

# Ueber die Widerstandsfähigkeit trockener pflanzlicher Organismen gegen giftige Stoffe.

Von

Walther Kurzwelly.

## Einleitung.

Die Natur hat viele Pflanzen aufzuweisen, welche das Austrocknen ungeschädigt vertragen können. Wir wissen, dass sie in diesem Zustande grosse Resistenz gegen äussere Einflüsse gewinnen. Es zählen hierher Moose, Flechten und Spaltpilze. Viele dieser Pflanzen vertragen, wie ja schon ihr Standort beweist, das Austrocknen selbst bis zur grössten Dürre sehr gut und in beliebiger Wiederholung. Vor allem aber sind die Samen der phanerogamen und die Sporen der kryptogamen Pflanzenwelt austrocknungsfähig.

In Samen und Sporen liegen uns durch harte Schalen respektive derbe Membranen und in manch anderer Weise geschützte und widerstandsfähig gemachte Gebilde vor, sie befinden sich daher den vegetativen Moosen, Flechten und Spaltpilzen gegenüber im Vortheil, denen derartige schützende Einrichtungen fehlen.

Der austrocknungsfähige Organismus wird durch anhaltende Wasserentziehung während der Dauer derselben in einen Zustand der Ruhe versetzt. Der Begriff des Ruhezustandes ist hier mit dem der Trockenstarre eng verknüpft, so eng, dass beide Begriffe für einander eingesetzt werden. Denn in einer Zelle tritt nicht eher der unveränderliche Ruhezustand ein, als bis der Gehalt an Wasser, sei es nun hygroskopisch oder chemisch gebunden, auf ein gewisses Minimum reducirt ist. Erst dann versinkt der Organismus in seinen scheintodähnlichen Zustand. Andererseits ist wasserfreies lebensthäftiges Protoplasma nicht denkbar, und selbst für die schwächste Regung einer Lebensäußerung, für den geringsten Vorgang, der sich im Protoplasmaleibe abspielt, muss eine gewisse

minimale Wassermenge gegenwärtig sein. Auch hier gilt der Satz:  
corpora non agunt nisi soluta.

In dem in Trockenstarre ruhenden Organismus sind daher auch alle Functionen bis auf ein gewisses Minimum brachgelegt. Sie können vollkommen aufgehoben werden, wenn man auf künstlichem Wege die Objecte gänzlich austrocknet; es tritt dann der Fall absoluter Ruhe ein. So zeigt Kochs<sup>1)</sup>), dass bei Samen, welche durch Quecksilberluftpumpe und Phosphorsäureanhydrid getrocknet waren, jedwede Athmung ausbleibt, indem noch nach Monaten die jene Samen umgebende, abgeschlossene Luft sich als völlig normal erwies.

Gleichzeitig wird durch die Austrocknung den Samen, Sporen und dergleichen ein mächtiger Schutz gewährt, der ihnen über viele Klippen hinweghilft: Die Empfindsamkeit des in Starre befindlichen Organismus ist erheblich verringert, er weist äusseren Einflüssen gegenüber grosse Resistenz auf, eine weit grössere jedenfalls, als sie der lebende mit Wasser imbibirte Protoplast im entsprechenden Falle leisten kann. Dies ist eine bekannte Thatsache, für die ja die Natur selbst jederzeit die schönsten Beweise liefert. Zu den physikalischen Einflüssen, wie Kälte, Wärme, Licht, gesellen sich die zahllosen Einflüsse chemischer Natur, die mit jenen auch noch vielfach gleichzeitig in Wirkung treten.

Wissenschaftlich ist namentlich auf dem Gebiete der physikalischen Einflüsse<sup>2)</sup>), wobei ja chemische Veränderungen im Innern des Protoplasten eine Rolle spielen können, gearbeitet worden. Hauptsächlich wurde die Einwirkung extremer Temperaturen studirt, wurden doch hier die wichtigen grundlegenden Thatsachen der Sterilisation aufgestellt.

Ist auch im allgemeinen die Frage der Einwirkung chemischer Substanzen auf pflanzliches Protoplasma schon sehr viel untersucht worden, so hat man doch bislang die specielle Frage, in welcher Weise wasserfreie chemische Agentien auf trockenstarres Protoplasma einwirken, eingehend noch nicht behandelt. So sind die in der Literatur hierüber vorhandenen Angaben zum Theil knapp gehalten und tragen zuweilen den Charakter der mehr nebenbei angestellten Beobachtungen. Eine zusammenstellende, die ver-

1) W. Kochs, Biologisches Centralblatt 1890, Bd. X, p. 684; s. auch Litt. bei Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. I, p. 576; Bd. II, 1. Theil, p. 282.

2) S. Litt. bei Pfeffer, Pflanzenphys., 1. Aufl., Bd. II, p. 431, und 2. Aufl., Bd. II, Th. 1, p. 293 u. 321; Flügge, Mikroorganismen, 1896, Bd. I, p. 437 ff.

schiedenen Punkte gleichzeitig ins Auge fassende und miteinander vergleichende Arbeit ist noch nicht ausgeführt. Auf den Vorschlag meines verehrten Lehrers, des Herrn Geh. Hofrath Prof. Dr. Pfeffer, entschloss ich mich gern, an diese Frage näher heranzutreten.

Wenden wir uns in der bereits vorliegenden Literatur zunächst zu denjenigen Versuchen, die mit trockenen Pilz- oder Bakterien-sporen und Hefen gemacht worden sind.

Gelegentlich seiner Untersuchungen über die Keimung der Pilzsporen macht H. Hoffmann<sup>1)</sup> darauf aufmerksam, dass mit Weingeist angefeuchtete Sporen von *Botrytis vulgaris* nach dem Abdunsten desselben noch auskeimten, dass *Peziza repanda* durch 24ständiges Liegen in absolutem Alkohol nicht geschädigt wurde.

Weitere Mittheilungen machen dann Pasteur<sup>2)</sup> und Claude Bernard<sup>3)</sup>. Ersterer fand, dass Sporen des *Bacillus anthracis* durch mehrtägige Einwirkung von absolutem Alkohol nicht angegriffen wurden, dass hingegen vegetative Milzbrandbacillen alsbald vernichtet wurden. Letzterer operirte mit getrockneter und fernerhin mit frischer Bierhefe. Auf beide liess er absoluten Alkohol einwirken. Die frische vertrug einen viertägigen Aufenthalt, während die getrocknete, 1½ Jahre lang in Alkohol aufbewahrt, sich noch keimfähig zeigte.

Die Pasteur'sche Angabe konnte Koch<sup>4)</sup> bestätigen. In seiner Arbeit über Desinfection theilt er mit, dass er trockene Milzbrandsporen 110 Tage lang der Einwirkung von absolutem Alkohol aussetzte, ohne dass dieselben getötet worden wären. Ebenso wenig vermochte die Sporen 50% wie 30% Alkohol nach 110 Tagen abzutödten. Dagegen bewirkte bereits 8% Alkohol völlige Entwicklungshemmung seiner Milzbrandkulturen, welche demnach noch keine Sporen gebildet haben konnten.

Fernerhin behandelte Koch trockene Milzbrandsporen mit Schwefelkohlenstoff (20 Tage), Chloroform (100 Tage), Benzol (20 Tage): die Sporen keimten, in günstige Bedingungen versetzt, aus. Jedoch wirkte Aether nach 30 Tagen bereits tödtlich.

Die Unwirksamkeit des absoluten Alkohols auf Milzbrand-sporen beweisen schliesslich auch noch Krönig und Paul<sup>5)</sup>. Sie

1) H. Hoffmann, Jahrb. f. wiss. Botan. 1860, Bd. II, p. 331.

2) Pasteur, Compt. rend. 1877, Tome 85, p. 104.

3) Claude Bernard, Leçons sur les phénom. d. l. vie 1878, T. I, p. 95.

4) Koch, Mittheil. aus d. Kaiserl. Ges.-Amte, 1881, Bd. I, p. 263.

5) Krönig u. Paul, Zeitschr. f. Hyg. u. Infect., 1897, Bd. XXV, p. 91.

weisen aber nach, dass Methyl- oder Aethylalkohol, einer wässerigen Quecksilberchlorid- oder Höllensteinlösung in bestimmtem Procentgehalt hinzugefügt, deren Desinfectionswerth erhöhen.

Die gleichen Resultate bringen die zu fast derselben Zeit veröffentlichten Arbeiten von Epstein<sup>1)</sup> und Minervini<sup>2)</sup>.

Schliesslich stellte Lode<sup>3)</sup> an frischen, turgescenten Sporen verschiedener Aspergillusarten Abtötungsversuche mit Alkohol an, die eine sehr geringe Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen absoluten Alkohol ergaben.

Was die hierher gehörenden Versuche an Samen anbelangt, so ist die älteste Angabe bei Nobbe<sup>4)</sup> zu finden. Derselbe constatirt, dass Rothkleesamen 21 Monate lang den Aufenthalt in absolutem Alkohol vertragen. Mit Wasser verdünnter Alkohol wirkte sehr bald schädlich, namentlich auf Lein und Weizen. Auch Aether liess er 10 Tage lang ohne Schädigung auf die Samen einwirken.

Umfassende Versuche an Samen (speciell *Medicago*) stellte Italo Giglioli<sup>5)</sup> an mit Gasen (wie CO<sub>2</sub>, CO etc.) und Flüssigkeiten. Er zeigt vor allem, dass trockene Samen weit widerstandsfähiger sind als feuchte, dass Alkohol, Aether und dergleichen den trockenen Objecten erst nach langer Zeit schädlich werden, und schliesslich, dass Gifte, in Alkohol oder Glycerin gelöst, nicht anders wirken, als Alkohol und Glycerine allein.

Ueber bedeutende Schädigung von Weizen durch eine Schwefelkohlenstoff-Atmosphäre berichtet Ed. Prillieux<sup>6)</sup>. Nach 21 tägiger Einwirkung keimten kaum noch 30% der Früchte aus. Gleichzeitig bemerkte Prillieux schon nach drei Tagen einen Rückgang in der Schnelligkeit des Auskeimens.

Hingegen wirken nach Romanes<sup>7)</sup> Aether- und Chloroformdämpfe nicht oder nur sehr wenig ungünstig auf Samen ein. Romanes studirte 1893 die Einwirkung gewisser Gase und Dämpfe auf trockene Samen verschiedener Pflanzen und lehnte seine Ver-

1) F. Epstein, Zeitschr. f. Hyg. u. Infect., 1897, Bd. XXIV, p. 1—21.

2) R. Minervini, Zeitschr. f. Hyg. u. Infect., 1898, Bd. XXIX, p. 128 ff. u. p. 136 ff.

3) A. Lode, Arch. f. Hyg., 1902, Bd. XLII, Heft 2, p. 141.

4) Nobbe, Samenkunde, 1876, p. 116 u. 283.

5) I. Giglioli, Gazzetta chimica italiana, 1879, Bd. IX, p. 474—505.

6) E. Prillieux, Bull. de la soc. botan. de Fr., 1878, Tome XXV, p. 98—99 u. p. 155—158.

7) G. J. Romanes, cit. bei H. Brown u. F. Escombe, Proceed. of the Royal Soc., 1897, Bd. LXII, p. 160.

suehe zwölf Monate aus, ohne eine wesentliche Schädigung der Samen zu erzielen.

Aehnliches constatirte Coupin<sup>1)</sup>) bei seinen Versuchen an trockenen Samen mit Aether- resp. Chloroformdämpfen, die sich allerdings nur auf einen Zeitraum von ca. 28 Tagen erstreckten. Er hat auch in feuchte Sägespäne ausgesäte Samen luftdicht abgeschlossen verschiedenprozentigen Aetheratmosphären ausgesetzt und dabei bedeutende Schwächung bezw. baldigen Tod der Objecte constatirt.

Ferner findet sich eine Beobachtung über die Unschädlichkeit von Schwefelkohlenstoff für ruhende Samen in einer Arbeit Sandsten's<sup>2)</sup>) über den Einfluss von Gasen und Dämpfen auf das Wachsthum der Pflanzen.

Hier ist auch eine von Hicks und Dabney<sup>3)</sup> 1897 erschienene Arbeit zu citiren, die mir nicht zugänglich war.

0,1% Formaldehydlösung liess W. Kinzel<sup>4)</sup> auf trockene Erbsen, Lupinen, Klee, Gerste, Hafer, Weizen und Roggen einwirken. Er fand, dass selbst nach zweistündiger Behandlung die Objecte noch nicht angegriffen waren.

Schliesslich veröffentlichte in letzter Zeit B. Schmid<sup>5)</sup> seine Untersuchungen über die Einwirkung von Chloroformdämpfen auf ruhende Samen. Aus ihnen geht hervor, dass die Dämpfe bei Erbsen und Weizen verhältnissmässig leicht schädlich wirken, während Samen von *Lepidium sativum* kaum angegriffen werden. Wurden die Samen ganz oder theilweise geschält den Dämpfen ausgesetzt, so gingen sie in kürzester Frist zu Grunde.

Kurze Zeit darauf berichtete R. Kolkwitz<sup>6)</sup> gelegentlich seiner Versuche über die Athmung ruhender Samen, dass diese, in zerriebenem Zustande mit absolutem und selbst mit 96% Alkohol mehrtätig behandelt, nach Abdunstenlassen des Alkohols und nachträglichem Befeuchten mit Wasser die Athmung wieder auf-

1) H. Coupin, Compt. rend., 1899, T. CXXIX, No. 15, p. 561/2.

2) Emil P. Sandsten, Minnesota Bot. Stud, second ser., 1898, Bd. I, p. 53—68.

3) H. G. Hicks and J. C. Dabney, The vitality of seed treated with carbon bisulphid. U. S. Dep. Agr. Divis. of bot. Circ., 11, 1897.

4) W. Kinzel, Landw. Vers.-Stat. 1897, Bd. 48, p. 461—466.

5) B. Schmid, Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch., 1901, Bd. XIX, Heft 2, p. 71—76.

6) R. Kolkwitz, Bericht der Deutsch. botan. Gesellschaft, 1901, Bd. XIX, Heft 4, p. 285.

nehmen, also hierin nicht geschädigt sind. Einige Bemerkungen über die Einwirkung des Alkohols auf das Keimen verschiedener Samen hat erst kürzlich Ludmila Sukatscheff<sup>1)</sup> veröffentlicht.

Trockene Pollen (vorzüglich solche von *Melandrium alb.*) untersuchten P. Rittinghaus<sup>2)</sup> und später auch Strasburger<sup>3)</sup>. Während Chloroform- und Schwefelkohlenstoffdämpfe schon nach 15 resp. 25 Minuten tödtlich wirkten, war dies bei Alkoholdämpfen erst nach 60 Minuten der Fall.

Auf den ersten Blick kann man aus diesen hier aufgeführten Thatsachen zunächst entnehmen, wie sehr die Wirkung von dem grösseren oder geringeren Wassergehalte der untersuchten Objecte und der angewandten chemischen Agentien abhängt. Und wie sehr die Giftwirkung erhöht wird, wenn chemische Agentien mit Wasser verdünnt angewandt werden, oder wasserfrei auf noch lebende, also wasserhaltige Bakterien zur Einwirkung gelangen, zeigen die Angaben der nachstehend citirten Autoren<sup>4)</sup> sehr deutlich.

Die Gegenwart von Feuchtigkeit oder flüssigem Wasser kann in dreierlei Weise verderblich wirken:

1. Die Samenschale, Membran resp. Zellhaut wird erweicht und erleichtert durch Quellung dem umgebenden Medium den Zutritt;

2. das angewandte Medium dringt durch Lösung im Wasser leichter ein;

3. der anfangs im Ruhezustand befindliche Keim oder Protoplast wird durch Wasserzutritt zur Lebenstätigkeit angeregt und eilt nun, weniger widerstandsfähig, rasch dem Untergang zu.

In dem jeweiligen Wassergehalte in dieser oder jener Hinsicht ist wohl der wichtigste in Frage kommende Punkt zu erblicken.

Eine zweite sehr wichtige Frage ist die: vermag das umgebende Agens durch die Samenschale, die Sporenmembran resp. Zellhaut

1) L. Sukatscheff, Beihefte z. botan. Centralbl., 1902, Bd. XII, Heft 1, p. 137 f.

2) P. Rittinghaus, Inaug.-Diss., Bonn 1887.

3) Strasburger, Biol. Centralbl. 1900, Bd. XX, p. 763 f.

4) Miquel, cit. bei Flügge, Mikroorg. 1896, Bd. I, p. 463. — De la Croix, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XIII, p. 175. — Schill u. Fischer, Mittheil. aus d. Kaiserl. Ges.-Amte, 1882, Bd. II, p. 131. — A. Yersin, Ann. de l'Inst. Past., 1888, Bd. II, p. 62. — Sternberg, A manual of Bakt. 1889, p. 189. — Salkowski, Deutsche med. Wochenschr. 1888, No. 16, und Virchow's Archiv, Bd. CXV, Heft 2. — Hanel, Beitr. z. klin. Chirurgie, Bd. 26, Heft 29. — Salzwedel u. Eisner, Berlin, klin. Wochenschr. 37, No. 23; C. 1900, II. 1160. — M. Barsikow, Pharm. Zeitung 1901, No. 46, p. 49—50.

einzu dringen? Bei Gegenwart von Wasser wohl mit der Länge der Zeit stets. Ist aber jede Gegenwart von Wasser ausgeschlossen, so kann der Fall eintreten, dass das betreffende Agens gar nicht zu dem Zellinhalt vordringt, ihn also auch nicht schädigen kann.

Sicher findet dennoch Eindringen statt, wenn das umgebende Medium sich in einem die Membran oder Samenschale imbibirenden Stoffe (wie Oel, Fett) löst<sup>1)</sup>. Dies geht auch aus den später zu schildernden Versuchen hervor. Ist das umgebende Medium einmal eingedrungen, so werden auch Stoffe, soweit sie überhaupt in demselben löslich sind, herausgelöst werden und nach längerem oder kürzerem Zeitraume aus dem Samen oder der Sporenzelle ganz verschwunden sein.

Dritte Frage: In wie weit leidet der betreffende Organismus unter der Herauslösung von Fett, Harz, Oel und sonstigen Stoffen?

In dem Maasse, als das Herauslösen erfolgt, tritt auch eine Erschöpfung des betreffenden Objectes ein, die sich jedoch, wie später noch in dieser Arbeit gezeigt wird (und wie auch schon von einigen Autoren<sup>2)</sup> angegeben ist), zunächst nur in einer Verlangsamung des Auskeimungstermines kundgibt. Direct wird das Object daher, soweit nicht irgend welche Zersetzung des Protoplasmaleibes eintreten, nicht geschädigt, denn so lange, als es sich in dem Medium trockenstarr befindet, braucht es ja jene Stoffe nicht. Immerhin wird mit dem Herauslösen dem Medium die Bahn in das Innere des Organismus freigelegt. Vielleicht ist das Herauslösen von Reservestoffen an sich nicht höher zu bewerthen, als das theilweise Entfernen von Reservematerial, wie es bei Samen durch Abschneiden des einen oder gar beider Kotyledonen ohne Schädigung der ersten Lebensbethärtigung des Embryo ausgeführt werden kann. Denn warum soll ein Embryo, dem doch im Laufe des oft langen Zeitraumes alles Wasser entzogen ist und der, wie bekannt, in diesem Zustande enorm hohe wie niedrige Temperaturgrade bequem verträgt, also gar keine Reactionsfähigkeit aufweist, den Aufenthalt in einem wasserfreien Alkohol oder Aether nicht aushalten können? Man könnte sich vorstellen, dass bei einem z. B. in Aether gelegten Samen der Embryo noch nicht getötet ist, so lange, als er sich in dem Aether befindet. Dass er aber, diesem entnommen

1) Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., Bd. I, p. 158.

2) A. Yersin, l. c., p. 62. — Ed. Prillieux, l. c., p. 99.

und in günstige Lebensbedingungen versetzt, in Folge zu grosser Erschöpfung abstirbt, sobald er aus dem Latenzstadium erwacht.

Die Frage der Wasserentziehung durch Flüssigkeiten wie Alkohol oder Aether aus noch lebenden Zellen dürfte durch die Plötzlichkeit, mit der sie eventuell eintritt, neben der Giftwirkung des eindringenden Mediums eine Rolle spielen. Die schädliche Wirkung kann aber zum Theil wieder aufgehoben werden, da ja mit eintretendem Wasserverlust der erstarrende Protoplast mehr und mehr geschützt wird gegen das feindliche Medium. Bei lufttrockenen Objecten und bei solchen, die vorher im Exsiccator schon ausgetrocknet wurden, kommt eine derartige Schädigung wohl gar nicht in Betracht.

Denn hier geht ein weiteres Entziehen von Wasser nunmehr sehr langsam vor sich. Im Gegentheil wird dadurch die Widerstandsfähigkeit des Objectes nur noch erhöht.

Flüssigkeiten wie Benzol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform, die Wasser gar nicht oder nur wenig lösen, entziehen den betreffenden Objecten auch entsprechend wenig Wasser. Da ihre Löslichkeit in Wasser nicht minder gering ist, so erfolgt auch das Eindringen langsamer als bei Alkohol oder Aether; andererseits bleibt aber auch das Object länger wasserhaltig und ist daher leichter angreifbar.

Man müsste bei diesen Flüssigkeiten eigentlich eine weniger schädliche Wirkung als bei Alkohol und Aether erwarten. Dies trifft auch tatsächlich zu, in gewissen Fällen bei Benzol wenigstens im Vergleich mit Alkohol. Schwefelkohlenstoff jedoch wirkt vor allem bei längerer Dauer des Versuches am ungünstigsten auf die Objecte ein, was wohl einer specifischen Giftwirkung zuzuschreiben ist. Immerhin kann bei Beginn des Versuches der Fall eintreten, dass Schwefelkohlenstoff weniger schädlich einwirkt als der gierig Wasser anziehende absolute Alkohol.

Wie man sieht, können mannigfache Complicationen statthaben bei der Einwirkung genannter Chemikalien, und eine eingetretene Schädigung wird immer durch mehrere Ursachen begründet sein.

Es ist möglich, dass unter Umständen der im vegetativen Zustand befindliche trockenstarre Organismus bei weitem nicht den Widerstand leistet, wie dies ein Samenkorn, eine Pilz- oder Bakterien-spore zu thun vermag. Jedoch erweist sich Hefe, mit der eine Anzahl Versuche angestellt wurden, und an der Sporenbildung niemals beobachtet werden konnte, als erstaunlich widerstandsfähig.

Ihre Widerstandskraft reicht in manchen Fällen an die einer Spore hinan, zuweilen übertrifft sie dieselbe sogar.

Ich möchte hierbei auf die bei Hefe beobachteten, von De Bary<sup>1)</sup> beschriebenen, schleimigen Membranaussenschichten aufmerksam machen, welche beim Eintrocknen gewiss eine schwer durchdringbare Hülle abgeben. Möglicherweise verdankt dieser Schichte die Hefezelle theilweise ihre eminenten Resistenz.

Es würde dies an die Verhältnisse erinnern, die einige Samen der Cruciferen bieten, deren Epidermiszellen in Wasser mächtig quellen und den Samen mit einer Schleimhülle umgeben. B. Schmid<sup>2)</sup> schreibt diesen quellbaren Schichten, die sich beim Austrocknen dicht zusammenlegen, zum Theil die grosse Widerstandsfähigkeit zu, welche lufttrockene Samen von *Lepidium sativum* Chloroform-dämpfen gegenüber aufweisen.

Die eben genannte Arbeit gab auch zu einer besonderen Frage noch Anlass:

B. Schmid hat bei seinen Versuchen mit Dämpfen von Chloroform gearbeitet; er brachte die Samen unter abgeschlossenem Raum in reine Chloroformatmosphäre.

Es kam mir nun darauf an, zu untersuchen, ob ein Unterschied zwischen der Wirkung flüssigen oder dampfförmigen Chloroforms sich herausstelle. Ich wiederholte also die Schmid'schen Versuche und machte gleichzeitig Parallelversuche mit flüssigem Chloroform. Ebenso wurden Aether und auch Schwefelkohlenstoff flüssig und dampfförmig auf ihre Wirkung untersucht.

Es ergab sich nun, dass in der Mehrzahl der Fälle die Medien im Dampfraum schädlicher wirkten als in flüssigem Zustande. Bei einigen Versuchen zeigte sich kein Unterschied, keinesfalls stand das dampfförmig angewandte Medium hinter dem flüssigen in der Wirkung zurück. Natürlich wurden stets gleiche Versuchsanstellungen getroffen.

Dieses Resultat ist gewiss überraschend; man hätte eher das Gegentheil erwarten mögen. Werden doch irgendwelche Stoffe in einer Dampfatmosphäre kaum ausgezogen. Dabei fällt ja die Frage des Auslösens gar nicht so schwer ins Gewicht. Allerdings wurde ölhaltigen Früchten, wie *Helianthus*, die ich in spitzen, auf Flaschen gesteckten Gazedüten in Aether- wie auch Chloroformatmosphäre

1) A. de Bary, Vergl. Morphol. u. Biol. d. Pilze, 1884, p. 10, 11 u. 289.

2) B. Schmidt, l.c., p. 75.

brachte, durch Verdichtung des in dem fetten Oele sich lösenden Dampfes doch eine recht beträchtliche Menge Reservematerial abgezapft.

Bei diesen Versuchen wäre also der Unterschied im Herauslösen ausgeglichen.

### Specieller Theil.

Ich gehe nunmehr zu den von mir angestellten Versuchen über.

Diese erstreckten sich auf Moospflänzchen, ölhaltige und ölfreie Samen wie Früchte, Pilzsporen, Hefezellen, Spaltpilze und deren Sporen.

Und zwar dienten mir von Moosen:

*Ceratodon purpureus*, *Bryum caespiticium*, *Barbula muralis*.

Von Samen und Früchten: *Sinapis alba*, *Trifolium incarnatum*, *Trifol. hybridum*, *Ernum lens*, *Helianthus annuus*, *Pisum sativum*, *Lepidium sativ.*, *Triticum sativ.*

Von Pilzsporen: *Aspergillus niger*, *Phycomyces nitens*.

Als Hefe: *Saccharomyces cerevisiae*.

Von vegetativen Spaltpilzen: *Micrococcus prodigiosus*, *Sarcina rosea*.

Von Bakteriensporen: *Bacillus subtilis*.

Die Pilzsporen und *Micrococcus prodigiosus* konnten von vorhandenen Reinkulturen abgeimpft werden. *Sarcina rosea* war von Král-Prag bezogen. Die Hefe wurde isolirt und rein gezüchtet aus Brauereihefe, *Bacillus subtilis* aus Heuinfus.

Die für die Untersuchungen benutzten chemischen Agentien sind: Alkohol, Aether, Benzol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform. Also theils wasserlösliche, theils nicht lösliche Substanzen.

Aether, Schwefelkohlenstoff und Chloroform wurden ausser in flüssigem auch in dampfförmigem Zustande angewendet.

### Methodisches. — Allgemein.

Bei Versuchen, welche wie die meinigen auf längere und zudem unbestimmte Zeiten sich ausdehnen können und zu vergleichenden Betrachtungen geeignet sein sollen, ist es nothwendig, dass ein für alle Mal gleiches Ausgangsmaterial zur Verfügung steht, dass fernerhin beständig die gleichen Bedingungen in Bezug auf Licht, Temperatur etc. eingehalten werden.

Um in den Fällen, für welche Gegenwart von Wasser thunlichst ausgeschlossen sein sollte, einwandfrei arbeiten zu können, musste ich sicher sein, dass die zur Verwendung gelangenden Chemikalien wasserfrei waren.

Bei Benzol und Schwefelkohlenstoff steht nicht zu befürchten, dass sie mit der Zeit Wasser anziehen. Anders bei Alkohol, Aether und Chloroform. Diese wurden über entsprechend reinem Calciumoxyd aufbewahrt, waren also annähernd trocken, wenn sie in Gebrauch genommen wurden.

Sämtliche Chemikalien wurden vor Licht- wie Luftzutritt geschützt. Ebenso wurden die Glasstopfenflaschen mit ihren in die jeweilige Flüssigkeit eingelegten Objecten unter luftdicht abschliessende Glasglocken gebracht, die gleichzeitig auch Schälchen mit Calciumchlorid, Aetzkalk oder Calciumhydroxyd bargen. Die so beschickten Glasglocken wurden sodann in einem Schranken bei Zimmertemperatur aufgestellt. Unter gleichen Verhältnissen verwahrte ich die Controllobjecte.

Sollten die Objecte den Dämpfen einer Flüssigkeit ausgesetzt werden, so wurde unter die Glasglocke die eine Hälfte einer grossen Petrischale, gefüllt mit Calciumoxyd und der betreffenden Flüssigkeit, gesetzt. Darüber lagen dann auf einem Gestell die Objecte in Säcken aus starker Gaze. Doch musste bei ölhaltigem Material und bei Sporen etwas anders verfahren werden, wie im specielleren Theile zu ersehen ist.

Als Abschluss für diese Glocken eignete sich vorzüglich wasserfreies Glycerin. Dasselbe mischt sich mit Aether, Schwefelkohlenstoff oder Chloroform nicht oder nur wenig und adhärirt an vorher entfetteten, abgeschliffenen Glasplatten ausgezeichnet. Die Wasser anziehende Eigenschaft des Glycerins bringt allerdings die Gefahr mit sich, dass der Raum innerhalb der Glasglocke mit der Zeit nicht mehr absolut trocken bleibt. Jedoch wird das unter der Glocke zugleich befindliche Calciumoxyd jede Spur von Feuchtigkeit an sich reissen.

Die anfangs zum Abschluss benutzte Fettmischung bewährte sich nicht: sie wurde von den anprallenden Dampftheilchen sehr bald gelöst, daher undicht, und zog sich über Glasplatte und Tisch hin. Hingegen blieben die mit Glycerin abgeschlossenen Räume wochenlang intact, die Flüssigkeiten brauchten seltener ersetzt zu werden, da jetzt nur beim Abheben der Glocke Verlust an Dampf eintrat.

Das Trocknen aller Objecte wurde bei Zimmertemperatur im Exsiccatore über Schwefelsäure, Calciumchlorid oder Kaliumhydroxyd ausgeführt. Die Exsiccatoren standen zumeist vor Licht geschützt. Wurden Pilzsporen oder Bakterien getrocknet, so war dies ständig der Fall. War auch von vornherein directes Sonnenlicht stets ausgeschlossen, so hätte auch das zerstreute Tageslicht mit der Länge der Zeit den Bakterien wenigstens Schaden bringen können, so dass sie vielleicht bereits afficirt in die Medien gelangt wären.

### Methodisches bei den Versuchen an Moospflanzen und Samen resp. Früchten.

Die Versuchsanstellung bei Moospflanzen und Samen war einfach.

Die Moospflanzen wurden sorglich ausgesucht, von Erde und Sand durch Schwenken in Wasser befreit, mit Fliesspapier abgetupft und sodann, soweit sie nicht getrocknet werden sollten, unmittelbar also in voller Turgescenz in die betreffenden Flüssigkeiten gebracht. Die Glasstopfenflaschen kamen dann sofort unter eine entsprechende Glasmölle.

Die anderen Moose wurden an der Luft trocknen gelassen und am folgenden Tage erst in den Exsiccatore gebracht. Nach zwei Wochen zumeist wurden sie, nachdem sich eine Probe des getrockneten Materials durch Einweichen in Wasser und Plasmolyse mittels 5- bis 10 proc. Kaliumnitrates als ungeschädigt und zum weiteren Versuch geeignet zeigte, in die Medien eingelegt. Nach Ablauf der Einwirkungsdauer musste, bevor man die Moose auf Lebensfähigkeit untersuchte, natürlich das anhaftende und eingedrungene chemische Agens aus ihnen entfernt werden. Durch Liegenlassen an freier Luft<sup>1)</sup> (ich liess die Objecte zwei Tage lang trocknen) geschieht dies vollständig.

Beim Uebertragen der trockenen Moose in Wasser braucht nach G. Schröder<sup>2)</sup> besonderes stufenweises Vorgehen nicht eingehalten zu werden. Ich habe daher auch, da sich bei zahlreichen Vorversuchen ein Unterschied nicht geltend machte zwischen directem Uebertragen in Wasser und vorherigem Einbringen in feuchte Kammer, die betreffenden Objecte gleich in Wasser eingeweicht und sodann mit meiner Salpeterlösung auf Plasmolysirbarkeit

1) Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. II, Th. 1, p. 346.

2) G. Schröder, Unters. aus d. botan. Inst. Tübingen, 1886, Bd. II, p. 47.

untersucht. Diese wurde für das Lebendigsein des Protoplasten als entscheidend angesehen<sup>1)</sup>.

Dasselbe Verfahren wurde eingehalten, wenn die Moose den Dämpfen einer Flüssigkeit ausgesetzt waren.

Gleichfalls sehr einfach war die Ausführung der Versuche an Samen und Früchten.

Zunächst wurde als Ausgangspunkt die Keimkraft der Versuchsobjecte procentual festgestellt, mochten sie mit oder ohne Samenschale zur Verwendung kommen. Ferner wurden sie nochmals auf Keimfähigkeit geprüft, bevor sie nach dem Aufenthalt im Exsiccator in die Untersuchungsflüssigkeit eingelegt wurden.

In bei den einzelnen Versuchen verschiedenen Zeitintervallen wurden sodann Proben herausgenommen und zwei Tage lang an der Luft bei Zimmertemperatur liegen gelassen. Sodann wurden sie, nach bestimmter Quellungsdauer in Wasser, zwischen feuchtem Fliesspapier in leicht bedeckter Glasschale bei annähernd optimaler Temperatur zur Keimung gebracht.

Zum Schluss des Versuches wurde von den Controllsamen wiederum die procentuale Keimfähigkeit bestimmt. Hat sich bei ihnen an und für sich schon ein Rückgang im Auskeimen eingestellt, so ist dieser natürlich bei der Beurtheilung für die Schädlichkeit eines der Medien für die Versuchsobjecte in Ansatz zu bringen. Da sich manche der Versuche auf einen Zeitraum von über einem Jahre ausdehnen, muss mit einem natürlichen Rückgang jedenfalls gerechnet werden.

Bei Anwendung von Aether-, Schwefelkohlenstoff- oder Chloroformdämpfen auf nicht ölhältige Samen und Früchte beobachtete ich die schon angegebenen Regeln. Diese gestalteten sich bei ölhältigen Objecten jedoch anders, da schon am nächsten Tage der Einwirkung durch die im Oele der Samen sich lösenden und daher ansehnliche Extraction bewirkenden Dämpfe so viel Flüssigkeit condensirt war, dass die Samen richtig darin schwammen, dass also von einem Aufenthalt im Dampfraum nicht mehr die Rede sein konnte. Dies trat, wenn auch minder stark, bei nicht geschälten Samen gleichfalls ein. Die Objecte wurden deshalb in spitz auslaufende Gaze-düten gebracht und die Düten auf weithalsige, tarirte Flaschen gesteckt; die sich verdichtenden Dämpfe konnten nun abtropfen, sodass die Samen sich ständig nur im Dampfraum befanden.

---

1) Pfeffer, l. c., p. 288.

Gleich an dieser Stelle möchte ich noch bemerken, dass bei einer allerdings geringen Anzahl von Versuchen die Menge der bei den einzelnen Proben entnommenen Samen anfänglich nur zehn Stück betrug. Es stellte sich aber heraus, dass diese Zahl denn doch zu klein sei, um einen Rückschluss auf die prozentuale Keimfähigkeit zu gestatten. Es wurde deshalb die Zahl auf 25 festgesetzt und daran bei allen Versuchen festgehalten. Auch diese Menge genügt natürlich noch lange nicht, um gerade von dem prozentualen Keimungsvermögen eine sichere Vorstellung zu geben. Jedoch ist sie, wenn man die Länge der Versuchsdauer in Betracht zieht und die häufige Wiederkehr der Probeentnahme, zur Illustrirung der mehr oder minder schädigenden Wirkung eines Mediums jedenfalls ausreichend.

### Methodisches bei den Versuchen an Pilzen und Bakterien.

Diese Versuche waren ungleich mühevoller und umständlicher, da sie von vornherein peinlichste Aufmerksamkeit gegen irgendwelche Infection namentlich durch Luftübertragung erheischten.

In knapper Darstellung ist das Verfahren folgendes:

Die Reinkulturen, von denen aus die Organismen geerntet wurden, waren gezüchtet

bei <i>Aspergillus niger</i>	auf mit schwach saurer Zuckerlösung getränktem, fractionirt sterilisiertem Brot,
<i>Phycomyces nit.</i>	
bei <i>Saccharom. cerev.</i>	
<i>Micrococc. prod.</i>	
<i>Sarcina ros.</i>	auf Agarnährboden in Petrischalen.
<i>Bac. subtilis</i>	

Die Ernte erfolgte, wenn die jeweilige Kultur auf ihrem Höhepunkte sich befand. Dies war bei den Pilzen nach ca. zehn Tagen der Fall, bei Hefe und *Micrococc. prodig.* nach ungefähr fünf bis sechs Tagen, während die langsamer wachsende *Sarcina rosea* erst nach zwei Wochen lohnenden Ertrag gab. Die Kulturen von *Bacillus subt.* wurden, da es sich ja hier um Erzielung von Sporen handelte, und der Luftzutritt nicht allzu rege sein konnte, erst im Laufe der zweiten oder dritten Woche abgeerntet.

Das Ernten nahm ich, um bei der längere Zeit beanspruchenden Arbeit Verunreinigung meiner Kulturen durch Luft zu vermeiden, stets in einem geräumigen Dampfkasten vor, welcher auch

ständig benutzt wurde beim Uebertragen der in den Versuchsstückigkeiten befindlich gewesenen Objecte auf den betreffenden Nährboden.

Das Verfahren ist derart, dass man in diesen Dampfkasten, der eine Art allseitig abgeschlossenes Glashaus vorstellt, die zu benutzenden Geräthe verdeckt hineinsetzt und hierauf einige Zeit lang reichlich Wasserdampf in den Kasten leitet. Der sich condensirende Dampf reisst dann alle Keime und Staubtheilchen mit sich zu Boden nieder. Man kann nun durch zwei, dicht über dem Boden des Kastens angebrachte, verschliessbare Oeffnungen mit den sterilisirten Armen in das Innere des zugfreien, sterilen Raumes gelangen und ganz ruhig seine Handlungen vornehmen. Zudem gestattet die Grösse des Kastens, eine kleine Spirituslampe für das Ausglühen von Platinneedeln und dergleichen zu brennen. Ich habe in dieser Weise an dem nach Pfeffer'schen Angaben gebauten Apparat oft  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  Stunden gearbeitet, ohne dass mir jemals eine Infection vorgekommen wäre.

Mit Ausnahme von *Phycomyces nitens* wurden nun die in den flachen Petrischalen gezogenen Organismen auf 25 mm lange und 5 mm breite, sterilisierte Streifchen von Filtrerpapier aufgeschmiert: mit steriler Pincette wurden die Streifchen leicht über die Kultur hingezogen und in steriler Schale verwahrt. Entweder kamen sie in dieser sogleich in den Exsiccatore, oder sie wurden frisch sofort in die mit dem jeweiligen Medium gefüllten, vorher lufttrocken sterilisirten Glasstopfenflaschen eingelegt, die in den schon beschriebenen Glasglocken untergebracht wurden.

Das Abernten der *Phycomyces*-Kulturen war etwas einfacher: Die ca. zehn Centimeter hohen Pilzrasen wurden mit steriler Scheere direct abgeschnitten und, in steriles Fliesspapier eingeschlagen, in die Medien eingelegt. Geschah dies in frischem Zustande, so mussten sie vorher zwischen sterilem Fliesspapier nachhaltig abgetupft werden, da sich an den dicht stehenden Hyphen regelmässig viel Condenswasser bildete, welches die chemischen Agentien doch immerhin wesentlich verändert haben würde.

Der Aufenthalt zum Trocknen im Exsiccatore war nicht für alle Organismen von gleicher Dauer. Er erstreckte sich bei den Pilzsporen, Hefe und Heubacillus auf 'zwei Wochen und mehr. *Micrococcus prod.* und *Sarcina rosea* habe ich nicht länger als acht Tage im Exsiccatore lassen können, da ich die Beobachtung machte, dass sie nach zwölftätigem Aufenthalt über Chlorcalcium bereits nicht

mehr recht auskeimen wollten, zum Theil auch schon abgestorben waren.

Die getrockneten Organismen wurden schliesslich nach vorheriger Prüfung auf Keimfähigkeit in die Chemikalien eingelegt.

Sollten deren Dämpfe auf sie einwirken, so wurden sie in sterile, mit Watte verschlossene Kölbchen gebracht, und diese unter die Dampfglocke gesetzt. Ich überzeugte mich, dass Fliegen und die lebenszähen Ameisen, in solcher Weise den Dämpfen ausgesetzt, nach wenigen Minuten verschieden: die Aether-, Schwefelkohlenstoff- oder Chloroformatmosphäre drang also prompt durch den Wattepropf hindurch.

Die je nach dem betreffenden Versuch in bestimmten Zeitabständen entnommene Probe wurde zwei Tage lang in steriles, beiderseits mit Watte verschlossenem Glasrohr bei Zimmertemperatur und Lichtabschluss trocknen gelassen, so dass jede Spur anhaftenden Mediums verdunstete. Dieses vorherige Abdunstenlassen war nothwendig. Denn, wie sich durch Parallelversuche herausstellte, genügte die den Blättchen anhängende sehr geringe Menge von Alkohol, Aether, Benzol oder Schwefelkohlenstoff vollkommen, um *Micrococcus prodig.* beim Uebertragen in die Nährlösung in allen Fällen nachträglich abzutödten, respective am Wachsthum zu verhindern. Bei Hefe wirkten nur Benzol und Schwefelkohlenstoff tödtlich, während die Sporen stets unbehelligt auskeimten. Nichtsdestoweniger habe ich bei allen Versuchen das Austrocknen beibehalten.

Unter allen Kautelen wurden schliesslich die Fliesspapierstreifchen im Dampfkasten auf den Nährboden übertragen. Die Kulturen wurden bei optimaler Temperatur aufgestellt und zur Bestimmung des Auskeimungstermines so weit als möglich kontrollirt.

Der Nährboden war stets von gleicher Zusammensetzung; er bestand bei *Aspergillus* und Hefe in der üblichen, ganz schwach sauren Nährösung (die für Hefe 7% Traubenzucker enthielt), bei *Phycomyces nitens* in gleichfalls schwach saurer Peptonfleisch-extractgelatine, bei *Micrococcus prod.* und *Bacillus subtilis* in schwach alkalischer 1,5% Peptonfleisch-extractbouillon, bei *Sarcina rosea* in einem neutralisirten Gemisch aus gleichen Theilen Bouillon und 10% Heuabkochung.

### Versuche an Moosen.

Die Pflänzchen wurden sowohl frisch, in voller Turgescenz, wie auch trockenstarr der Einwirkung der flüssigen respective dampfförmigen Medien ausgesetzt.

Die frischen Moose waren sehr empfindlich: in keinem Falle vermochten sie, sich am Leben zu erhalten. Die nach 24 Stunden entnommenen Exemplare zeigten den Tod schon makroskopisch durch ihr gelblich fahles bis braunes Aussehen an, das nur bei dem Aufenthalt in Aether sich schön grün erhielt. Lediglich *Barbula muralis* blieb im Aussehen in allen Flüssigkeiten und Dämpfen fast unverändert. Unter dem Mikroskop jedoch war leicht zu erkennen, dass alle drei Moosarten in den flüssigen wie dampfförmigen Medien zu Grunde gegangen waren. Das Protoplasma der Zellen war collabirt, durch den jähnen Wasserverlust stark zusammengezogen, die Chlorophyllkörper erschienen vielfach geschrumpft.

Die verwendeten Flüssigkeiten waren bis auf den Alkohol farblos geblieben; letzterer erschien durch Chlorophyll grün gefärbt.

Auch die 14 Tage lang im Exsiccatore über Chlormalcium getrockneten Moose werden durch den Aufenthalt in den wasserfreien Medien sehr leicht abgetötet. Alkohol und Schwefelkohlenstoff wirken am verderblichsten (nach 24stiündiger Einwirkung war keines der Moose mehr am Leben); Benzol ist für *Bryum caespiticium* und *Barbula muralis* von derselben schädlichen Wirkung, während es für *Ceratodon* erst nach zwei Tagen tödtlich ist. Chloroform in Dampfform kommt Alkohol und Schwefelkohlenstoff gleich, ist aber als Flüssigkeit *Ceratodon* und *Bryum* nach 24 Stunden noch nicht schädlich. Aether hat sowohl in Dampfform wie auch flüssig die geringste Wirkung ausgeübt: *Bryum* und *Barbula* vertragen ihn 24 Stunden ohne wesentliche Schädigung, *Ceratodon* sogar 48 Stunden. Dieses Moos ist somit das widerstandsfähigste.

Ich lasse der Uebersichtlichkeit halber in einer Tabelle das Resultat meiner Untersuchungen an trockenen Moosen folgen. Zu jedem Versuch wurden 50 Pflänzchen gebraucht, aller 24 Stunden wurden je zehn untersucht. Das Minuszeichen in der Tabelle bedeutet Abtötung des Mooses, das Pluszeichen Plasmolysirbarkeit; ferner bedeutet Fl, dass das Medium als Flüssigkeit, D, dass es in Dampfform angewandt wurde.

## Tabelle I.

Einwirkung der Agentien auf die exsiccatortrockenen Moose.

Name des Mooses	Dauer der Einwirkung in Stunden	Alkohol		Aether		Benzol		CS <sub>2</sub>		CHCl <sub>3</sub>	
		Fl	Fl	D	Fl	Fl	D	Fl	D	Fl	D
<i>Ceratodon purp.</i>	24	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—
	48	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	72	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bryum caesp.</i>	24	—	+	+	—	—	—	—	—	+	—
	48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Barbula mural.</i>	24	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Von einiger Wichtigkeit erscheinen mir folgende Beobachtungen:

Im Gegensatz zu den Versuchen an frischen Moosen blieb der auf getrocknetes Material einwirkende absolute Alkohol, obgleich er innerhalb 24 Stunden in allen Fällen tödlich war, farblos, und selbst nach zehn Tagen hatte er nicht die geringste grünliche Färbung.

Ein Unterschied stellte sich weiterhin insofern heraus, als die getrockneten Moose in den Flüssigkeiten makroskopisch ihr Aussehen nicht ändern, gleichgültig wie lange sie denselben ausgesetzt sind. Befeuchtet man sie, nach zweitägigem Liegen an der Luft, mit Wasser, so schwollen sie, mögen sie noch lebendig sein oder nicht, binnen kurzem wieder auf, nehmen ihre natürliche Form an und gleichen den frischen unbehandelten Moosen in jeder Weise. (Die gleiche Erscheinung kann man auch an todtem Herbarmaterial beobachten.)

Schwefelkohlenstoff und seine Dämpfe, wie die Medien in Dampfform überhaupt, wirken schon nach 24 stündiger Exposition leicht bleichend auf die Objecte.

Auffällig ist, dass flüssiges Chloroform für trockenes *Ceratodon* und *Bryum* nach 24 Stunden nicht schädlich ist, während seine Dämpfe in derselben Frist abtödten. *Barbula* hält weder Flüssigkeit noch Dampf aus. Hingegen ist Aether flüssig wie dampfförmig von gleicher Wirkung auf die getrockneten Moose.

Die geschädigten trockenen Moose bieten nach dem Einweichen in Wasser mikroskopisch durch ihren collabirten Zell-

inhalt im grossen ganzen das gleiche Bild wie die frisch in die Medien eingelegten Objecte.

Waren die Moose lebendig, so trat im Durchschnitt nach ca. 15 Minuten Plasmolyse ein, in sehr vielen Fällen aber früher. Dabei machte ich andauernd die Beobachtung, dass, wenn die Moose stark geschwächt waren, die Zellen des Leitbündels schneller und besser plasmolysirt wurden, als die des Mesophylls, dass diese also früher abstarben als jene. Bei *Barbula* trat dies besonders deutlich auf.

In erster Linie ist diesen Versuchen an Moosen zu entnehmen, dass deren Zellwand leicht und sicher von den Medien passirt wird, dass fernerhin durch vorhergehende Austrocknung im Exsiccator der Protoplast wenigstens gegen Aether einigermassen unempfindlich gemacht ist. Zudem zeigen die Versuche, in wie weit dieses Unempfindlichwerden durch Austrocknen eine specifische Eigenschaft des Protoplasmas sein kann; bei genauer Einhaltung gleicher Bedingungen ist das Protoplasma von *Ceratodon* widerstandsfähiger als das der beiden anderen Moose.

### Versuche an Samen und Früchten.

Es seien hier zunächst die Versuche an *Sinapis alba*, *Trifolium incarnatum*, *Trifol. hybridum* und *Eruca lens* beschrieben.

Auch hier interessirte mich in erster Hinsicht die Frage, wie weit Gegenwart von Wasser eine Rolle spielt.

Ich wendete daher

1. in Wasser eingeweichte Samen an, die vor dem Einlegen in die Medien mit Fliesspapier abgetupft worden waren, und
2. im Exsiccator getrocknete Objecte.

Ich liess Alkohol, Aether, Benzol und Schwefelkohlenstoff einwirken, sämmtlich in flüssigen Zustande. Gleichzeitig geben diese Versuchsreihen einen Anhalt zur Beurtheilung der Schädlichkeit der genannten Flüssigkeiten auf Samen.

Der Contrast zwischen eingeweichten und exsiccatorgetrockneten Samen ist sehr gross, die Widerstandsfähigkeit je nach der Art der Samen verschieden.

Bei den gequollenen Objecten ist die Durchlässigkeit der Samenschale für Wasser natürlich sehr wichtig; einen Maassstab dafür bietet zum Theil das mehr oder minder frühzeitige Absterben der Samen, andererseits die benötigte Quellungsdauer.

Denn je mehr das Wasser die Schale zur Quellung gebracht hat, um so leichter vermögen dann die chemischen Agentien dieselbe zu passiren und den Embryo zu erreichen.

In der folgenden Tabelle wie in allen weiteren (sowohl für Samen als auch für Sporen oder Bakterien) bedeutet K die Keimfähigkeit der Objecte. Ein Minuszeichen deutet die erfolgte Abtötung an.

Sämmtliche Tabellen werden nur im Auszug veröffentlicht, da sie in ihrer eigentlichen Ausdehnung zu weitläufig erscheinen würden.

Tabelle II.

Einwirkung der Agentien auf in Wasser eingeweichte Samen.

Samen von	Einwirkg. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	$\text{CS}_2$
<i>Sinapis a.</i> 1 h in Wasser	3	—	—	K 4 %	—
<i>Ervum lens</i> 1 h in Wasser	3	K 40 %	—	K 20 %	K 20 %
	6	K 20 %	—	K 20 %	—
	9	—	—	—	—
<i>Trifol. incarn.</i> 1 h in Wasser	3	K 20 %	—	—	—
	6	K 10 %	—	—	—
	9	K 10 %	—	—	—
<i>Trifol. hybrid.</i> 1 h in Wasser	3	K 50 %	K 30 %	K 40 %	K 50 %
	6	K 50 %	K 20 %	K 20 %	K 20 %
	9	K 30 %	K 10 %	K 30 %	K 30 %
	12	K 30 %	K 10 %	K 20 %	K 20 %
<i>Trifol. hybrid.</i> 2 h in Wasser	3	K 50 %	K 20 %	K 10 %	—
	6	K 20 %	K 10 %	K 10 %	—
	9	K 20 %	—	—	—
<i>Trifol. hybrid.</i> 3 h in Wasser	3	K 50 %	—	—	—
	6	K 10 %	—	—	—

Aus vorliegender Tabelle können wir ersehen, dass *Sinapis* sehr rasch, *Trifol. hybrid.* bedeutend langsamer Wasser aufnimmt. Denn während jener durch einstündiges Quellen so sehr erweicht wird, dass er durch die Medien in kurzer Frist absterben muss, reichen bei *Trifol. hybrid.* zwei und selbst drei Stunden kaum aus, damit die Samen vom Wasser ordentlich durchtränkt werden. Dies gab sich auch schon äusserlich darin kund: *Sinapis* hatte im

Wasser um die Hälfte und mehr an Volumen zugenommen, die Samen von *Trifolium hybrid.* waren nach einstündigem Aufenthalt unverändert. Den Grund dafür hat man wohl zu suchen in der Imprägnation der Samenschale mit Stoffen, die das Benetzen durch Wasser verzögern. Etwas widerstandsfähiger als *Sinapis* sind *Ervum* und *Trifol. incarnatum*.

Die Wirkung der Medien auf die Samen wird eine directe gewesen sein; der durch das Wasser aus seiner Starre erwachte Embryo wird von den eindringenden Medien zerstört worden sein. Dass dieselben in die Samen eindrangen, verbürgte nicht allein das veränderte, glasige, wie paraffinierte Ausschen der Objecte, sondern ich vermochte mich davon dadurch in einfacher Weise zu überzeugen, dass ich die Samen nach dem Trocknen an der Luft zerbiss. Mehr oder minder deutlich trat dann der charakteristische Geschmack des betreffenden Mediums auf.

Durch Herauslösen von Stoffen war den Samen nur sehr wenig entzogen worden. Die Flüssigkeiten waren nicht oder nur schwach gelblich gefärbt und hinterliessen beim Eindampfen äusserst wenig hell- bis dunkelgelben, schmierigen Rückstand.

Das Quellungsvermögen war den Samen durchaus nicht benommen: sie quollen, in günstige Bedingungen versetzt, anfangs sämmtlich. Diejenigen Samen, deren Embryo abgetötet war, wurden jedoch sehr schnell breiig und faulten.

Im Anschluss hieran will ich noch Versuche mit *Lepidium sativum* erwähnen, dessen lufttrockene Samen ich mit 15%, 30%, 60% und 90% und absolutem Alkohol ansetzte.

Am nächsten Tage schon waren bei den drei ersten Versuchen die Samen im wasserhaltigen Alkohol sehr stark gequollen und keimten nicht mehr aus. Die Samen, die in 90% Alkohol gelegen hatten, keimten am ersten Tage noch zu 92%, am dritten zu 50%, am fünften zu 12%, und am siebenten Tage waren sie sämmtlich todt. Im absoluten Alkohol bewahrte ich sie 100 Tage auf, ihre Keimfähigkeit war noch nicht unter 90% gesunken. Die trockenen Samen entzogen also dem Alkohol das Wasser, begannen zu quellen und gingen alsbald durch den nachdringenden Alkohol zu Grunde.

In grellem Gegensatz dazu stehen die mit den im Exsiccator getrockneten Samen angestellten Versuche, deren Resultat die Tabellen III—VI bringen.

Tabelle III.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (28 Tage) Samen von *Sinapis alba*.

K zu Beginn des Versuches 100%. K am Schluss des Versuches 85%.

Dauer der Einwirkg. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
7	K 100%	K 100%	K 100%	K 90%
28	K 90%	K 100%	K 100%	K 80%
70	K 80%	K 90%	K 90%	K 80%
126	K 72%	K 96%	K 84%	K 64%
224	K 64%	K 88%	K 72%	K 56%
336	K 60%	K 80%	K 68%	K 56%
448	K 52%	K 84%	K 72%	K 56%
541	K 48%	K 80%	K 72%	K 60%

Tabelle IV.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (30 Tage) Samen von *Ervum lens*.

K zu Beginn des Versuches 100%. K am Schluss des Versuches 98%.

Dauer der Einwirkg. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
14	K 80%	K 90%	K 50%	K 50%
42	K 70%	K 60%	K 40%	K 50%
93	K 60%	K 48%	K 40%	K 48%
135	K 48%	K 28%	K 28%	K 28%
163	K 40%	K 16%	K 24%	K 20%
205	K 40%	—	K 24%	K 12%
303	K 32%	—	K 20%	—
427	K 32%	—	K 8%	—

Tabelle V.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (28 Tage) Samen von *Trifolium incarnat*.

K zu Beginn des Versuches 100%. K am Schluss des Versuches 60%.

Dauer der Einwirkg. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
7	K 90%	K 100%	K 80%	K 90%
42	K 80%	K 90%	K 80%	K 70%
98	K 84%	K 88%	K 80%	K 76%
259	K 76%	K 80%	K 76%	K 48%
446	K 60%	K 64%	K 56%	K 40%
536	K 44%	K 52%	K 48%	K 44%

## Tabelle VI.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (28 Tage) Samen von *Trifolium hybridum*.

K zu Beginn des Versuches 100%. K am Schluss des Versuches 32%.

Dauer der Einwirkg. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
7	K 100%	K 100%	K 90%	K 100%
35	K 70%	K 90%	K 80%	K 60%
70	K 60%	K 80%	K 60%	K 50%
167	K 60%	K 68%	K 64%	K 40%
251	K 52%	K 60%	K 60%	K 32%
382	K 32%	K 36%	K 40%	K 24%
564	K 24%	K 28%	K 24%	K 24%

Die Widerstandskraft ist durch das Ausschliessen jeglichen Wassergehaltes ausserordentlich gesteigert. Der viele Monate währende Aufenthalt in den Medien hat die Samen in gewissen Fällen so gut wie gar nicht geschädigt, wenn man die Keimkraft der unbehandelten Controllsamen zum Vergleich heranzieht (*Sinapis*, *Trifol. hybrid.*, *Trifol. incarnat.*). *Eruca sativa* dagegen bietet ein sehr ungünstiges Verhältniss; bei ihm keimen die Controllsamen zu 98%, während die Keimkraft der in Alkohol aufbewahrten Samen auf 32% und bei Benzol auf 8% in derselben Zeit gesunken ist. Bedeutend früher schon erlosch sie völlig bei den mit Aether und Schwefelkohlenstoff behandelten Objecten.

Bei den drei anderen Samen ist der Unterschied in der Wirkung der verschiedenen Medien bei weitem nicht so gross: Alkohol rangiert mit Schwefelkohlenstoff ungefähr auf einer Stufe, Aether mit Benzol.

Während bei Alkohol der Abfall im Auskeimen der Samen ein mehr stetiger ist, findet man bei Schwefelkohlenstoff anfangs ähnliche Verhältnisse, dann aber geht es mit einem Male rasch abwärts.

Die über den Samen stehenden Flüssigkeiten waren farblos oder hellgelb im Aussehen, Aether und Schwefelkohlenstoff zumeist farblos. Beim Eindunsten blieb wenig gelblicher Rückstand fettartiger Natur. In wie weit derselbe lediglich aus der Samenschale oder auch von den Samen selbst stammte, habe ich hier nicht weiter untersucht. Dass jedoch die Flüssigkeiten früher oder später in die Samen vordringen, zeigt nicht nur das oft charakte-

ristische glasige Aussehen derselben an, sondern dies wird auch durch den Umstand bewiesen, dass das Auskeimen der Samen nach und nach verlangsamt, dass also eine Schwächung sich bemerkbar macht.

Die Controllsamen hingegen zeigten in dieser Hinsicht nicht den geringsten Rückgang. Diese Thatsache konnte ich nicht nur bei meinen Versuchen an Samen, sondern auch bei den an Mikroorganismen dauernd beobachten.

Die Schwächung im Auskeimen war besonders auffallend bei *Ervum*, dessen Keimlinge zudem oft sehr schwächlich ausfielen und gewöhnlich schnell in Fäulniss übergingen. Dabei quollen die Kotyledonen mächtig auf, das hervorkommende Würzelchen jedoch war häufig krankhaft lang und dünn, und bevor die Kotyledonen zu irgend welcher Entfaltung gelangen konnten, ging das ganze Pflänzchen ein. Die drei anderen Samenarten zeigten ein derartiges Verhalten bislang noch nicht. Es ist ja aber durchaus nicht ausgeschlossen, dass es bei gehöriger Verlängerung der Versuche mit der Zeit hier auch eintritt. Vorläufig ist damit nur gesagt, dass die Samenschale der Linsen für die Medien leichter durchlässig ist, und dass ihr Protoplasma andere specifische Eigenschaften besitzt.

Jedenfalls ist die Reactionsfähigkeit des wasserfreien Protoplasmas im Vergleich zu wasserhaltigem äusserst gering; das Herauslösen von Reservematerial aus den Samen geht nur sehr langsam vor sich.

Die später erfolgenden Versuche an Früchten oder Samen von *Helianthus annuus*, *Pisum sativum*, *Lepidium sat.* und *Triticum sat.* bestätigen die bereits gemachten Erfahrungen vollkommen. Es handelte sich hierbei jedoch in erster Hinsicht um die Lösung folgender Fragen:

1. Bietet die Frucht- resp. Samenschale einen wesentlichen Schutz gegen die Einflüsse chemischer Agentien.
2. Kommen die durch dieselben herausgelösten Stoffe für die Widerstandsfähigkeit des Samens wesentlich in Betracht.
3. In welcher Weise erfolgt das Herauslösen von Reservestoffen.
4. Besteht ein Unterschied in der Wirkung, wenn die chemischen Agentien in flüssigem oder dampfförmigem Aggregatzustand angewendet werden.
5. Sind exsiccatortrockene Objecte wesentlich widerstandsfähiger als lufttrockene.

Ich stellte demnach zunächst Versuche an mit geschältem und intactem Material. Das Schälen war bei *Helianthus* leicht; *Pisum* und *Triticum* liess ich einige Zeit in Wasser weichen, worauf die Schale leicht abzulösen war. Die Samen wurden nachträglich abgetupft und im Exsiccator über Chlorcalcium schnell getrocknet. Diese Procedur vertrugen sie, wie Controllaussaaten bewiesen, ohne jedwede Schädigung.

Geschälte Samen von *Pisum* und *Triticum* wurden durch flüssiges sowie dampfförmiges Chloroform sehr rasch abgetötet. Bereits nach 24ständigem Aufenthalt in den Medien trat Keimung nicht mehr ein. Die Samen fingen zwar zu quellen an, wurden aber schnell breiig und faulten. Sie boten dasselbe Bild wie keimungsunfähige Samen von *Ervum lens*. Zu denselben Resultaten ist übrigens schon B. Schmid gelangt.

Wie sich ungeschältes *Pisum* und *Triticum* dem Chloroform gegenüber verhalten, möchte ich erst an späterer Stelle besprechen. Vorläufig sei daher nur gesagt, dass sie weit mehr Widerstand leisten, dass demnach die Frucht- resp. Samenschale einen nachhaltigen Schutz bietet.

Anders gestalteten sich die Verhältnisse bei *Helianthus* in sofern, als hier die geschälten Objecte relativ sehr lange den Aufenthalt in den Medien zu überstehen vermögen.

Tabelle VII.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatorgetrockene (40 Tage),  
ungeschälte Früchte von *Helianth. annuus*.

K zu Beginn des Versuches 96%—100%.

K am Schluss " " 96%.

Dauer der Einwirkg. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
7	K 84%	K 96%	K 84%	K 88%
28	K 80%	K 92%	K 76%	K 72%
84	K 76%	K 84%	K 72%	K 72%
140	K 64%	K 76%	K 72%	K 64%
Gewicht der ver- wendeten Früchte	19,9	20,0	20,6	20,5
Menge des Oel- auszuges	0,08 = 0,4 %	0,12 = 0,6 %	0,68 = 3,3 %	0,64 = 3,12 %

## Tabelle VIII.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (40 Tage), von der Fruchtschale befreite Samen von *Helianth. annuus*.

Dauer der Einwirkg. in Tagen	K zu Beginn des Versuches 100 %.			
	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
7	K 56 %	K 56 %	K 60 %	K 76 %
14	K 56 %	K 56 %	K 60 %	K 48 %
21	K 52 %	K 52 %	K 44 %	K 44 %
42	K 52 %	K 48 %	K 44 %	K 32 %
84	K 48 %	K 44 %	K 36 %	K 12 %
140	K 44 %	K 36 %	K 36 %	K 12 %
Gewicht der ver- wendeten Samen	10,6	11,1	9,8	10,9
Menge des Oel- auszuges	0,28 = 2,64 %	4,15 = 37,4 %	2,79 = 28,45 %	3,70 = 33,94 %

Ohne weiteres geht aus dem Vergleich beider Tabellen hervor, dass auch hier die Fruchtschale als Schutz für den Samen sehr wichtig ist.

Sie erschwert naturgemäss dem umgebenden chemischen Agens den Zutritt zum Samen und verhindert, wenn dasselbe dieses erste Hinderniss überwunden hat, das Herauslösen von Reservestoffen augenscheinlich. Denn die geringen Mengen von öligem Rückstand, die beim Verdunsten der verschiedenen Flüssigkeiten bleiben, sind nicht von Bedeutung. Wie ich mich überzeugte, werden aus den Fruchtschalen an und für sich schon ölige Producte herausgelöst.

24,3 g *Helianthus*-Fruchtschalen (von insgesamt 600 Früchten) ergaben nach zwölftägigem Digeriren in Aether einen Rückstand von 1,62 g = 6,6 % des Schalengewichtes. Auf die Schalen von 200 Früchten kommen dann durchschnittlich 0,54 g fetten Oeles. Die geringen Oelmengen also, welche den nicht geschälten Früchten in Tabelle VII entzogen wurden, stammen vermutlich der Haupt-sache nach aus den Fruchtschalen.

Bei alledem sind die Medien wirklich zum Samen vorgedrungen: schon nach wenigen Tagen fangen die Früchte an, durchsichtig zu werden, und man sieht deutlich, wenn man die Früchte gegen das

Licht hält, eine beträchtliche Flüssigkeitsmenge zwischen Schale und Samen eingeschaltet.

Fernerhin möchte ich dafür als Beweis anführen, dass Früchte, die, aus dem Medium herausgenommen und getrocknet, völlig geruchlos waren, dennoch den Geruch der jeweiligen Medien aushauchen, wenn man sie vorzeitig in das Keimbett bringt. Wenn ich Früchte aus dem Aether und dergleichen herausnahm und vorsichtig öffnete, so enthielt die herausdringende Flüssigkeit reichlich Oel.

Die Verhältnisse liegen demnach so, dass ein Eindringen der Medien erfolgt, dass jedoch ein weiterer Austausch durch die Schale sehr erschwert ist.

Sehr wenig widerstandsfähig sind Samen, welche geschält und des einen Kotyledo beraubt den Medien ausgesetzt werden. Durch Ausbrechen des Kotyledo wird die Plumula theilweise freigelegt, sie ist dem feindlichen Element schutzlos preisgegeben.

Ich führte den Versuch in folgender Weise aus: geschält, in Wasser eingeweichten *Helianthus*-Samen wurde der eine Samenlappen sehr vorsichtig ausgebrochen, worauf sie im Exsiccator über Chlorcalcium sechs Tage lang getrocknet wurden. Sie hielten dies gut aus: von einer Probe von 30 Exemplaren keimten sämmtliche. Ich brachte hierauf 200 Stück in wasserfreien Aether und entnahm diesem von Tag zu Tag je 25. Nach eintägiger Behandlung keimten 10 Samen, nach zwei Tagen 6, nach drei Tagen 2, nach vier Tagen keiner mehr. Der Oelauszug betrug rund 1 g ( $1,025 = 15\%$  des Samengewichtes (6,8 g).

Es erhellt daraus, dass die Kotyledonen für die Plumula einen wesentlichen Schutz abgeben können.

Wie steht es nun mit Frage 2. Vergleicht man in Tabelle VIII die Keimkraft der Samen mit der Menge des herausgelösten Reservematerials (hier speciell fettes Oel), so wird man gewahr, dass der Rückgang in der Keimfähigkeit der Samen mit dem Oelverlust nicht gleichen Schritt hält. Denn Aether hat ca. 4 g ( $= 37,4\%$ ) entzogen, und Alkohol noch nicht 0,5 g ( $= 2,64\%$ ), Benzol etwas über 2,5 g ( $= 28,45\%$ ), Schwefelkohlenstoff ca. 3,5 g ( $= 33,94\%$ ).

Gleichwohl ist in den drei ersten Fällen die Schädigung der Samen ungefähr dieselbe, im vierten Fall eine unverhältnismässig schwere.

Man sieht, dass der Oelverlust primär gar nicht so in Frage kommen kann, sondern dass die specifische Wirkung des jeweiligen

Mediums in erster Linie Ausschlag gebend ist. Secundär erst, beim Auskeimen, wird der Verlust an Reservematerial von dem Keimling empfunden werden.

Das Herauslösen des Oeles (und demzufolge wohl der Reservestoffe im allgemeinen) erfolgt in centripetaler Richtung, beginnt also an der Peripherie und schreitet in der Weise, als das chemische Agens eindringt, nach dem Innern vor. Zum Nachweis benutzte ich vornehmlich eine nach Zimmermann<sup>1)</sup> hergestellte Lösung von Alkannin in verdünntem Alkohol.

Den nach Tabelle VIII behandelten Samen war im Laufe der zwanzig Wochen das Oel noch nicht völlig entzogen. Oft liess es sich durch Druck zwischen zwei Objectträgern einfach aus den Samen noch herauspressen. Bei denen, die in Aether gelegen hatten, war allerdings nur wenig zu finden.

Es erübrigts jetzt noch, über die Versuche Bericht zu erstatten, welche mit flüssigen und dampfförmigen Medien an lufttrockenen wie auch exsiccator-trockenen, geschälten wie ungeschälten Früchten und Samen angestellt worden sind.

### Tabelle IX.

Einwirkung flüssigen und dampfförmigen Aethers auf exsiccator-trockene (14 Tage), ungeschälte resp. geschälte Früchte von *Helianthus annuus*.

K zu Beginn des Versuches 93% — 98%,  
K am Schluss „ „ 94% — 95%.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Ungeschälte Früchte		Geschälte Früchte	
	Fl	D	Fl	D
7	K 92%	K 84%	K 56%	K 36%
35	K 92%	K 72%	K 44%	K 16%
77	K 80%	K 52%	K 40%	K 12%
189	K 60%	K 48%	K 32%	K 20%
Gewicht der ver- wandten Früchte	18,6	—	11,6	11,0
Menge des Oelauszuges	0,55 = 2,9%	—	3,75 = 32,3%	1,07 = 9,7%

1) Zimmermann, Mikrotechnik, 1892, p. 69.

Tabelle X.

Einwirkung flüssigen und dampfförmigen Chloroforms auf exsiccatortrockene (14 Tage), ungeschälte resp. geschälte Früchte von *Helianthus annuus*.

K s. Tab. IX.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Ungeschälte Früchte		Geschälte Früchte	
	F1	D	F1	D
7	K 92%	K 80%	K 48%	K 60%
35	K 88%	K 72%	K 48%	K 24%
77	K 76%	K 60%	K 20%	K 12%
119	K 48%	K 36%	K 12%	K 12%
189	K 40%	K 20%	K 12%	K 12%
Gewicht der ver- wandten Früchte	20,0	—	10,0	10,3
Menge des Oelauszuges	0,74 = 3,7%	—	3,51 = 35,1%	2,58 = 25%

Gleichzeitig werden mit diesen Versuchen nochmals die Fragen 1 und 2 berührt. Die Ergebnisse stehen mit dem schon Gesagten in vollem Einklang.

Während die *Helianthus*-Früchte nur exsiccatortrocken zur Verwendung gelangten, sind *Pisum*, *Lepidium* und *Triticum* zugleich lufttrocken in Parallelversuchen genommen worden.

Das Resultat, das hierbei die geschälten Objecte lieferten, habe ich schon mitgetheilt, es folgen deshalb nur die Beobachtungen an den nicht geschälten. (Tab. XI—XIII s. p. 320 u. 321.)

Alle fünf Tabellen (IX—XIII) lassen mehr oder minder deutlich erkennen, dass sowohl Aether wie Chloroform im dampfförmigen Zustande energischer wirken als im flüssigen. Allerdings ist den geschälten *Helianthus*-Früchten vom Aether- resp. Chloroform-dampf Oel entzogen worden, aber doch lange nicht so viel wie durch die Flüssigkeiten, wobei man ferner in Betracht ziehen muss, dass der Oelverlust zunächst nicht in Frage kommt. Und trotzdem wirken die Flüssigkeiten nicht so schädlich wie die Dämpfe.

Die ungeschälten *Helianthus*-Früchte gaben in den Dampfräumen kein Oel ab. Die Schale war getränkt von Oel, liess aber keines hindurchtreten. Beim Aufbrechen verbreiteten die Objecte starken Geruch nach Aether oder Chloroform, noch nach zwei Stunden besassen sie den charakteristischen Geschmack dieser Agentien.

Dieselben sind also auch in diesem Falle eingedrungen, ohne ein Herauslösen von Oel erreicht zu haben.

Es wird hierdurch eine Bestätigung für die Seite 317 ausgesprochene Vermuthung gegeben. Dieselbe wird zudem noch dadurch gestützt, dass der hier sogar 27 Wochen einwirkende flüssige Aether auch dieses Mal kein Oel aus dem Innern des Samens durch die Schale herausgelöst hat. Und das Gleiche ergeben die Versuche mit flüssigem und dampfförmigem Chloroform.

Tabelle XI.

Einwirkung flüssigen und dampfförmigen Chloroforms auf ungeschälte,  
a) lufttrockene, b) exsiccatortrockene (18 Tage) Samen von *Pisum sativum*.

K zu Beginn des Versuches bei a) wie b) = 100%,  
K am Schluss „ „ bei a) = 90%, b) = 88%.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Lufttrockene Samen		Exsiccatortrockene Samen	
	D	Fl	D	Fl
7	K 80%	K 92%	K 76%	K 96%
42	K 68%	K 72%	K 76%	K 80%
92	K 52%	K 56%	K 56%	K 64%
147	K 32%	K 40%	K 48%	K 48%
182	K 20%	K 28%	K 28%	K 36%
217	—	K 16%	K 8%	K 24%
252	—	K 4%	—	K 24%
272	—	K 4%	—	K 24%

Tabelle XII.

Einwirkung flüssigen und dampfförmigen Chloroforms auf ungeschälte,  
a) lufttrockene, b) exsiccatortrockene (18 Tage) Früchte von *Triticum sativum*.

K zu Beginn des Versuches bei a) = 92%, b) = 100%,  
K am Schluss „ „ bei a) = 94%, b) = 92%.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Lufttrockene Früchte		Exsiccatortrockene Früchte	
	D	Fl	D	Fl
7	K 36%	K 48%	K 40%	K 64%
28	K 28%	K 40%	K 32%	K 56%
42	K 12%	K 24%	K 24%	K 56%
63	—	K 16%	K 16%	K 40%
92	—	—	K 8%	K 24%
147	—	—	—	K 8%

## Tabelle XIII.

Einwirkung flüssigen und dampfförmigen Chloroforms auf ungeschälte,  
a) lufttrockene, b) exsiccatorgetrocknete (18 Tage) Samen von *Lepidium sativum*.

K zu Beginn des Versuches bei a) wie b) = 100%;

K am Schluss „ „ „ a) „ b) = 100%.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Lufttrockene Samen		Exsiccatorgetrocknete Samen	
	D	Fl	D	Fl
7	K 88%	K 92%	K 84%	K 100%
42	K 84%	K 92%	K 88%	K 100%
119	K 76%	K 92%	K 84%	K 96%
252	K 80%	K 92%	K 80%	K 92%
320	K 76%	K 92%	K 80%	K 92%

In den Tabellen XI—XIII spielt die Frage des Herauslösens keine besondere Rolle, da die bei diesen verwendeten Objecte wenig oder keine Stoffe enthalten, die in Chloroform sich lösen. In der That sind die Flüssigkeiten mit Ausnahme derer, die über *Pisum* gestanden haben, fast farblos und hinterlassen keinen wesentlichen Rückstand.

Auch bei diesen Versuchen ist die schädlichere Wirkung des Chloroforms als Dampf ganz evident, wenngleich die sehr wenig angreifbaren *Lepidium*-Samen einen nur geringen Unterschied bieten.

Was mir schon bei den ersten Versuchen an Samen aufgefallen war, beobachtete ich auch bei den folgenden, Tab.VII—XIII: Mit der Länge der Einwirkungsdauer der Medien gelit die Schnelligkeit im Auskeimen zurück und häuft sich die Zahl der krankhaft austreibenden Samen.

Ich bemerkte hier sogar einen sehr markanten Unterschied in der Wirkung der flüssigen und dampfförmigen Medien, besonders auf *Helianthus*, *Pisum* und *Lepidium*. Die Verlangsamung im Auskeimen tritt bei Anwendung der Medien in Dampfform bedeutend früher ein, als dann, wenn Flüssigkeiten einwirken. Es zeigt sich also auch hierin die giftigere Eigenschaft der Dämpfe.

Ziehen wir schliesslich, soweit angängig, noch in Betracht, inwiefern durch vorheriges Austrocknen im Exsiccator die Objecte geschützt werden.

Die wenigen hierfür angestellten Versuche lassen es nicht zu, ein bindendes Urtheil zu fällen. Immerhin stellt sich bei *Pisum*

und namentlich bei *Triticum* ein merklicher Unterschied zu Gunsten des exsiccatortrockenen Materials heraus. Und dies ist auch zu erwarten. Ist doch bislang zur Genüge dargethan, dass mit zunehmendem Wassergehalt die Resistenz trockenstarrer Organismen zurückgeht.

### Versuche an Pilzen und Bakterien.

Von denselben Gesichtspunkten aus, welche für die Arbeiten an Moosen und Samen die Richtschnur bildeten, sind auch die Versuche an Pilzen und Bakterien angestellt worden. Als solche sind vegetative und Dauerformen untersucht.

Es würde ermüdend wirken, wenn ich jede Organismengruppe einzeln für sich besprechen wollte; da vielfach dieselben Versuche wiederkehren, würden ja eben so oft die gleichen Betrachtungen anzuknüpfen sein. Es werden deshalb die Versuche in bestimmter Reihenfolge gebracht, und jeder Ausführung die dazu gehörigen Tabellen beigegeben.

Ganz allgemein sei vorausgeschickt, dass von den untersuchten Objecten die Dauerformen weit widerstandsfähiger sind als die Vegetativzustände. Selbst die exsiccatortrockenen vegetativen Organismen stehen den frischen ungetrockneten Sporen hierin nach. Hefe bildet, wie schon betont wurde, eine Ausnahme. Sie ist oftmals den Sporen an die Seite zu stellen.

Was die Wirkung der chemischen Agentien auf die Mikroorganismen im allgemeinen anbelangt, so sind im grossen ganzen Alkohol und Schwefelkohlenstoff schädlicher als Aether, Benzol und Chloroform. Jedoch ist dies durchaus nicht die Regel. So wirken Alkohol auf trockene *Phycomyces*-Sporen, Schwefelkohlenstoff auf trockenen *Micrococcus prodigiosus* erstaunlich langsam ein, sie sind diesen Organismen weniger schädlich als die anderen Medien. Man hat eben auch hier mit den specifischen Eigenschaften eines Protoplasmas zu rechnen.

Die in den Tabellen angegebenen Auskeimungstermine sind nur als ungefähre anzusehen. Da das Wachsthum der Kulturen nach 8<sup>h</sup> Abends und vor 7<sup>h</sup> früh nicht controllirt wurde, so ergiebt sich schon ein Spielraum von ca. 12 Stunden. Tagsüber fand eine bestimmte Controlle vier Mal statt, jedoch wurde sie meistens häufiger, sechs bis acht Mal, ausgeübt. Sonntags beschränkte sie

sich auf ein bis zwei Male; doch ich sah darauf, dass Sonnabends frische Kulturen thunlichst nicht angesetzt wurden.

Des ferneren ist zur Erläuterung der späteren Tabellen hinzuzufügen, von welcher Bedeutung in der vordersten senkrechten Reihe die Datumangaben sind. Das erste Datum giebt die Entnahme der Objecte aus den Medien an, das zweite den Termin der Uebertragung auf den Nährboden. In der zwischenliegenden Zeit befanden sich die Objecte in sterilen Glasröhren zum Austrocknen.

Als beginnendes Wachsthum (in den Tabellen mit K bezeichnet) nahm ich bei Bakterien- und Hefekulturen die erste makroskopisch bemerkbare Trübung der Flüssigkeit an, bei den Pilzkulturen das erscheinende Mycel. Die charakteristische Farbe des *Micrococcus prodigiosus* wurde in der Bouillonkultur verdeckt; ich impfte ihn deshalb, um sicher zu gehen, immer erst noch auf Agarröhrchen über und wartete da die rothe Farbstoffbildung ab, bevor der Versuch als gültig angesehen wurde.

Ich beginne mit denjenigen Versuchen, bei welchen die Mikroorganismen in frischem Zustande, ohne vorangegangenen Aufenthalt im Exsiccatore, in die wasserfreien Medien eingelegt wurden.

Die Resultate der Versuche an Vegetativzuständen kann ich da diese in den Medien sehr rasch absterben, in folgendem kurz zusammenfassen: Nach 24 Stunden zeigte sich *Micrococcus prod.* in allen Medien abgestorben. Desgleichen *Sarcina rosea*, die jedoch Alkohol 24 Stunden zu ertragen vermochte und erst nach 2 Tagen getötet war. *Saccharomyces cerev.* hielt Alkohol 3 Tage aus, Aether einen Tag, Benzol und Schwefelkohlenstoff tödten sie nach Verlauf von 24 Stunden.

Um vieles ausdauernder verhielten sich die Pilzsporen. Die auf nächster Seite folgenden Tabellen stellen eine kurze Auswahl der zahlreichen diesbezüglichen Versuche dar.

Während also die vegetativen Formen lediglich dem Alkohol und in einem Falle Aether nur wenige Tage widerstehen, von den übrigen Medien in derselben Frist aber abgetötet werden, zeigen sich die Sporen gegen sämtliche Flüssigkeiten bereits in hohem Grade resistent.

Die Membranen der *Sarcina* und des *Micrococcus* sind offenbar schnell durchtränkt, und auch bei Hefe, welche, wie die folgenden Tabellen zeigen werden, in trockenem Zustande ungemein hohe Ausdauer besitzt, ist dies der Fall. Bei den frischen Hefezellen sind eben jene Membranaussenschichten, deren in der Ein-

Tabelle XIV.

Einwirkung der Agentien auf ungetrocknete Sporen von *Aspergillus niger*.

Beginn der Versuche: 3. VIII. 1900.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
10. 8., 11. 8. 10 <sup>h</sup> +	7	K 12. 8. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 8. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 8. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 8. 9 <sup>h</sup> +
10. 9., 11. 9. 11 <sup>h</sup> +	38	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +
4. 10., 5. 10. 10 <sup>h</sup> +	62	K 6. 10. 10 <sup>h</sup> +	K 6. 10. 10 <sup>h</sup> +	K 6. 10. 10 <sup>h</sup> +	K 7. 10. 11 <sup>h</sup> +
18. 10., 19. 10. 9 <sup>h</sup> +	76	K 20. 10. 12 <sup>h</sup> +	K 20. 10. 9 <sup>h</sup> +	K 20. 10. 9 <sup>h</sup> +	—
29. 11., 30. 11. 2 <sup>h</sup> —	118	—	K 1. 12. 10 <sup>h</sup> +	K 1. 12. 10 <sup>h</sup> +	—
1901.					
5. 2., 6. 2. 4 <sup>h</sup> —	186	—	K 7. 2. 6 <sup>h</sup> —	K 8. 2. 9 <sup>h</sup> +	—
14. 7., 15. 7. 4 <sup>h</sup> —	345	—	K 16. 7. 1 <sup>h</sup> —	K 17. 7. 6 <sup>h</sup> —	—
18. 8., 19. 8. 1 <sup>h</sup> —	380	—	K 20. 8. 1 <sup>h</sup> —	—	—
13. 11., 14. 11. 3 <sup>h</sup> —	467	—	K 16. 11. 9 <sup>h</sup> +	—	—
1902.					
15. 2., 17. 2. 10 <sup>h</sup> +	561	—	K 19. 2. 9 <sup>h</sup> +	—	—

NB.: <sup>h</sup> = vormittags, <sub>h</sub> = nachmittags.

Tabelle XV.

Einwirkung der Agentien auf ungetrocknete Sporen von *Phycomyces nitens*.

Beginn der Versuche: 8. XI. 1900.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
15. 11., 17. 11.	7	K 19. 11.	K 19. 11.	K 19. 11.	K 19. 11.
6. 12., 8. 12. 12 <sup>h</sup> +	28	K 11. 12. 9 <sup>h</sup> +	K 10. 12. 9 <sup>h</sup> +	K 10. 12. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 12. 9 <sup>h</sup> +
1901.					
3. 1., 7. 1. 10 <sup>h</sup> +	56	K 9. 1. 9 <sup>h</sup> +	K 9. 1. 9 <sup>h</sup> +	K 9. 1. 4 <sup>h</sup> —	K 12. 1. 9 <sup>h</sup> +
17. 1., 19. 1. 12 <sup>h</sup> +	70	—	K 21. 1. 9 <sup>h</sup> +	K 22. 1. 4 <sup>h</sup> —	—
28. 2., 4. 3. 3 <sup>h</sup> —	112	—	K 6. 3. 9 <sup>h</sup> +	K 6. 3. 9 <sup>h</sup> +	—
21. 3., 23. 3. 12 <sup>h</sup> +	133	—	—	K 26. 3. 9 <sup>h</sup> +	—
4. 7., 7. 7. 11 <sup>h</sup> +	238	—	—	K 12. 7. 9 <sup>h</sup> +	—
29. 8., 4. 9. 9 <sup>h</sup> +	294	—	—	—	—

leitung bereits Erwähnung gethan wurde, noch in dem gequollenen, schleimigen Zustande und daher leicht durchdringbar.

Die Flüssigkeiten waren in allen Fällen farblos und hinterliessen einen wägbaren Rückstand nicht. Ebenso wenig war durch das Mikroskop eine Veränderung an den Organismen zu erkennen.

Durch die Sporenmembran dringen die Medien, wie es scheint, langsam ein, entsprechend werden den Sporen die löslichen Stoffe nur ganz allmählich entzogen. In der Hauptsache mögen die geringen Rückstände der eingedunsteten, mit Ausnahme von Alkohol farblosen Flüssigkeiten der Sporenmembran selbst entstammen, welche ja Fette und harzhähnliche Stoffe enthält. Dieser Imprägnation verdankt die Spore die schwere Benetzbarkheit mit Wasser. Mit Alkohol extrahirte Sporen benetzen sich in Folge dessen mit Wasser viel leichter.

Alkohol hatte im Laufe der Zeit (namentlich bei den *Aspergillus*-Sporen) eine gelbliche Färbung erhalten; die Sporen zeigten auch daher unter dem Mikroskop ein helleres, ins Graue hinüberspielendes Aussehen im Vergleich zu in normalen Verhältnissen befindlichen Sporen. In Aether bekamen die *Aspergillus*-Sporen schliesslich eine hellröhliche Farbe, ohne ihre Auskeimungsfähigkeit deswegen zu verlieren, und ohne dass Farbstoff in den Aether übergegangen wäre.

Das Aussehen der *Phycomyces*-Sporen hingegen veränderte sich in keinem Falle.

Alkohol wirkt neben Schwefelkohlenstoff am ungünstigsten auf die frischen Sporen ein. Durch seine Eigenschaft, sowohl in Fetten als auch in Wasser löslich zu sein, dringt er leichter vor als Aether oder Benzol und wirkt daher auch früher tödtlich.

Zum Vergleich mit dieser ersten Versuchsreihe habe ich Versuche mit exsiccatorgetrockneten Organismen angestellt. Auch sie wurden mit wasserfreien Medien behandelt.

Für Tabelle XX muss ich vorher mittheilen, dass von Herrn Dr. P. Meischke bereits Versuche mit getrockneten Sporen von *Phycomyces nitens* zur Verfügung standen. Er liess Alkohol und Benzin auf sie einwirken. Der Beginn seiner Versuche datirt vom 9. XII. 1899, im October 1900 konnte ich sie übernehmen.

Die folgenden Tabellen zeigen deutlich, um wie viel widerstandsfähiger der Protoplast wird, wenn ihm durch vorherige Austrocknung das Wasser bis auf ein Minimum entzogen ist.

Tabelle XVI.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockenen (8 Tage) *Micrococcus prodigiosus*.

Beginn der Versuche: 4. XII. 1900.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
11. 12., 12. 12.	7	K 14. 12.	K 14. 12.	K 14. 12.	K 14. 12.
18. 12., 19. 12. 8 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	14	K 20. 12. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>	K 20. 12. 11 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 20. 12. 4 <sup>h</sup> <u>—</u>	K 20. 12. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>
1901.					
1. 1., 2. 1. 10 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	28	—	—	—	K 3. 1. 12 <sup>h</sup> <sub>+</sub>
19. 1., 20. 1. 12 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	46	—	—	—	K 21. 1. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>
5. 2., 6. 2. 3 <sup>h</sup> <u>—</u>	63	—	—	—	K 7. 2. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>
14. 2., 15. 2. 4 <sup>h</sup> <u>—</u>	72	—	—	—	—

Tabelle XVII.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (8 Tage) *Sarcina rosca*.

Beginn der Versuche: 10. VIII. 1901.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>	CHCl <sub>3</sub>
13. 8., 15. 8. 10 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	3	K 16. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 16. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 17. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 17. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 17. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>
17. 8., 19. 8. 1 <sup>h</sup> <u>—</u>	7	K 21. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 20. 8. 12 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 20. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 22. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	—
24. 8., 26. 8. 1 <sup>h</sup> <u>—</u>	14	—	K 28. 8. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 27. 8.	—	—
31. 8., 3. 9. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	21	—	—	—	—	—

Tabelle XVIII.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockenen (16 Tage) *Saccharomyces cerevis*.

Beginn der Versuche: 18. XII. 1900.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
24. 12., 26. 12. 1 <sup>h</sup> <u>—</u>	6	K 28. 12. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 27. 12. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 28. 12. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 28. 12. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>
1901.					
9. 3., 11. 3. 2 <sup>h</sup> <u>—</u>	81	K 13. 3. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 12. 3. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>	K 13. 3. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 13. 3. 12 <sup>h</sup> <sub>+</sub>
14. 6., 17. 6. 5 <sup>h</sup> <u>—</u>	178	K 20. 6. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 19. 6. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 20. 6. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>	K 20. 6. 9 <sup>h</sup> <sub>+</sub>

(Fortsetzung von Tabelle XVIII.)

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
15. 7., 17. 7. 5 <sup>h</sup>	209	K 19. 7. 6 <sup>h</sup>	K 19. 7. 6 <sup>h</sup>	K 20. 7. 5 <sup>h</sup>	K 19. 7. 6 <sup>h</sup>
19. 8., 21. 8. 1 <sup>h</sup>	244	K 24. 8. 9 <sup>+</sup>	K 23. 8. 9 <sup>h</sup>	—	K 23. 8. 6 <sup>h</sup>
30. 9., 2. 10. 12 <sup>h</sup>	286	K 5. 10. 9 <sup>h</sup>	K 4. 10. 9 <sup>h</sup>	—	—
16. 12., 18. 12. 2 <sup>h</sup>	363	K 21. 12. 12 <sup>h</sup>	K 20. 12. 2 <sup>h</sup>	—	—
1902.					
10. 2., 12. 2. 2 <sup>h</sup>	419	—	K 15. 2. 12 <sup>h</sup>	—	—

Tabelle XIX.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (14 Tage) Sporen  
von *Aspergillus niger*.

Beginn der Versuche: 14. V. 1900.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>
21. 5., 22. 5. 11 <sup>h</sup>	7	K 23. 5. 9 <sup>h</sup>	K 23. 5. 9 <sup>h</sup>	K 23. 5. 9 <sup>h</sup>	K 24. 5. 9 <sup>h</sup>
12. 7., 13. 7. 11 <sup>h</sup>	59	K 15. 7. 9 <sup>h</sup>	K 14. 7. 7 <sup>h</sup>	K 14. 7. 9 <sup>h</sup>	K 15. 7. 9 <sup>h</sup>
16. 8., 17. 8. 11 <sup>h</sup>	94	K 19. 8. 10 <sup>h</sup>	K 18. 8. 6 <sup>h</sup>	K 19. 8. 10 <sup>h</sup>	K 19. 8. 10 <sup>h</sup>
13. 9., 14. 9. 10 <sup>h</sup>	122	K 16. 9. 9 <sup>h</sup>	K 15. 9. 12 <sup>h</sup>	K 16. 9. 9 <sup>h</sup>	—
18. 10., 19. 10. 12 <sup>h</sup>	157	K 21. 10. 10 <sup>h</sup>	K 21. 10. 10 <sup>h</sup>	K 21. 10. 6 <sup>h</sup>	—
1901.					
5. 2., 6. 2. 4 <sup>h</sup>	267	K 9. 2. 9 <sup>h</sup>	K 8. 2. 9 <sup>h</sup>	K 8. 2. 4 <sup>h</sup>	—
6. 5., 7. 5. 4 <sup>h</sup>	357	—	K 9. 5. 9 <sup>h</sup>	K 8. 5. 6 <sup>h</sup>	—
14. 11., 15. 11. 3 <sup>h</sup>	549	—	K 17. 11. 9 <sup>h</sup>	K 17. 11. 9 <sup>h</sup>	—
1902.					
15. 2., 17. 2. 10 <sup>h</sup>	642	—	K 19. 2. 9 <sup>h</sup>	—	—

Tabelle XX.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (14 Tage) Sporen  
von *Phycomyces nitens*.

Beginn der Versuche: 9. XII. 1899 resp. 5. XI. 1900.

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einw. in Tagen	Alkohol	Benzin
1900.			
15. 10., 17. 10.	310	K 20. 10.	K 20. 10.
17. 12., 19. 12.	373	K 21. 12. 6 <sup>h</sup>	K 22. 12. 9 <sup>h</sup>

(Fortsetzung von Tabelle XX.)

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einw. in Tagen	Alkohol	Benzin
1901.			
30. 1., 1. 2. 4 <sup>h</sup> —	417	K 4. 2. 11 <sup>h</sup> +	—
13. 6., 15. 6. 12 <sup>h</sup> +	551	K 18. 6. 12 <sup>h</sup> +	—
30. 10., 4. 11. 2 <sup>h</sup> —	690	K 7. 11. 9 <sup>h</sup> +	—
1902.			
27. 2., 1. 3. 10 <sup>h</sup> +	810	K 5. 3. 9 <sup>h</sup> +	—

  

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einw. in Tagen	Aether	CS <sub>2</sub>
12. 11., 14. 11.			
	7	K 16. 11.	K 17. 11.
1901.			
30. 1., 1. 2. 4 <sup>h</sup> —	86	K 3. 2. 9 <sup>h</sup> +	K 4. 2. 11 <sup>h</sup> +
14. 3., 16. 3. 2 <sup>h</sup> —	129	K 20. 3. 9 <sup>h</sup> +	—
31. 8., 4. 9. 9 <sup>h</sup> +	299	K 6. 9. 9 <sup>h</sup> +	—
30. 10., 4. 11. 2 <sup>h</sup> —	359	K 6. 11. 9 <sup>h</sup> +	—
1902.			
27. 2., 1. 3. 10 <sup>h</sup> +	479	K 4. 3. 9 <sup>h</sup> +	—

Tabelle XXI.

Einwirkung der Agentien auf exsiccatortrockene (25 Tage) Sporen  
von *Bacillus subtilis*.

Beginn der Versuche: 3. VI. 1901.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	CS <sub>2</sub>	CHCl <sub>3</sub>
10. 6., 12. 6. 6 <sup>h</sup> —	7	K 14. 6. 9 <sup>h</sup> +	K 13. 6. 4 <sup>h</sup> —	K 13. 6. 4 <sup>h</sup> —	K 14. 6. 4 <sup>h</sup> —	K 13. 6. 2 <sup>h</sup> —
9. 9., 11. 9. 11 <sup>h</sup> +	98	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +	K 13. 9. 12 <sup>h</sup> +	K 12. 9. 9 <sup>h</sup> +
21. 10., 23. 10. 2 <sup>h</sup> —	140	K 25. 10. 8 <sup>h</sup> +	K 25. 10. 8 <sup>h</sup> +	K 25. 10. 8 <sup>h</sup> +	—	K 25. 10. 8 <sup>h</sup> +
1902.						
27. 1., 29. 1. 4 <sup>h</sup> —	238	K 1. 2. 9 <sup>h</sup> +	K 31. 1. 9 <sup>h</sup> +	K 31. 1. 9 <sup>h</sup> +	—	K 31. 1. 9 <sup>h</sup> +
8. 3., 10. 3. 10 <sup>h</sup> +	278	K 11. 3. 7 <sup>h</sup> —	K 11. 3. 7 <sup>h</sup> —	K 11. 3. 7 <sup>h</sup> —	—	K 11. 3. 7 <sup>h</sup> —

Die Flüssigkeiten stehen nach dem Eindringen einem sehr wasserarmen Protoplasten gegenüber, dessen Reactionsfähigkeit bedeutend herabgesetzt ist und in einzelnen Fällen ganz aufgehoben zu sein scheint. Bei der langen Dauer, die manche Versuche bereits aufweisen, kann man wohl mit Sicherheit annehmen, dass die Medien früher oder später schliesslich doch eindringen. Dieses wird auch durch das Herauslösen fettartiger Stoffe bewiesen, vor allem bürgt dafür der Umstand, dass durchweg auch hier mit der Länge der Einwirkungszeit allmählich die behandelten Objecte langsamer auskeimen, als dies Organismen gleichen Alters thun, welche zur Controlle lufttrocken resp. im Exsiccator aufbewahrt wurden.

Auffallend lange halten *Phycomyces*-Sporen den Aufenthalt in absolutem Alkohol aus. Bei der letzten Probeentnahme am 27. II. 1902 hat die Einwirkungsdauer 2 Jahre und 2 Monate betragen; die am 1. III. ausgesäten Sporen waren am 5. III. ausgekeimt. Bedenkt man, dass *Phycomyces*-Sporen für gewöhnlich schon im lufttrockenen Zustande nicht allzu lange keimfähig bleiben, so könnte man in diesem Falle beinahe von einer Conservirung derselben durch absoluten Alkohol sprechen. De Bary<sup>1)</sup> verzeichnet eine Beobachtung, laut welcher lufttrockene *Phycomyces*-Sporen nach zehn Monaten noch keimten, in anderen Untersuchungen betrug nach ihm die Dauer der Keimfähigkeit jedoch nur einen Monat. Van Tieghem und le Monnier<sup>2)</sup> geben für die *Phycomyces*-Sporen durchweg dreimonatliche Lebensdauer an. Und bei Versuchen, die ich mit Sporen verschiedenen Alters anstellte, erhielt ich bei solchen, die vom Februar 1901 stammten (also ca. 15 Monate alt waren), nach zwei Tagen noch Keimung. Sporen aus dem Jahre 1899 keimten in keinem der Versuche mehr aus.

Die conservirende Kraft des absoluten Alkohol für exsiccator-trockene *Phycomyces*-Sporen wird natürlich weniger in diesem selbst beruhen, als vielmehr darin, dass jegliche Feuchtigkeit von den Sporen ferngehalten wird.

Denn dass dieser Umstand von grosser Wichtigkeit für sie ist, zeigt G. Schroeder<sup>3)</sup>, dessen Sporenmaterial sich nach dreijährigem Liegen über Calciumchlorid noch als keimfähig erwies. Die Auskeimung erfolgte binnen 36 Stunden; wonach die ca.  $2\frac{1}{4}$  Jahr in

1) De Bary, Vergl. Morphol. u. Biol. d. Pilze, 1884, p. 369.

2) Van Tieghem et le Monnier, Annal. d. sc. nat. 5. série, XVII, 1873, p. 286 u. 288.

3) G. Schröder, Untersuch. aus dem botan. Inst. Tübingen, 1886, Bd. II, p. 34.

absolutem Alkohol befindlich gewesenen Sporen, welche erst nach vier Tagen auskeimten, also doch schon etwas angegriffen wären. Immerhin liegt hier ein bemerkenswerther Fall von Reactionslosigkeit trockenstarren Protoplasmas vor.

Desgleichen verdient die Resistenz der *Aspergillus*-Sporen, wie auch des *Saccharomyces*, gegen Aether hervorgehoben zu werden. Der relativ sehr hohen Unempfindlichkeit des *Micrococcus prodigiosus* gegen Schwefelkohlenstoff hatte ich bereits gedacht.

Die angewendeten Flüssigkeiten waren in allen Fällen farblos geblieben. Nur Alkohol färbte sich mit *Aspergillus*-Sporen schwach gelblich.

Makroskopisch zeigte nach einigen Tagen *Micrococc. prodig.* eine Veränderung: er war durch Aether und Alkohol farblos geworden, ohne deshalb seine Lebensfähigkeit zu verlieren. In den anderen Medien hielt er sich schön rot, auch nachdem er bereits schon lange abgestorben war. Demnach hängt sein Wohlbefinden mit der Gegenwart des rothen Farbstoffes keineswegs zusammen; so tritt er ja auch in Kulturen unter gewissen Bedingungen farblos auf.

Mikroskopisch liess sich bei keinem der Objecte eine Veränderung feststellen.

In den nun folgenden Versuchen habe ich die im trockenen wie auch im frischen Zustande so wenig angreifbaren Sporen vor dem Einlegen in die Medien drei Stunden lang in steriles reinem Wasser digerirt und erst dann in die Flüssigkeit gebracht.

Die Sporen zeigten sich, wie zu erwarten war, hierdurch schwer geschädigt, wenigstens was *Phycomyces* und *Aspergillus* anbelangt.

Und zwar sind ihnen jetzt Alkohol und Aether schädlicher als Benzol oder Schwefelkohlenstoff. Begründet wird dieses unerwartete Verhalten dadurch, dass Alkohol und Aether in Folge ihrer Wasserdissolubilität in die mehr oder weniger gequollenen Objecte rascher eindringen als die unlöslichen Benzol oder Schwefelkohlenstoff; die letzteren werden im Gegentheil in der ersten Zeit durch die Wasserschicht am Vordringen behindert werden.

So tödteten Alkohol und Aether diese Sporen schon nach 24 Stunden ab. Hingegen wurde Benzol von *Aspergillus*-Sporen 33 Tage, von *Phycomyces*-Sporen 14 Tage vertragen; und Schwefelkohlenstoff von ersteren 23 Tage, von letzteren 7 Tage.

Die im übrigen trotz der vorausgehenden Wasserbehandlung noch sehr resistenten *Bacillus subtilis*-Sporen sind, wie schon aus

Tabelle XXI hervorgeht, gegen Schwefelkohlenstoff relativ sehr empfindlich, auch Aether greift sie leicht an. Immerhin übertreffen sie auch in diesen Fällen bei weitem die Pilzsporen.

Tabelle XXII.

Einwirkung der Agentien auf 3 Stunden lang in Wasser eingeweichte Sporen von *Bacillus subtilis*.

Beginn der Versuche: 4. VI. 1901.

Entnahme u. Uebertragung	Dauer d. Einw. in Tagen	Alkohol	Aether	Benzol	$\text{CS}_2$	$\text{CHCl}_3$
11. 6., 13. 6. 7 <sup>h</sup> <u>+</u>	7	K 14. 6. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 14. 6. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 14. 6. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 16. 6. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 14. 6. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>
16. 7., 18. 7. 5 <sup>h</sup> <u>—</u>	42	K 19. 7. 12 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 19. 7. 6 <u>—</u>	K 19. 7. 10 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 21. 7. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 19. 7. 12 <sup>h</sup> <u>+</u>
13. 8., 15. 8. 12 <sup>h</sup> <u>+</u>	70	K 16. 8. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 16. 8. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 16. 8. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	—	K 16. 8. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>
10. 9., 12. 9. 12 <sup>h</sup> <u>+</u>	98	K 13. 9. 9 <sup>h</sup> <u>—</u>	K 14. 9. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	K 13. 9. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>	—	K 13. 9. 9 <sup>h</sup> <u>+</u>
5. 11., 7. 11. 4 <sup>h</sup> <u>—</u>	154	K 8. 11. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>	—	K 8. 11. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>	—	K 8. 11. 6 <sup>h</sup> <u>—</u>
1902.						
8. 3., 10. 3. 10 <sup>h</sup> <u>+</u>	277	K 11. 3. 7 <sup>h</sup> <u>—</u>	—	K 11. 7. 7 <sup>h</sup> <u>—</u>	—	K 11. 3. 7 <sup>h</sup> <u>—</u>

Mit dem leichteren Eindringen und Abtöten geht ein schnelleres Entziehen von Farbstoff und Fetten Hand in Hand. Während sich bei den exsiccatortrockenen Objecten von den Flüssigkeiten nur Alkohol leicht gelblich färbte, waren dieses Mal sämmtliche Agentien mehr oder weniger gefärbt. Alkohol namentlich färbte sich rasch. Die mit ihm behandelten Pilzsporen sahen ähnlich denen, die in Aether gelegen hatten, hellröhlich aus. Mikroskopisch war weder an ihnen noch an den Bakterien eine auffallende Veränderung zu beobachten.

In gleicher Weise gehen die Organismen bald zu Grunde, wenn man sie exsiccatortrocken in wasserhaltige Medien bringt. Ich wählte für diese Versuche Alkohol und Aether. Von ersterem wurden sechs Verdünnungen mit Wasser hergestellt, von letzterem zwei. Die Mischungen von Aether und Wasser fertigte ich mir durch Schütteln im Scheidetrichter an. Es wurde mit zeitweiligen Unterbrechungen durch mehrere Stunden lang fortgesetzt. Man hat dann im Scheidetrichter zwei Flüssigkeiten übereinander geschichtet, deren obere nach Kolbe aus Aether mit 2,71% Wasser, deren untere aus Wasser mit 10% Aether besteht. Da bei der Flüchtigkeit des Aethers leicht, für diese Versuche jedoch bedeutungslose, Schwan-

kungen im Prozentgehalt eintreten, so sind die Flüssigkeiten in den Tabellen mit „Aether ca. 97%“ und „Aether ca. 10%“ bezeichnet. Alkohol gelangte 15, 22, 30, 60, 80 und 90% zur Verwendung.

Die vegetativen Organismen *Microcoec. prodig.* und *Sarcina rosea* sind in sämmtlichen Verdünnungen beider Medien nach 24 Stunden getötet. Hefe hingegen ist wesentlich resistenter. Sie vermag 15% Alkohol relativ gut zu vertragen, es ist dies ja auch ungefähr die Grenze, bis zu welcher sie in Gährungsflüssigkeiten existenzfähig bleibt. (Tabellen s. p. 233 u. 34.)

Es ergeben sich aus den Tab. XXIII bis XXV eine Anzahl beachtenswerther Thatsachen.

Prüfen wir den Einfluss, den die verdünnten Medien speciell auf Hefe und *Aspergillus*-Sporen ausüben, und gedenken dabei der äusserst geringen Wirkung wasserfreier Agentien, so gelangen wir zu dem Resultat, dass mit zunehmendem Wassergehalt die tödtliche Wirkung des Alkohol und Aether erhöht wird. Am intensivsten wirkt 30 – 70% Alkohol; geht die Verdünnung unter 30%, so schwächt sich der schädigende Einfluss allmählich wieder ab. Immerhin übt ein 15% Alkohol auf *Aspergillus*-Sporen bei weitem stärkere Wirkung aus als 90%.

Während absoluter Alkohol aus diesen Sporen nur sehr wenig während langer Frist herauslöst und sich entsprechend gering dabei färbt, entzieht wässriger Alkohol den Sporen relativ viel. Nach wenigen Tagen färben sich die Flüssigkeiten, mit der Zeit immer dunkler werdend. Am schnellsten trat dies ein beim 60% Alkohol, nach ihm beim 30% und 80%; in demselben Grade wirken die Flüssigkeiten schädlich.

Beim Eindampfen derselben bleibt ein hell- bis dunkelgelber, schmieriger Rückstand, der sich in Wasser fast gänzlich löst. Derselbe entwickelt beim Verbrennen den charakteristischen Karameleruch, ein Zeichen, dass den Sporen Kohlehydrate entzogen worden sind.

Die gleichen Erfahrungen mit verdünntem Alkohol haben an Bakterien bereits Epstein<sup>1)</sup> und Minervini<sup>2)</sup> gemacht, welche Alkohol auf seinen desinfektorischen Werth hin prüften. Auch ist hier die p. 296 Anm. 4 citirte Litteratur zu berücksichtigen.

1) F. Epstein, Zeitschr. f. Hyg. u. Infect., 1897, Bd. 24, p. 20 f.

2) R. Minervini, Zeitschr. f. Hyg. u. Infect., 1898, Bd. 29, p. 136 ff.

**Tabelle XXIII.** Einwirkung wässriger Alkohols und Aethers auf exsiccatortrockenen (21 Tage) *Saccharomyces cerevis*.

Beginn der Versuche: 21. XI. 1901.

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einwirkung in Tagen	Alkohol						Aether	
		15%	22%	30%	60%	80%	90%	ca. 97%	ca. 10%
22. 11.	1	K 24. 11. 12 h	K 25. 11. 9 h	—	—	—	K 25. 11. 9 h	—	K 24. 11. 12 h
23. 11. 6	—	+	+				+		+
23. 11.	2	K 26. 11. 2 h	—	—	—	—	K 27. 11. 9 h	—	—
25. 11. 2	—						+		
25. 11.	4	K 27. 11. 12 h	—	—	—	—	K 28. 11. 9 h	—	—
26. 11. 3	—	+					+		
28. 11.	7	K 2. 12. 9 h	—	—	—	—	—	—	—
30. 11. 12	—	+							
21. 12.	30	K 26. 12.	—	—	—	—	—	—	—
23. 12. 11	—	+							
16. 1. 1902	56	—	—	—	—	—	—	—	—
18. 1. 10	—	+							

**Tabelle XXIV.** Einwirkung wässriger Alkohols und Aethers auf exsiccatortrockene (21 Tage) Sporen von *Aspergillus nig*.

Beginn der Versuche: 13. II. 1901.

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einwirkung in Tagen	Alkohol						Aether	
		15%	22%	30%	60%	80%	90%	ca. 97%	ca. 10%
20. 2.	7	K 22.2. 6 h	K 23.2. 6 h	—	—	K 24.2. 10 h	K 24.2. 10 h	K 22.2. 3 h	K 23.2. 9 h
21. 2. 3	—					+	+	+	+
27. 2.	14	K 2. 3. 9 h	—	—	—	—	K 2. 3. 9 h	K 2. 3. 9 h	—
28. 2. 3	—	+					+	+	
6. 3.	21	—	—	—	—	—	K 9. 3. 9 h	10. 3. 9 h	—
7. 3. 1	—						+	+	
10. 4.	56	—	—	—	—	—	K 13.4. 9 h	13.4. 7 h	—
11. 4. 9	—	+					+	+	
24. 4.	70	—	—	—	—	—	K 29.4. 9 h	28.4. 9 h	—
25. 4. 6	—						+	+	
8. 5.	84	—	—	—	—	—	—	—	—
9. 5. 9	—	+							

Tabelle XXV.

Einwirkung wässriger Alkohols und Aethers auf exsiccatortrockene  
(28 Tage) Sporen von *Bacillus subtilis*.

Beginn der Versuche: 5. VI. 1901.

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einwirkung in Tagen	Alkohol						Aether	
		15 %	22 %	30 %	60 %	80 %	90 %	ca. 10 %	ca. 97 %
12. 6.	7	K 15.6. 9 h 9 +	K 15.6. 12 h 12 +	K 16.6. 9 h 9 +	K 15.6. 12 h 12 +				
14. 6. 9 h +									
17. 7.	42	K 20.7. 9 h 9 +	K 20.7. 9 h 9 +	K 20.7. 9 h 9 +	K 20.7. 9 h 9 +	K 20.7. 9 h 9 +	K 20.7. 9 h 9 +	K 20.7. 4 h 4 —	K 20.7. K 4 h 4 —
19. 7. 9 h +									
14. 8.	70	K 17.8. 9 h 9 +	K 17.8. 9 h 9 +	K 17.8. 9 h 9 +	K 17.8. 9 h 9 +	K 17.8. 9 h 9 +	K 17.8. 9 h 9 +	—	K 17.8. K 9 h 9 +
16. 8. 11 h +									
11. 9.	98	K 14.9. 9 h 9 +	K 14.9. 9 h 9 +	K 14.9. 9 h 9 +	K 14.9. 9 h 9 +	K 14.9. 9 h 9 +	K 14.9. 9 h 9 +	—	K 15.9. K 9 h 9 +
13. 9. 11 h +									
6. 11.	154	K 9.11. 6 h 6 —	K 9.11. 6 h 6 —	K 9.11. 6 h 6 —	K 9.11. 6 h 6 —	K 9.11. 6 h 6 —	K 9.11. 6 h 6 —	—	K 10.11. K 9 h 9 +
8. 11. 2 h —									
8. 1. 1902	217	K 11.1. 5 h 5 —	K 11.1. 5 h 5 —	K 11.1. 5 h 5 —	K 11.1. 5 h 5 —	K 11.1. 5 h 5 —	K 11.1. 5 h 5 —	—	—
10. 1. 10 h +									
8. 3.	276	K 11.3. 7 h 7 —	K 11.3. 7 h 7 —	K 11.3. 7 h 7 —	K 11.3. 7 h 7 —	K 12.3. 9 h 9 +	K 11.3. 7 h 7 —	—	—
10. 3. 10 h +									

Eine sehr hohe Widerstandskraft weisen die Sporen von *Bacillus subtilis* auf. Keine der Alkoholverdünnungen hat ihnen im Laufe der 276 tägigen Einwirkung etwas anhaben können. Nicht einmal in der Schnelligkeit des Auskeimens sind sie beeinflusst.

Minervini<sup>1)</sup>), der sie acht Tage lang in verschiedenprozentigem Alkohol digerirte, fand sie gleichfalls ungeschädigt. Ueber etwas längere Frist hinaus erstrecken sich seine Versuche an Milzbrandsporen und verschiedenen Alkoholgraden: sie sind in diesen Fällen nach fünfzig Tagen noch nicht todt. R. Koch<sup>2)</sup> hat Milzbrandsporen sogar 110 Tage in verdünnten Alkoholen aufbewahrt und fand dieselben keimfähig.

Ueberraschend ist in Anbetracht der sonstigen grossen Zähigkeit des *Bacillus subtilis* die Thatsache, dass er von verdünntem Aether verhältnissmässig leicht angegriffen wird. Dies ist auch

1) R. Minervini, I. c., p. 127.

2) R. Koch, Mittheil. aus dem Kaiserl. Ges.-Amte, 1881, Bd. I, p. 263.

bereits aus Tabelle XXII ersichtlich. Von den angewandten Agentien dürfte daher, nächst Schwefelkohlenstoff, Aether diesen Sporen am verderblichsten sein.

Fussend auf der aus dem bisherigen sich ergebenden That-sache, dass durch Austrocknen und Fernhalten jeglicher Feuchtigkeit die Lebenstätigkeit des Zelleibes vermindert wird, und dass derselbe schliesslich in einen Zustand der Reactionslosigkeit gelangt, gebrauchte ich in einigen Versuchen Zusätze von Phenol und Quecksilberchlorid zu wasserfreiem Alkohol, um zu prüfen, wie weit unter solchen Bedingungen die Wirkung dieser Substanzen reicht.

Verwendet wurde Quecksilberchlorid 1 : 1000 und Phenol 3 : 100 in wasserfreiem Alkohol gelöst; Versuchsobjecte waren exsiccator-trockene *Aspergillus*-Sporen.

Das Verfahren war das übliche; neu hinzu kam, dass die behandelten Sporen vor dem Uebertragen in die Nährösung von anhaftendem Quecksilberchlorid oder Phenol befreit werden mussten. Sie wurden daher von der alkoholischen Lösung aus in sterilisirten absoluten Alkohol eingelegt und hatten nacheinander vier solcher Waschkölbechen innerhalb ungefähr zweier Stunden zu passiren. Nach 2 tägigem Trocknen in sterilem Rohr wurden die Sporen unter allen Vorsichtsmaassregeln ausgesät.

Tabelle XXVI.

Einwirkung von Phenol- resp. Sublimatalkohol auf exsiccator-trockene Sporen (20 Tage) von *Aspergillus nig.*

Beginn der Versuche: 2. XII. 1901. 11  $\frac{h}{+}$

Entnahme und Uebertragung	Dauer der Einw. in Tagen	Phenol-Alkohol 3 %	Sublimat- Alkohol 1 %
4. 12. 11 $\frac{h}{+}$ , 6. 12. 11 $\frac{h}{+}$	2	K 8. 12. 9 $\frac{h}{+}$	K 9. 12. 9 $\frac{h}{+}$
9. 12. 11 $\frac{h}{+}$ , 11. 12. 3 $\underline{h}$	7	K 13. 12. 9 $\frac{h}{+}$	K 16. 12. 1 $\underline{h}$
16. 12. 11 $\frac{h}{+}$ , 18. 12. 2 $\frac{h}{+}$	14	K 21. 12. 9 $\frac{h}{+}$	K 23. 12. 11 $\frac{h}{+}$
1902.			
6. 1. 11 $\frac{h}{+}$ , 8. 1. 10 $\frac{h}{+}$	35	K 11. 1. 9 $\frac{h}{+}$	K 12. 1.
27. 1. 11 $\frac{h}{+}$ , 29. 1. 11 $\frac{h}{+}$	56	K 1. 2. 9 $\frac{h}{+}$	K 2. 2. 6 $\underline{h}$
17. 2. 11 $\frac{h}{+}$ , 19. 2. 2 $\underline{h}$	77	K 22. 2. 12 $\frac{h}{+}$	—
14. 4. 9 $\frac{h}{+}$ , 18. 4. 9 $\frac{h}{+}$	133	K 23. 4. 9 $\frac{h}{+}$	—

Obgleich nach ungefähr drei Wochen die Medien durch Sporenauszug sich gelblich färbten, und auch durch das verlangsamte Auskeimen der Sporen angezeigt wurde, dass die Flüssigkeiten in die Objecte eingedrungen waren, so halten sich die Sporen doch auf viele Wochen hinaus lebensfähig. Lediglich die Schnelligkeit des Auskeimens hat nachgelassen und zwar mehr als dies bei Abwesenheit der Gifte der Fall zu sein pflegt. Ob die Sporen schliesslich doch früher zu Grunde gehen werden als sie es im reinen Alkohol thun, ist damit noch nicht erwiesen. Jedenfalls sind die so geschätzten Antiseptica hier vorläufig machtlos; irgend eine Reaction tritt nicht ein, ist zum mindesten sehr erschwert und verlangsamt.

Diese Erscheinung ist übrigens schon lange bekannt. Bereits Giglioli<sup>1)</sup> stellte an *Medicago*-Samen fest, dass sie nach 382 tägigem Liegen in concentrirter Lösung von Quecksilberchlorid in absolutem Alkohol noch zu 55% keimten, in concentrirtem Phenolalkohol zu 68%.

Später hat R. Koch<sup>2)</sup> bei seinen Arbeiten über Desinfection bewiesen, dass die antiseptische Kraft der verschiedensten Desinfectientien gleich Null ist, wenn diese in Alkohol oder Oel gelöst sind, dass also bei Ausschluss von Wasser ein Abtödten von Keimen nicht statthat. Seither sind eine ganze Reihe diesbezüglicher Beobachtungen<sup>3)</sup> gemacht worden, welche sämmtlich mit denen Koch's in Einklang stehen.

Das Sterilisiren des Alkohol lässt sich in einfacher Weise im Rückflusskühler ausführen. Zur Prüfung der Resistenz der *Aspergillus*-Sporen gegen siedenden Alkohol wählte ich deren an und für sich widerstandsfähigste Form: die exsiccatortrockenen. Derartig getrocknetes Material wurde demnach in absolutem Alkohol gekocht, und die stündlich entnommenen Proben nach zweitägigem Trocknen ausgesät. Die Temperatur des siedenden Alkohol lag dicht bei 80°.

Es stellte sich heraus, dass nach dreistündigem Kochen die Sporen abgetötet waren, während sie, zwei Stunden lang gekocht,

1) Italo Giglioli, *Gazzetta chimica italiana* 1879, Bd. IX, p. 497, 501 f.

2) R. Koch, l. c., p. 250 f.

3) Ceppi, ref. in Baumgarten's Jahresber. 1893, p. 557. — Lenti, Annali dell'Istituto d'igiene sperimentale di Roma, Bd. III, p. 518. — Krönig u. Paul, Zeitschr. f. Hyg. u. Infect., 1897, Bd. XXV, p. 84 u. 91 ff. — Epstein, l. c., p. 21. — Minervini, l. c., p. 136 ff.

nach zwei Tagen auskeimten. Um absolut sicher zu gehen beim Sterilisiren des Alkohol, liess ich ihn vier Stunden lang sieden.

Gelegentlich dieser Sterilisationen stellte ich noch einige andere Versuche über die Einwirkung hoher Temperaturen an, welche ich nicht unerwähnt lassen möchte, da sie die dem ausgetrockneten Protoplasten zukommende, bisweilen unglaublich hohe Widerstandskraft trefflich illustriren.

Und zwar liess ich trockne Hitze in Parallelversuchen zu siedendem Alkohol auf trockne Hefe und *Aspergillus*-Sporen wirken.

Das Verfahren bestand darin, dass die Objecte in sterile, lange Glasröhren eingeschmolzen wurden, die eine ungefähr 3 cm hohe Schichte von Chlorcalcium zur Erhaltung der Trockenheit bargen. Diese zugeschmolzenen Röhren wurden dann im Dampfsterilisator heissen Dämpfen von 100° während bestimmter Zeit ausgesetzt. Als dann wurden die Röhren vorsichtig erbrochen, und die Objecte in die Nährlösung übertragen.

*Aspergillus*-Sporen waren in trockener, heißer Luft von 100° schon nach 60 Minuten todt. Diese Empfindlichkeit trockener Pilzsporen gegen hohe Temperatur ist auffällig, wenn man bedenkt, dass eine ganze Anzahl von Samen in trockenem Zustande ein- bis mehrstündiges Erwärmern auf 100—120° ungeschädigt vertragen<sup>1)</sup>). Jedoch ergaben Controllversuche mit den Sporen das gleiche Resultat. Sie scheinen tatsächlich relativ empfindlich zu sein, denn siedenden Alkohol halten sie auch nur zwei Stunden lang aus.

Merkwürdig resistent zeigte sich Hefe.

In heißer Luft von 100° war sie erst nach vier Stunden abgestorben, noch weniger vermochte ihr siedender Alkohol etwas anzuhaben. Nach fünfzehn Stunden währendem Kochen keimte die Hefe unbehelligt aus und zwar bereits am zweiten bis dritten Tage.

Die Sporen von *Bacillus subtilis* waren nach fünfzehnstündigem Kochen in Alkohol sogar schon nach einem Tage ausgekeimt.

Wie lange diese Organismen das Kochen in Alkohol weiterhin vertragen, habe ich danach nicht untersucht.

Dass Hefe bereits lufttrockne Temperaturen bis ca. 110° verträgt, ist schon von verschiedener Seite bekannt gegeben<sup>2)</sup>). Als Ursache hierfür ist anzusehen, dass mit zunehmendem Austrocknen in der Zelle die Lebensfunction nachlässt, gleichzeitig auch die

1) Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. II, Th. I, p. 293.

2) s. Litt. bei Pfeffer, l. c., p. 294.

Reactionsfähigkeit vermindert wird. Je vollkommener die Wasserentziehung, um so eher ist die Gefahr der Eiweissgerinnung beseitigt. Sicherlich wird der siedende absolute Alkohol alles in den schon im Exsiccator getrockneten Objecten noch vorhandene Wasser rasch an sich reissen und auf diese Weise dem Widerstand gegen die hohe Temperatur Vorschub leisten.

Derartige stundenlang in Alkohol gekochte Hefezellen gleichen dem exsiccatorgetrockneten Material durchaus und sind nicht weiter alterirt. Die Membran erscheint unverändert, der körnig aussehende Zellinhalt ist in Folge des Wasserverlustes stark zusammengezogen und gewöhnlich zum Theil von der Membran abgehoben. In Wasser übertragen nehmen die Zellen ihre normale Gestalt wieder an.

Schliesslich sind noch die Versuche über die Einwirkung dampfförmiger Medien auf Mikroorganismen anzuführen.

Wie schon erwähnt wurde, brachte ich die Objecte in kleine, mit Watte verschlossene sterile Kölbchen und setzte sie in diesen der betreffenden Dampfatmosphäre aus. Im übrigen wichen die Versuchsanordnung in nichts von der bisher angewandten ab.

Was sich schon bei den Versuchen an Samen herausstellte, ist auch hier bei den Mikroorganismen wieder eingetreten: die chemischen Agentien wirken im Dampfzustand schädlicher als im flüssigen, zum Theil sehr auffällig.

So hält *Micrococcus prodig.* flüssigen Schwefelkohlenstoff 63 Tage aus, dampfförmigen dagegen nur zwei; flüssigen Aether 14 Tage, Aetherdampf zehn. *Sarcina rosea* verträgt flüssigen Aether 14 Tage, Aetherdampf gleichfalls nur zehn; flüssigen Schwefelkohlenstoff 7 Tage, dampfförmigen vier Tage.

Sehr grosse Unterschiede stellen sich weiterhin heraus bei *Aspergillus*-Sporen: diese vertragen flüssigen Schwefelkohlenstoff 94 Tage, durch dampfförmigen werden sie schon nach 39 Tagen abgetötet. Chloroform in Dampfform tödtet sie nach 121 Tagen, während ihnen flüssiges Chloroform nach 365 Tagen noch nicht im geringsten geschadet hat.

Wie diese Sporen überhaupt eine specielle Unempfindlichkeit gegen Aether aufweisen, so hat Aetherdampf sie im Verlauf von 178 Tagen noch nicht abzutöten vermocht. Aber auch flüssiger Aether hat sie nach 642 Tagen noch nicht getötet. Immerhin ist eine Verzögerung im Auskeimen der Sporen auffällig genug. Mit Aetherdampf sieben Tage lang behandelte Sporen brauchen bereits

ca. 40 Stunden zum Auskeimen. Eine derartige Schwächung zeigen Sporen, welche in flüssigem Aether digerirt sind, erst nach ungefähr zwanzig Wochen (siehe Tab. XIX). Allerdings ist bei der Aetherdampfwirkung zu berücksichtigen, dass sie auch nach 27 Wochen an Intensität nur wenig zugenommen hat. Das Resultat hierfür bleibt demnach abzuwarten.

Es wurde mit diesen Versuchen die Arbeit vorläufig abgeschlossen, obgleich eine ganze Reihe der Tabellen noch nicht zu Ende geführt ist, und das Material dafür zur Verfügung steht. Es kann sich aber bei diesen Versuchen schliesslich nur noch darum handeln, zeitliche Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit der Objecte resp. in der Giftigkeit der angewandten chemischen Agentien festzustellen. Für manche Organismen, wie Samen von *Sinapis alba*, *Lepidium sat.*, sodann Sporen von *Aspergillus*, *Phycomyces*, *Bacillus subtilis*, ferner für *Saccharomyces*, kann man mit Sicherheit annehmen, dass noch geraume Zeit verstreichen wird, bis sie zu Grunde gehen, wenn sie unter den gegebenen Aussenbedingungen bleiben. Vielleicht stellt sich dann in Jahr und Tag heraus, dass manche Objecte in den Medien nicht früher absterben, als dies beim Liegen an der Luft unter den atmosphärischen Einflüssen der Fall ist. Als unwahrscheinlich ist der Gedanke durchaus nicht zu verwerfen, liefern doch die *Phycomyces*-Sporen ein Beispiel, nach welchem derartige Erwartungen weit übertroffen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Versuche zeigen zur Genüge, wie sehr der trockenstarre Zellinhalt den Einflüssen wasserfreier chemischer Agentien widersteht. Demzufolge kann man wasserfreien Alkohol, Aether und dergleichen nicht ohne weiteres als steril betrachten und Gegenwart lebensfähiger Keime in ihnen für ausgeschlossen halten.

Ich untersuchte daraufhin den Inhalt verschiedener, viel gebrauchter Standgefässe, die in dem Laboratorium auf freiem Regal stehen, indem ich jedem derselben 30 ccm mit steriler Pipette entnahm und die Flüssigkeit in sterile, mit Watte verschlossene Kölbchen füllte. Sodann liess ich in dem Wärmezimmer bei 30° den Inhalt der Kölbchen verdunsten und setzte danach sterile, neutral reagirende Nährlösung zu. Es ergab sich:

1. Aether: keinerlei Wachsthum.
2. Schwefelkohlenstoff: nach 3 Tagen *Mucor*.
3. Benzol: nach 2 Tagen *Penicillium*.
4. Alkohol: nach 2 Tagen *Penicillium, Mucor*.

Dass aus dem Aetherrückstand nichts gewachsen ist, kann man demnach als rein zufällig bezeichnen. Unerwartet ist, dass in keinem Falle Bakterien wuchsen, ferner auch, dass sich nirgends *Aspergillus* zeigte, der eigentlich zu allererst zu erwarten war, da gerade in dem Zimmer, in welchem die Chemikalien standen, viel mit diesem Pilze gearbeitet wurde.

Ist Wasser in den Chemikalien oder Versuchsobjecten enthalten, so ändert sich die Sachlage sofort. Es wird dadurch die mehr oder minder grosse Reactionslosigkeit des trockenstarren Protoplasten aufgehoben. Dies ist ungemein wichtig. Denn die Wirkung eines Giftes beruht auf der specifischen Wechselwirkung zwischen ihm und dem Protoplasten<sup>1)</sup>. Eine solche kann aber, wie die diesbezüglichen Versuche lehren, nicht stattfinden oder wird jedenfalls sehr erschwert, wenn das Protoplasma in einem actionslosen Zustand sich befindet.

Diese Thatsachen kehren bei allen Versuchsobjecten wieder, sind natürlich von der jeweiligen specifischen Eigenschaft des Protoplasten abhängig. Allenthalben aber zeigt sich, wie sehr durch veränderte Aussenbedingungen (in unserem Falle Austrocknung) die Empfindlichkeit des Protoplasten gegen Gifte verschoben wird<sup>2)</sup>.

Die Resultate der Arbeit seien in folgendem nochmals kurz zusammengefasst:

1. Vegetativzustände sind weniger resistent als Dauerformen.
2. Für beide gilt, dass sie frisch früher abgetötet werden, als im getrockneten Zustande. Ferner: exsiccatortrockene Objecte sind widerstandsfähiger als lufttrockene.
3. In allen Fällen sind die Medien früher oder später in die Objecte eingedrungen.
4. Der Auskeimungstermin sämtlicher Versuchsobjecte geht mit der Länge der Einwirkungsdauer der Medien zurück.
5. Die Samenschale gewährt grossen Schutz. Die Kotyledonen schützen ihrerseits die Plumula.
6. Früher oder später werden den Objecten Reservestoffe entzogen, deren Verlust jedoch erst secundär empfunden wird.
7. Das Herauslösen solcher Stoffe erfolgt bei Samen in centripetaler Richtung.

1) Pfeffer, Pflanzenphysiol., 2. Aufl., Bd. II, Th. I, p. 339.

2) Pfeffer, l. c., p. 336.

8. Exsiccatortrockene Sporen von *Phycomyces nitens* halten sich in 100% Alkohol besser und länger keimfähig, als wenn sie lufttrocken aufbewahrt werden.
  9. Mit Wasser digerirte Sporen gehen in den Medien bedeutend schneller zu Grunde als getrocknete; und zwar um so rascher, je leichter sich die Medien in Wasser lösen.
  10. Die angewandten Medien sind wasserfrei weniger schädlich als im mit Wasser verdünnten Zustande.
  11. Antiseptica werden in Lösung von absolutem Alkohol in ihrer Wirkung herabgesetzt.
  12. Die Medien wirken dampfförmig intensiver als im flüssigen Zustande.
  13. Durch Austrocknen wird die Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperatur sehr gesteigert.
- 

Die diesen Ausführungen zu Grunde liegenden Versuche wurden im Mai 1900 begonnen und sind Mai 1902 abgeschlossen worden. Herrn Geh. Hofrath Prof. Dr. Pfeffer möchte ich für die vielfach ertheilten Rathschläge und die wohlwollende Unterstützung meinen ehrerbietigen, aufrichtigen Dank aussprechen.

---