salpetrige Säure anbelangt, so wurde sie in Form des Kaliumsalzes verwendet und bei schwachbasischer Reaktion in Gegenwart von Calciumsalzen als recht brauchbar gefunden. Die Kulturen können ebenso üppig werden wie die in Nitratlösungen. Sehr verderblich ist aber schon die schwächste Acidität.

Von Ammonsalzen erwies sich das sekundäre Phosphat auch bei den anderen kultivierten Algen als besonders günstig. Eine zu starke Säuerung wird dabei nicht leicht auftreten, weil die Phosphorsäure verhältnismässig wenig dissoziiert und daher in dem zunächst entstehenden Monophosphat oder vielmehr Gemisch von NH_4^- , PO_4^- , HPO_4^- , H_2PO_4^- und H-Jonen mit den undissoziierten Molekülen $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ die H-Jonen weniger konzentriert sind als z. B. in den Lösungen, die entstehen, wenn das Sulfat oder Chlorid des Ammoniums seines Kations beraubt wird. Fast ebenso günstig erwies sich das in reinem Wasser schwer aber doch etwas lösliche Ammoniummagnesiumphosphat. Da es in größerer Menge zugesetzt werden kann, ohne zur Entstehung von H- oder OH-Jonen Veranlassung zu geben oder durch seinen osmotischen Druck lästig zu fallen, daher auch ein Abwägen nicht nötig ist, erweist es sich als besonders bequem und wurde deshalb als Stickstoffquelle bei den Versuchen mit N-freien organischen Stoffen bevorzugt. Ammoniumsulfat und -Chlorid sind bei annähernd neutraler Lösung auch ganz brauchbar.

Die Wiedergabe eines meiner Versuche möge die Wirkung verschiedener anorganischer Stickstoffquellen dartun.

Oscillaria tenuis aus Heydenagarröhrchen vom 28. Mai 1912, geimpft am 22. Juli 1912 in:

- 1) 0,05% KNO_3 + 0,02% MgSO_4 + 0,02% eines Gemisches von 15 Teilen KH_2PO_4 u. 100 Teilen K_2HPO_4
- 2) = KNO_2 = =
- 3) = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = =
- 4) = $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ = =
- 5) Kleine Menge NH_4MgPO_4 + 0,01% K_2SO_4

Überall Spur FeSO_4 und CaSO_4 . Kölbchen mit je 50 ccm dopp. dest. Wasser.

Ergebnis am 23. Juli:

In allen Kulturen beginnen die Oscillarien auseinanderzukriechen.

29. Juli:

1. Oscillarien ganz fein auseinandergetrochen. 2. Impfkümpchen sieht schlecht aus, haftet nicht, ist aber noch grün. 3. u. 4. Ähnlich wie 1, aber besser. 5. Etwa wie 1.

2. August:

1. Mäßig. 2. Schlecht. 3.—5. Gut.

12. August:

Am besten 4., dann 5. (fast ebenso), dann 1. (auch nicht viel schlechter), dann 3. (auch noch hübsche Haut), dann 2. (Impfkümpchen gut gefärbt, aber geringe Ausbreitung in kurzen Fadenstückchen). Reaktion geprüft mit Rosolsäure: 3. Etwas gelblicher als 1., 2. u. 4., während 5. in der Mitte steht.

Es erlauben also die verschiedenen N-Quellen gutes Wachstum bis auf das Nitrit, für dessen Ausnutzung die Lösung mehr basisch sein muß, als in obigem Versuche, etwa wie sie durch Verwendung des primären Phosphates wird. Eine geeignete Nährlösung mit Nitrit als Stickstoffquelle hat z. B. folgende Zusammensetzung: 0,05% KNO_2 ; 0,02% K_2HPO_4 ; 0,01% MgSO_4 ; Spur CaSO_4 und $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$ in dopp. dest. W. Darin wachsen neben anderen alle in Reinkultur gewonnenen Arten recht gut. Vergl. Tafel 2, Abb. II, 2.

Das Ergebnis^a dieser Versuche ist also dahin zusammenzufassen, daß unter sonst günstigen Umständen für Blaualgen Nitrate, Nitrite und Ammonsalze geeignete Stickstoffquellen darstellen, daß aber zum weiteren Eindringen in diese Probleme verfeinerte physikalisch-chemische Methoden notwendig sein werden. Ich denke dabei vor allem an die genaue Verfolgung der Reaktions- und Mischungsveränderungen in den Lösungen.

In noch höherem Grade gilt das Letztgesagte für die Feststellung der optimalen Anfangsreaktion der Nährlösungen. Wie besonders Molisch und O. Richter betonen, ist schwache Alkalinität das einzig richtige. Daß das aber doch nicht so uneingeschränkt gelten kann, ersieht man aus den Angaben von Marx¹⁾ und Chodat und Goldflus²⁾, die genügend verdünnte Lösungen, etwa 0,05%, von primärem Phosphat mit Erfolg anwandten. Allerdings stellte dabei das physiologisch-basische

¹⁾ F. A. Marx, Untersuch. über die Zellen der Oscillarien. Diss. Erlangen 1892.

²⁾ Chodat und Goldflus, Note sur la culture des Cyanophycées et sur le développement d'Oscillatoriées coccogènes. Bull. de l'Herbier Bossier, T. V. 1901. Zitiert nach E. Strasburger, Das botan. Praktikum, 4. Aufl. Jena 1902. S. 398.

KNO_3 oder $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ die Stickstoffquelle dar. Aber geringe Mengen von H-Jonen können danach doch nicht tödlich sein.

Ein Versuch wurde mit 0,02prozentigen Lösungen von käuflichem kristallisiertem primärem und sekundärem Kaliumphosphat (Merk) angestellt. Als Stickstoffquellen dienten je 0,1% von Kaliumnitrat, Kaliumnitrit und Ammoniumsulfat. Daneben wurde überall 0,01% Magnesiumsulfat und eine Spur Ferrosulfat zugefügt. Eine Parallelreihe erhielt daneben noch eine kleine Menge tertiäres Calciumphosphat. *Oscillaria brevis* war in den sauren Nitritlösungen nach wenigen Tagen tot. Im übrigen aber war der Unterschied zwischen sauren und alkalischen Lösungen nicht groß. Die calciumhaltigen erwiesen sich den anderen als überlegen.

Um genauere Ergebnisse zu erzielen, durfte nicht von den käuflichen Salzen ausgegangen werden, weil diese nie genau der Molekularformel entsprechen. Da andererseits aber Alkaliphosphate noch das beste Mittel darstellen, um bestimmte, nahe am Neutralitätspunkte liegende H- und OH-Jonenkonzentrationen herzustellen, mußte ich mir die Salzlösungen selbst bereiten. Von den für solche Zwecke empfohlenen¹⁾ Acetat-, Ammonium- und Phosphatgemischen dürften die letzteren für unsere Zwecke die einzig brauchbaren sein. Auch ist ja die Eigenschaft der Phosphatlösungen, ihre H-Jonenkonzentration relativ unabhängig von der Konzentration, von Beimengungen und von der Temperatur beizubehalten, allerdings wohl meist unbewußt, in der Nährlösungstechnik oft genug mit Erfolg ausgenutzt worden.

Für meine Zwecke habe ich denn eine (nicht durch Titration eingestellte) Phosphorsäurelösung von bestimmtem Gehalt von Kahlbaum bezogen und mit einer auf Normaloxalsäure eingestellten Kalilauge vermischt. Von den so hergestellten einhalbnormalen Lösungen, die solchen von primärem und sekundärem Phosphat entsprachen, wurden verschiedene Mengen gemischt und damit die Nährlösungen versetzt, sodaß diese dann $\frac{1}{100}$ und in einem Versuche $\frac{1}{400}$ Mol Phosphate enthielten. Calciumsalze mußten wegen des zu befürchtenden Anfallens von Calciumphosphat in den mehr basischen Lösungen vermieden werden. Auch von Magnesiumsalz durften aus demselben Grunde nur geringe Mengen zugegen sein. Als Stickstoffquelle kam daher Ammoniumnitrat und Ammoniumsulfat in Verwendung, ferner wurde 0,01 oder 0,02% Magnesiumsulfat und eine Spur Ferrosulfat hinzugefügt.

Die Ergebnisse sind noch nicht klar genug, um sie hier im einzelnen mitzuteilen, doch scheint die Methode zum Ziel zu führen.

¹⁾ L. Michaelis, Methoden zur Herstellung bestimmter Wasserstoffionenkonzentrationen, Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Bd. III, 2. Berlin u. Wien 1910, S. 1337 ff.

Jedenfalls kann man damit zeigen, daß ganz schwach saure und etwas basische Reaktion vertragen wird. Die Grenzen sind im einzelnen Versuch scharf, verschoben sich aber je nach der sonstigen Zusammensetzung der Lösung.

Damit sind die an reinen anorganischen Nährsalzlösungen gemachten Erfahrungen wiedergegeben. Auf die Verhältnisse in der Natur darf ihre Geltung nur mit Vorsicht erweitert werden. Das zeigen schon die Versuche mit Agar, Kieselgallerte und Erdabkochung. Alle diese Substanzen sind geeignet, die Schädlichkeit sonst unbrauchbarer Nährgemische herabzusetzen und auch die Giftigkeit des käuflichen destillierten Wassers, die wie für Conjugaten¹⁾, so auch für Blaualgen, wenn auch in verringertem Maße gilt, aufzuheben. Deshalb bin ich jetzt der Meinung, daß die in der ersten Mitteilung betonte günstige Wirkung des Agars und der Humusstoffe bei der Algenkultur mindestens z. T. auf der Adsorption schädlicher Stoffe beruht, die ebenso von anderen Colloiden übernommen werden kann.

Eine Lösung von 0,1% KNO_3 , 0,025% MgSO_4 und 0,025% K_2HPO_4 in käuflichem destilliertem Wasser z. B. war für Blaualgen ganz unbrauchbar. Mit Agar, Kieselgallerte oder Erdabkochung aber erlaubte sie üppige Vermehrung. Daß hieran nicht etwa nur die Zufuhr von Eisenverbindungen schuld war, zeigte die Unfähigkeit solcher, die obige Lösung zu verbessern. Natürlich ist diese Hypothese noch nicht genügend gestützt, aber sie kann zu neuen Untersuchungen anregen. Vielleicht darf sogar die so häufige Schleimabsonderung bei phanogamen Wasserpflanzen und Algen in ähnlichem Sinne gedeutet werden.

Neben den zahlreichen Agar- und Kieselgallertekulturen möge der folgende Versuch als Beispiel für das Gesagte dienen.

Am 5. Oktober 1911 wurden sieben Cyanophyceenarten, meist Oscillarien, ein *Nostoc* und eine *Schizothrix* in eine Lösung von 0,1% KNO_3 , 0,025% MgSO_4 und 0,025% K_2HPO_4 in käuflichem destilliertem Wasser geimpft und zum Vergleich in eine solche, die daneben noch Erdeauszug enthielt. Am 25. Oktober hatten sich in der erstgenannten Lösung nur zwei Arten ein klein wenig ausgebreitet, deutlich vermehrt hatte sich keine. In der Lösung mit Erdeauszug waren alle gut gewachsen und entwickelten sich schließlich zu sehr üppigen Kulturen.

Eine starke Förderung durch Humusstoffe ist ja von anderen Mikroorganismen auch bekannt geworden, besonders von *Azotobakter*. Nachdem man anfänglich von einer schwer definierbaren „Reizwirkung“ gesprochen hatte, kam man schließlich darauf, den mineralischen Be-

¹⁾ Vgl. 1. Mitteilung, Die Kultur von Algen in Agar, Diese Beiträge, Bd. XI, S. 328.

standteilen des Humus, besonders den Eisenverbindungen¹⁾, eine große Bedeutung beizumessen, ohne daß dadurch die Frage ganz geklärt wäre²⁾. Vielleicht kann die hier betonte Adsorptionskraft kolloidaler Stoffe die anderen Erklärungsmöglichkeiten ergänzen, was um so wahrscheinlicher ist, als nach Benecke (a. a. O.) „die Gegenwart von Humusstoffen“ bei *Azotobakter* „nicht so notwendig ist, wenn man ihn auf festen Böden, z. B. Agar, züchtet“.

VII. Kultur in Nährlösungen mit organischen Stoffen.

Um den Einfluß organischer Verbindungen auf irgend einen Organismus kennen zu lernen, ist die Verwendung von Lösungen möglichst genau bekannter Zusammensetzung und längere Beobachtung erforderlich. D. h., auf Pflanzen angewendet, es müssen Reinkulturen zur Verfügung stehen, da nur diese die Wirkung organischer Stoffe während längerer Zeit ungestört zu verfolgen erlauben; und weiter, es muß die Vermehrung der betreffenden Organismen aus kleinen Anfängen heraus in Nährlösungen, die alles zum Gedeihen Notwendige enthalten, genau beobachtet werden.

Nur so können Fehler vermieden werden, die dadurch entstehen, daß irgend ein Stoff zwar nicht tödlich, aber entwicklungs hemmend wirkt, [wie z. B. Gelatine bei dem kultivierten *Nostoc*] und daß ein anderer vielleicht anfangs leidliche Vermehrung erlaubt, durch Umsetzung in irgend einen giftigen Stoff aber schließlich doch tödlich wird. Bei den hier in Betracht kommenden fädigen Blaualgen kommt dann noch ein Umstand hinzu, der die Beurteilung erschwert. Beim Impfen wird nämlich, wie oben gezeigt, stets ein zusammengeballtes Knäuel übertragen, dessen mehr oder weniger große Ausbreitung einen verschiedenen Grad der Vermehrung vortäuschen kann. Die Kultur muß deshalb stets solange aufbewahrt werden, bis das Wachstum der Algen zweifellos festgestellt ist oder jede Hoffnung auf eine Entwicklung aufgegeben werden muß.

Vielfach zeigt zwar schon die Schnelligkeit der Ausbreitung das Wohlbefinden der Faden-Cyanophyceen an, aber diese Regel ist doch nicht ohne Ausnahme. Unter Umständen kann auf ein schnelles Auseinanderkriechen sehr langsame Vermehrung oder selbst Absterben folgen, und umgekehrt können auch zusammengeballt bleibende Fäden in diesem Zustande weitere Zellteilungen erfahren und zu einer

¹⁾ New Jersey State Report of the Agricultural Station. 1903, S. 276, 1905, S. 269.

²⁾ W. Benecke, Bau und Leben der Bakterien. Leipzig u. Berlin 1912, S. 504 f. und die dort angeführte Literatur.

ziemlich großen, dichten Kugel heranwachsen. Beispiele werden unten gegeben werden. (Vergl. Protokolle, Anhang S. 101.)

Bei der Einwirkung irgend eines Stoffes auf einen Organismus sind ganz allgemein drei Fälle zu unterscheiden: Die betreffende Substanz kann schädlich, wirkungslos und förderlich sein. Fast immer läßt sich die Entscheidung, welcher Fall vorliegt, nicht leicht treffen, da die Konzentration eine große Rolle spielt, und je nach dieser alle drei Möglichkeiten an ein und demselben Stoffe angetroffen werden können. Manche Organismen, wie z. B. die meisten Pilze und Bakterien, sind gegen die Konzentration organischer Stoffe, abgesehen von den bekannten „Giften“ ziemlich unempfindlich. Für die Mehrzahl der Algen und im besonderen für Blaualgen gilt das nicht. Hier mußte daher der Konzentration der betreffenden Stoffe einige Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Das Interesse konzentrierte sich bei meinen Untersuchungen natürlich hauptsächlich darauf, ob eine Förderung durch organische Stoffe eintritt, d. h. ob von „mixotropher“ Ernährung gesprochen werden kann. Diese müßte sich dann darin zeigen, daß die Assimilationsfähigkeit z. T. oder schließlich auch ganz durch die Verarbeitung organischer Stoffe ersetzt werden könnte, oder daß organische Stickstoffquellen besonders günstig wären. Um die Antwort vorweg zu nehmen, so wuchsen in allen meinen Hunderten von Kulturen mit organischen Stoffen die Blaualgen bestenfalls wenig besser, als in den günstigsten mineralischen Nährsalzlösungen. Eine sichere Vermehrung im Dunkeln konnte nie beobachtet werden. Neben der etwa auftretenden Förderung wurde auch auf die Schädigung durch organische Stoffe geachtet. Hier ist das Ergebnis dahin zusammenzufassen, daß gerade diejenigen Verbindungen, die als gute Nährstoffe für Pilze und Bakterien bekannt sind, nur in sehr geringer Konzentration vertragen werden.

Die Resultate der ausgeführten Kulturreihen will ich nach der chemischen Natur der organischen Verbindungen anordnen. Es sind organische Säuren, höhere Alkohole, Zuckerarten und organische Stickstoffverbindungen, wie Eiweißstoffe und deren Abbauprodukte verwendet worden.

A. Organische Säuren.

Von organischen Säuren ist es bekannt, daß sie gerade für chlorophyllführende Mikroorganismen zur Ernährung geeignet sind¹⁾. Wenn auch Zumsteins²⁾ Befunde von *Euglena gracilis* nach meinen Unter-

¹⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911. S. 36 f.

²⁾ Zumstein, Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 34, 1900.

E. G. Pringsheim, Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen, III. 82
 suchungen¹⁾ in der Beziehung etwas zweifelhaft geworden sind, so bleiben neben manchen anderen doch die Befunde von Treboux²⁾, dem es gelang, eine ganze Reihe von Formen sogar im Dunkeln mit organischen Säuren zu ernähren.

Hier seien zunächst die stiekstofffreien Verbindungen berücksichtigt, über Aminosäuren wird man weiter unten einiges finden.

Er wurde Essigsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Apfelsäure, Milehsäure, Bernsteinsäure, Buttersäure und Oxalsäure als Ammon- oder Calciumsalz in verschiedenen Konzentrationen geprüft.

Oscillaria tenuis wird durch zitronensaures Ammon etwas gefördert. Die anderen Säuren sind entweder indifferent oder bei höherer Konzentration schädlich.

Oscillaria brevis zeigt gleichfalls kaum eine ernährende Wirkung organischer Säuren. Nur bei Milchsäure war das Wachstum ein klein wenig besser als in anorganischer Lösung. Essigsäure ist schädlich, die anderen bei genügender Verdünnung unwirksam.

Nostoc spec. Keine Förderung durch irgend eine der organischen Säuren. Milehsäure und Essigsäure schädlich. (Vgl. Protokolle S. 92.)

B. Höhere Alkohole.

Aus der Alkoholreihe habe ich wegen der bekannten Giftwirkung der einwertigen Verbindungen nur die drei- und mehrwertigen geprüft. Die Verwendbarkeit, besonders des Glycerins und Mannits für die Ernährung von Mikroorganismen ist bekannt. Außerdem wurden Erythrit und Sorbit geprüft.

Im ganzen ist eine Förderung durch die organischen Stoffe auch hier kaum zu bemerken. Nur *Oscillaria tenuis* scheint durch Mannit und Sorbit etwas günstig beeinflusst zu werden, ohne daß das besonders deutlich wäre. Eine Verzögerung des Wachstums ist bei dem *Nostoc* zu erkennen, das sich aber schließlich noch erholt. Das Krieehen scheint bei *Oscillaria tenuis* durch Glycerin gehemmt zu werden. Auf eine Schädigung des Stoffwechsels darf daraus aber nicht geschlossen werden. (Vgl. Protokolle S. 95 ff.)

C. Kohlehydrate.

Mit den verschiedenen Zuckerarten, Pentosen, Hexosen, Disacchariden und Polysacchariden habe ich wegen deren ernährungsphysiologischer Bedeutung etwas mehr Versuche angestellt als mit den oben behandelten Stoffen.

¹⁾ Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. II. Mitt. *Euglena gracilis*. Diese Beiträge. Bd. XII, S. 38.

²⁾ O. Treboux, Organische Säuren als Kohlenstoffquelle bei Algen. Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 23. 1905, S. 432.

Zur Anwendung kamen:

Glukose, Fruktose, Galaktose, Arabinose, Saccharose, Milchzucker, Maltose, Inulin, Dextrin, Glykogen.

Monosaccharide: *Oscillaria tenuis* wird durch Glukose und Galaktose gefördert, durch die beiden anderen Monosaccharide nicht beeinflusst. *Oscillaria brevis* ist dankbar für Fruktose, Galaktose und Arabinose. Bei *Nostoc spec.* wird das Wachstum nach längerer Zeit durch Galaktose und Arabinose etwas verbessert, aber weniger als bei den Oscillarien. Eine Gesetzmäßigkeit in der Wirkung der geprüften Monosaccharide auf die Blaualgen ist also nicht zu erkennen.

Di- und Polysaccharide: *Oscillaria tenuis* und *brevis* werden durch diese Zuckerarten garnicht beeinflusst, scheinen sie auch nicht zu hydrolysieren. *Nostoc spec.* wird durch sehr geringe Konzentration von Rohrzucker, Malzzucker, Dextrin und Glykogen nach längerer Einwirkung vielleicht ein klein wenig gefördert. (Vergl. Protokolle S. 97 ff.)

D. Organische Stickstoffverbindungen.

Nachdem oben gezeigt worden ist, daß Blaualgen die verschiedenartigsten anorganischen Stickstoffverbindungen verwerten können, mußte gefragt werden, ob sie ihren Stickstoffbedarf auch aus organischen Stoffen zu entnehmen imstande sind, die ja in besonders hohem Maße von anderen Mikroorganismen verarbeitet werden. Bei der wiederholt ausgesprochenen Vermutung, daß Cyanophyceen geringe Mengen organischer Stoffe brauchen dürften¹⁾, wird man wohl vorwiegend an die Deckung des Stickstoffbedarfs gedacht haben. Abgesehen davon kommt dem Einfluß der organischen Stickstoffverbindungen auf das Wachstum der Blaualgen dasselbe Interesse zu, wie dem der anderen organischen Substanzen.

Eiweißstoffe. Geprüft wurden: Tropon, Heydennährstoff, Serumalbumin, Albumin aus Eiweiß, Kasein und Legumin. Alle verwendeten Blaualgen wuchsen in den meisten eiweißhaltigen Flüssigkeiten, in denen nach dem Kochen nur Spuren gelöst waren, recht gut und zeigten durch langandauernde, üppige Vermehrung die Ausnutzung dieser Substanzen als Stickstoffquellen. Auffallend war das Ausbleiben des Auseinanderkriechens besonders bei *Oscillaria tenuis* in diesen Lösungen, sowie in solchen mit Pepton. Während diese Art kaum einen Unterschied zwischen den gebotenen Substanzen machte, waren die anderen beiden wählerischer, worüber in der Besprechung der Protokolle nachzulesen ist.

¹⁾ Vgl. z. B. E. Küster, Kultur der Mikroorganismen, Berlin und Leipzig 1907 und das dortige Zitat über Schlössing und Laurent.

Eiweißabbauprodukte. *Oscillaria tenuis* verwertete Pepton und Asparagin sehr gut, während Leucin, Glycocoll und Acetamid als Stickstoffquellen ungeeignet waren. Bei *Oscillaria brevis* war das Ergebnis ähnlich, nur war hier auch Glycocoll gut. Der Nostoc vertrug nur niedere Konzentrationen, wuchs dann aber mit Pepton, Asparagin und Acetamid recht gut. Die ersten beiden Substanzen sind also für alle drei Arten günstig, Leucin für alle schlecht, während Glycocoll und Acetamid verschieden wirken. (Vgl. Protokolle S. 100 ff.)

Im ganzen ist also die Neigung der kultivierten Blaualgen organische Stoffe zu verarbeiten, gering. Einzig und allein die Monosaccharide zeigten teilweise eine günstige Wirkung, die vielleicht bei schwächerer Beleuchtung deutlicher geworden wäre. Bei einigermaßen gutem Lichte reicht aber offenbar die Assimilationsarbeit für annähernd optimales Wachstum aus. Dagegen sind die Cyanophyceen imstande, ihren Stickstoffbedarf aus den verschiedenartigsten organischen Verbindungen zu decken, ohne daß aber diesen ein Vorzug vor den anorganischen Stoffen eingeräumt wäre. Auch hierin zeigt sich schließlich die auffallende Indifferenz gegen organische Stoffe.

VIII. Dunkelkulturen.

Da es sich im Laufe der Untersuchungen immer mehr gezeigt hatte, wie wenig organische Stoffe die Entwicklung der Cyanophyceen fördern, so war die Aussicht gering, eine ganze heterotrophe Ernährung zu erzielen, d. h. die Blaualgen im Dunkeln zum Wachsen zu bringen.

Trotzdem mußte diese Frage angeschnitten werden. Das Ergebnis der Bemühungen war bei den reinkultivierten Arten gänzlich negativ. Damit ist natürlich für die große Masse der übrigen Spezies noch nichts entschieden. Wenn man z. B. sieht, wie *Nostoc punctiforme* in Gunnera-Rhizomen, die mit Erde bedeckt sind, gedeiht, so macht es fast den Eindruck, als läge hier eine vollkommene Heterotrophie vor.

Meine Versuche wurden zunächst mit Agarschrägröhren angestellt, wobei ich die Substrate bevorzugte, die besonders gutes Wachstum ergeben hatten, also vor allem Heyden- und Asparaginagar. Daneben wurden auch die anderen oben (S. 71.) angeführten Mischungen verwendet, soweit sie sich als nicht schädlich erwiesen hatten. Alle drei reinkultivierten Cyanophyceen breiteten sich darauf im Dunkeln aus und blieben wochenlang lebend, ohne sich aber zu entwickeln. Wenn man sie rechtzeitig ans Licht brachte, setzte die Vermehrung ein.

Etwas eingehender soll hier ein Versuch mit Flüssigkeitskulturen behandelt werden, bei dem eine Parallelreihe dem Lichte ausgesetzt wurde. Diese ist zugleich ein Beispiel für die Wirkung von Kohlehydraten bei gleichzeitiger Gabe organischer Stiekstoffquellen. Die Kombination wurde für die Dunkelkulturen gewählt, weil ich mir sagte, daß eine solche komplette organische Nährlösung, die auch den anspruchsvolleren unter den heterotrophen Bakterien und Pilzen alles Nötige geboten hätte, den günstigsten Fall für eine etwaige Vermehrung im Dunkeln darstelle. Das Versuchsobjekt war die *Oscillaria brevis*, die unter den zur Verfügung stehenden Blaualgen noch am meisten durch organische Stoffe gefördert wird. Unter diesen wurden wieder die günstigsten ausgesucht. Dementsprechend war auch ihr Wachstum im Hellen recht reichlich, besonders in Gegenwart von Pepton. Im Dunkeln breiteten sich die Oscillarien anfangs normal aus, blieben auch lange gut gefärbt, vermehrten sich aber nicht im geringsten! (Vgl. Protokolle S. 106.)

Nach diesem Ergebnis schienen weitere Versuche wenig aussichtsvoll; doch wurden noch einige gleichfalls negative Erfahrungen mit den anderen Cyanophyceen gesammelt, nach denen ich wohl im Recht bin, die ganz heterotrophe Ernährung für meine Blaualgen als unmöglich zu bezeichnen, denn es ist nicht wahrscheinlich, daß es organische Stoffe gibt, deren Ausnützung sehr viel günstiger ist. Soviel läßt sich schon aus den Lichtkulturen schließen. Ob bei anderen Arten ein Erfolg zu erzielen wäre, muß ich dahingestellt sein lassen. Bouilhae hat sich möglicherweise durch die Ausbreitung der Fäden oder durch eine Gewichtsvermehrung infolge von Bakterienwachstum täuschen lassen.

IX. Schluß.

Die meist rein physiologischen Gesichtspunkte dieser Arbeit und die geringe Anzahl der genauer untersuchten Arten machen ins Einzelne gehende ökologische Schlüsse vorläufig unmöglich. Immerhin dürfte mindestens die Grundlage für eine extensivere Forschungsweise gegeben sein. Diese wird dem Ideale zustreben müssen, die Lebensgewohnheiten der einzelnen Arten, d. h. also deren Standortverhältnisse, physiologisch zu deuten. Hierbei werden die Ernährungsverhältnisse im Vordergrund stehen müssen, aber auch die Bewegungserscheinungen und die Ansprüche an die physikalische Natur der Umgebung werden berücksichtigt werden müssen. Ich denke hierbei etwa an die Ersehung der Wasserblüte, bei deren Zustandekommen die physikalische und chemische Beschaffenheit der betreffenden Gewässer ausschlaggebend sein dürfte.

Bei den empfindlicheren Arten wird die Konzentration der Stickstoffquelle, die Azidität der Nährflüssigkeit, ihr Sauerstoffreichtum und anderes zu berücksichtigen sein.

Darf man aus den untersuchten Fällen, soweit sich die drei Arten gleich verhalten, allgemeine Schlüsse ziehen, so ist vor allem die vorwiegend autotrophe Ernährung der Blaualgen hervorzuheben. Diese haben zwar die Fähigkeit, organische Stickstoffquellen auszunutzen, erfahren durch sie aber eine ebensowenig in Betracht kommende Förderung wie durch andere organische Stoffe. Die wohl ziemlich verbreitete Ansicht, daß die Cyanophyceen vielfach mixotroph seien, dürfte auf zwei Ursachen zurückzuführen sein, einmal auf die Schwierigkeit, sie in den für höhere Pflanzen gebräuchlichen Nährlösungen zu kultivieren, andererseits auf das Vorkommen in verschmutzten Gewässern.

Die Unfähigkeit, in den Nährlösungen von Sachs, Pfeffer etc. zu wachsen, dürfte, wenn nicht deren saurerer Reaktion, so nach Beseitigung derselben gewissen häufigen Verunreinigungen durch Schwermetallspuren zuzuschreiben sein, gegen die die Cyanophyceen wie auch andere Algen äußerst empfindlich sind. Was das Vorkommen in verschmutzten Gewässern anbelangt, so ist dieses wohl nicht dem Nahrungsreichtum der betreffenden Orte, sondern im Gegenteil der Widerstandsfähigkeit der Oscillarien gegen Fäulnisstoffe, wie z. B. Schwefelwasserstoff, zuzuschreiben, sowie der Vorliebe für sauerstoffarme Standorte. Diejenigen organischen Substanzen, die als gute Nährstoffe für Pilze und Bakterien bekannt sind, werden in höherer Konzentration gefährlich, sind aber in Bruchteilen von Prozenten indifferent.

Der eigenartige „schlammige“ Geruch, der allen Fundorten von Oscillarien gemeinsam ist, kommt diesen letzteren selbst und allein zu. Er ist bei allen Oscillarien-Kulturen unverkennbar, fehlte aber den übrigen untersuchten Blaualgen.

Die Gestalt und Farbe der einzelnen Arten erweist sich in allen verschiedenen Nährlösungen als konstant, bis auf die bei der schließlichen Verarmung an Nahrungsstoffen eintretenden Veränderungen. Mit bloßem Auge erkennbar ist der Übergang der Tönung ins Gelbliche bis zu strohgelber oder rötlicher Verfärbung, wie das von Magnus und Schindler¹⁾ vor kurzem studiert worden ist. Ihre Angaben kann ich durchaus bestätigen. Nur scheint zuweilen die Einstellung des Wachstums nicht gleichzeitig mit der Gelbfärbung, sondern später zu erfolgen. Auch finden sich in der vorliegenden Arbeit Beispiele für die Förderung der Verfärbung durch gewisse organische

¹⁾ W. Magnus und B. Schindler, Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien. Ber. d. deutsch. bot. Gesellschaft 1912. Bd. 30, S. 314.

Stoffe. Aber das sind unwesentliche Zusätze zu den zweifellos richtigen Ergebnissen der genannten Autoren. Mannigfaltige Versuche mit Farbstofffiltern, auf deren Veröffentlichung ich nunmehr verzichte, ergaben nie eine mit der gewählten Beleuchtung komplementäre Färbung.

Neben der Verfärbung älterer Kulturen ist bei den Oscillarien oft ein Zerfall in kurze Stücke, bei dem Nostoc die bekannte Bildung von runden, sporenartigen Einzelzellen zu beobachten. In solchem Zustande bleibt aber die Algenmasse noch lange Zeit entwicklungsfähig.

X. Zusammenfassung.

1. Blaualgen können durch Plattenguß mit Salpeteragar speziesrein erhalten werden.

2. Sie von Bakterien zu befreien, gelingt bei beweglichen Formen durch fortgesetzte Weiterimpfung unter Verwendung von Kieselsäuregallerte; doch werden immer nur einzelne Fäden bakterienfrei, die durch Übertragen auf Agar mit organischen Stickstoffverbindungen herauszufinden sind.

3. Die Widerstandsfähigkeit gegen organische Stoffe ist sehr verschieden. Im allgemeinen schädigen höhere Konzentrationen. Sehr geringe werden ertragen, können z. T. auch schwach fördernd wirken. Das gilt besonders für die Zuckerarten.

4. Die Förderung durch organische Stoffe ist nie sehr deutlich und meist garnicht zu beobachten.

5. Die verschiedensten organischen Stickstoffverbindungen können verarbeitet werden, ohne aber den anorganischen wesentlich überlegen zu sein.

6. Rein autotrophe Ernährung gelingt mit Nitraten, Nitriten und Ammonsalzen bei schwachbasischer oder neutraler Reaktion.

7. Je nach der Ernährung ist der Habitus der Kulturen recht verschieden. Das Ausbleiben der Ausbreitung fällt nicht immer mit Vermehrungsunfähigkeit zusammen.

8. Heterotrophe Ernährung mit organischen Stoffen im Dunkeln ist nicht gelungen.

9. Verschiedenfarbiges Licht hat keinen Einfluß auf die Färbung der Blaualgen, die aber mit der Ernährung in bestimmter Weise wechseln kann.

Anhang.

Einige Protokolle und deren Besprechung.

Gang der Isolierungsversuche.

Da die Wiedergabe aller Anzeichnungen über meine Versuche mit den verschiedenen Blaualgen zu viel Raum beanspruchen würde, will ich im folgenden nur kurz den Gang der Kulturen an den bakterienfrei gewonnenen Arten wiedergeben.

a. *Oscillaria tenuis*.

Diese kräftig blaugrüne Form wurde in meinen Protokollen zunächst als *Oscillaria IV* gekennzeichnet. Sie trat zuerst im Frühling 1911 in einer alten abgeblühten Algenkultur auf, und zwar in Gestalt feiner Schleier, die sich zuweilen zu schlauchartigen Gebilden zusammenwickelten. Die Fäden waren recht dünn. Da die Bestimmung der Arten nur an den in Reinkultur gewonnenen Formen und deshalb viel später geschah, mögen diese Angaben für die Kennzeichnung hier genügen.

Am 22. Mai 1911 wurde in eine Lösung geimpft, die aus einer Spur Ammoniummagnesiumphosphat in Leitungswasser bestand. Es bildete sich bald ein zartes Netz von hellblaugrüner Farbe am Grunde des Gefäßes, das wenig am Glase in die Höhe kroch, sich aber bald vom Boden erhob und am 26. Mai einen feinen Schleier an der Oberfläche bildete. Am 3. Oktober reichlich, teils blaugrün, teils braun, Haut durch Blasen aufgetrieben.

Am 10. Juni wurde 1. in ziemlich konzentrierte Erdbkochung von brauner Farbe, 2. in dieselbe bis zu weingelber Farbe verdünnt, 3. in die verdünnte Lösung + 0,1% KNO_3 geimpft. Am 24. Juni zeigt 1. eine wenig ausgebreitete, kräftig blaugrüne Masse am Rande des Flüssigkeitsspiegels, 2. ist ähnlich, aber mehr ausgebreitet, noch üppiger, und 3. ebenso.

Am 27. Juni aus der Kultur mit verdünntem Erdeauszug vom 10. Juni

1. in dieselbe Flüssigkeit,

2. in eine Lösung von 0,2% KNO_3 , 0,025% MgSO_4 und 0,025% K_2HPO_4 , zu der eine Spur gefällter Humussäure¹⁾ getan wurde. Es löst sich in der schwach alkalischen Lösung nur sehr wenig.

Am 3. Juli in 1. sehr gutes Wachstum wie früher, in 2. feines Netz am Boden, dauernd sauber aussehend.

Von 2. am 14. Juli 1911 auf einen Gipsblock von der oben (S. 53) beschriebenen Form geimpft, der in einer Deckelschale sich befindet und mit einer Lösung getränkt ist, die aus verdünntem Erdeauszug + 0,1% KNO_3 + 0,025% MgSO_4 + 0,025% K_2HPO_4 besteht.

Die *Oscillarien* haben sich am 24. Juli schön ausgebreitet und bilden auf der Oberfläche des Gipses die bezeichnenden Wirbel, doch machen sich noch kleine Grünalgen (*Scenedesmus*) bemerkbar. Nur auf einer Seite rein blaugrün, wodurch es aber gelingt, die Art speciesrein zu bekommen.

¹⁾ Dargestellt durch Ausziehen von Gartenerde mit Ammoniak und Fällen der gelösten Humussäure mit Salzsäure, sowie sorgfältiges Auswaschen.

Hiervon am 5. Oktober in Erdbkochung + KNO_3 usw. wie oben und daraus am 28. Oktober 1911 Material für das Gießen von Petrischalen entnommen. Es wurde gewässerter Agar mit 0,1% KNO_3 , 0,025% MgSO_4 und 0,025% K_2HPO_4 verwendet.

Darin sind am 5. Dezember die Oscillarien gut gewachsen. Erst zeigen sich kleine blaugrüne Fleckchen, bald aber breiten sich die Blaualgen über die ganze Platte aus. Zwischen den Oscillarien zahlreiche sehr klein bleibende Bakterienkolonien. Es wurde nun dieses Plattengießen mit demselben Ergebnis öfters wiederholt, indem jedesmal wenig Oscillarienmaterial von den reinsten Agarstellen entnommen wurde. Immer aber traten doch wieder Bakterien dazwischen auf. Dabei zeigte sich, daß ungewässerter Agar die Oscillarien, freilich auch die Bakterien besser ernährte als der gewässerte.

Am 25. Januar 1912 war doch ein gewisses Zurückdrängen der Bakterien erzielt, fremde Algen und Pilze waren nicht mehr zu fürchten. Es wurde deshalb Impfung auf die Oberfläche der erstarrten Agarmasse gewagt, und zwar wurde ungewässerter Agar mit Kalisalpeter und den anderen Nährsalzen verwendet. Anfangs zeigten sich um die Impfmasse Bakterien, aus denen sich aber die strahlig nach außen kriechenden Oscillarien bald befreiten. Am 22. April 1912 war eine üppige Schicht von Oscillarien herangewachsen. Da diese schön rein aussah, wurde am nächsten Tage (23. April 1912) in Reagensgläser mit schrägerstartem Agar geimpft, und zwar

1. Agar mit 0,5% Pepton,
2. Agar mit Erdeauszug und Kalisalpeter.

Am nächsten Tage zeigen beide den Beginn der Ausbreitung, am 25. April ist auf Peptonagar Bakterienwachstum zu bemerken, aber die Oscillarienfäden sind schon weit von der Impfstelle. Auf Erdeauszugagar sieht die weit ausgebreitete Algenmasse hübsch sauber aus. Aber weder die Abimpfungen von den scheinbar bakterienfreien Fäden von Peptonagar noch die von dem zweiten Röhrechen erweisen sich auf Peptonagar als rein.

Nun wurde die Kieselgallerte herangezogen, über deren Herstellung oben berichtet wurde (vgl. S. 55.) Die in Leitungswasser gut gewässerten Gallertschichten in den Petrischalen wurden für drei Stunden mit folgenden Lösungen überschichtet:

1. 0,1% KNO_3 + 0,025% MgSO_4 + 0,025% K_2HPO_4 ,
2. ebenso, dazu Erdeauszug.

Hierauf wurden die Lösungen abgegossen. Die Gallerte bei 1. deutlich bräunlich. Sterilisiert im Autoclaven bei 2 Atmosphären. Dadurch die Schicht etwas zerrissen und blasig. Viel Kondenswasser. Den nächsten Tag Impfung, und zwar am 21. Mai 1912 aus dem Röhrechen mit Erdeauszug + KNO_3 -Agar vom 23. April.

Am 22. Mai in beiden Schalen starke Ausbreitung, einzelne Fäden schon viel umhergekrochen. Man sieht ihre Spuren (vgl. S. 58). Dem guten Kriechvermögen dieser Art auf Kieselgallerte habe ich es zu verdanken, daß sie als erste rein kultiviert werden konnte.

Am 30. Mai ist die Oscillaria IV in 1. Sehr üppig und schön ausgebreitet, keine Pilze, Bakterien nicht zu sehen. 2. Weniger gut, aber auch ganz schön, Pilze, die zwar nicht stark wachsen, aber doch eine reine Abimpfung unmöglich machen. Später überwuchern die Oscillarien die Pilze, und am 21. Juni ist diese Schale noch üppiger als die ohne Erdeauszug, allerdings fangen die Oscillarien nun an einer Seite an gelblich zu werden.

Von der Schale 1. vom 21. Mai wurde am 28. Mai 1912 ein Stückchen Gallerte vom Rande mit wenig Fäden in ein Röhrechen mit schräg erstarrtem Heydenagar¹⁾ übertragen. Am 21. Juni ziemlich viel hell aussehende Oscillarienfäden über die Oberfläche ausgebreitet, die frei von Bakterien ist und bleibt.

Hiermit ist die erste sichere Reinkultur von Blaualgen gewonnen.

Die Kultur wird später recht üppig und nimmt schöne spaugrüne Farbe an. Alle späteren Abimpfungen bleiben bakterienfrei.

¹⁾ Dieser für Wasserbakterien empfohlene Nährboden wurde durch Kochen von 0,8% Heyden-Nährstoff mit 2% Agar-Agar im Autoclaven und Filtrieren gewonnen.

Ähnlich verliefen die Versuche mit den anderen in Kultur genommenen Arten, von denen aber nur fünf bis zur Impfung auf Kieselgallerte beibehalten und noch zwei in Reinkultur gewonnen wurden. Es kann hier natürlich nur eine kleine Auswahl aus der sehr großen Zahl von Versuchen mit den verschiedensten Nährböden und Lösungen geschildert werden.

b. *Oscillaria brevis*.

Als zweite wurde in Reinkultur gewonnen die *Oscillaria* X, eine dunkelgraugrüne Art mit etwas dickeren Fäden als die von IV. Sie stammte aus einem Jaucheabfluß, durfte also als Schmutzform für Ernährungs-Versuche mit organischen Stoffen als besonders geeignet gehalten werden.

Die erste Kultur vom Ursprungsmaterial wurde am 12. September 1911 in einem Kölbehen mit Erdeauszug und Kalisalpeter angelegt. Von dem am Glase in die Höhe kriechenden Fäden, die, wie es schien, nur einer Art angehörten, wurde am 27. Oktober 1911 eine Platte in gewässertem KNO_3 -Agar angelegt. Am 5. Dezember zeigte sie sich gut ausgebreitet, aber nicht sehr üppig gewachsen, wohl wegen des schlechten Lichtes. Am 8. Januar 1912 war die Kultur immerhin ganz gut, fremde Algen und Pilze zeigten sich nicht, die Bakterienkolonien blieben klein. Mit Material aus dieser Schale wurde am 21. November 1911 eine weitere Platte mit ungewässertem KNO_3 -Agar gegossen, die am 27. Januar nicht sehr viel, aber weit ausgebreitete Fäden neben wenig Pilzen und Bakterien zeigte. Am 22. April 1912 war diese Schale sehr üppig, tiefgraugrün, mit seidenartigem Glanz der dichtverflochtenen Oscillarienfäden.

Aus der Schale vom 27. Oktober wurde über mehrere Zwischenstufen schließlich am 23. Februar 1912 auch eine Impfung auf die Oberfläche von erstarrtem gewässertem KNO_3 -Agar in der Petrischale angelegt. Am 22. April 1912 sah diese Schale sehr günstig aus, üppig gewachsen, ohne mit bloßem Auge sichtbare Bakterien bis auf die Umgebung der Impfstelle.

Eine Impfung hieraus in ein Reagensglas mit schräg erstarrtem Peptonagar vom 23. April 1912 zeigte am nächsten Tage den Beginn der Ausbreitung, am 25. zwar Bakterien an der Impfstelle, aber weit ausgebreitete Fäden über den ganzen Agar. Noch besser war das Wachstum in einem Schrögröhren mit Erdbkochung + KNO_3 -Agar vom selben Tage. Impfungen aus diesen beiden Röhren von möglichst vom Impffleck entfernten Stellen im Peptonagar ergaben immer wieder Bakterienwachstum, eine Erfahrung, die an scheinbar reinen Kulturen sehr oft gemacht wurde. Auf diese Weise kommt man eben nicht zum Ziele.

Am 21. Mai 1912 wurde nun von dem zweiten Röhren vom 23. April (mit Erdbk. + KNO_3 -Ag.) auf Kieselgallerte mit Kalisalpeter mit und ohne Erdeauszug geimpft. Am 22. Mai waren auf beiden Platten Fäden herausgekrochen, die sich aber als in lauter kurze Stücke zerbrochen erwiesen. Am 30. Mai waren beide Schalen sehr schön, um die Impfstelle herum hatten sich die *Oscillarien* in Form kreisrunder tiefgraugrüner Flecke ausgebreitet. Sie bildeten keine langen Fäden, die durch ihre Schlingen und Biegungen nie eine so regelmäßige Ausbreitung erlaubt haben würden, sondern waren in kurze Stücke zerfallen, was wohl mit der größeren Dicke dieser Art gegenüber *Oscill.* IV zusammenhängt. Durch die größere Dicke wird der Widerstand beim Gleiten erhöht, dadurch das Abknicken der durch interkalares Wachstum sich verlängernden Fäden bewirkt und so die Ausbreitung verzögert, sowie das weite Kriechen einzelner langer Fäden verhindert. Für die angegebene Deutung der Zusammenhänge spricht die Erfahrung, daß mehrere verhältnismäßig dicke Arten sich im Gegensatz zu den dünnen übereinstimmend so verhielten.

Leider wurde durch diese Eigenheit auch die Reinkultur erschwert. Denn einzelne, sich in noch unbesiedelten Gebiete relativ schnell vorwärts schiebende Fäden streifen leichter die Bakterien ab als kurze dichtgelagerte *Oscillarien*stücke, zwischen denen durch Absterben von Zellen und wohl auch die Ausscheidung organischer Stoffe der Nährboden für das Bakterienwachstum vorbereitet wird. Dieser Umstand machte den Weg bis zur Erreichung der Reinkultur hier etwas länger.

Um nun zu den Kulturen auf Kieselgallerte mit Erdbkochung und ohne solche vom 21. Mai zurückzukommen, so entwickelte sich die erstere etwas

üppiger. Die kreisförmige Kolonie war etwas dichter besiedelt und hatte trotzdem nach 9 Tagen einen größeren Durchmesser von fast 3 cm gegenüber etwa 2 cm ohne Erdauszug. Diese Förderung durch die Humusstoffe war nicht bei allen Cyanophyceen auf Kieselgallerte zu bemerken. Da außerdem Bakterien und Pilze dadurch gefördert wurden, ward sie später als überflüssig fortgelassen.

Von nun an wird die Geschichte der Reinkultur von *Oscillaria* X etwas verwirrt, da vielfach hin- und herprobiert wurde, auch mehrere, teilweise nicht zum Ziele führende Impfreihen nebeneinander hergeführt wurden. Hier soll nur ganz kurz der Gang der schließlich erfolgreichen Kulturserie wiedergegeben werden.

Am 3. Juni 1912 wurde aus der Schale mit Kieselgallerte + Erdauszug + KNO_3 vom 21. Mai auf die Oberfläche von Asparaginagar (Agar 2%, Asparagin 0,025%, MgSO_4 0,01%, K_2HPO_4 0,01%) übertragen, der in der Petri-schale erstarrt war. Am 8. Juni zeigten sich um die Impfstelle Bakterienmassen, aus denen sich aber die Oscillarien später befreiten. Am 21. Juni waren viele Fäden über die ganze Agarmasse ausgebreitet, die sie freilich nicht sehr dicht bedeckten. In der Mitte, wo geimpft worden war, Bakterien, sonst rein ansiehend. Viel längere Fäden als auf den Kieselplatten. Diese Kultur ist am 22. Juli recht üppig, schön olivgrün, seidig, nach den Rändern der Schale hin sind die Fäden radiär angeordnet, eine Beobachtung, die bei dieser Oscillarie gerade beim Wachstum auf Asparaginagar wiederholt gemacht wurde.

Aus dieser Asparaginschale wurde am 21. Juni in ein Heydenagar-Schrägröhrechen übertragen, in dem am 3. Juli sich nur Fäden an der von Agar freien Glaswand befinden, wo sich Wassertröpfchen niedergeschlagen haben. Die Kultur ist noch nicht rein. Offenbar haben die Bakterien auf dem Agar Stoffwechselprodukte gebildet, gegen die die Oscillarien negativ chemotaktisch reagieren. Auch diese Beobachtung wurde in ähnlicher Form wiederholt gemacht. Nachdem am 15. und 22. Juli in derselben Weise aus einem Heyden-Röhrechen ins andere übertragen worden war, erwies sich die Kultur in dem letzten am 28. Juni als rein. Sie zeigte schön auseinanderstrahlende Fäden von graugrüner Farbe auf dem Agar; Bakterien waren nicht mehr zu sehen und blieben auch in der Folge aus. So war also auf einem etwas umständlicheren Wege auch *Oscillaria brevis* in Reinkultur gewonnen. Das Wachstum dieser Art auf Agar mit organischen Stoffen war freilich zunächst im allgemeinen nicht sehr günstig. Genügend Material für die Impfung größerer Versuchsserien wurde daher erst aus Flüssigkeitskulturen mit organischen Stoffen gewonnen. Darüber später.

c. *Nostoc spec.*

Wir kämen nun zu der dritten Cyanophyceenart, die noch größere Schwierigkeiten bereitete. Es war ein schön blaugrüner *Nostoc* mit frei kriechenden Fäden und wenig Gallertabscheidung. Er trat im Frühjahr 1911 in einer Kultur auf, die Erde und Gips in Leitungswasser enthielt.*

Auch hier will ich nur die Reihe von Impfungen angeben, die sich von der schließlich erzielten Reinkultur rückwärts verfolgen läßt, wenn ich in meinen Protokollen stufenweise immer die Mutterkultur jeder folgenden aufsuche und alle nicht zum Ziele führenden, weit zahlreicheren Versuche fortlasse. Man wird gerade aus dieser Art der Darstellung ersehen, daß hier ein planmäßiges Vorgehen besonders erschwert war, weil das Kriechvermögen dieser Form gegenüber den Oscillarien geringer ist, Plattengüsse nicht zum Ziele führen und außerdem organische Stoffe besonders stark hemmen.

Nachdem der *Nostoc* im Frühjahr 1911 mehrmals in Erdbkochung mit Salpeter ungeimpft worden war, wurden am 7. Juli und hiervon am 17. Oktober Platten mit gewässertem KNO_3 -Agar gegossen. Das Wachstum war darin sehr gut, auch waren fremde Algen und Pilze nicht mehr zugegen. Auf dem Agar bildete der *Nostoc* zahlreiche Wirbel und Schleifen, sodaß der Habitus bei Betrachtung mit bloßem Auge oder schwacher Vergrößerung dem der Oscillarien gleich. Die sehr üppige Schale vom 17. Oktober 1911 zeigte am 8. Januar 1912 bei Betrachtung mit Leitz Obj. 4, Comp. Ok. 12 (Vergröß. 304) ganz wenig winzige Bakterienkolonien, dagegen zahlreiche Amöbenzysten. Manche Zellreihen waren

entfärbt und tot, andere in Dauerzellen zerfallen, die etwas größer und dickwandiger als die vegetativen sind.

Hiervon war am 23. November 1911 auf die Oberfläche von erstarrtem gew. KNO_3 -Agar geimpft worden. Am 8. Januar 1912 waren die Fäden deutlich phototropisch annähernd gradlinig dem Fenster zugewachsen, was ich bei den Oscillarien nie bemerkt habe, die in gallertigen Nährböden gar keine Lichtreizbarkeit verraten, in Flüssigkeiten nur phototaktisch sich an der Fensterseite ansammeln. Der Phototropismus dieser Nostocart ist mir schon früher aufgefallen und wurde photographisch festgehalten¹⁾. Leider zeigte diese Schale mit Oberflächenimpfung ziemlich viel Bakterien und Amöben. Von einer verhältnismäßig reinen Stelle wurde am 8. Januar in ein Schrägröhrchen mit gewässertem KNO_3 -Agar und daraus am 28. Februar in ein gleiches geimpft. Dieses sah auch mikroskopisch am 22. April rein aus und zeigte sehr gutes Wachstum. Durch die Zwischenstufe einer weiteren Oberflächenimpfung auf gew. KNO_3 -Agar wurde am 21. Mai 1912: 1. auf Kieselgallerte mit KNO_3 und Nährsalzen und 2. auf ebensolche, die daneben noch Erdauszug enthielt, geimpft. Am 22. Mai zeigte 1. schon ganz gute Ausbreitung, die bei 2. viel geringer war, hier waren nur einzelne Fäden aus dem Impfkümpchen herausgekrochen. Am 30. Mai war 1. sehr fein ausgebreitet, die Fäden lang, gesund und rein. 2. war viel dichter, weniger auseinandergekrochen, sonst ähnlich. Über eine weitere Salpeter-Kieselgallertschale wurde aus 1. am 27. Juni in ein Schrägröhrchen mit Erdauszug + KNO_3 -Agar übertragen. Hiermit war, wie eine Abimpfung vom 29. Juli auf 0,2prozentigen Heydenagar zeigte, die Reinkultur erreicht. Am 28. August war dieses Schrägröhrchen nicht sehr üppig, aber der Nostoc bildete viele, rein und gesund aussehende Fäden und Schleifen von schön blaugrüner Farbe. Das Wachstum war auf Agar mit organischen Stickstoffverbindungen immer langsam. Die Alge degenerierte dabei in Gegenwart von Bakterien leicht, sodaß Abimpfungen erfolglos blieben. So ging es mit zahlreichen, zwischen den angeführten unternommenen Kulturen. Es läßt sich deshalb auch nicht genau sagen, auf welcher Stufe die Bakterien ausgeblieben waren. Mir war natürlich das Hauptergebnis wichtiger. Nachdem einmal die Reinkultur erzielt war, konnte sie durch Kultur in Flüssigkeiten oder sicherer auf Heydenagar bequem rein erhalten und vermehrt werden.

Kulturen mit organischen Stoffen.

A. Organische Säuren.

Die organischen Säuren, die durchweg von Merck stammten, wurden zunächst auf einhalbnormale Kalilauge eingestellt, wozu Rosolsäure als Indikator diente, und dann mit Ammoniak möglichst wenig überneutralisiert. Die Neutralität wurde durch längeres Kochen zum Verjagen etwa überschüssigen Ammoniaks noch besonders gesichert und mit einem Indikator (Rosolsäure oder Nilblau)²⁾ nachgeprüft. Für die Nährlösungen wurden diese Lösungen auf das Hundertfache verdünnt.

Oscillaria tenuis.

I.

9. Juli 1912:

1. $\frac{n}{200}$ essigsäures Ammon³⁾,
2. $\frac{n}{200}$ weinsäures Ammon,

¹⁾ Vgl. E. Pringsheim, Die Reizbewegungen der Pflanzen. Berlin 1912, Abb. 67, S. 198.

²⁾ Nilblau ist besonders geeignet. Es zeigt die Neutralität durch eine lila Zwischenfarbe an.

³⁾ Abgekürzter Ausdruck, wohl ohne weiteres verständlich.

3. $\frac{n}{200}$ zitronensaures Ammon.

4. $\frac{n}{200}$ apfelsaures Ammon.

Überall 0,1% MgSO₄, 0,1% KH₂PO₄ und eine Spur CaCO₃.

Nur bei 3. trat gute Entwicklung ein. In 1. u. 2. starben die Oscillarien ab. In 4. wurde ein dünnes Netz gebildet. Auch nachdem die Flüssigkeiten auf das Fünffache verdünnt worden waren, um etwaige Schädigungen durch zu hohe Konzentration auszuschalten, trat in essigsauerm Ammon keine Entwicklung ein und blieb diese in weinsauerm und apfelsauerm Ammon sehr mäßig.

II.

28. Juli 1912:

1. Milchsäure, Calciumsalz, löslich, neutral, 0,05%.

2. Bernsteinsäure, Calciumsalz, schwer löslich, neutral, 0,05%.

3. Essigsäure, Ca-Salz, löslich, alkalisch gegen Lakmus, neutral gegen Cureuma, 0,05%.

4. Apfelsäure, Calciumbimalicum, löslich, sauer, mit CaCO₃ neutralisiert, 0,05%.

5. Buttersäure, 2 Tropfen auf 100 ccm, mit CaCO₃ neutralisiert.

6. Ohne organische Säure.

Dazu überall 0,1% Ammoniumnitrat, 0,02% Magnesiumsulfat, 0,02% primäres Kaliumphosphat in Leitungswasser. Alles neutral, starker Niederschlag. Impfung aus Heydenagarröhrchen vom 26. Juni.

Ergebnis am 12. August:

Überall lebend, aber kein Wachstum.

14. August:

Nun die Flüssigkeit klar abgegossen und mit doppelt destill. Wasser auf Fünffache verdünnt. Nach dem Sterilisieren frisch beimpft.

21. August:

1. u. 2. Nicht ausgebreitet, aber gut gefärbt. 3. Ein Teil der Fäden herausgekrochen. 4.—6. Wie 1.

24. August:

1. Unverändert. 2. Impfklümpchen durch kleines Netz am Glase befestigt. 3. Mehr ausgebreitet. 4.—6. Wie 1.

28. August:

1. Unverändert. 2. Hübsches Netz. 3. Noch besser. 4.—6. Wie 1.

3. September:

1. Ohne Entwicklung, aber z. T. lebend. 2. Wenig ausgebreitet, aber etwas gewachsen. 3. Feines Netz, an allen Wänden verbreitet. 4. Wie 1., aber besser gefärbt. 5. Kleiner Klumpen, Oscill. wohl etwas vermehrt, aber wenig strahlend. 6. Ähnlich, aber mehr.

Man ersieht aus diesen Versuchen, daß organische Säuren auch bei neutraler Reaktion und geringer Konzentration die *Oscillaria tenuis* zum größten Teil hemmen oder doch nicht fördern. Nur für die Zitronensäure gilt das nicht. Sie verbessert die Entwicklung.

Oscillaria brevis.

I.

14. August 1912:

Versuch mit Calciumsalzen wie der obige mit *Osc. tenuis* vom selben Tage, d. h. je 50 ccm der verdünnten Lösungen beimpft aus Heydenagarröhre vom 27. Juli.

Ergebnis am 21. August:

Überall Fäden auseinandergetrochen, an der Fensterseite einen dünnen Schleier bildend.

24. August:

In allen Kölbchen die Oscillarien gauz fein auseinander gekrochen.

18. August:

1. Sehr gut, Netz und Haut. 2.—6. Ähnlich, etwas weniger.

3. September:

1.—3. Haut und am Glase in die Höhe gekrochen, am Boden wenig. 4—6. Ähnlich, etwas weniger.

Oscillaria brevis verträgt also die organischen Säuren besser als die vorbehandelte Art und wird durch Milchsäure in dieser Form etwas gefördert. Gleichzeitig wird dadurch gezeigt, daß die Lösungen nicht irgend eine für Oscillarien überhaupt ungünstige Beschaffenheit hatten. Das ist deshalb wertvoll, weil die mehr physikalischen Eigenschaften, wie Konzentration, Neutralität und dergleichen so stark auf die Blaualgen einwirken, daß sie den Einfluß der organischen Stoffe unter Umständen verdecken können. Das gilt natürlich besonders für diese erst künstlich neutral gemachten Substanzen, erschwerte aber besonders in den ersten Versuchen die Schlußfolgerungen überhaupt sehr. Leider ist hier auch noch kein Eisen zugefügt worden, wie das später immer geschah, doch dürfte in dem Leitungswasser, das Eisenbakterien führt, genug davon vorhanden gewesen sein.

II.

7. September 1912:

Die Lösungen wurden hergestellt, wie oben beschrieben, mit Ammoniak neutralisiert und mit Nilblau auf die Reaktion nachgeprüft. Auf diesen Versuch ist mehr als auf die früheren zu geben, weil bei seiner besonders vorsichtigen Anstellung schon die früheren Erfahrungen benutzt und auch zwei verschiedene Konzentrationen angewendet wurden.

	a.	b.
1. Essigsäures Ammon	n/200	n/1000
2. Weinsäures	=	=
3. Apfelsäures	=	=
4. Zitronensäures	=	=
5. Oxalsäures	=	=
6. Buttersäures	=	=
7. Milchsäures	=	=
8. Ohne Säure, mit NH_4MgPO_4 .		

Überall 0,01% MgSO_4 , 0,01% KH_2PO_4 und Spur FeSO_4 in doppelt destill. Wasser. *Oscillaria brevis* geimpft aus einer üppigen Flüssigkeitskultur mit Zucker vom 14. August 1912.

Ergebnis am 16. September:

1a. u. b. Tot. 2a. Gut strahlend. 2b. Gut gewachsen auf der Fensterseite. 3a. Etwas mehr strahlend als 2a. 3b. Gut, aber nicht ganz so wie 2b. 4a. Gut strahlend. 4b. Etwas mehr gewachsen. 5a. Sehr gut. 5b. Etwas weniger. 6a. u. b. Ausgebreitet, aber nicht viel gewachsen. 7a. u. b. Ähnlich, aber mehr, besonders bei b. 8. Gut, etwa wie 1b., die beste der anderen Kulturen.

22. September:

Überall Wachstum, außer bei Essigsäure, aber nirgends besser als ohne organische Säure. In Zitronensäure die Oscillarien recht gelblich, in Buttersäure bei der höheren Konzentration gauz hell, wohl krank.

1. Oktober:

1 a. Sehr schön, lange Fäden, tief graugrün. 1 b. Auch viel gewachsen, aber gelb. 3 a. Wenig. 3 b. Etwas mehr, gut am Raude. 4 a. Ähnlich, gelblich, nicht gut weiter entwickelt. 4 b. Ganz gelb, Entwicklung steht still. 5 a. u. b. Ziemlich viel, besonders a., aber hell. 6 a. u. b. Sehr wenig, ganz hell. 7 a. Schlecht. 7 b. Viel, aber gelb. 8. Ebenso. Alle weisen bei Prüfung mit Nilblau als Indikator schwach saure Reaktion auf. Es wird also, falls überhaupt, weniger Säure verarbeitet, als dem verbrauchten Ammon entspricht.

Auch hier sieht man also, daß *Oscillaria brevis* die organischen Säuren, abgesehen von der Essigsäure und vielleicht der Buttersäure, bei großer Verdünnung recht gut verträgt, ohne durch sie aber im Wachstum merklich gefördert zu werden. Die höheren Konzentrationen, die doch noch sehr gering sind, erweisen sich fast überall schon als schädigend. Möglicherweise könnte freilich bei noch stärkerer Verdünnung eine günstigere Wirkung auftreten, doch ist die Hoffnung darauf wohl nicht groß, da dann die absolute Menge selbst bei größerem Flüssigkeitsvolumen zu gering würde.

Nostoc spec.

7. September 1912:

Der Versuch wurde genau so angesetzt wie der letztbeschriebene vom selben Tage mit *Oscillaria brevis*. Geimpft wurde aus einer Heydenagar-röhre vom 29. Juli.

Ergebnis am 16. September:

1 a. u. b. Tot. 2 a. Strahlend mit phototropischer Richtung der Fäden. Diese aber am Ende entfärbt, 2 b. Ähnlich, etwas besser. 3 a. Klümpchen ohne Ausbreitung, aber gut gefärbt. 3 b. Gut strahlend und phototropisch. 4 a. u. b. Verschiedene nicht festgeheftete Klümpchen von guter Farbe. 5 a u. b. Etwas ausgebreitet. 6 a. u. b. Ebenso. 7 a. Tot. 7 b. u. 8. Etwas strahlend, phototropisch, gut.

22. September:

Bei den noch lebenden überall Wachstum, aber nirgends besser als ohne Säure.

28. September:

Alle einander ähnlich, die Kulturen mit Säuren meist schlechter als ohne diese, nur 7 b ebensgut wie 8.

22. Oktober:

2 a. Ganz gut, teils nestartig verflochtene, teils phototropische Fäden. 2 b. Ebenfalls leidlich. 3 a. Klümpchen. 3 b. Viel fein verteilte Fäden am Boden. 4 a. u. b. Gesund aussehend, Klümpchen und Fäden. 5 a. Gut, schön blaugrün, viel Fäden am Boden. 5 b. Sehr wenig. 6 a. Wenig, schlecht. 6 b. Viele, aber nicht gut aussehende Fäden. 7 b. Gelblich, nicht gut. 8. Viel, aber gelblich.

Es bestätigt sich also auch an dem *Nostoc*, daß die organischen Säuren bestenfalls das Wachstum nicht hemmen, vielfach aber, und besonders bei den höheren der verwendeten Konzentrationen, schädlich sind. Dies gilt z. B. für Essigsäure und Milchsäure, während Apfelsäure ziemlich indifferent ist.

B. Höhere Alkohole.

Das Glycerin wurde vor dem Abwägen im Exsikkator getrocknet, die anderen Substanzen im kristallisierten Zustande von Merck bezogen.

Nachdem ein Vorversuch mit bakterienhaltigen Kulturen von *Oscillaria* I die Unschädlichkeit von Mannit in der Konzentration von 0,05, 0,1 und 0,05% neben KNO_3 als Stickstoffquelle gezeigt hatte, wurde eine Kulturreihe mit allen drei in Reinkultur gewonnenen Arten angesetzt;

6. September 1912:

	a.	b.
1. Glycerin	0,2%	0,05%
2. Erythrit	=	=
3. Mannit	=	=
4. Sorbit	=	=
5. Ohne Alkohol.		

Dazu überall kleine Menge NH_4MgPO_4 , Spur CaSO_4 und $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$, sowie 0,01% K_2SO_4 zu je 25 ccm in dopp. dest. Wasser, 3 mal im Dampfopf sterilisiert.

Oscill. tenuis und *brevis* geimpft aus üppigen Zuckerkulturen vom 14. August, *Nostoc* aus Heydenagarröhre vom 29. Juli 1912. Impfung um 2^h.

Um 5^h bei den *Oscillarien* schon Auseinanderkriechen deutlich, und zwar: *Oscillaria tenuis*: 1a. Ganz wenig strahlend. 1b. Etwas mehr. 2a. u. b. 3a. u. b. Völlig auseinandergetrochen. 4a. Schön strahlig ausgebreitet. 4b. u. 5. wie 1a.

Oscillaria brevis: 1a. u. b. Schön strahlend. 2a. Mehr auseinander. 2b. Ganz weit auseinandergetrochen. 3a. bis 5. Schön weit strahlend.

Ergebnis am 16. September:

Oscillaria tenuis: 1a. Wenig strahlend, aber sehr dicht, gut vermehrt. 1b. Ganz ausgebreitet, Netz mit Strängen. 2a. u. b. Ganz feine ausgespannte Netze, nicht sehr viel. 3a. u. b., 4a. Verhältnismäßig üppige ausgespannte Netze. 4b. u. 5. Weniger ausgebreitet, aber gut.

Oscillaria brevis: 1a. bis 2b. Sehr gut ausgebreitet, hübsche Haut. Erythrit etwas besser als Glycerin. 3a. bis 5. Noch etwas besser.

Im ganzen sind die Unterschiede hier sehr gering. Glycerin und Erythrit scheinen bei 0,2% etwas zu hemmen, die übrigen ohne Wirkung.

Nostoc spec. zeigt noch keine Veränderung des gut gefärbten Impfklümpchens.

22. September:

Oscillaria tenuis: 1a. Weiter wie früher. 1b. Zusammengekrochen¹⁾. 2a. und besonders b. enthalten sehr hübsche Netze. 3a., 3b. u. 4a. Sehr gut, üppig, schön blaugrün. 4b. u. 5. Gut, aber nicht wie die besten, Klümpchen und Netz.

Oscillaria brevis: Alle Kulturen gut gewachsen, sehr üppig. Farbe nicht überall ganz gleich. 1a. u. b., 2b. u. 3b. Schön graugrün. 2a., 3a., 4a. u. b., sowie 5. Mehr gelblich, besonders 4b. Was diese Farbdifferenzen bedeuten, läßt sich schwer sagen²⁾. Vielleicht war nur die Menge des Ammoniummagnesiumphosphates nicht ganz gleich, sodaß es in manchen Kulturen bei der üppigen Entwicklung schon an Stickstoff zu mangeln begann.

Nostoc spec.: Die meisten Kulturen unverändert, d. h. das Impfklümpchen noch zusammengeballt. Nur 3a. u. b. strahlend und 5. phototropisch gerichtete Stränge aufweisend. Diese Kultur ohne Alkohol ist die beste.

22. Oktober:

Oscillaria brevis: 1a. u. b. Wenig gewachsen, aber gut gefärbtes Häutchen an der Oberfläche. 2a. Viel mehr, Klümpchen und Netz an der Lichtseite. 2b. Wenig, aber gut gefärbt. Klümpchen am Boden, Rand an der Lichtseite. 3a. Ziemlich viel, aber gelblich. 3b. Tot. 4a. Viel an der Lichtseite, aber gelblich. 4b. Weniger als bei 4a., etwa wie 1a. 5. Etwa wie 2a., aber etwas gelblicher.

Nostoc spec.: 1a. Gut strahlend. 1b. Fäden am Boden. Nester bildend. 2a. Ähnlich, aber mehr. 2b. Noch mehr, 3a. Sehr gut, viel Algen am Rande.

¹⁾ Das kommt zuweilen aus unbekanntem Ursachen vor, ohne eine ungünstige Bedeutung zu haben.

²⁾ Eine Prüfung der Reaktion der Lösungen mit Nilblau ergab für Glycerin und Mannit schwach saure, für alle anderen basische Reaktion.

Glas gleichmäßig mit phototropischen Fäden bedeckt. Beginnende Verfärbung. 3b. Ähnlich, aber mehr klumpig. 4a. Viele Klümpehen, durch strahlende Fäden festgeheftet. 4b. Kleine Nester und Stränge, gut. 5. Ähnlich, aber schlechter als 3a.

C. Kohlehydrate.

Nachdem auch hier Vorversuche mit bakterienhaltigen Kulturen die Unschädlichkeit des Traubenzuckers und einiger anderer in genügend verdünnter Lösung gezeigt hatten, wurden zunächst einige Monosen in verschiedenen Konzentrationen erprobt.

14. August 1912:

Oscillaria tenuis, geimpft aus Heydenagarröhrchen vom 28. Mai in:

	a.	b.	c.
1. Glukose	0,2	0,1	0,05%
2. Fruktose	=	=	=
3. Galaktose	=	=	=
4. Arabinose	=	=	=
5. Ohne Zucker.			

Dazu überall kleine Menge NH_4MgPO_4 , Spur CaSO_4 und $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$, sowie 0,1% K_2SO_4 in doppelt destilliertem Wasser. Sterilisiert durch zweimaliges Erhitzen im Dampftopf.

Ergebnis am 21. August:

1a. bis c. Feines Netz am Boden, wenig vermehrt. 2a. bis c. Wenig gewachsen. 3a. bis c. Hübsches Netz, aber noch nicht viel. 4a. Ganz wenig strahlend. 4b. u. c. Feines Netz am Boden. 5. Ganz geringe Menge, aber fein ausgebreitet.

28. August:

1a. bis e. Gut gewachsen, Netz, das teilweise klumpig geballt ist. 2a. Wenig ausgebreitet, nicht gut aussehend. 2b. Wie 1a. bis e. 2c. Etwas weniger, so wie ohne Zucker. 3a. Gutes Netz. 3b. Mehr. 3c. Weniger, so wie ohne Zucker. 4a. Wenig ausgebreitet, nicht gut aussehend. 4b. Nicht viel besser, schlechter als ohne Zucker. 4c. Schlechte Ausbreitung, aber wohl leidlich vermehrt. 5. Hübsches Netz, aber weniger als die besten.

3. September:

1a. u. b. Klumpen. 1c. Netz, überall gut gewachsen. 2a. Fast nichts. 2b. u. c. Gut, Netz und Schleier. 3a. bis c. Sehr gut. 4a. Weniger als ohne Zucker. 4b. Ebenso wie ohne Zucker. 4c. Klumpen. 5. Feines Netz und Schleier.

Es wirkt also Glukose und besonders Galaktose günstig, Fruktose und Arabinose in der höchsten Konzentration schädlich, in den geringeren garnicht. Jedenfalls läßt sich hier unter gewissen Umständen eine sichere Förderung durch organische Stoffe beobachten.

14. August 1912:

Oscillaria brevis, genau derselbe Versuch, geimpft aus Heydenagarröhrchen vom 12. August, das mit viel Material beschickt worden war.

Ergebnis am 21. August:

1a. Wenig strahlend. 1b. u. c. Mehr auseinander, aber noch nicht ganz. 2a. bis e. Entsprechend wie 1. 3a. An der Fensterseite strahlig ausgebreitet. 4a bis e. Ähnlich wie 3., aber weniger strahlend. 5. Ganz wenig Fäden herausgekrochen.

28. August:

1a. Rand über dem Meniskus von viel Fäden besiedelt. 1b. u. c. Fäden fein ausgebreitet. 2a. Wenig strahlend. 2b. u. c. Schönes Netz. 3a. u. b. Sehr hübsch, wie 1a. 3c. Ähnlich, noch besser, Rand und Haut. 4a. bis c. Sehr gut, etwa wie 3c. 5. Gut, Rand und Netz.

3. September:

1a. Etwas zurück gegenüber b. u. c., die recht üppig sind. 2a. Schön strahlend, aber b. und besonders c. viel üppiger, noch besser als 1b. u. c. 3. Alle drei Kulturen sehr üppig. 4. Alle gut, besonders c. sehr üppig. 5. Etwa wie 1a., also schlechter als die besten.

Bei *Oscillaria brevis* ist demnach die Förderung durch Zucker bei niederen Konzentrationen noch stärker als bei *O. tenuis*.

5. September 1912:

Nostoc spec. Derselbe Versuch, geimpft aus Heydenagarröhre vom 29. Juli.

Ergebnis am 16. September:

Alle fast garnicht ausgebreitet, bis auf 1b., das die für diese Art bezeichnenden phototropischen Stränge zeigt und 3c. sowie 4c., die ganz wenig strahlen.

22. September:

1a. Nicht ausgebreitet. 1b. Gut. 1c. Ganz wenig strahlend. 2a. u. b. Unverändert. 2c. Etwas strahlend. 3a. Ganz hell, wohl tot. 3b. u. c. Wenig strahlend. 4a. bis c. In wachsendem Maße ausgebreitet, sodaß 4c. der Kultur 1b. gleicht. 5. Garnicht ausgebreitet.

28. September:

1a. Unverändert. 1b. Gut strahlend. 1c. Fäden weit gekroehen, gut. 2a. u. b. Unverändert. 2c. Wenig strahlend. 3a. ? 3b. Wie 1b. 3c. Wie 1c. 4a. u. b. Wie 1c. 4c. Viel Fäden am Boden. 5. Einige Fäden heransgekroehen.

18. Oktober:

1b. Klümpehen und wenig Fäden am Boden. 1c. Klümpehen und ziemlich viel phototropische Fäden. 2a. Zahlreiche winzige, schlecht aussehende Kügelehen. 2b. Eine kleine Kugel. 2c. Wie 1c. 3a. u. b. Unverändert. 3c. Rings am Glase sehr viel gute, phototropische Fäden, teilweise spinwebig verflochten. 4a. Ebenso. 4b. Ähnlich, dazu an der Fensterseite dichter Belag, gut. 4c. Ähnlich, aber weniger. 5. Einige Kugeln, dureh Fäden befestigt.

Der *Nostoc* wird also durch Zucker, wie überhaupt durch organische Stoffe, wenig gefördert, nur Galaktose und Arabinose sind in geringer Konzentration günstig, was sich aber erst nach längerer Zeit bemerkbar macht.

Wir kommen nun zu den Di- und Polysacchariden, aus denen natürlich auch wieder nur eine kleine Auswahl getroffen werden konnte. Da sie sich aber größtenteils ziemlich übereinstimmend verhielten, sind auch bei den nicht berücksichtigten keine besonderen Überraschungen zu erwarten.

7. September 1912:

Oscillaria tenuis, geimpft aus üppiger Fruktosekultur vom 14. August in

	a.	b.
1. Saccharose	0,02	0,05%
2. Milchzucker	=	=
3. Maltose	=	=
4. Inulin	=	=

	a.	b.
5. Dextrin	0,2	0,05 %
6. Glykogen	=	=
7. Ohne Zucker.		

Alle verwendeten Kohlehydrate waren die reinsten Präparate von Merck. Das ist von Bedeutung, da z. B. ein Milchzucker unbekannter Herkunft sich in wiederholten Versuchen als recht giftig erwiesen hatte. Alle Lösungen klar bis auf das Glykogen, das stark opalisierte. Überall kam eine kleine Menge NH_4MgPO_4 , 0,01% K_2SO_4 , sowie eine Spur von CaSO_4 und $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$ hinzu. Dopp. destill. Wasser.

Ergebnis am 16. September:

1 a. u. b., 2 a. u. b. Schöner, ausgespannter Schleier. 3 a. u. b. Wenig Wachstum am Boden, etwas weniger als ohne Zucker. 4 a. Noch schlechter. 4 b. Gut, fast wie 1. 5 a. Wie 4 a. 5 b. Etwas besser. 6 a. u. b. Ohne Ausbreitung am Boden. 7. Etwas ausgebreitet und gewachsen.

22. September:

1 a., b., 2 a. u. b. Hübsche, ausgespannte Netze, besonders 2 b. gut. 3 a. u. b. Etwas schlechter. 4 a. Klümpchen am Grunde mit wenig Strahlung. 4 b. Schönes Netz. 5 a. Wie 4 a. 5 b. Am Glase seitlich festgeheftet, wenig strahlend. 6 a. u. b. Wie 4 a. 7. Klümpchen seitlich am Glase festgeheftet, nicht so gut wie die besten Kulturen.

1. Oktober:

1 a., 3 b., 4 a., 5 a., 6 a. u. b. Sehr mäßig, die anderen gut, ob 1. besser als 7. ist fraglich, am besten 2 a. u. b., 3 a. u. 4 b.

Nun etwas Flüssigkeit aus den Kulturen mit 0,05 % Kohlehydrat, weil diese im allgemeinen besser sind, mit Fehlingscher Lösung gekocht, um zu prüfen, ob hydrolysierende Enzyme abgeschieden worden sind. Bei Milchzucker und Maltose, die schon an sich reduzieren, ist die Probe nicht anwendbar. Von den übrigen Lösungen gibt nur die mit Dextrin, das ja stets eine Spur Zucker enthält, eine minimale Reduktion, die übrigen gar keine. Monosen sind also nicht gebildet worden.

Man darf wohl annehmen, daß die Di- und Polysaccharide überhaupt nicht zur Ernährung verwendet werden.

7. September 1912:

Oscillaria brevis: Genau derselbe Versuch, geimpft aus iippiger Zuckerkultur vom 14. August.

Ergebnis am 16. September:

Überall gut gewachsen, Unterschiede gering bis auf 6 a., wo nur wenig am Boden. Auch 6 b. gegen die übrigen zurück, die einschließlich die zuckerfreie Kultur, Netz am Glase und dicke Ansammlung am Meniskus zeigen.

22. September:

1 a. bis 5 b. Etwa gleich gut. 6 a. u. b. Auch ganz hübsch, wenngleich schlechter. 7. Etwas zurück gegen die besten Kulturen.

1. Oktober:

Alle Kulturen gut. 6 a., das sich später entwickelt hat, noch grün, alle anderen gelb. Sonst keine Unterschiede zu bemerken. Prüfung mit Fehling'scher Lösung ergibt wieder negatives Resultat.

Diese Art scheint also gleichfalls die betreffenden Kohlehydrate nicht zu verarbeiten, ohne daß sie aber in den verwendeten Konzentrationen schädlich wären.

7. September 1912:

Nostoc spec. Der gleiche Versuch, geimpft aus Heydenagarröhrchen vom 29. Juli.

Ergebnis am 16. September:

Überall Fäden, nur wenig herausgekrochen, am Boden.

22. September:

1 a. Klümpehen ganz wenig strahlend. 1 b. Fäden teilweise herausgekrochen, neue Nester bildend. 2 a. Wie 1 a. 2 b. Wie 1 b., aber wenig gewachsen. 3 a. Klümpehen nicht festgeheftet. 3 b. Beste Kultur, Klümpehen durch Fäden an der seitlichen Glaswand festgeklebt, Beginnendes Netz. 4 a. u. b. Wie 1 a. 5 a. Wie 3 a. 5 b. Wie 3 b., aber weniger. 6 a. Ähnlich wie 1 a. 6 b. Ebenso, etwas besser. 7. Klümpehen wenig strahlend, einige herausgekrochene Fäden netzartig angeordnet.

1. Oktober:

Meist einzelne Fäden an den Glaswänden. Bei 3 a., 4 a. u. b., sowie 6 a. Algen nur am Boden. 2 a. Gut, um das Lupfklümpehen Netz. 3 b. Sehr gut. 5 b. u. 6 b. Auch recht gut, besser als 7.

22. Oktober:

Auch da, wo anfangs keine Entwicklung zu bemerken war, jetzt überall zahlreiche Fäden am Glase, außer bei 6 a.; 3 b. u. 5 b. gelblich, die anderen hübsch blaugrün. 7. ist entschieden zurück gegenüber 1 b., 3 b., 5 b. u. 6 b.

Die recht langsame Entwicklung zeigt also erst nach längerer Zeit eine deutliche Förderung durch Saccharose, Maltose, Dextrin und Glykogen, falls diese in sehr geringer Konzentration geboten werden. Die Verbesserung des Wachstums ist aber immer gering.

D. Organische Stickstoffverbindungen.

Auch hier gingen den systematisch angelegten Kulturreihen mit Reinkulturen einige Vorversuche mit noch bakterienhaltigem Material voraus. Sie zeigten, daß die verschiedensten Arten von Blaualgen Eiweißstoffe, wie Albumin und Pepton, sowie Aminosäuren, wie Asparagin, Leucin, Glycocoll usw. in nicht zu hoher Konzentration gut vertragen und sich unter Umständen auch dann noch zu vermehren vermögen, wenn eine schwache Fäulnis eingesetzt hat. Da aber diese Versuche recht verschiedenartig ausfielen, offenbar je nach der Art der zur Entwicklung kommenden Bakterien, soll auf ihre Wiedergabe im einzelnen verzichtet werden, um so mehr, als sie ja über die Art der wirklich assimilierten Nährstoffe nichts aussagen können. Wir wollen zunächst die Experimente mit den eigentlichen Eiweißstoffen betrachten, den sogenannten nativen Albuminen, die also unter den Versuchsbedingungen durch die Erhitzung beim Sterilisieren koaguliert worden waren. Zwei der benutzten Präparate, nämlich Tropon und Nährstoff Heyden, enthalten freilich auch nicht mehr koagulierbare Albumosen.

26. Juli 1912.

Oscillaria tenuis, geimpft aus Heydenagarröhre in Kölbchen, die neben 0,02% K_2SO_4 , einer kleinen Menge NH_4MgPO_4 und einer Spur $CaSO_4$ und $Fe_2(PO_4)_2$ in dopp. destill. Wasser je eine kleine Menge enthalten von:

1. Tropon.
2. Heydennährstoff.
3. Serum siccum aus Pferdeblut von Grübler.
4. Albumin aus Eiweiß von Merck.

5. Kasein puriss. von Merck.

6. Ohne Eiweiß.

Sterilisiert im Autoclav.

Schon nach 4 Stunden (1—5 Uhr) teilweise auseinandergetrochen, und zwar:
1. Wie es scheint, Fäden chemotaktisch um Troponklümpchen angeordnet.
2. Schwache Strahlung. 3. Ganz auseinandergetrochen. 4., 5. u. 6. Mehr als 2, aber weniger als 3. gekrochen.

Ergebnis am 28. Juli.

1., 2. u. 4. Wenig ausgebreitet 3. Schön auseinandergetrochen. 5. Ganz ausgebreitet. 6. Gutes Netz.

1. August:

1. Klümpchen und Netz. 2. Nur Klümpchen. 3. Schönes Netz am Boden, gut. 4. Wie 1. 5. Noch besser als 3. 6. Wenig ausgebreitet, aber gut aussehend.

12. August:

1. Dauernd zusammengeballt, aber vermehrt. 2. Viele Klümpchen um die Troponstiecke. 3. wie 1., 4. u. 5. Klümpchen durch strahlende Fäden am Glase festgeheftet. 6. Mehr ausgebreitet als die anderen, aber nicht sehr.

21. August:

Überall Klümpchen, außerdem bei 4. kräftiger, tiefblaugrüner Rand. 6. Ist gegen die anderen zurück, offenbar aus Stickstoffmangel, da die Fäden teilweise gelb werden, sich aber auf erneuten Zusatz von etwas Ammoniummagnesiumphosphat wieder gut färben und weiter entwickeln.

In den übrigen Kulturen bilden sich aus einzelnen isolierten Fäden am Boden der Gefäße weitere Klümpchen, die wieder kugelige Gestalt annehmen, sodaß am

26. September

in 1., 2., 3. und 5. mehrere runde, schwarzgrüne Klümpchen, in 4. ein gut gefärbter dicker Klumpen, der mit Strängen festgeheftet ist, sich befindet. In 6. üppige Haut, deren Masse mit der der anderen Kulturen durch bloße Schätzung nicht verglichen werden kann.

Ogleich bei dem Zusatz des Ammonsalzes die Eignung der Eiweißstoffe als Stickstoffquellen nicht von vornherein ganz klar ersichtlich ist, spricht die üppige, langandauernde Entwicklung gegenüber dem allmählich eintretenden Stillstand und der Entfärbung ohne organischen Stickstoff, doch für ihre Ausnutzung. Die gute Ernährung auf Heidenagar deutete ja auch schon darauf hin. Die Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Eiweißpräparate sind gering. In allen haben die Oscillarien auffallenderweise die Neigung, sich zusammenzuballen oder garnicht erst auseinanderzukriechen, ohne daß diese Erscheinung, wie sonst vielfach, auf eine für das Wohlfinden ungünstige Zusammensetzung der Lösung schließen ließe, da die Vermehrung offenbar recht lebhaft ist. Dasselbe Verhalten habe ich noch in Erbsenwasser, und wie man sehen wird, auch in Peptonlösungen beobachtet. Es ist besonders für diese eine von den untersuchten Arten bezeichnend, kann aber auch in konzentrierteren Lösungen anderer Stoffe auftreten.

Durch Versetzen mit dem Indikator Nilblau wurde schließlich noch festgestellt, daß die eiweißhaltigen Kulturen alle schwach alkalisch waren, die eiweißfreie aber neutral oder schwach sauer.

2. August 1912:

Oscillaria brevis, geimpft aus Heydenagarröhre vom 15. Juli in Kölbchen des gleichen Inhalts wie im vorigen Versuche. Sehr bald überall gute Ausbreitung.

Ergebnis am 12. August:

1. u. 2. Rand auf der Fensterseite. 3. Fäden gelblich, am Boden. 4. Feines Netz auf allen Wänden. 5. Nicht sehr reichliche Fäden am Boden. 6. Weniger als 1. u. 2., Fäden hauptsächlich auf der Fensterseite.

21. August:

Überall Wachstum, in 1., 2. u. 6. am meisten, in 5. am wenigsten, in 3. Oscillarien gelblich.

Es wurde nun aus diesen Kulturen wiederholt abgeimpft, weil hier das erste reine Material in genügender Menge vorlag. Deshalb ließ sich die Entwicklung in den einzelnen Kölbchen nicht mehr gut vergleichen. Jedenfalls aber wurden alle, außer 3., auch 5. allmählich sehr üppig, nur 6. zeigt am 24. August die ersten Spuren der Verfärbung. Am 28. August war 6. ganz gelb, alle anderen außer 3 schön tief grangrün.

Bei *Oscillaria brevis* sprechen also dieselben Anzeichen für die Verwertung der Eiweißstoffe als Stickstoffquellen wie bei *O. tenuis*. Nur sind die Unterschiede etwas größer. Warum gerade Serumalbumin nicht geeignet war, vermag ich nicht zu sagen. Soviel aber ist sicher, daß sich mit manchen Eiweißstoffen, besonders mit Albumosen, von Oscillarien sehr üppige Reinkulturen erzielen lassen, die an andauerndem kräftigem Wachstum die rein autotrophen Kulturen unter Umständen hinter sich lassen. Ob diese Überlegenheit auch gegenüber Nährlösungen mit einer größeren Menge anorganisch gebundenen Stickstoffs gelten würde, muß freilich fraglich bleiben.

30. August 1912:

Nostoc spec., geimpft aus Heydenagarrröhre vom 29. Juli in Lösungen, die denen der beiden letzten Versuche entsprechen, nur daß noch Legumin Merck hinzukam. Die Kölbchen enthielten also:

1. Tropon,
2. Nährstoff Heyden,
3. Serum aus Pferdeblut von Grübler,
4. Albumin aus Eiweiß von Merck,
5. Casein purissimum, " "
6. Legumin Merck,
7. Keinen Eiweißstoff. Daneben die Salze wie oben.

Ergebnis am 4. September:

Nur bei 3. etwas strahlend.

6. September:

1. Gut anschend. Von verschiedenen Punkten aus etwas strahlend. 2. Dickes Klümpchen ohne Strahlung. 3. u. 4. Ziemlich viel Fäden herausgekrochen. 5. Impfstückchen gelblich. 6. Wie 2. 7. Sehr gut.

22. September:

Nur 7. wirklich gut. 1., 3. u. 4. Leidlich, viel Fäden am Boden. 1. u. 6. Tiefblaugrüner Klex. 5. Tot. 2. Wie oben.

3. Oktober:

1. Sehr gut, viel Fäden an der Fensterseite, phototropisch schräg nach oben strahlend. 2. Noch wie am 6. September angeordnet, aber viel mehr. 3. Fäden verteilt am Boden, meist entfärbt. 4. Sehr üppig, dicker wurstartiger Klumpen, von da Fäden den ganzen Boden überziehend. 5. —. 6. Runder, schwarzgrüner Ball, nicht sehr viel. 7. Gut, Netz und phototropische Fäden.

23. Oktober:

1. Sehr gut, an der Lichtseite dicke, ausgebreitete Masse, hoch herauskriechend. 2. Klümpchen und Netz am Boden, gut. 3. Tot. 4. Dicker Klex

und Ausbreitung, teilweise tot. 5. Sehr wenig, nicht entwickelt, aber noch grünlich. 6. Gelblich grün, Rand über dem Meniskus und Bodenwachstum. 7. Unverändert, gelblich.

Das Aussehen der Kulturen hat sich also z. T. schließlich noch geändert. Bei dem *Nostoc* dauert es immer einige Zeit, ehe die Wirkung der einzelnen Stoffe klar hervortritt. Nach einer Art Latenzperiode setzt dann oft noch überraschend gutes Wachstum ein. Während von den Eiweißstoffen Tropon und Albumin sehr gut ausgenutzt werden, was aus der Überlegenheit der betreffenden Kulturen gegenüber der eiweißfreien hervorgeht, wirkt Serumalbumin und Kasein hier schädlich. Nährstoff Heyden und Legumin verzögern die Ausbreitung sehr, scheinen sonst aber unschädlich zu sein.

Die Wirkung der verschiedenen Präparate auf die kultivierten Cyanophyceen, außer *Oscillaria brevis*, ist demnach sehr ungleich. Da ihre Zusammensetzung nicht bekannt ist, auch schädliche Beimengungen darin enthalten sein können¹⁾, kann auf die Ergebnisse im einzelnen, soweit sie negativer Natur sind, nicht viel gegeben werden. Die Hauptsache ist, daß es Eiweißstoffe gibt, die ertragen oder selbst verarbeitet werden. Daneben ist die hemmende Wirkung auf die Ausbreitung bei *Oscillaria tenuis* und *Nostoc spec.* bemerkenswert.

Die zweite Gruppe von Versuchen umfaßt einige nicht koagulierbare Eiweißabbauprodukte, nämlich Pepton und Aminosäuren, sowie Amide. Hier wurde nun kein Stickstoff nebenher gegeben und auch durch recht vorsichtige Sterilisation, in Gestalt dreimaliger kurzer Erhitzung im Dampftopf, eine etwaige Zersetzung durch höhere Temperatur vermieden. Es konnte daher eine Vermehrung nur auf Grund der Verwendung organisch gebundenen Stickstoffs stattfinden. Die verschiedenen Verbindungen wurden wegen ihrer Leichtlöslichkeit in zwei Konzentrationen verwendet.

24. August 1912:

Oscillaria tenuis aus Salpeteragarröhrchen vom 9. Juli geimpft in Lösungen mit:

	a.	b.
1. Pepton Witte	0,05 %	0,01 %
2. Leucin synthetisch Kahlbaum	=	=
3. Glycocoll puriss. Grübler	=	=
4. Asparagin Merck	=	=
5. Acetamid =	=	=
6. KNO ₃ 0,1 %,		

sowie überall 0,005 % MgSO₄, 0,005 % K₂HPO₄, Spur CaSO₄ und Fe₂(PO₄)₂ in doppelt destilliertem Wasser. Sterilisiert durch dreimaliges Erhitzen im Dampftopf.

Ergebnis am 28. August:

1 a. Wenig ausgebreitet, nicht fest haftend. 1 b. Gut ausgebreitet. 1 c. Garnicht ausgebreitet. 2 a. u. b. Fast garnicht ausgebreitet. 2 c. Gutes Netz am Boden. 3 a. bis c. Wenig ausgebreitet. 4 a. u. b. Gut gewachsen und ausgebreitet. 4 c. u. 5 a. bis c. Fast

¹⁾ Vgl. Bengt Lidforss, Reizbewegungen der Pollenschläuche, Zeitschrift für Botanik, Bd. I, 1909, S. 461.

garnicht ausgebreitet. 6. Strahlig bis netzig. In keiner Kultur die Impfkümpchen ganz verteilt.

1. September:

1a. Noch Klümpchen, daneben zarter Schleier. 1b. Schönes Netz. 1c. Nur Klümpchen. 2a. Klümpchen dünn und gelblich, Netz. 2b. Klumpen blaugrün, ganz wenig strahlend. 2c. Schönes Netz. 3a. Klümpchen und dünnes Netz, gut. 3b. Schöner Schleier. 3c. Beginnender Schleier, ziemlich wenig, aber gut gefärbt. 4a. Gutes, wenn auch feines Netz, 4b. n. c., 5a. Gut aussehend, wenn auch wenig haftend. 5b. Ganz wenig strahlend. 5c. Wenig ausgebreitetes Netz. 6. Gut strahlend, noch nicht ganz ausgebreitet.

16. September:

1a. Schön strahlend, in der Mitte noch Klümpchen. 1b. Sehr üppiges Netz mit Strängen. 1c. Wie 1a. 2a. Ganz feines, gelbliches Netz. 2b. Klümpchen blaugrün, strahlend. 2c. Leidlich gute Haut, laubgrün. 3a. Ganz fein verteilte kurze Fadenstücke. 3b. Dünne gelbliche Haut. 3c. Feiner angespannter Schleier mit Strängen, nicht viel gewachsen und ganz hell. 4a. n. b. Gut gefärbtes, schönes Netz und Haut. 4c. Oscillarien an einer Seite am Meniskus, dicht, gut gefärbt. 5b. bis c. Ganz fein verteilte, helle Fadenbruchstücke. 6. Gut gefärbter, alle Wände und die Oberfläche bedeckender dünner Schleier, weniger gewachsen als in 1b., 4a. u. 4b.

1. Oktober:

1a. u. b. Üppiger Schleier, Haut usw. 1c. Etwas weniger. 2a. Unverändert, schlecht. 2b. u. c. Nicht sehr viel gewachsen, zusammengeballt. 3a. bis c. Unverändert, schlecht. 4a. u. b. Dicke Massen. sehr gut. 4c. Unverändert, gut. 5a. bis c. Unverändert schlecht. 6. Gut gefärbt, überall fein verteilt, weniger Oscillarien als in den guten Pepton- und Asparaginkulturen.

Die Ergebnisse sind also, wie man sieht, sehr ungleichartig. Während Pepton und Asparagin gutes Wachstum ergeben, besseres sogar als Kalisalpeter, sind Leucin, Glycocoll und Acetamid nicht geeignet als Stickstoffquellen. Daß dieser Grund und nicht eine Giftwirkung vorliegt, schließe ich erstens daraus, daß die Kulturen so aussahen wie bei Stickstoffmangel und zweitens aus dem Umstand, daß die niederen Konzentrationen genau dasselbe Bild ergaben wie die höheren. Nur bei Leucin ist das letztere nicht der Fall. Dieses scheint direkt schädlich zu sein. Die höchste verwendete Konzentration von 0,05% ist bei den ersten beiden jedenfalls nicht zu hoch, vielleicht erzielt sie noch nicht optimale Entwicklung. Die niedrigste Konzentration von 0,01% bewirkt, daß die anfangs sehr guten Kulturen schließlich etwas zurückbleiben.

21. August 1912:

Oscillaria brevis. Genau derselbe Versuch, geimpft aus Troponkultur vom 2. August.

Ergebnis am 24. August:

Bei 4a. nur einzelne kurze Fadenstücke herausgekrochen, sonst überall schon zum feinen Netz angeordnet.

28. August:

In allen Kölbehen völlig ausgebreitet.

1. September:

Überall gutes Netz, kaum Unterschiede zwischen den Kulturen.

16. September:

1a. bis c. Gleichmäßig sehr gut, Netz und Haut. 2a. Viel weniger gewachsen, wenn auch nicht schlecht vermehrt. Fäden kurz, hell. 2b. An der Lichtseite gut gewachsen. (Leider durch Rosahefe infiziert, die aber nicht zu stören scheint.) 2c. Sehr wenig feine kurze Fäden ganz verteilt. 3a. Üppig an der Fensterseite. 3b. Wie 2c. 3c. Wenig gewachsen. 4a. Nicht viel. 4b. Sehr

schön gefärbt, üppig. 4c. Viel weniger. 5a. bis b. Nicht viel. 6. Gut, aber nicht so viel wie in 4b.

1. Oktober:

1a. u. b., 3a., 4b. u. 6. Gut, besonders 4b. besser als 6. Alle übrigen verfärbt, gelblich.

Auch für *Oscillaria brevis* sind also die verschiedenen Stickstoffverbindungen von sehr ungleicher Brauchbarkeit, die stark von der Konzentration abhängt. Da der Versuch in dieser Ausführlichkeit nur einmal angestellt wurde, läßt sich nicht sagen, inwieweit die wechselnden Ergebnisse bei verschiedenen Konzentrationen gesetzmäßig sind. Soviel aber ist sicher, daß Pepton, Glycocoll und Asparagin sehr gutes Wachstum ergeben können, das selbst das mit Kalisalpeter übertreffen kann, daß dagegen Leucin und Acetamid sich nicht eignen. Eine Prüfung mit dem Indikator Nilblau ergab nirgends merkliche Basizität, sodaß die schlechten Resultate nicht einer Abspaltung von Ammoniak zuzuschreiben sind.

28. August 1912:

Nostoc spec. Dieselbe Versuchsanstellung, geimpft aus Heydenagar-röhre vom 29. Juli.

Ergebnis am 1. September:

Nur bei 1c. etwas ausgebreitet.

3. September:

1a. ? 1b. Etwas strahlend. 1c. Gut strahlend. 2a. bis c. Ganz wenig Fäden herausgekrochen. 3a. bis c. Ebenso. 4a. Etwas mehr, b. u. c. noch mehr strahlend. 5a. bis c. Ziemlich gut ausgebreitet. 6. Nicht viele Fäden herausgekrochen.

16. September:

1a. Wenig strahlend. 1b. Besser, Fäden von verschiedenen Punkten strahlig ausgehend. 1c. Von einem Klümpchen Fäden nach dem Fenster und entgegengesetzt phototropisch strahlend. Gutes Wachstum. 2a. bis c. Wie 1b. 3a. Gut gefärbt, aber nicht ausgebreitet. 3b. Klümpchen schwimmt, wenig strahlend. 3a. Wie 1b. 4a. Ähnlich, wenig. 4b. u. c. Anordnung ebenso, aber sehr viel mehr gewachsen. 5a. bis c. Sehr gut, besonders b., phototropische Fäden. 6. Wenig strahlend.

22. September:

1a. Schlecht. 1b. Viele kleine nestartige Fadenhäufchen mit Strahlen. 1c. Anordnung wie oben, aber dichter. Farbe und Vermehrung gut. 2a. Anordnung wie 1b., aber gelblich. 2b. u. c. Viele kleine tiefblaugrüne Stränge von Komma- und Schleifenform. 3a. bis c. Ähnlich, aber weniger und gelblich. 4a. Tot. 4b. u. c. Sehr gut, Anordnung wie bei 1b. 5a. Ebenso. 5b. u. c. Noch besser, an der Fensterseite schön blaugrüne Masse, sonst feines Netz. 6. Viel weniger, angeordnet wie bei 1b.

1. Oktober:

1a. Unverändert, teilweise noch grün. 1b. Vermehrung hat aufgehört, Fäden verfärbt. 1c. Gut, in der Mitte des Bodens dichte Häufung und von da strahlige Ausbreitung. 2a. Wie früher. 2b. u. c. Wie früher, aber gelblich grün. 3a. bis c. Alles entfärbt. 4a. —. 4b. u. c. Sehr gut. 5a. bis c. u. 6. Sehr gut.

Die guten Kulturen 1c., 4b. u. c., 5a. bis c. u. 6. weiter aufgehoben, bei den anderen mit Nilblau die Reaktion geprüft: 1a. rosa, 1b. lila, 4a. rosa, die anderen blau oder blaulila, d. h. die von vornherein schlechten Kulturen alkalisch, die anderen neutral. Es wird also wohl aus Pepton und Asparagin Ammoniak abgespalten, das bei zu hoher Konzentration schädlich wird.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Pepton und Asparagin bei großer Verdünnung, Acetamid auch bei etwas höherer Konzentration für den *Nostoc* geeignete Stickstoffquellen sind, ja daß sie den Kalisalpeter übertreffen können. Leucin und Glycocoll dagegen sind ungünstig, ebenso Pepton und Asparagin

bei zu hoher, noch immer, absolut genommen, geringer Konzentration. Der *Nostoc* ist ja überhaupt empfindlicher gegen organische Stoffe als die Oseillarien. Ein weiterer Unterschied gegenüber diesen liegt in der Brauchbarkeit des Aetamid's.

E. Zucker neben organischen Stickstoffverbindungen am Licht und im Dunkeln.

7. September 1912:

Oscillaria brevis, geimpft aus üppiger Galaktosekultur v. 14. August in:

	a.	b.	c.
1. 0,1% Glukose 0,05% Asparagin	0,05% Pepton	0,05% (NN ₄) ₂ HPO ₄	
2. " Fruktose	"	"	"
3. " Galaktose	"	"	"
4. " Arabinose	"	"	"

Dazu überall 0,005% MgSO₄; 0,01% K₂HPO₄ und Spur FeSO₄, alles gelöst in dopp. dest. Wasser, sterilisiert durch dreimaliges Erhitzen im Dampftopfe. Je zwei Kölbchen zu 25 cem, von denen immer eins ins Dunkle, eins ans Nordfenster kommt.

Ergebnis:

Nach fünf Stunden beginnt die Ausbreitung, und zwar zunächst in den Kulturen mit Asparagin.

16. September:

Hellkulturen.

1a. Oscill. fein ausgebreitet, Wachstum noch gering. 1b. Schwimmendes, gutes Häutchen in der Mitte des Wasserspiegels. 1c. Wie 1a. 2a. Wie 1b., aber gelblicher. 2b. Wie 1a., aber mehr. 2c. Nicht so ausgebreitet, nur strahlend, aber gut aussehend. 3a. Ähnlich wie 2a., aber an der Fensterseite mehr. 3b. und c. Etwas weniger. 4a. Wie 3c., aber durch Pilz infiziert. 4b. und c. Etwas weniger.

Dunkelkulturen.

1a. Ziemlich weit strahlend, gut aussehend. 1b. Wenig strahlend, aber wohl gesund. 1c. Schwimmendes Klümpehen, sehr wenig strahlend. 2a. Durch Pilz infiziert, beseitigt. 2b. Zusammengeballt, aber gut gefärbt. 2c. Etwas wie 1a. 3a. Wie 1c. 3b. und e. Mehr strahlend. 4a. Gar nicht ausgebreitet. 4b. Fast nicht ausgebreitet. 4c. Ganz wenig strahlend.

22. September:

Hellkulturen.

1a. Schwaches Netz. 1b. Gute Haut. 1c. Wie 1a. 2a. Wie 1b. 2b. Eben-sogut, aber am Glase. 2c. Weniger. 3a. Wie 1a. 3b. Üppig, auf der Fenster-seite am Glase hochgekrochen. 3c. Wie 1a. 4a. Großes Pilzmycel, aber trotz-dem Oscillarienwachstum gut. 4b. Ähnlich wie 1a., aber etwas mehr. 4b. Ähn-lich, aber gelblich.

Dunkelkulturen.

1a. Gut strahlend und gesund aussehend. 1b. Strahlt viel weniger. 1c. Ganz wenig strahlend. 2b. Klümpehen festgeheftet. 2c. Gut ausgebreitet. 3a. bis c. Etwas wie 1b. 4a. bis e. Wie 2b. Nirgends Vermehrung!

22. Oktober:

Hellkulturen.

1a. Viel Fäden, fein verteilt, aber gelblich. 1b. Sehr gut, Haut dicht, dunkel-grün, Fäden kraus aussehend. (Bei mikroskopischer Betrachtung Fäden vielfach verschlungen, teilweise kurz, Zellen ab und zu abgerundet, im ganzen gesund aussehend.) 1c. Schlecht, gelb. 2a. Wie 1c., wenn auch etwas mehr. 2b. Gut, Netz und Fäden. 3a. Nicht mehr weiter entwickelt, gelblich, aber nicht wenig. 3b. Äußerst üppig und gut gefärbt. 3c. Schlecht, gelb. 4b. Leidlich, grün. 4c. Schlecht, gelb.

Dunkelkulturen.

Keine Vermehrung oder sonstige Veränderung, aber Oscillarien überall gut gefärbt, also wohl lebend.

Nun die K ölbeh en mit den Dunkelkulturen in einen Thermostaten von 31° gesetzt, da Bouilhae¹⁾ behauptet hat, daß sein *Nostoc punctiforme* mit Zucker bei einer Temperatur von etwas über 30° im Dunkeln wachsen könne (a. a. O. S. 39), während ihm das bei tieferer Temperatur nur bei schwachem Lichtzutritt gelungen sei.

Das Resultat war, wie zu erwarten, völlig negativ. Zwar behielten die Oscillarien ihre Farbe auch im Thermostaten während 14 Tagen, vermehrten sich aber nicht. Nachher wurden sie ans Licht gebracht, wo sie sich aber auch nicht mehr erholten, sondern unter allmählicher Verfärbung von den Spitzen der Fäden her zugrunde gingen. Was die Wirkung von Kohlehydraten neben organischen Stickstoffquellen in Hellkulturen anbelangt, so ergibt sich ein gutes Wachstum besonders auf Grund von Peptongaben. Asparagin ist schon weniger günstig, und Ammonphosphat erweist sich als schädlich. Die Nährlösungen mit dem letzteren werden bei dem Mangel an Calcium und der minimalen Menge von Magnesiumsalzen durch Verbrauch des Ammoniums sauer geworden sein.

¹⁾ R. Bouilhae, Recherches sur la végétation de quelques algues d'eau douce. Thèse de Paris, 1898.

Inhalts - Übersicht.

I. Einleitung	49
II. Erzielung der Reinkulturen	54
III. Die reinkultivierten Arten	61
IV. Entwicklung und Habitus der Kulturen	64
V. Kultur auf Nährgallerte	69
VI. Kultur in Mineralsalzlösungen	74
VII. Kultur in Nährlösungen mit organischen Stoffen	80
A. Organische Säuren	81
B. Höhere Alkohole	82
C. Kohlehydrate	82
D. Organische Stickstoffverbindungen	83
VIII. Dunkelkulturen	84
IX. Schluß	85
X. Zusammenfassung	87
Anhang. Einige Protokolle und deren Besprechung	88

Figurenerklärung.

Tafel II (Schizophyceen).

1. Die Photographie zeigt einige charakteristische Agarröhrchen, die am 26. August 1912 aufgenommen wurden, bei schwacher Verkleinerung.

1. *Oscillaria brevis*, am 21. Juni in Asparaginagar geimpft, tiefgraugrün, zeigt die Art der Ausbreitung am Glase in älteren Kulturen.

2. *Osc. brevis*, am 27. Juni in Agar mit Erdeauszug und 0,1% KNO_3 geimpft. Die üppige Kultur zurzeit der Aufnahme ockergelb.

3. *Oscillaria tenuis*. Ein Klümpchen Material war am 24. August aus einer Eiweiskultur auf gewässerten Salpeteragar übertragen worden. Ausbreitung noch ohne wesentliche Vermehrung.

4. *Osc. tenuis*, am 1. August auf Heydenagar geimpft, zeigt schon gutes Wachstum.

5. *Osc. tenuis*. Eine größere Menge Material aus einer Flüssigkeitskultur am 22. August auf Gelatine übertragen. Man sieht unten das bei dichter Häufung erfolgende strahlige Eindringen in die Gelatine, wodurch der runde Hof um den Impfkümpfen entsteht.

6. *Nostoc spec.*, am 16. August auf Agar mit 0,2% Heyden-Nährstoff übertragen. In den 8 Tagen hat die strahlige Ausbreitung begonnen. Wachstum noch gering.

7. *Nostoc spec.*, ältere Heydenagarkultur.

8. *Oscillaria brevis* vom 2. August auf Fleischextraktagar, von der Rückseite aufgenommen. Ausbreitung in Wirbeln zwischen Agar und Glaswand.

II. *Oscillaria brevis*.

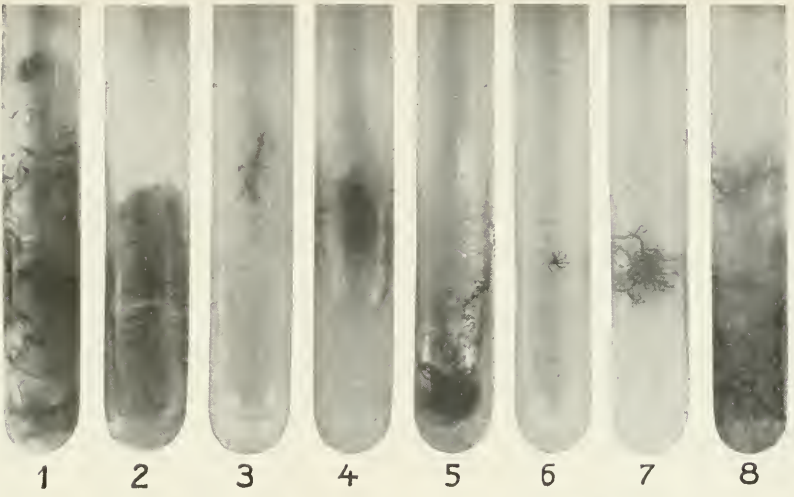
1. Haut und Rand in einer Flüssigkeitskultur mit 0,1% KNO_3 vom 2. August bis 2. Oktober 1912. 2. *Osc. brevis* in einer schwach basischen Nährlösung mit KNO_2 als Stickstoffquelle. Schönes Netz mit Strängen am Boden. 31. August bis 2. Oktober 1912.

III. *Nostoc spec.*

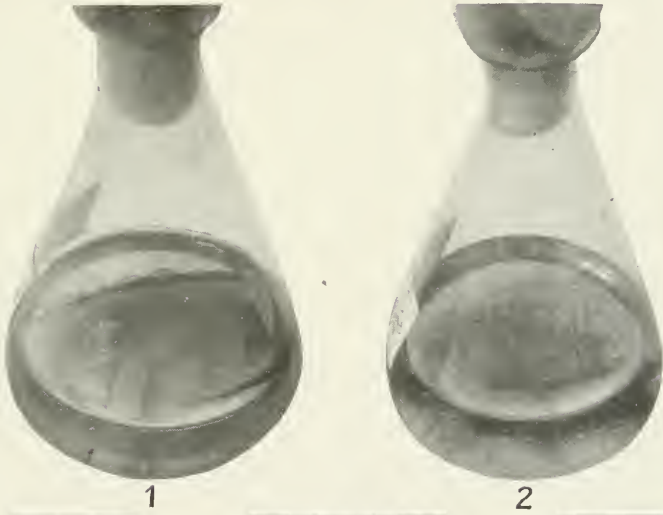
3 Kolben mit verschiedenem Habitus aus einer Versuchsreihe vom 28. August, aufgenommen am 20. Oktober 1912. 1. Pepton 0,01%. 2. Asparagin 0,05% 3. KNO_3 0,1%. Bei 1. Klümpchen mit Strahlung, bei 2. einzeln liegende phototropische Fäden, bei 3. kleine, regellos verteilte Stränge. (Der schwarze Fleck führt von einer Spiegelung her.)

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

I.



II.



III.



ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1913

Band/Volume: [12_1](#)

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

Artikel/Article: [Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen 49-108](#)