Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen.

IV. Mitteilung.

Die Ernährung von *Haematococcus pluvialis* Flot.

Von **Ernst G. Pringsheim.**

I. Einleitung.

Zu den Mikroorganismen, die sich in der Natur auch dem bloßen Auge leicht bemerkbar machen, gehören u. a. einige Flagellaten und Volvocineen, die durch ihr massenhaftes Vorkommen charakteristische Färbungen hervorrufen. Diese Färbung ist bekanntlich bei *Euglena sanguinea* und *Haematococcus pluvialis* ein kräftiges Blutrot, das diese Arten besonders auffällig macht.

Über die Ursachen der plötzlichen Vermehrung dieser in Tümpeln so häufigen Organismen wissen wir vorläufig sehr wenig. So oft auch gerade *Haematococcus* zu allerlei Beobachtungen und Untersuchungen angeregt hat und so gut er morphologisch untersucht ist, so sind doch seine Ernährungsverhältnisse bis in die neueste Zeit nicht näher studiert worden. Zwar liegen von Wollenweber¹⁾, dem letzten und eingehendsten Monographen der Gattung *Haematococcus* auch einige Kulturversuche vor; ferner hat Reichenow²⁾ die Bedingungen der Hämatochrombildung studiert; aber da beiden Reinkulturen nicht zur Verfügung standen, so wurde durch sie der Nährwert besonders organischer Stoffe nicht geklärt. Nur von Treboux³⁾ liegt eine Angabe vor, daß es ihm gelungen sei, eine ganze Reihe von Algen, darunter auch *Haematococcus pluvialis* im Dunkeln mit organischen Säuren zur Vermehrung zu bringen. Gerade mit *Haematococcus* scheint Treboux

1) W. Wollenweber, Untersuch. über die Algengattung *Haematococcus*. Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch. Festschrift, Bd. XXVI. 1908. S. 238.

2) E. Reichenow, Untersuchungen an *Haematococcus pluvialis* nebst Bemerkungen über andere Flagellaten. Arbeiten aus dem kais. Gesundheitsamt, Bd. 33, Heft 1, 1909, S. 1.

3) O. Treboux, Organische Säuren als Kohlenstoffquelle bei Algen. Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch. Bd. XXIII, 1905 S. 432.

nur einen Versuch, und zwar mit essigsauerm Kalium angestellt zu haben, der zu einem positiven Ergebnis geführt haben soll. Daß Bakterien und andere Organismen ganz ausgeschaltet waren, darf man wohl bezweifeln. Der Verf. gibt zwar an, seine Kulturen „unter Erfüllung der Methoden der Reinkultur“ angestellt zu haben. Wenn wirklich absolute Reinkulturen aller genannten, teilweise schwer zu züchtenden Organismen vorgelegen hätten, so hätte man von ihnen wohl noch mehr gehört. So bleibt es also zweifelhaft, ob das konstatierte Erntegewicht wirklich der Vermehrung von *Haematococcus* zuzuschreiben ist. Nach den später zu schildernden Versuchen kann diese Annahme geradezu verneint werden.

Das Vorkommen von *Haematococcus pluvialis* in der Natur deutet auf gewisse Eigenheiten in seinen Ernährungsverhältnissen hin, die es nicht unlohnend erscheinen ließen, die Kulturbedingungen für sein Gedeihen zu prüfen. Dazu mußten Reinkulturen erzielt und deren Wachstum in anorganischen und organischen Nährlösungen studiert werden. Hieran schloß sich die Frage, ob eine Vermehrung im Dunkeln, also ganz heterotrophe Ernährung, möglich wäre. Ferner waren die Bedingungen für das Auftreten des roten Farbstoffes und für die Schwärmerbildung noch einmal an Reinkulturen nachzuprüfen.

Besondere Überraschungen waren freilich nicht zu erwarten, aber vor allem aus ökologischen Gründen ist es doch erwünscht, die Kulturbedingungen und Ernährungsansprüche möglichst vieler Mikroorganismen zu kennen.

Im Gegensatz zu den höheren Pflanzen ist ja die Ernährungsphysiologie der Kleinlebewesen recht mannigfaltig. Selbst innerhalb einer Gattung zeigen sich wesentliche Unterschiede. Gerade über *Chlamydomonaden* liegen nähere Angaben von Frank¹⁾ und Jacobsen²⁾ vor, von denen der erstere nur Mineralsalzlösungen, der letztere auch organische Stoffe in Reinkulturen geprüft hat. Danach kann es nicht zweifelhaft sein, daß diese *Haematococcus* nahestehenden Formen entweder autotroph oder mixotroph sind. Vermehrung im Dunkeln ist nur für *Chlorogonium euchlorum* sichergestellt, bleibt aber immer gering. Für *Haematococcus* war eine weniger ausgeprägte Vorliebe für organische Stoffe zu erwarten als bei den zuerst von Jacobsen kultivierten Arten, die durch Anhäufung in faulenden Flüssigkeiten mit Erde als Impfmateriale gewonnen worden waren.

Dieser Auffassung entsprachen auch die Ergebnisse einer neueren

¹⁾ Th. Frank, Kultur und chemische Reizerscheinungen der *Chlamydomonas tingingens*. Bot. Ztg. 1904. Bd. 62 S. 153.

²⁾ H. C. Jacobsen, Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen. Zeitschr. f. Bot. Bd. 2. 1910 S. 145.

Arbeit von Jacobsen¹⁾, welche erschien, als die meisten meiner Versuchsreihen abgeschlossen waren. Auf die Einzelheiten wird später zurückzukommen sein. Jacobsen isolierte *Haematococcus* bakterienfrei und prüfte einige anorganische und organische Nährlösungen, wobei sich herausstellte, daß autotrophe Ernährung in stark verdünnten Mineralsalzlösungen am besten wirkt. Auch über die Bedingungen der Haematochrombildung und der Entstehung von Zoosporen wurden einige Versuche angestellt. Jacobsens Ergebnisse kann ich bestätigen und in mehrfacher Hinsicht ergänzen.

II. Erzielung der Reinkultur und Wachstum auf Agar.

Haematococcus pluvialis tritt, wie schon der Name sagt, mit Vorliebe in Regenpfützen auf. Mein Material stammte auch aus einer solchen, und zwar waren es ausgetrocknete, tiefrote Massen, die, mit Wasser übergossen, nur vereinzelte Schwärmer entließen. Sehr zahlreich traten dagegen bewegliche Individuen auf, wenn eine hellgelbe Erdeabkochung damit geimpft wurde. Die Schwärmer sind zuerst grün und sammeln sich phototaktisch auf der Fensterseite des Gefäßes am Flüssigkeitsrande. Nach etwa 10—14 Tagen sieht man bei guter Beleuchtung an einem Nordfenster die ersten Zeichen einer Rotfärbung am obersten Rande der sich am Glase etwas in die Höhe ziehenden grünen Masse, wo also wohl Wasser- und Nährstoffmangel eintritt. Bald ist dann die Kultur rein rot.

Nach wiederholter Überimpfung in derartige Lösungen wurde von gut schwärmendem Material in Agargemische geimpft und von verschiedenen „Verdünnungen“ Petrischalen gegossen. Folgende Mischungen kamen zur Anwendung:

1. 2% Agar mit verdünnter Erdeabkochung
2. „ „ + 0,1% KNO_3 + 0,02% MgSO_4 + 0,02% K_2HPO_4
3. „ „ + 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ „ „
4. „ „ + 0,1% Asparagin „ „

Überall traten Kolonien von *Haematococcus* auf, die erst grün und je nach der Ernährung früher oder später braun, endlich rot wurden. 1. Auf Erddekoktagar waren die Kolonien klein, gelbbraun, bald rot. 2. Auf Nitratagar erst üppig grün, größer als bei 1., dann braun, zuletzt blutrot. Dieses letzte Stadium erreichten sie nach 3—4 Wochen. 3. Auf Ammonphosphatagar ähnlich, aber nie rein rot. 4. Asparaginagar bewirkte geringe Ausbreitung, sodaß die recht kräftigen Kolonien gewölbt aussahen. Erst waren sie grün, dann olivbraun.

¹⁾ H. C. Jacobsen, Die Kulturbedingungen von *Haematococcus pluvialis*. *Folia microbiologica*, 1912, Bd. I, S. 163.

Reine Kolonien konnten am besten in Nitratagar erzielt werden. Nach einmaliger Wiederholung des Plattengusses war die Reinkultur erzielt. Die Schwierigkeiten bei der Reinkultur, die Jacobsen¹⁾ durch Bakterien erwachsen, welche den Aplanosporen anhafteten, konnten also durch Verwendung von Schwärmermaterial leicht weggeräumt werden.

Es wurden nun noch einige Agarmischungen geprüft, die in Reagenzröhren schräg erstarrt waren. Die Impfung geschah aus einer schwärmerhaltigen Reinkultur in Nährlösung mit Erdabkochung.

1. Nitratagar wie oben;
2. Ammonphosphatagar;
3. Agar mit Erdabkochung und Ammonsulfat;
4. Asparaginagar wie oben;
5. Heydenagar (0,2% Nährstoff Heyden filtr.)²⁾;
6. Fleischextraktagar (0,1% Fleischextrakt);
7. Peptonfleischextraktagar (0,5% Fleischextrakt, 0,2% Pepton);
8. Mannitagar (wie für Azotobaktar, also 2% Mannit ohne besondere N-Quelle außer dem im Agar enthaltenen).

Das Ergebnis war nach 2—3 Wochen im Sommer folgendes:

1. Wachstum nicht sehr reichlich, im Kondenswasser grün, auf der Agarfläche bräunlich.
2. Mehr gewachsen, Sekundärkolonien zahlreicher, alles rein grün.
3. Ähnlich, aber an den trockenen Stellen rötlich.
4. Von dem Impfstrich aus wenig ausgebreitet, dicker, zunächst rein grüner, später olivgrüner, dann rotbrauner Streifen.
5. Ausgezeichnetes Wachstum, ähnlich wie bei 4, aber sehr bald braun, dann rein rot.
6. Wenig Vermehrung.
7. Sehr kleine, dicke, dunkelgrüne Flecke, die später olivgrün werden.
8. Ganz wenig, rein rot.

Zur Weiterzüchtung der Reinkulturen empfahl sich demnach besonders Heydenagar, der auch etwa auftretende Verunreinigungen besonders deutlich verrät, ferner Asparaginagar. Auf diesen Substraten wurde *Haematococcus* nun schon zwei Jahre ohne Schwierigkeit in Reinkultur erhalten. Auch alte, schon ziemlich trockene Kulturen gehen bei Impfung in geeignete Nährlösungen leicht an, und selbst mehrere Monate trockene Kulturen können durch Übergießen mit sterilem Wasser jederzeit zum Leben erweckt werden, sodaß *Haematococcus* sich als immer vorrätiger Laboratoriumsorganismus empfehlen dürfte, der z. B. zur Demonstration der Phototaxis besonders geeignet ist.

¹⁾ Jacobsen 1912 a. a. O. S. 176.

²⁾ Vgl. III. Mitteilung. Diese Beitr. Bd. XII, Heft 1, S. 60.

III. Kultur in anorganischen Nährsalzlösungen.

Für *Haematococcus pluvialis* gibt Wollenweber¹⁾ an, daß er in der Natur an sehr gering konzentrierte Nährmedien angepaßt und dann gewöhnlich hämatochromreich sei. Damit stimmt das recht gute Wachstum in verdünnten, sicher sehr stickstoffarmen Erdauszügen überein. Ferner schreibt der genannte Autor der Art vorwiegend autotrophe Lebensweise zu. Er hat gute Vermehrung unter Zurückgehen des Hämatochroms in Knopscher Nährlösung beobachtet. Auf den letzteren Punkt komme ich noch zurück. Reichenow²⁾ verwendete die etwas einfachere Nährlösung von Molisch mit demselben Ergebnis. *Haematococcus pluvialis* kann also jedenfalls ohne organische Stoffe auf Grund der Kohlensäureassimilation gut gedeihen.

Ferner geht aus diesen Versuchen schon hervor, daß Nitrate geeignete Stickstoffquellen sind. Denn in der Beziehung stimmen die genannten Nährlösungen überein. Dagegen ist die Knopsche durch primäres Kaliumphosphat ganz schwach sauer, die von Molisch durch sekundäres basisch. *Haematococcus* scheint also an die Reaktion der Nährlösung keine besonderen Ansprüche zu stellen. In der Tat konnte ich bestätigen, daß innerhalb gewisser Grenzen schwach saure und basische Flüssigkeiten gleich gut sind, doch wird weniger Säure als Alkali ertragen.

Um weiter in die Nährsalzbedürfnisse von *Haematococcus* einzudringen, mußten aber die Lösungen variiert werden. Und zwar waren neben Nitraten auch Nitrite und Ammonsalze zu prüfen. Ferner war der Einfluß der Konzentration von Bedeutung, denn gerade die Fähigkeit, auch stärkere oder sehr verdünnte Lösungen auszunutzen, dürfte gewissen Mikroorganismen die schnelle Vermehrung und Überwucherung von Mitbewerbern ermöglichen.

Es hätte wenig Wert, die zahlreichen Versuche einzeln aufzuführen. Ich will mich damit begnügen, die Hauptergebnisse wiederzugeben:

1. Von den Stickstoffsalzen hat Nitrit im Gegensatz zu Jacobsens³⁾ Angaben nie irgend welche Vermehrung bewirkt. Ammonsalze werden eher noch etwas besser ausgenutzt als Nitrate. Daß Jacobsen⁴⁾ das Gegenteil angibt, beruht auf der Nichtberücksichtigung der sonstigen Zusammensetzung der Nährflüssigkeit. Dabei spielt nämlich die Reaktion der Lösung insoweit eine Rolle, als z. B. der physiologisch basische Kalisaltpeter eine bessere Vermehrung in neutraler bis schwacher saurer Lösung (0,02—0,05 % KH_2PO_4), das physio-

1) a. a. O. S. 280. 2) a. a. O. S. 7.

3) H. C. Jacobsen, 1912, a. a. O. S. 170.

4) H. C. Jacobsen, 1912, a. a. O. S. 169.

logisch saure Ammonsulfat eine bessere in schwach basischer Lösung (0,02—0,05% K_2HPO_4) ergibt. Setze ich die Menge des K_2HPO_4 auf 0,01% herab wie Jacobsen, so finde ich auch, daß die Ammonsalze ungünstig wirken.

Von den Nitraten erwies sich sowohl das Calcium wie das Kaliumsalz in Konzentrationen bis zu 0,1% als günstig, größere Mengen wurden nicht vertragen. Dies gilt für Lösungen mit KH_2PO_4 . War die Lösung schwach basisch, so mußte die Nitratkonzentration herabgesetzt werden, um Wachstum zu erlauben, und zwar bei KNO_3 bis zu 0,02%, bei $Ca(NO_3)_2$ bis zu 0,05%.

Als Ammonsalze verwendete ich hauptsächlich das Sulfat und Phosphat, ferner das schwer lösliche Ammoniummagnesiumphosphat. Gerade das letztere erwies sich als recht geeignet¹⁾. Ammonphosphat und -sulfat waren gleich günstig. Bei dem letzteren war umgekehrt als bei den Nitraten das Konzentrationsmaximum höher in Gegenwart des sekundären als des primären Phosphates, im ersteren Falle trat bei 0,1%, in letzterem bei 0,02% noch Wachstum ein, nicht aber bei höheren Konzentrationen. Es sind das Dinge, die sich aus der Veränderung der Reaktion in der Lösung erklären, deren Konstatierung aber doch nicht wertlos sein dürfte. Ammonnitrat bewirkte stets nur eine vorübergehende und schwache Entwicklung, wie das auch Jacobsen findet.

Eine einprozentige Lösung der verschiedenen Stickstoffsalze ergab nie ein Wachstum. Neben den genannten Phosphaten war noch 0,01—0,02% $MgSO_4$ und eine Spur Eisen zugegen. Ein Zusatz von Kalksalzen erwies sich nicht als notwendig, doch wurde deren eventuelle Entbehrlichkeit nicht durch besondere Versuche mit eigens gereinigten Substanzen und kalkfreien Gefäßen erhärtet. Eine größere Menge Calcium ist jedenfalls, wie auch Jacobsen²⁾ findet, schädlich. Daraus erklärt sich die wenig günstige Wirkung von Calciumnitrat bei Mengen, die 0,05% überstiegen.

Es ergibt sich also, daß Haematococcus mit Nitraten und Ammonsalzen gedeihen kann, wobei die Reaktion der Lösung eine Rolle spielt. Sie darf im ganzen nach beiden Seiten von der Neutralität etwas abweichen, ohne zu schaden. Die Konzentration an Nährsalzen darf nicht zu hoch sein, sodaß also Wollenweber und Jacobsen recht haben, die eine Anpassung an nährstoffarme Standorte betonen.

Weitere Versuche mit mineralischen Nährlösungen finden sich in dem Abschnitt über die Bedingungen der Schwärmerbildung.

¹⁾ Vgl. I. Mittel. Diese Beiträge, Bd. XI, Heft 2, S. 327.

²⁾ Jacobsen, 1912, a. a. O. S. 167 f.

IV. Kultur in Lösungen mit organischen Stoffen.

Aus dem Vorkommen von *Haematococcus* in der Natur läßt sich für die Möglichkeit einer Ausnutzung organischer Stoffe höchstens das entnehmen, daß wahrscheinlich aus der Erde ausgelaugte Stoffe und nach Wollenweber¹⁾ Viehexkreme die Vermehrung fördern. Da aber der Autor keine Reinkulturen besaß, im Gegenteil sogar betont, daß er organische Substanzen erst durch Bakterien verarbeiten lassen mußte, ehe sie für *Haematococcus* brauchbar waren²⁾, so ist es nicht klar, ob nicht die durch Fäulnis angereicherten anorganischen Nährstoffe die Vermehrung steigerten. Auch Reichenow hat nicht mit Reinkulturen gearbeitet. Dagegen erwiesen sich bei Jacobsen verschiedene andere Volvocineen, besonders *Chlorogonium*, als sehr dankbar für organische Stoffe, sie sind typisch mixotroph und verhalten sich darin ganz ähnlich, wie die früher von mir und anderen untersuchte *Euglena gracilis*.

Für *Haematococcus pluvialis* ist die Mixotrophie, wie gleich vorweggenommen sei, lange nicht so ausgeprägt, und eine gänzlich heterotrophe Ernährung im Dunkeln mit organischen Stoffen wie etwa bei *Chlorogonium euechlorum* und *Euglena gracilis* ließ sich nicht erreichen.

Die Versuche wurden so angestellt, daß Erlenmeyerkölben von 50 ccm Inhalt mit 25 ccm der verschiedenen Nährlösungen beschickt, dreimal im Dampftopf sterilisiert und nach der Impfung mit reinem Material aus Heydenagarröhrchen an einem Nordfenster aufgehängt wurden. Die Nährlösungen enthielten annähernd dieselben Stoffe wie die in ihrer Wirkung auf Blaualgen geprüften³⁾; nämlich organische Säuren, höhere Alkohole, Kohlehydrate und verschiedene Stickstoffverbindungen.

A. Organische Säuren.

Treboux⁴⁾ hat den Versuch gemacht, *Haematococcus* mit Essigsäure im Dunkeln zu ernähren. Das Ergebnis ist, wie oben betont, nicht ganz klar. Doch haben gerade die organischen Säuren schon mehrfach als geeignete Nährstoffe für mixotrophe Organismen gedient⁵⁾.

Die Herstellung der Lösungen war die gleiche wie in der III. Mitteilung. Zunächst kamen die käuflichen Ammonsalze unter Zusatz

¹⁾ a. a. O. S. 284. ²⁾ a. a. O. S. 282.

³⁾ Vgl. III. Mitteilung. Diese Beiträge, Bd. XII, Heft 1, S. 80 ff. Dort nähere Angaben über die verwendeten Substanzen u. a.

⁴⁾ a. a. O. S. 438.

⁵⁾ O. Richter, Die Ernährung der Algen, Leipzig 1911, S. 36 f.; H. Zumbstein, Zur Morphologie u. Physiologie von *Euglena gracilis*, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., Bd. 34, 1900; sowie II. u. III. Mitteilung über Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen, diese Beiträge, Bd. XII, Heft 1.

von Calciumcarbonat zur Anwendung, später sorgfältig titrierte und mit Ammoniak neutralisierte Lösungen der freien Säuren. Von weiteren Salzen waren Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat zugegen, sowie eine Spur Ferriphosphat, alles gelöst in doppelt destilliertem Wasser. Zum Vergleich diente je ein Kolben mit Ammoniummagnesiumphosphat oder Ammonsulfat als Stickstoffquelle. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt, ohne daß kleine Änderungen in den anorganischen Nährsalzen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis gehabt hätten.

	$\frac{1}{200}$ Mol.	$\frac{1}{400}$ Mol.
Oxalsäure	+ ?	+
Essigsäure	—	+
Buttersäure	+ ?	+ ?
Äpfelsäure	+	+ +
Zitronensäure	+	+ +
Weinsäure	+ ?	+
Milchsäure	+ ?	+
(NH ₄)MgPO ₄	+	

Die Zeichen bedeuten: + + sehr gutes, + gutes, + ? recht mäßiges, — kein Wachstum.

Die anorganische Lösung, die zum Vergleich herangezogen wurde, blieb also nur hinter den schwächeren Lösungen von äpfelsaurem und zitronensaurem Ammon zurück. Auch Jacobsen¹⁾ fand, daß Äpfelsäure nicht ungünstig ist. Die stärkeren Lösungen erwiesen sich allgemein als ungünstiger als die schwächeren, besonders bei Essigsäure war der Unterschied sehr groß, da die $\frac{1}{200}$ molekulare Lösung gar keine Vermehrung gestattete.

Gleichartige, ins Dunkle gestellte Lösungen ergaben gar keine Entwicklung.

B. Höhere Alkohole.

Es wurde zunächst ein Versuch mit Mannit in den Konzentrationen 0,2, 0,1 und 0,05% neben Kalisalpeter als Stickstoffquelle angestellt, ohne daß sich eine Förderung oder Schädigung der Vermehrung ergeben hätte. In den weiteren Versuchen kam NH₄MgPO₄ in Anwendung und die Alkohole Glycerin, Erythrit, Mannit und Sorbit in den Konzentrationen 0,2 und 0,05%. Auch hier war kein merklicher Einfluß zu beobachten. Dunkelkulturen waren ohne Erfolg.

C. Kohlehydrate.

Ein Versuch mit Glukose in den Konzentrationen 0,2, 0,1 und 0,05% neben KNO₃ ergab gutes Wachstum. Eine größere Versuchsreihe wurde mit Calciumnitrat als Stickstoffquelle angesetzt, wobei

¹⁾ Jacobsen, a. a. O. S. 179.

ohne Zucker die Vermehrung gering war. Hier ergab sich Förderung durch die verschiedenen Monosaccharide. Von solchen wurden geprüft: Glukose, Fruktose, Galaktose und Arabinose, alle in den Konzentrationen 0,5, 0,2 und 0,05%. Besonders Glukose und Fruktose bewirkten kräftige Vermehrung in einem mit der Konzentration abfallenden Maße. Von den beiden Pentosen waren dagegen die höheren Konzentrationen schon schlechter als die niederen, von denen nur 0,05% Arabinose ein leidliches Wachstum erlaubte, das aber nicht an das in den Lösungen der Hexosen heranreichte. Auch Jacobsen¹⁾ fand Förderung durch Glukose, betont aber, daß nichts davon verzehrt wurde.

Im Dunkeln erfolgte kein Ausschlüpfen und keine Vermehrung. Als die Kulturen nach zwei Monaten ans Licht gebracht wurden, entwickelten sie sich nur in den Hexoselösungen, in den anderen waren die geimpften Zellen, die aus einer braunrot gefärbten Asparaginagar-röhre stammten, abgestorben.

Von Di- und Polysacchariden wurden Saccharose, Milchzucker, Maltose, Inulin, Dextrin, Glykogen und lösliche Stärke²⁾ in 0,2 und 0,04prozentiger Lösung geprüft. Als N-Quelle diente NH_4MgPO_4 , ferner waren 0,01% K_2SO_4 und eine Spur $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$ zugegen.

Keiner der Stoffe hemmte die Vermehrung ganz, aber keiner förderte deutlich gegenüber der Kultur ohne organische Stoffe. Dementsprechend war auch nachher nirgends eine Reduktion von Fehling-scher Lösung zu erzielen, wo sie nicht schon ohne Hydrolyse auftritt. Es scheint also, daß die geprüften Kohlehydrate ganz indifferent für *Haematococcus* sind. Eine Prüfung mit dem Indikator Nilblau ergab nirgends eine Säuerung.

Im Dunkeln keine Vermehrung.

D. Organische Stickstoffverbindungen.

Pepton, Leucin, Alanin, Glycocoll, Asparagin, Acetamid und Fleisch-extrakt wurden zu 0,4, 0,2, 0,1 und 0,01% mit MgSO_4 und K_2HPO_4 in Wasser gelöst. Zum Vergleich dienten 0,2- und 0,1-prozentige $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösungen, die sehr mäßiges Wachstum bewirkten. Demgegenüber war in verschiedenen der Lösungen mit organischen Stoffen mehr oder weniger üppige Vermehrung zu beobachten. Besonders Fleischextrakt (schwach sauer!) war sehr günstig. Bei den geringsten Konzentrationen von Glycocoll, Asparagin und Acetamid war die Vermehrung äußerst

¹⁾ H. C. Jacobsen, 1912, a. a. O. S. 178.

²⁾ Anylum solubile von Merck; gekochte Lösung gibt mit JJK reinblaue, ungekochte lila Färbung. Fehling wird nicht reduziert. Lösung fast ganz klar.

spärlich. Bei Pepton erwies sich 0,4% als zu viel, bei Leucin war erst die geringste Konzentration gut. Alanin war in der höchsten Konzentration am günstigsten. Bei Glycocoll erwiesen sich alle Lösungen als etwa gleich förderlich.

Im Dunkeln trat kein Wachstum ein, dagegen entwickelten sich in den Fleischextraktkulturen Schwärmer, die sich allerdings allmählich zur Ruhe setzten, ohne sich weiter zu vermehren.

Diese eigenartige Wirkung des Fleischextraktes, mit dem auch am Lichte besonders üppige Kulturen erzielt werden konnten, forderte zu einer besonderen Untersuchung heraus. Es fragte sich, ob die im Fleischextrakt vorhandenen stickstoffhaltigen Verbindungen oder vielleicht die schwach saure Reaktion das Ausschlüpfen bewirkten. Deshalb wurde der folgende Versuch angesetzt:

1. 0,2% Fleischextrakt in dopp. dest. Wasser;
2. 0,1% Pepton + 0,05% KH_2PO_4 ;
3. 0,1% Leucin + 0,05% KH_2PO_4 + 0,05% MgSO_4 ;
4. Guanin Merck gesättigte Lösung + " "
5. Acidum uricum Merck gesättigte Lösung + 0,05% MgSO_4 ;
6. 0,05% Acid. asparaginum Merck + " "
7. 0,2% Fleischextrakt, mit Na_2CO_3 neutralisiert, sodaß Lakmus gebläut, Carcuma nicht gebräunt wird;
8. 0,1% Pepton + 0,05% K_2HPO_4 ;
9. 0,1% Leucin + 0,05% K_2HPO_4 + 0,05% MgSO_4 ;
10. Guanin gesättigte Lösung + 0,05% K_2HPO_4 + 0,05% MgSO_4 .

Von jeder Lösung kam ein Kölbchen an ein Nordfenster (22. XI. 13, also schwaches Licht), eins ins Dunkle.

Das Ergebnis war folgendes: Am Licht war das Wachstum fast überall gut, ganz gleich, ob primäres oder sekundäres Phosphat zugegen war. Nur bei Asparagin blieb das Wachstum aus und bei Leucin war es beidemal sehr gering, was den früheren Befunden entspricht.

Im Dunkeln waren schon nach vier Tagen in den meisten Kölbchen mehr oder weniger Schwärmer zu entdecken, am meisten in Fleischextraktlösung, und zwar in der neutralisierten mehr als in der sauren. Bei Asparagin und Leucin schlüpfte nichts aus. Bald verschwanden die Schwärmer wieder, und durch mikroskopische Prüfung konnte festgestellt werden, daß sie am Grunde der Kölbchen in Körnchen zerfielen.

Demnach hat das Ausschlüpfen im Dunkeln nichts mit der Reaktion der Lösung zu tun, sondern wird durch gewisse, an sich förderliche Stoffe hervorgerufen, die aber doch keine Heterotrophie ermöglichen.

Von Eiweißstoffen wurden zunächst Tropon, Nährstoff Heyden, Serum von Pferdeblut (Grübler), Albumin aus Eiweiß (Merek), Casein

puriss. (Merek) geprüft, und zwar in sehr kleinen Mengen in einer Nährlösung, die NH_4MgPO_4 , K_2SO_4 und $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_2$ enthielt. Hier war also organisch und anorganisch gebundener Stickstoff zugegen. Zum Vergleich diente eine gleiche Lösung ohne Eiweißstoffe. Überall erfolgte gute Vermehrung. Die Unterschiede waren gering, nur die rein anorganische Lösung und die mit Serum blieben etwas zurück. Nach vier Wochen waren alle Kulturen mit Eiweißstoffen rot, die ohne Eiweiß rein grün. Sie rötete sich erst viel später.

Nun wurde ein Versuch angesetzt, in dem die Eiweißstoffe die einzige Stickstoffquelle abgaben, also außer ihnen nur noch K_2HPO_4 und MgSO_4 geboten wurde. Als Vergleichskultur kam eine mit NH_4MgPO_4 in Anwendung. Die Vermehrung war nicht so gut und gleichmäßig wie in dem vorigen Versuche. Nährstoff Heyden, Nuclein und Guanin gaben bessere, Serum, Legumin und Tropon schlechtere Entwicklung als die anorganische Lösung. Hier trat allgemein in den Flüssigkeiten mit Eiweiß die Rotfärbung noch früher auf als in dem früheren Versuche. Aus den meisten Eiweißstoffen kann *Haematococcus* jedenfalls seinen Stickstoff nur schwer entnehmen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß *Haematococcus* im allgemeinen durch organische Stoffe kaum gefördert wird, nur Hexosen unter den Kohlehydraten und gewisse Stickstoffverbindungen machen hiervon eine Ausnahme. Fleischextrakt ist besonders günstig. Im ganzen stimmt dieses Ergebnis recht gut überein mit dem, was bei Blaualgen gefunden wurde¹⁾. Vielleicht hängt das mit den ähnlichen Lebensbedingungen zusammen. In beiden Fällen dienen periodisch austrocknende nasse Stellen als Wohnort, sodaß die im Staub vorhandenen oder aus der Erde gelaugten Stoffe zur Nahrung dienen müssen. Diese wirken daher auch auf *Haematococcus* und die untersuchten Cyanophyceen besonders günstig. Eine weitere Übereinstimmung bedeutet die Unfähigkeit zu ganz heterotropher Ernährung, wie sie z. B. bei den typisch mixotrophen *Euglena gracilis*, *Chlorogonium euechlorum* und niederen Algen möglich ist. Wir haben demgegenüber in *Haematococcus pluvialis* wieder eine in der Hauptsache autotrophe Form vor uns, was nicht ausschließt, daß doch gewisse organische Stoffe die Vermehrung fördern und sogar Schwärmerbildung im Dunkeln hervorrufen. Die von O. Richter²⁾ geprüften braunen Süßwasserdiatomeen werden, wie es scheint, durch organische Stoffe mehr gefördert als meine Blaualgen und *Haematococcus*, können aber im Dunkeln auch nicht wachsen.

1) Vgl. III. Mitteilung, S. 84.

2) O. Richter, Zur Physiologie der Diatomeen (I. Mitteil.). Sitz.-Ber. der Wiener Akad. Math.-naturw. Kl. Bd. 115, Abt. I. 1906.

V. Die Bedingungen der Hämatochrombildung.

Nachdem Wollenweber¹⁾ beobachtet hatte, daß die Rotfärbung von *Haematococcus* bei Kultur in Knopscher Nährlösung allmählich zurückgeht und schließlich ganz verschwindet, schenkte Reichenow²⁾ dieser Erscheinung seine besondere Aufmerksamkeit. Soweit das ohne Reinkultur möglich war, hat er die Sache völlig geklärt und durch schöne Abbildungen illustriert. Er ging von der Nährlösung von Molisch aus, die mit der Knopschen in ihrer Wirkung übereinstimmt, und suchte durch Fortlassen der einzelnen Salze den Bestandteil zu ermitteln, der die Rotfärbung verhindert. Es zeigte sich, daß ein Mangel an Phosphor und noch mehr an Stickstoff die Bildung des Hämatochroms veranlaßt. Dabei wirkte der Stickstoff aus Nitraten ebenso wie der aus Ammonsalzen. Auch mit organischen Stoffen, Eiweiß, Pepton, Erbsenwasser, wurde das gleiche Ergebnis, d. h. Unterdrückung der Rotfärbung, erzielt. Diese letzten Versuche sind aber natürlich wegen der Gegenwart von Bakterien nicht beweisend. So zeigte sich denn auch in Reinkulturen, daß die als Stickstoffquellen nicht sehr günstigen Eiweißstoffe viel frühere Bildung des Hämatochroms bewirkten als Nitrate, und diese wieder frühere als Ammonsalze. Immerhin bleibt das Hauptergebnis Reichenows erhalten, daß in Gegenwart gut assimilierbaren Stickstoffs rein grüne *Haematococcus*-zellen gezüchtet werden können, die im Aussehen sehr abweichen von den an natürlichen Standorten meist gefundenen roten, denen ja auch die Gattung ihren Namen verdankt.

Einiges blieb immerhin zu dieser Frage noch zu ergänzen. Wollenweber bemerkte, daß in Knopscher Lösung ein Teil des roten Farbstoffes hartnäckig in der Zelle verharret. Wurde dagegen ein Nähragar mit denselben Salzen verwendet, der mit Wasser überschichtet war, so ging das Hämatochrom bis auf den Augenfleck ganz verloren. Das gleiche Ergebnis liefern nach meinen Versuchen Ammonsalze, die überhaupt etwas bessere Stickstoffquellen für *Haematococcus* zu sein scheinen als Nitrate, ferner Pepton, Fleischextrakt, Alanin etc.

Besonders kräftig war die Rotfärbung in Erdeauszügen, die den natürlichen Medien ähnlich sein dürften. Darin fand schnell Vermehrung statt. Zuerst wurde die Flüssigkeit rein grün gefärbt, bald aber trat ein feiner roter Rand am Flüssigkeitsrande auf, dessen Färbung sich allmählich über die ganze Algenmasse erstreckte, und zwar so, daß ein roter Bodensatz und ein roter Streifen an der

¹⁾ W. Wollenweber, Das Stigma v. *Haematococcus*. Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. XXV, 1907, S. 316, und Untersuchungen über die Algengattung *Haematococcus*. Ebenda Bd. XXVI, 1908, S. 282.

²⁾ a. a. O. S. 7 ff.

Flüssigkeitsoberfläche erschien, während die Schwärmer noch grün waren.

Zu dieser Flüssigkeit wurden nun verschiedene Stickstoffverbindungen gesetzt, um zu sehen, ob sich die schnelle Rotfärbung verzögern oder unterdrücken ließe.

Das Ergebnis war, daß Kalisalpeter und noch mehr Ammonsulfat die Vermehrung begünstigten und gleichzeitig das Auftreten des Hämatochroms verzögerten, so daß bei Zusatz des Ammonsalzes überhaupt keine rein rote Farbe auftrat, sondern ein brauner Satz erzielt wurde. Noch üppiger war das Wachstum in einer Lösung, die neben Erdeauszug 0,1% Fleischextrakt enthielt. Dies war die beste aller geprüften Nährlösungen, in der die Zellen sich monatelang schwärmfähig erhielten und geradezu einen Brei lieferten, der aus rein grünen Zellen bestand. Die Membran war, wie immer bei reichlicher Ernährung kaum abstehend¹⁾. Hierdurch erklärt sich auch der Befund Strasburgers, dessen durch Übergießen des Rohmaterials mit Wasser erzielte Schwärmer zuerst alle hüllenlos waren und später — offenbar nach Verbrauch der Nährstoffe — die abstehende Zellulosemembran aufwiesen²⁾.

Die Wirkung des Erdeauszuges beruht offenbar auf seiner die Vermehrung stark fördernden Eigenschaft im Verein mit Armut an assimilierbarem Stickstoff. Wie schon Reichenow betonte, ist *Haematococcus* nicht der einzige Organismus, der bei Stickstoffmangel eine Vermehrung der gelben und roten Farbstoffe auf Kosten des Chlorophylls aufweist. *Sphaerella nivalis* und *Euglena sanguinea* dürften sich genau so verhalten, wahrscheinlich gilt das gleiche für *Chroolepus iolithus*. Weniger ausgeprägt, aber auf denselben Ursachen beruhend, ist die Erseheinung bei *Euglena gracilis* und Cyanophyteen sowie Seenedesmaccen³⁾, sodaß ihr wohl eine allgemeine, vielleicht ökologische Bedeutung zukommt.

Die Aplanosporenbildung hat direkt nichts mit der Rotfärbung zu tun. Es gibt sehr hämatochromreiche Schwärmer und nahezu rein grüne Ruhezustände. Das erstere ist z. B. in Erdeauszug, das letztere in Fleischextraktlösung zu beobachten. Doeh wird im allgemeinen das Aufgeben des Schwärmzustandes ebenso wie die Rotfärbung an den Mangel des wichtigsten Närelementes, des Stickstoffs, gebunden sein. Wie die anderen Stoffe dabei mitwirken, wurde nicht untersucht. Jedenfalls wird jeder ins Minimum gesetzte Nährstoff die reichliche Vermehrung und damit das Schwärmstadium beenden

¹⁾ Reichenow, a. a. O. S. 4.

²⁾ E. Strasburger, Wirkung des Lichtes und der Wärme auf Schwärm-sporen. Jena 1878. S. 10.

³⁾ Vgl. II. Mitteilung, S. 43.

können. Auch hat Reichenow gefunden, daß der Mangel an Phosphor, wenn auch in geringerem Maße als der des Stickstoffs für die Rotfärbung von Bedeutung ist.

Wenn also die Gegenwart oder das Fehlen einer geeigneten Stickstoffquelle die deutlichste Wirkung auf die Hämatochrombildung ausübt, so sind doch andere Einflüsse nicht ohne Bedeutung. Das zeigen z. B. die Versuche mit Eiweißstoffen (vgl. S. 423), die auch bei Gegenwart einer anderen guten Stickstoffquelle ein beschleunigtes Rotwerden bewirkten. Entsprechend ist die Ansicht von Jacobsen¹⁾, der neben der Anwesenheit indifferenten Verbindungen, die als Wachstumsreize wirksam sein können, auch dem Entwicklungsstadium, der Temperatur, dem Licht und dem Austrocknen einen Einfluß zuschreibt, freilich ohne diese Vermutungen durch überzeugende Versuche zu belegen.

VI. Die Bedingungen der Schwärmerbildung.

Es ist seit langer Zeit bekannt, wie leicht und schnell die Dauerzustände von *Haematococcus* beim Übergießen mit Wasser Schwärmer entlassen. Auch der Zusammenhang dieser Erscheinung mit dem Vorkommen in Regenpfützen ist offensichtlich genug. Der natürliche Standort dürfte in Vertiefungen von Felsen und dergleichen vorliegen, in die allerlei Staub hineingeweht worden ist und die dann bei Wasserzufuhr einer schnell vorübergehenden Vegetation die geeigneten Bedingungen liefern. Ähnlich liegen die Verhältnisse in Dachrinnen. Doch kommt der Organismus auch in Bächen vor.

Strasburger²⁾ fand, daß mit roten *Haematococcus* überzügen versehene Steine nach dem Übergießen mit Wasser schon nach weniger als einem Tage Schwärmer gaben. Wurde das Material aus dem Wasser gehoben und nach 24 Stunden oder später frisch übergossen, so wurden weitere Zoosporen entlassen, und zwar reichlicher als nach bloßer Erneuerung des Wassers. Daraus geht schon hervor, daß das erste Mal noch viele Zellen unbeweglich blieben.

Näher untersucht wurden die Bedingungen der Schwärmerbildung von Freund³⁾, einem Schüler von Klebs. Sein Material stammte aus einem im Freien stehenden, mit allerlei Detritus erfüllten und Wasser enthaltenden Glasaquarium. Wurden die roten Dauercysten mit filtriertem Wasser aus dem Aquarium übergossen, so blieben sie unverändert, auch wenn sie vorher getrocknet worden waren, in de-

¹⁾ Jacobsen, a. a. O. S. 194. ²⁾ E. Strasburger, a. a. O. S. 9.

³⁾ Hans Freund, Neue Versuche über die Wirkungen der Außenwelt auf die ungeschlechtliche Fortpflanzung der Algen. Flora, 1904, Bd. 98, und Dissertation Halle 1907, S. 35.

stilliertem Wasser dagegen entließen sie zu einem gewissen Teil ihren Inhalt als Schwärmsporen. Der Verf. ging deshalb so vor, daß er das Aquariumwasser benutzte und ihm die Nährsalze der Knopschen Lösung zusetzte. Es stellte sich heraus, daß dadurch eine reichliche Schwärmerbildung veranlaßt wurde, die lebhafter war als in destilliertem Wasser, und zwar erwiesen sich die Nitrate als der allein wirksame Bestandteil. Denselben Einfluß hatten ferner Nitrite und Ammonsalze, sodaß es also die Stickstoffzufuhr war, auf die es ankam. Sie bewirkte gleichzeitig ein Zurückgehen des Hämatochromgehaltes.

Einige Versuche in der vorliegenden Frage hat auch Jacobsen¹⁾ angestellt. „Durch mit destilliertem Wasser unter Zusatz verschiedener Verbindungen angestellte Versuche konnte nachgewiesen werden, daß ein massenhaftes Ausschwärmen und also auch eine kräftige Teilung der Aplanosporen nur stattfindet, wenn in dem für das Übergießen benutzten Wasser sämtliche Elemente: N, P, S, K und Mg zu gleicher Zeit vorhanden sind.“ Der Gegensatz dieser Beobachtung zu den Jacobsen unbekanntenen Versuchen von Freund ist, wie ich zeigen werde, nur scheinbar und erklärt sich dadurch, daß der eine die Kulturflüssigkeit, der andere destilliertes Wasser verwendet hat.

I. Um zunächst die Wirkung reinen Wassers auf die Ruhezustände zu studieren, ging ich so vor, daß ich verschiedenartige Kulturen mit Schwärmern erst durch Seidengaze kolierte, um die Flöckchen unbeweglicher Zellen möglichst zu entfernen, dann die Schwärmsporen sich phototaktisch ansammeln ließ und das so gewonnene, aus lauter beweglichen Zellen bestehende Material auf Papierfilterchen brachte. Auf diesen wurde es ganz langsam im Laufe von drei Tagen getrocknet. Die Farbe der Zellen änderte sich dabei nicht. Nun wurden die am kräftigsten gefärbten Stücke der Filter mehrfach mit reinstem destilliertem Wasser gewaschen und dann in mit Chromschwefelsäure gereinigte Erlenmeyerkölbchen aus Jenenser Glas getan und mit doppelt destilliertem Wasser übergossen.

Es kam Material aus folgenden Kulturen zur Anwendung:

1. Vier Monate alte Kultur mit 0,5% Glukose und 0,1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Schwärmer rein grün.
2. Ebenso mit Fruktose. Schwärmer rotbraun.
3. Zwei Monate alte Kultur mit 0,04% Inulin und wenig Ammoniummagnesiumphosphat. Schwärmer rein grün.
4. Vier und einhalb Monate alte Kultur mit $\frac{1}{200}$ Mol. weinsaurem Ammon. Rein grün.

¹⁾ H. C. Jacobsen, Die Kulturbedingungen von *Haematococcus pluvialis*. *Folia microbiologica* 1912, Bd. I, S. 172.

5. Vier Monate alte Kultur mit Erdabkochung und Kalisalpeter, rotbraun.
6. Material aus vier und einhalb Monate alten Heydenagarröhrchen. Dauerzellen dunkelrot, möglichst rein abgehoben.

Nach spätestens 14 Tagen hatten sich überall Schwärmer gebildet, die keine Veränderung der Farbe aufwiesen. Doch waren sie in allen Kulturen spärlich. Der Versuch zeigt, daß durch bloßes Eintrocknen unbeweglich gewordene Zellen in Wasser ohne Nährstoffe nicht viele, aber regelmäßig Schwärmsporen bilden.

Ein Eintrocknen während der kräftigsten Entwicklung wird auch in der Natur oft genug vorkommen, nur daß dann bei Wasserzufuhr die auskristallisierten Nährsalze wieder gelöst werden und ein weit reichlicheres Ausschwärmen erlauben. Bleibt der Standort aber feucht, so gelangen schließlich doch alle Zellen zur Ruhe. Hierfür kommen zwei Ursachen in Betracht, entweder Mangel an lebenswichtigen Elementen oder Anhäufung schädlicher Stoffwechselprodukte. Es fragt sich nun, ob für den auf so verschiedene Weise in den Dauerzustand übergegangenen Organismus jedesmal dieselben Bedingungen zur Wiedererweckung geeignet sind.

Um nun in diese Frage einzudringen, suchte ich zunächst einen bestimmten Nährstoff durch stufenweise Verminderung seiner Menge ins relative Minimum zu setzen, während die anderen in möglichst optimaler Konzentration geboten wurden. Man durfte dann annehmen, daß bei der geringsten, eben noch Entwicklung zulassenden Menge des abgestuften Nährsalzes die Ursache für das Aufgeben der Beweglichkeit im Mangel eben dieses Stoffes zu suchen war. Es mußte sich dann zeigen, ob nur durch Zufuhr des fehlenden Nährstoffes oder auch durch andere Ursachen ein neues Ausschwärmen zu bewirken war.

II. Zunächst wurde die Stickstoffverbindung als abzustufendes Nährsalz gewählt. Neben 0,05% K_2HPO_4 , 0,01% $MgSO_4$, 0,005% $CaSO_4$ und Spur $FeSO_4$ kamen folgende Konzentrationen von Ammonsulfat und Kalisalpeter zur Anwendung:

	0,5%	0,1%	0,01%	0,001%
KNO_3 }	1 5	2 6	3 7	4 8
$(NH_4)_2SO_4$ }	9 13	10 14	11 15	12 16

Von jeder Lösung also 2 Kölbehen mit 50 cem Flüssigkeit.

Zuerst entwickelten sich die Kulturen 10—12 und 14—16, von denen aber die mit 0,001% Ammonsulfat bald etwas zurückblieben und einen braunen Rand an der Flüssigkeitsoberfläche ergaben. Von

den Nitrat-Kulturen gingen die mit der schwächsten Konzentration zuerst an. Schließlich wurde mit Ammonstickstoff überall Entwicklung erzielt, die aber in der höchsten Konzentration gering war, auch verloren die Zellen allmählich die Farbe, während mit Nitrat 1, 2, 5, 6 steril blieben und 4 und 8 wenig bräunlich aussehende Dauerzellen am Wasserrande aufwiesen.

Als alle Schwärmer zur Ruhe gekommen waren, wurden am 20. April folgende Zusätze zu den Kulturen gegeben:

Zu 4 und 8	je	0,01%	KNO_3 ,
" 12	" 16	" "	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
" 11	" 15	" "	MgSO_4 ,
" 9	" 13	" "	K_2HPO_4 ,

und zwar wurden diese Mengen in je 20 ccm sterilisierter Lösung zugefügt. Da nämlich die Kulturen eingedunstet waren und nur noch etwa 40 ccm Lösung enthielten, mußte soviel genommen werden, um die trockenen Ränder sicher unter Wasser zu setzen. Es kamen demnach je 20 ccm 0,03 prozentiger Lösungen zur Anwendung, die bei der Verdünnung auf 60 ccm 0,01% ergaben. Zu den schwächsten Nitratnährlösungen kam Nitrat, zu den Ammonkulturen Ammonsulfat. Die anderen dienten zur Kontrolle.

Schon nach vier Tagen war das Ergebnis klar. Alle neu mit Stickstoff versehenen Kulturen ergaben eine frische Entwicklung, die anderen keine, trotzdem mindestens 11 u. 15 reichlichere Algenmengen enthielten als jene. Als sich das nicht weiter änderte, wurde zu 11 und 9 je eine kleine Menge gefälltes reinstes Calciumcarbonat, zu 15 und 13 0,01% Ammoniummagnesiumphosphat gesetzt. Jetzt zeigte sich etwas neues. Die Kultur 9 wies bald einen hübschen Rand von Schwärmern auf, während 11 nur ganz wenig bewegliche Zellen enthielt. Umgekehrt war die Entwicklung in Kultur 13 minimal, in 15 etwas besser. Also bei zuviel Ammonsulfat hat das Calciumcarbonat gut gewirkt, bei zu wenig das Ammoniummagnesiumphosphat. Letzteres erklärt sich ungezwungen aus der Stickstoffzufuhr, ersteres bedarf einer besonderen Erklärung, die offenbar dadurch zu geben ist, daß die durch Verbrauch des Ammons frei werdende Schwefelsäure hier die Entwicklung gehemmt hat, durch das Calciumcarbonat aber neutralisiert wurde, wodurch die Möglichkeit eines neuen Wachstums gegeben war. Wir haben also eine Ergänzung zu dem schon früher von mir ausgesprochenen Satz: „Das Fehlende wird ergänzt, und der Organismus erwacht zu neuem Leben“¹⁾. Man muß hinzufügen, das Störende wird fortgeschafft, und die Entwicklung kann weitergehen.

¹⁾ E. G. Pringsheim, Kulturvers. mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. II. Mitteil., Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. Diese Beitr., Bd. XII, 1913, S. 46.

Ganz entsprechende Ergebnisse zeitigten die Versuche, in denen abnehmende Mengen des Phosphates neben Ammonsulfat als Stickstoffquelle geboten wurden.

III. Es kamen zur Anwendung 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% MgSO_4 , 0,005% CaSO_4 , Spur FeSO_4 und dazu von K_2HPO_4 in %:

0,05	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005	0,00025	0,0001
1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31	32

Je 4 Kölbchen zu 25 cem.

In allen Kulturen trat eine Entwicklung ein, die aber in den niedersten Konzentrationen sehr gering war und eine deutliche Abstufung zeigte. Einigermaßen günstig war die Vermehrung überhaupt nur bei 0,05% K_2HPO_4 , hier überall kräftig grün mit einem allmählich rot werdenden Rand. Die übrigen Kulturen wurden, von den niedersten Konzentrationen beginnend, nach und nach farblos, was, wie schon in Versuch II und auch später noch als Anzeichen der so schädlichen Säurebildung erkannt wurde.

Als nach etwa sechs Wochen auch die Kulturen mit der höchsten Phosphatgabe, in denen die Säure zum Teil durch deren basische Reaktion neutralisiert war, keine Schwärmer mehr aufwiesen, wurden ähnlich wie früher Zusätze gemacht. Und zwar bekamen:

die Kulturen 1 u. 2 und 9 u. 10 0,01% K_2HPO_4 ,

„ „ 17 „ 18 „ 25 „ 26 „ CaCO_3 .

Schon nach vier Tagen kam in 17 und 25, nach sieben Tagen in 18 und 26 Leben und Bewegung. Der bloße Zusatz von Phosphat, der bei 2 und 10 eine Vermehrung desselben auf das Doppelte, nicht aber auf die Höhe der anderen Kulturen bewirkte, hatte nichts vermocht. Nun erhielten

1 und 2 noch 0,01% CaCO_3 ,

9 „ 10 wenig NH_4MgPO_4 .

Das Calciumcarbonat bewährte wieder seine fördernde Wirkung. Der Zusatz von Ammoniummagnesiumphosphat hatte bei 10 eine leidliche, bei der durch reichlichere Entwicklung schon stärker saueren Kultur 9 eine schwache Vermehrung zur Folge.

Man muß daraus den Schluß ziehen, daß die Säuerung durch Verbrauch der Base aus dem Ammonsulfat die Entwicklung gehemmt und die Bildung von Dauerzellen bewirkt hat, was durch genügende Mengen von sekundärem Phosphat bis zu einem gewissen Grade vermieden oder verzögert werden kann. Dadurch kommt allerdings der Einfluß der Verminderung des Phosphorgehaltes der Lösung nicht klar

heraus. Dafür aber zeigt sich um so deutlicher die Entwicklungserregung durch Abstumpfung der Säure mit Calciumcarbonat.

IV. Dem weiteren Studium dieser Erscheinungen diene der folgende Versuch, der genau so angesetzt wurde wie der vorige, bis darauf, daß hier nur 0,02% Ammonsulfat geboten wurden, weil der Versuch II gezeigt hatte, daß diese Konzentration annähernd die günstigste ist.

Die Parallelkulturen entwickelten sich wieder mit befriedigender Gleichartigkeit. Die beste Vermehrung trat jetzt aber nicht in den höchsten Phosphorkonzentrationen, sondern bei 0,01% auf. Bei noch geringeren Mengen wurde das Wachstum immer geringer, bei 0,0001% war es äußerst schwach. Auch hier war wieder die Entfärbung in den niedersten Stufen zuerst zu beobachten und schritt nach den höheren fort. Nach 14 Tagen war in allen Kulturen mit weniger als 0,0025% K_2HPO_4 alles in Ruhe. Es wurden nun Zusätze gemacht, bei

6, 7, 8	Spur	$Fe_2(PO_4)_2$,
14, 15, 16	"	$Ca_3(PO_4)_2$,
22, 23, 24	"	$CaCO_3$,
30, 31, 32	"	NH_4MgPO_4 .

Nach weiteren fünf Tagen war ein Erfolg zu sehen: 6: Ganz wenig grüne Schwärmer, 7: Grünes Häutchen und Rand, 8: Nichts, 14: Stärkere grüne Haut und Schwärmer, 15 u. 16: Ganz schwache grüne Haut, 22—24: Ganz wenig Schwärmer, 30 u. 31: Grüne Haut und Schwärmer, 32: Nichts; 14 u. 30 entwickelten sich am besten. Die Kulturen mit der geringsten Phosphatmenge waren offenbar schon zu stark geschädigt gewesen. Das schwer lösliche Eisenphosphat hatte noch nicht viel genützt, später wurde die Entwicklung aber gut; das Carbonat dagegen half nichts. Hier ist also der Einfluß der Ergänzung des mangelnden Phosphors ganz deutlich.

Wo von vornherein mehr Phosphat zugegen gewesen war und daher eine tüppigere Entwicklung stattgefunden hatte, wirkte dagegen wieder nur Abstumpfung der Säure entwicklungserregend. Außer mit $CaCO_3$ wurde das auch mit MgO und KOH geprüft. Ein Tropfen Kalilauge z. B. genügte, um in einer der Kulturen mit 0,05% K_2HPO_4 die stillgestandene Entwicklung nach weniger als zwei Tagen wieder anzuregen.

Ogleich sich derartige Versuche noch sehr viel weiter ausbauen ließen, möge das angeführte genügen. Es ist daraus klar ersichtlich, wie gut sich gerade *Haematococcus* dazu eignet, einen Einblick in die Bedeutung der Nährlösungsbestandteile zu gewinnen und die Ursachen für eine Störung der Entwicklung zu ermitteln. Für das Übergehen in den Ruhestand können somit sehr verschiedenartige Gründe ausschlaggebend sein, z. B. Wasserentziehung, Säurebildung, Mangel eines lebenswichtigen Elementes. Was an dem Stillstand

schuld war, läßt sich dann aus der Möglichkeit eines neuen Aufblühens ersehen. Daß z. B. Wasser so oft Schwärmerbildung hervorruft, „hat seinen Grund namentlich in der Entfernung gewisser hemmender Stoffe aus der Umgebung der Cysten“, wie das schon Freund¹⁾ vermutet. Wenn dieser dagegen Stickstoffverbindungen besonders wirksam zur Anregung der Entwicklung findet, so wird der Grund hierfür in der Stickstoffverarmung seines Aquariumwassers gelegen haben, während die anderen Nährelemente zur Gänze vorhanden gewesen sein dürften, wie das unter den geschilderten Bedingungen an sich sehr wahrscheinlich ist. Tatsächlich sind, wie Jacobsen²⁾ richtig betont, alle Nährelemente zur Erzielung reichlichen Schwärmens notwendig. Freund hat also nur einen Sonderfall vor sich gehabt, der freilich in der Natur sehr häufig sein dürfte, denn Haematococcus bevorzugt offenbar stickstoffarme Standorte, womit, wie gezeigt, seine meist kräftig rote Farbe zusammenhängt. Allerdings darf dieses Anzeichen nicht überschätzt werden, denn eben durch diese rote Farbe macht der Organismus sich auffällig, an anderen Standorten wird er oft übersehen.

Das Ergebnis, daß die Beseitigung der die Unterbrechung der Entwicklung bewirkenden Hemmungen neue Schwärmerbildung bewirkt, möge mit dem Befunde von Glade³⁾ verglichen werden. Dieser fand, daß die Sporen von *Cylindrospermum* dann auskeimen, wenn ihnen allein der vorher ins Minimum gesetzte Nährstoff geboten wird, durch dessen Mangel die Bildung der Dauerzellen hervorgerufen worden war. Ob diese Erfahrungen verallgemeinert werden dürfen, müssen neue Untersuchungen zeigen.

VII. Allgemeines.

Versuchen wir, die Erfahrungen, die man bisher bei der Kultur chlorophyllführender Mikroorganismen gesammelt hat, vergleichend zusammenzustellen, so können wir einige allgemeine Regeln auffinden.

Die erste ist, daß auch diejenigen Formen, die durch organische Stoffe gefördert werden, doch einer rein autotrophen Ernährung fähig sind. Bisher liegt kein einziger Fall vor, der zwingend als Ausnahme gedeutet werden müßte. Als ausgesprochen mixotroph dürfen *Chlorogonium euechlorum*, *Englena gracilis* und gewisse kleine Diatomeen gelten. Sie wachsen alle in mineralischen Nährlösungen. Nur für *Navicula minuscula* gibt O. Richter⁴⁾ an, daß sie zwar auf Nähr-

¹⁾ Hans Freund, a. a. O. S. 49. ²⁾ Vgl. S. 427.

³⁾ R. Glade, Zur Kenntnis der Gattung *Cylindrospermum*. Diese Beiträge 1914, Bd. XII, Heft 2, S. 333.

⁴⁾ O. Richter, Zur Physiologie der Diatomeen (I. Mitt.). Sitz.-Ber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien. Mathem.-naturw. Kl. Bd. CXV, Abt. I, 1906.

salzagar, nicht aber in den entsprechenden Lösungen ohne Agar gedeihe. Wahrscheinlich haben Wasser oder Nährsalze irgendwelche schädigende Substanzen enthalten, die durch den Agar entgiftet werden. Nach meinen Erfahrungen wachsen die leicht kultivierbaren kleinen Navicula- und Nitzschiaarten leicht in sorgfältig hergestellten anorganischen Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser. Für Blaualgen haben ich und meine Mitarbeiter gleichfalls zeigen können, daß etwa zehn kultivierte Arten autotroph wachsen. Bei ihrer Ernährung spielen sogar organische Stoffe gar keine Rolle. *Haematococcus* verhält sich ähnlich. Eine besondere Neigung besteht noch, für Desmidiaceen ebenso wie früher für Cyanophyceen einen Bedarf an organischen Stoffen anzunehmen, eine Auffassung, die durch Versuche von Andreesen¹⁾ eine Stütze bekommen zu haben scheint. Doch konnte ich schon in der ersten Mitteilung zeigen, daß eine *Closterium*-, eine *Cosmarium*art und die Mesotaeniacee *Cylindrocystis* mit geeigneten mineralischen Lösungen vorlieb nehmen. Das gleiche zeigte sich in neuen, im hiesigen Institut vorgenommenen Versuchen mit anderen Desmidiaceen- und Mesotaeniaceenarten, von denen weit reichlichere und gesündere Kulturen erzielt wurden als es Andreesen gelang. Es bleiben somit wohl nur noch *Chlamydomonas variabilis* und *Carteria ovata* übrig, die Jacobsen²⁾ nur mixotroph, nicht aber heterotroph oder autotroph ernähren konnte. Vielleicht liegt der Grund für das Versagen in mineralischen Nährlösungen an dem zu hohen Sauerstoffgehalt der Flüssigkeit. Derartige Schädigungen kommen nach meinen Erfahrungen vor, ein Umstand, der bisher zu wenig beachtet worden ist. Sonst ist der Grund des Mißlingens autotropher Kulturen vielfach in Schwermetallspuren des destillierten Wassers, ungeeigneter Konzentration oder Reaktion der Lösung zu suchen. Für derartige Einflüsse sind viele Organismen sehr empfindlich. Agar oder andere kolloidale Stoffe und auch gelöste organische Substanzen können unter Umständen die Wirkung aller dieser Hemmungen ausgleichen.

Die zweite allgemeine Regel, die ich aufstellen möchte, lautet, daß als Stickstoffquelle wohl überall Ammonsalze und Nitrate gleich geeignet sind. Das ist eigentlich auffallend, aber die Erfahrung lehrt es. Molisch und Benecke zeigten es für Grünalgen³⁾. Für Cyanophyceen, *Englena gracilis*, *Nitzschia palea*, ja auch für die farblose *Nitzschia putrida*, dann für *Haematococcus* und einige andere *Chlamydomonadaceen* sowie für Desmidiaceen und Mesotaeniaceen gilt das

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

²⁾ H. C. Jacobsen, Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen. Zeitschr. f. Bot., 1910, Bd. 2, S. 181.

³⁾ Vgl. O. Richter, Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911. S. 56 ff.

gleiche. Allerdings kommt es bei Versuchen zur Erprobung der geeigneten Stickstoffquelle nicht nur auf diese, sondern auch auf die sonstige Zusammensetzung der Lösung, besonders ihre Reaktion, an. Da eine Anhäufung von OH- und besonders H-Ionen schädlich zu sein pflegt, muß für deren Neutralisation gesorgt werden. Aus diesem Grunde sind fast überall von den Nitraten das Kalksalz, von den Ammonverbindungen das sekundäre Phosphat am geeignetsten, weil dabei keine stark dissoziierten Verbindungen zurückbleiben. Werden aber die physikalisch-chemischen Verhältnisse in der Lösung berücksichtigt, so gelingt es wohl stets, mit beiden Arten von Stickstoffverbindungen gute Kulturen zu erzielen.

VIII. Zusammenfassung.

1. Reinkulturen von *HaeMATOCOECUS* sind bei Verwendung von Zoosporen durch Plattenguß mit Salpeteragar leicht zu gewinnen und auf Heyden- oder Asparaginagar weiter zu züchten.

2. Autotrophe Ernährung gelingt mit Ammonsalzen und Nitraten, aber nicht mit Nitriten. Die Reaktion darf nach beiden Richtungen ein klein wenig von der Neutralität abweichen, doch wird weniger Säure als Alkali vertragen. Die Eignung von Ammonsalzen und Nitraten ist je nach der Reaktion der Lösung verschieden.

3. Von organischen Stoffen sind die Hexosen und einige Stickstoffverbindungen förderlich. Besonders günstig wirken Fleischextrakt und Erdeauszug. Höhere Alkohole, organische Säuren, Pentosen, Polysaccharide und einige Aminosäuren haben kaum einen Einfluß. Im ganzen ist die Schädlichkeit der meisten geprüften organischen Stoffe gering, aber auch ihr Nährwert beschränkt. Kultur im Dunkeln gelang nicht.

4. Die Bildung des Hämatochroms wird hauptsächlich durch einen Mangel an ausnützbaren Stickstoffverbindungen veranlaßt und ist besonders intensiv in Erdeauszügen. Durch Ammonsalze, Nitrate und assimilierbare organische Stickstoffverbindungen wird die Rotfärbung verzögert, durch die ersten am meisten, durch die letzten am wenigsten.

5. Für die Ursachen der Schwärmerbildung ist die Beschaffenheit der Dauerzellen ausschlaggebend. Hat Nährstoffmangel das Aufgeben der Beweglichkeit verursacht, so wirkt die Zufuhr des fehlenden Nährstoffes, war das Austrocknen schuld, so genügt Übergießen mit Wasser, haben sich schädliche Stoffwechselprodukte gebildet, so müssen diese fortgeschafft werden, um Schwärmerbildung hervorzurufen.

6. Für chlorophyllführende Organismen dürfte allgemein autotrophe Ernährung mit Nitraten sowohl wie mit Ammonsalzen möglich sein.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1914

Band/Volume: [12_3](#)

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

Artikel/Article: [Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen 413-434](#)