

Sitzungsberichte

der

mathematisch - physikalischen Classe

der

k. b. Akademie der Wissenschaften

zu München.

Band X. Jahrgang 1880.

München.

Akademische Buchdruckerei von F. Straub.

1880.

In Commission bei G. Franz.

Mathematisch-physikalische Classe.

Nachtrag zur Sitzung vom 5. Juli 1879.

Herr v. Nägeli legt folgende, den Ernährungschemismus der niederen Pilze betreffende Abhandlungen vor:

1. „Ernährung der niederen Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen“.¹⁾

Den Pilzen mangelt bekanntlich die den grünen Pflanzen zukommende Fähigkeit, Kohlensäure zu assimiliren. Sie müssen, ähnlich wie die Thiere, den Kohlenstoffbedarf aus höheren Kohlenstoffverbindungen sich aneignen. Man glaubte früher allgemein, der Autorität Liebig's folgend, dass bloss eiweissartige Stoffe ihnen als Nahrung dienen könnten.

Indessen hat Pasteur schon vor längerer Zeit gezeigt, dass die Sprosshefenpilze durch weinsaures Ammoniak und Zucker (1858), *Penicillium* durch weinsaures Ammoniak allein ernährt werden kann (1860). Die Richtigkeit dieser Thatsachen ist, entgegen dem anfänglich erhobenen Widerspruche, von allen späteren versuchskundigen Beobachtern bestätigt worden. Sie war übrigens bereits nach

1) Einige der erläuternden Versuche sind von Hrn. Dr. Oscar Loew ausgeführt worden und am Schlusse beschrieben.

den ersten Angaben Pasteur's unzweifelhaft, welcher nicht nur das Verschwinden des weinsauren Ammoniaks und die gleichzeitige Zunahme der Pilzsubstanz beobachtete, sondern auch nachwies, dass bei Anwendung von Traubensäure allmählich die rechtsdrehende Weinsäure von den Pilzen aufgenommen wird, während die linksdrehende noch in der Flüssigkeit zurückbleibt.

Seitdem sind von verschiedenen Beobachtern einzelne Thatsachen über die Ernährung der Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen festgestellt worden. Es schien mir besonders wünschenswerth, möglichst verschiedene Verbindungen bezüglich ihrer Ernährungstüchtigkeit zu prüfen, um zu ermitteln, welche chemische und physikalische Beschaffenheit sie dazu geeignet oder ungeeignet macht. Zu diesem Zwecke habe ich schon in den Jahren 1868 und 1869, dann gemeinschaftlich mit meinem Sohn, Dr. Walter Nägeli in den Jahren 1870/1 und 1875/6 eine grössere Anzahl von Versuchen ausgeführt, und in neuerer Zeit wurde dieselbe noch von Dr. O. Löw ergänzt.

Die gestellte Frage ist also: Aus welchen Verbindungen vermögen die Pilze die Elemente C, H, O, N zu entnehmen, um ihre Substanz zu vermehren? Wir können dabei die Elemente H und O ausser Acht lassen, weil dieselben entweder in den Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen enthalten sind oder dem Wasser und dem freien Sauerstoff entnommen werden. Es handelt sich also nur um C und N.

Zwei allgemeine Bemerkungen betreffend die Löslichkeit und die Giftigkeit der Verbindungen will ich vorausschicken. Selbstverständlich können solche Verbindungen, die in Wasser bei gewöhnlicher Temperatur unlöslich sind, nicht ernähren. Dies gilt aber auch von schwerlöslichen Stoffen. Die Schwerlöslichkeit deutet zwar an, dass das Wasser nur eine geringe Verwandtschaft zu ihnen hat, und

somit ist anzunehmen, dass von den kleinen Mengen, die in Lösung gehen, die lebende Pilzsubstanz immer einen Theil aufzunehmen und zu assimiliren vermag. Aber da die Pilzzellen durch Oxydation und Ausscheidung stets einen grossen Gewichtsverlust erleiden, so reicht die langsame Assimilation in sehr verdünnten Lösungen nicht aus, um denselben zu decken. Wenn daher eine schwerlösliche Substanz nicht zu ernähren vermag, so muss die Ursache nicht etwa nothwendig in ihrer chemischen Constitution gesucht werden.

Bezüglich der Giftigkeit der Verbindungen, so ist dieselbe bekanntlich eine durchaus relative Eigenschaft, indem die schädliche Wirkung bei einer bestimmten Verdünnung aufhört. Demgemäss giebt es Gifte oder antiseptische Substanzen, welche in einer gewissen Concentration die beste Nährlösung zur Ernährung untauglich machen, während sie in viel geringerer Concentration selbst als Nahrung dienen. Damit ist jedoch nicht gesagt, dass jede giftige C- und N-verbindung, die ihrer chemischen Constitution nach assimilationsfähig wäre, auch wirklich das Wachsthum der Pilzzellen unterhalten kann. Lösliche Substanzen, die den höchsten Grad der Schädlichkeit erreichen, werden erst bei so weitgehender Verdünnung unschädlich, dass sie nicht mehr ernähren können. Und zwar tritt die Ernährungsunfähigkeit schon früher ein, als bei den schwerlöslichen unschädlichen Verbindungen, weil eine leichter lösliche Substanz bei gleich grosser Verdünnung von dem Wasser fester zurückgehalten und daher von den Pilzzellen demselben weniger leicht entzogen wird.

Was nun zuerst den Stickstoff betrifft, so vermag derselbe aus allen Verbindungen angeeignet zu werden, die man als Amide und Amine bezeichnet. Dabei ist es gleichgültig, ob der Kohlenstoff der Verbindung zur Ernährung verwendet werden kann oder nicht. Während

Acetamid, Methylamin, Aethylamin, Propylamin, Asparagin, Leucin, zugleich als C- und als N-nahrung dienen, kann aus Oxamid und Harnstoff bloss N (nicht C) entnommen werden. Als Stickstoffquelle können die Pilze ferner alle Ammoniaksalze und die einen derselben auch die salpetersauren Salze verwenden.

Bezüglich der einfachsten der genannten Verbindungen ist zu bemerken, dass es von der Art und Weise, wie ein Versuch angestellt wird, abhängt, ob derselbe eine Vermehrung der Pilze zeigt oder nicht. Man darf sich daher durch negative Resultate nicht irre führen lassen. Besonders kann schon eine geringe Concentration der Lösung sich als zu hoch gegriffen und demnach als nachtheilig erweisen. In dem später unter Nr. 35 angeführten Versuch haben sich die Spaltpilze in einer 0,5prozentigen Lösung von salzsaurem Methylamin ziemlich reichlich, in den unter Nr. 59 und 60 angeführten Versuchen in einer 1 und 1,25 prozentigen Lösung gar nicht vermehrt.

Dagegen kann der freie Stickstoff nicht assimilirt werden, ebenso nicht der Stickstoff aus Cyan und aus allen Verbindungen, in denen er nur als Cyan enthalten ist (Versuch 62,a). Wenn solche Verbindungen zuweilen als Stickstoffquelle zu dienen scheinen, so geschieht es wohl nur desswegen, weil aus dem Cyan vorher unter Wasseraufnahme Ammoniak abgespalten wird, was durch die Gärwirkung der Spaltpilze verursacht werden kann. Möglicherweise war Letzteres bei den Versuchen 62 a und b der Fall, wo weder Schimmel- noch Sprosspilze, sondern nur Spaltpilze wachsthumsfähig waren.

Uebrigens hat man sich bei spärlichen Pilzvegetationen immer die Frage vorzulegen, ob dieselben ihren Stickstoffbedarf nicht etwa aus Verunreinigungen der andern Nährstoffe (z. B. des Zuckers) decken konnten, und wenn die Versuche lange dauern, ob nicht das aus der Luft von der

Nährlösung aufgenommene Ammoniak den Stickstoff geliefert habe.

Vergleichen wir Ammoniak und Salpetersäure mit einander, so ist bemerkenswerth, dass während die Schimmelpilze und die Spaltpilze die Salpetersäure assimiliren können, die Sprosspilze wohl durch Ammoniak aber nicht durch Salpetersäure ernährt werden. Auf die letzteren wirkt die Anwesenheit der Salpetersäure kaum günstiger, als wenn gar keine Stickstoffquelle vorhanden wäre, indem die eine Zeit lang vegetirende und sich fortpflanzende Sprosshefe zwar durch Bildung von Cellulose und Fett ihr Gesamtgewicht etwas vermehrt, den gesammten Stickstoffgehalt aber bedeutend vermindert (Versuch 55, b, c, d).

Die Resultate bei der Kultur der Schimmelpilze sind noch zweifelhaft. In einem Falle schien salpetersaures Ammoniak sich besonders günstig zu verhalten (vgl. Versuch 15 mit 13), während andere Male dasselbe keine grössere Ernte ergab als essigsaures Ammoniak (Versuche 14 und 16) oder als salpetersaures Kali (Versuch 58 b und c). Eine bessere Stickstoffquelle als Ammoniaksalze und Nitrate scheint der Harnstoff zu sein (Versuche 18, 19, 20, 58 d). — Was die Spaltpilze betrifft, so können manche von Salpetersäure wohl leben, zeigen aber mit Ammoniak ein entschieden besseres Gedeihen.

Es ist übrigens zu bemerken, dass die Salpetersäure nicht als solche assimilirt, sondern vorher in Ammoniak umgewandelt wird, und dass es somit wesentlich von dem Reduktionsvermögen der Pilze abhängt, ob sie dieselben ernähren kann oder nicht (Versuch 57, 58).

Suchen wir einen allgemeinen Ausdruck für die Ernährungstüchtigkeit der Stickstoffverbindungen, so können wir wohl sagen, dass der Stickstoff am leichtesten assimilirt wird, wenn er als NH_2 vorhanden ist, weniger leicht,

wenn er nur mit einem Wasserstoffatom verbunden ist (als NH), noch weniger leicht, wenn er als NO (ohne H) vorkommt, und dass er gar nicht assimilirt zu werden vermag, wenn er mit anderen Elementen als mit H und O verbunden ist. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass in einer solchen Verbindung durch die oxydirende Wirkung der Pilze selbst zuerst die Gruppe NO und aus derselben dann durch Reduction NH_2 entstehen kann. Dies ist wohl der Fall mit Trimethylamin und Triäthylamin.

Was die Quellen des Kohlenstoffs betrifft, so kann derselbe aus einer grossen Menge von organischen Verbindungen aufgenommen werden, wobei zu bemerken ist, dass für Schimmelvegetation die Lösungen beträchtlich sauer, für Spaltpilzvegetationen ziemlich alkalisch sein dürfen. Es ernähren bei Zutritt von Sauerstoff fast alle Kohlenstoffverbindungen, mögen sie sauer, indifferent oder alkalisch sein, sofern sie in Wasser löslich und nicht allzu giftig sind. Die allzu sauren oder alkalischen Eigenschaften müssen durch (unorganische) Basen oder Säuren abgestumpft werden. Die Unlöslichkeit oder Schwerlöslichkeit ist Schuld, warum die an Kohlenstoff und Wasserstoff reichen, an Sauerstoff armen Verbindungen nicht nähren. Die Humussubstanzen können für Schimmel- und Spaltpilze als Kohlenstoffquelle dienen, insofern sie löslich sind. Das aus Zucker künstlich dargestellte Humin zeigte sich ernährungsuntüchtig, ohne Zweifel wegen seiner Unlöslichkeit. Von nährenden schwächer antiseptischen Stoffen nenne ich beispielsweise Äthylalkohol (Versuch 34), Essigsäure (Versuch 2, 3, 4, 5, 6), von stärker antiseptischen Stoffen Phenol (Carbolsäure), Salicylsäure, Benzoësäure (Versuch 30, 31).

Es giebt aber einige Verbindungen, aus denen trotz ihrer nahen chemischen Verwandtschaft mit nährenden Substanzen die Pilze den Kohlenstoff nicht zu assimiliren

vermögen. Dahin gehören, ausser den unorganischen Verbindungen Kohlensäure und Cyan, die sog. organischen: Harnstoff, Ameisensäure, Oxalsäure, Oxamid (Versuch 17, 29, 26, 27, 37).

Versuchen wir den allgemeinen Charakter der assimilirbaren Kohlenstoffverbindungen festzustellen, so besteht die Bedingung wohl darin, dass sie die Gruppe CH_2 oder bloss CH enthalten. Vielleicht ist aber die Beschränkung beizufügen, dass die letztere Gruppe CH nur dann ernährt, wenn 2 oder mehrere C-atome, an welchen H hängt, unmittelbar mit einander verbunden sind. Es ernährt nämlich einerseits Methylamin (mit 1 C und 3 H), andererseits Benzoësäure (eine Kette von C-atomen, jedes mit 1 H) sicher, während Ameisensäure, in welcher an 1 C nur H und OH haften und ebenso Methylalkohol nicht assimilirt werden was indessen auch auf Rechnung ihrer antiseptischen Eigenschaften in Verbindung mit der ziemlich schweren Zersetzbarkeit kommen kann.²⁾

Dagegen kann der Kohlenstoff nicht assimilirt werden, wenn er unmittelbar nicht mit H, sondern nur mit andern Elementen zusammenhängt, wie dies in der Cyangruppe, ferner beim Harnstoff und der Oxalsäure nebst deren Abkömmlingen (Oxamid) der Fall ist. In diesen Verbindungen sind an C bloss N-, O- und C-atome befestigt.

Es besteht eine grosse Verschiedenheit in der Ernährungstüchtigkeit der verschiedenen Kohlenstoffverbindungen. Vom Standpunkte der morphologischen oder Constitutionschemie aus werden wir wohl annehmen dürfen, dass Verbindungen am leichtesten assimilirt werden, welche bereits

2) Die Ernährungsuntüchtigkeit von Verbindungen wie Chloral, Pikrinsäure, Chinin, Strychnin (Versuch 64) mag theils auf den antiseptischen Eigenschaften der Verbindungen oder der bei der Assimilation freiwerdenden Reste, theils auf dem Umstande beruhen, dass noch nicht die günstigste Zusammensetzung der Nährlösung gefunden wurde.

eine Atomgruppe besitzen, wie sie die zu bildende Substanz bedarf, und dass eine Verbindung um so weniger ernährt, je unvollständiger sie diese Gruppe enthält. Wir kennen nun zwar das erste Assimilationsprodukt der Pilzvegetation nicht und dürfen auch den Vorgang in den Pflanzengeweben, in welchen bei Anwesenheit des Chlorophylls Kohlensäure assimiliert wird, nicht etwa als Analogie benützen. Wenn wir aber die Ergebnisse der Ernährungsversuche bei Pilzen für eine Theorie verwenden wollen, so können wir vielleicht sagen, dass jene in dem ersten Assimilationsprodukt enthaltene Atomgruppe aus 2 oder eher 3 unmittelbar miteinander in einer Kette zusammenhängenden C-atomen, an denen unmittelbar sowohl H- als O-atome befestigt sind, bestehen muss, und dass durch Verdoppelung daraus zunächst eine (4 oder) 6 C-atome enthaltende Gruppe sich bildet. Findet dies wirklich statt, so begreifen wir die aus den Versuchen sich ergebenden Resultate, dass unter übrigens gleichen Umständen Verbindungen mit 1 C-atom am schwierigsten (Methylamin) oder gar nicht (Ameisensäure, Chloral) assimiliert werden, dass mit der steigenden Zahl der unmittelbar zusammenhängenden C-atome die Assimilation besser von Statten geht, (Leucin mit 6 C ernährt besser als Asparagin mit 4 C), dass es ferner günstiger ist, wenn an den C-atomen nicht bloss H-atome sondern auch O oder OH befestigt sind (die Gruppe $\text{CH}_2 \text{ OH}$ verhält sich unter übrigens gleichen Umständen günstiger als CH_3 , ebenso $\text{CH}_2 \cdot \text{CHO}$ günstiger als $\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3$), und dass Verbindungen mit mehreren C-atomen oder C-gruppen, die durch N oder O verbunden sind, nicht besser ernähren als solche, in denen die Gruppe nur einmal vorhanden ist (Trimethylamin nicht besser als Methylamin).

Auf die Constitution der in dem ersten Assimilationsprodukt enthaltenen Atomgruppe lässt sich aus der Be-

schaffenheit der nährenden Verbindungen kein Schluss ziehen, weil in den letzteren die entscheidende Gruppe offenbar ungleich constituirt ist und weil dessnachen Wanderungen der an der Kohlenstoffkette hängenden H- und O-atome bei der Assimilation angenommen werden müssen.

Ausser der chemischen Constitution der Nährverbindungen spielt aber jedenfalls noch ein anderer Umstand eine wesentliche Rolle bei der Assimilation. Die lebende Zelle wird unter übrigens gleichen Umständen diejenigen Substanzen am leichtesten zur Ernährung benutzen, für deren Assimilation sie die geringste Kraft aufwenden muss, — also diejenigen Substanzen, die von verschiedenen chemischen Mitteln am ehesten angegriffen und umgesetzt werden. Doch ist natürlich nur ganz im Allgemeinen ein Vergleich möglich, da ja die chemischen Verbindungen zu den verschiedenen Arten der Zersetzung sich nicht gleich verhalten, und da die Assimilation nichts anderes ist als eine besondere Art der Zersetzung, die mit den übrigen Zersetzungen bis zu einer bestimmten Grenze übereinstimmt, während sie im Einzelnen sich im Gegensatze zu ihnen befindet.

Doch macht uns dieser Gesichtspunkt manche Thatsache begreiflich, so z. B. warum Benzoëssäure und Salicylsäure besser ernähren als Phenol (Carbolsäure), warum Ameisensäure schwer oder gar nicht assimilirt wird, warum die Fettsäuren überhaupt ungünstig und die Essigsäure günstiger ist als die höheren Glieder, warum die Glycosen sich als die vorzüglichsten Kohlenstoffquellen erweisen.

Wie durch das Zusammenwirken der chemischen Constitution und der chemischen Widerstandsfähigkeit eine bestimmte Assimilationsfähigkeit bedingt wird, lässt sich einigermaßen erkennen, wenn man die Kohlenstoffquellen nach dem Grade ihres Nährwerthes in eine Reihe ordnet. Wir können etwa folgende Stufen unterscheiden, wobei die

günstigen Wirkungen der Gärthätigkeit der Pilzzellen und die ungünstigen der Giftigkeit der Verbindungen ausgeschlossen sind:

1. Die Zuckerarten.
2. Mannit; Glycerin; die Kohlenstoffgruppe im Leucin.
3. Weinsäure; Citronensäure; Bernsteinsäure; die Kohlenstoffgruppe im Asparagin.
4. Essigsäure; Aethylalkohol; Chinasäure.
5. Benzoësäure; Salicylsäure; die Kohlenstoffgruppe im Propylamin.
6. Die Kohlenstoffgruppe im Methylamin; Phenol.

Diese Stufenreihe hat nur bedingte Gültigkeit. Es giebt verschiedene Ursachen, welche die Ernährungsversuche mit Pilzen rücksichtlich ihrer Vergleichung unter einander erschweren. Ich werde nachher noch auf dieselben zu sprechen kommen. Bei der vorliegenden Frage tritt ein spezifischer Umstand in den Vordergrund. Die verschiedenen Nährverbindungen können als Kohlenstoffquelle nur dann in strengem Sinne vergleichend geprüft werden, wenn die Stickstoffquelle die nämliche ist, und ebenso als Stickstoffquelle nur dann, wenn die Kohlenstoffquelle sich gleich verhält. Oft aber sind beide verschieden. Wenn z. B. eine Nährlösung weinsaures Ammoniak, die andere Zucker und Methylamin enthält, so ist es zweifelhaft, wie viel jede der stickstoff- und kohlenstoffhaltigen Verbindungen zu dem Versuchsergebnisse beigetragen hat. Man kann zwar noch zwei andere Nährlösungen herstellen, von denen die eine Methylamin und Weinsäure mit einer unorganischen Basis, die andere Zucker und Ammoniak mit einer unorganischen Säure enthält. Man hat dann zwei Versuche mit der gleichen Stickstoffquelle und mit ungleichen Kohlenstoffquellen und zwei mit der gleichen Kohlenstoffquelle und mit ungleichen Stickstoffquellen. Eine

strenge Vergleichbarkeit ist aber damit doch nicht erreicht, denn einmal bleibt es fraglich, ob das Ammoniak in Verbindung mit Zucker die nämliche Assimilationsfähigkeit besitze wie mit Weinsäure, und der nämliche Zweifel besteht für die Wirksamkeit jeder der übrigen Verbindungen, — und ferner sind nicht bloss die Stickstoff- und Kohlenstoffquellen in den Versuchen vertauscht, sondern es sind auch die unorganischen Bestandtheile der Nährlösungen verändert worden, weil die Weinsäure und das Ammoniak neutralisirt werden mussten; die Wirksamkeit der organischen Verbindungen kann aber nur verglichen werden, wenn die unorganischen gleich sind. Ueberdem kann man bei Substanzen, die zugleich die Stickstoffquellen und die Kohlenstoffquellen enthalten, besonders wenn die Konstitution, wie bei den Albuminaten, unbekannt ist, auf dem Wege des Versuchs auch nicht annähernd die Wirkung der einen und andern bestimmen.

Es ist daher von wissenschaftlichem Interesse die Assimilationsfähigkeit der vereinigten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen zu kennen. Der praktische Nutzen, den die Kenntniss der Ernährungstüchtigkeit ganzer Nährlösungen gewährt, ist ohnehin selbstverständlich. Ich kann hierüber aber nicht viel mehr sagen, als was schon in der Mittheilung vom 3. Mai angegeben wurde. Wenn wir nur die Assimilation ohne Gärthätigkeit und ferner nur diejenigen Stoffe berücksichtigen, welche in grösserer Menge löslich sind, ohne giftig zu wirken, so können wir als eine von den besser zu den schlechter nährenden Substanzen fortschreitende Stufenreihe folgende anführen:

- 1) Eiweiss (Pepton) und Zucker,
- 2) Leucin und Zucker,
- 3) weinsaures Ammoniak oder Salmiak und Zucker,
- 4) Eiweiss (Pepton),
- 5) Leucin,

6) weinsaures Ammoniak, Bernstein-saures Ammoniak, Asparagin,

7) essig-saures Ammoniak.

Diese Stufenfolge für die Assimilationsfähigkeit wurde an einer Versuchsreihe mit Schimmelpilzen (*Penicillium*) gewonnen. Viele andere kleinere Versuchsreihen sowohl mit Schimmelpilzen als mit Spross- und Spaltpilzen stimmen damit im Allgemeinen überein. Die Vereinigung Pepton und Glycose, in welche Verbindungen Eiweiss und Rohrzucker oder Milchsucker zunächst umgewandelt werden, bildet mit einer nachher zu erörternden Beschränkung, mag Gärung stattfinden oder nicht, das beste Nährmaterial. So ergab beispielsweise die 1 procentige Zuckerlösung mit 1 Proz. Pepton eine 4 mal so grosse Zunahme der Sprosshefe als mit 1 Proz. weinsaurem Ammoniak, obgleich die vorhandene Gärthätigkeit ausgleichend wirkte (Versuch 54). Daraus ist es zu erklären, dass Flüssigkeiten aus Pflanzen und Thieren und Absude von pflanzlichen und thierischen Geweben meistens eine so lebhaftere Vegetation niederer Pilze hervorbringen.

Bemerkenswerth und einiger-massen überraschend ist die ausserordentlich günstige Wirkung der Beigabe von Zucker. Sie kann ja leicht erklärt werden, wenn Gärung stattfindet, weil Zucker in grösserer Menge zerlegt wird und dabei eine grössere Menge von Spannkraft frei werden lässt, als es bei anderem Gärmaterial der Fall ist. Aber der Zucker scheint seine günstige Wirkung auch zu äussern, wenn er wie bei Schimmelpilzkulturen nicht vergärt. Allerdings sind die in der Mittheilung vom 3. Mai angeführten Versuche noch nicht ganz entscheidend, da sie zu anderem Zwecke angestellt, nicht gleiche Mengenverhältnisse in den Nährlösungen sich vorsetzten. Wenn in der Versuchsreihe mit Schimmelpilzen, welche in der Mittheilung vom 3. Mai beschrieben ist, 0,8 Prozent Salmiak und 4,8 Prozent Zucker

in 34 Tagen 1,5 g Ernte gaben, dagegen 1 Prozent Albumin in 52 Tagen nur 0,86 g Ernte, — wenn ferner 1 Prozent weinsaures Ammoniak, 1 Prozent Weinsäure und 3 Prozent Zucker 2,3 g Ernte, dagegen 1 Prozent Albumin oder 1 Prozent Pepton bloss 0,5 g Ernte lieferten, so hatte jedenfalls der mit der Zuckerzugabe verbundene bedeutend grössere Prozentgehalt der Nährlösung einigen Einfluss auf das grössere Erntegewicht. Es ist aber doch fraglich, ob er dasselbe vollständig zu erklären vermöge und ob nicht ausserdem noch eine spezifische, vorerst nicht zu erklärende günstige Wirkung der Glycose auf die Assimilation anzunehmen sei. Weitere Versuche, die speziell zu diesem Behufe anzustellen sind, müssen darüber Aufschluss geben.

Ich habe bereits auf die Schwierigkeit hingewiesen, auf welche die Vergleichung der Kohlenstoffquellen unter sich oder der Stickstoffquellen unter sich stösst. Diese Schwierigkeit fällt nun allerdings hinweg, wenn man die ganzen Nährlösungen bezüglich ihrer Ernährungstüchtigkeit vergleicht, und man könnte dessnachen meinen, dass eine Reihe richtig angestellter Versuche uns unschwierig darüber Aufschluss geben sollte. Eine genauere Ueberlegung zeigt uns aber, dass, auch wenn alle experimentellen Bedingungen, die in unserer Macht liegen, erfüllt sind, noch mehrere störende Umstände zurückbleiben, die wir nicht beseitigen können.

Zu den Versuchsbedingungen, die sich mit gehöriger Vorsicht herstellen lassen, gehört vor Allem, dass nur gleiche Pilze mit einander verglichen werden, weil verschiedene Gattungen und selbst die nächst verwandten Formen sich ungleich verhalten können. So vermögen Schimmelpilze und gewisse Spaltpilze die Salpetersäure zu assimiliren, andere Spaltpilze und die Pilze der Wein- und Bierhefe dagegen nicht. So wachsen nach den Beobacht-

ungen von Dr. Hans Buchner die Heubacterien in Asparagin- und Leucinlösungen, indess die von denselben abstammenden (also nur varietätlich von denselben verschiedenen) Milzbrandbacterien nicht durch Asparagin und Leucin und überhaupt nur durch Eiweiss und Eiweisspeptone ernährt werden.

Bei vielen Versuchen ist eine strenge Reinkultur nicht erforderlich; es genügt, dass eine Pilzform in weit überwiegender Menge sich entwickle. Will man eine Schimmelvegetation mit Ausschluss der Spaltpilze erhalten, so muss die Nährlösung hinreichend sauer gemacht werden, wozu in Flüssigkeiten mit Ammoniaksalzen oder mit wenig Zucker, mit wenig Eiweiss etc. 0,5 Prozent Phosphorsäure und weniger genügen, in reicheren Nährflüssigkeiten dagegen bis 1 Prozent erforderlich ist. Sollen aber nur Spaltpilze wachsen und die Schimmelpilze ausgeschlossen werden, so reicht die neutrale Reaction dazu in der Regel hin; nöthigenfalls kann sie schwach alkalisch gemacht werden. Dabei ist noch zu bemerken, dass die Sprosspilze sich im Allgemeinen verhalten wie die Schimmelpilze und sehr häufig zugleich mit denselben auftreten, dass sie aber wegen ihrer viel geringeren Menge das Resultat meistens nicht stören.

Soll bei einer Versuchsreihe nur eine einzige bestimmte Pilzform wachsen, so dürfen in hinreichend ausgekochte pilzfreie Nährflüssigkeiten bloss Keime dieser Form gebracht werden. Um dies zu bewerkstelligen, bedarf es besonderer Vorsichtsmassregeln, die bis jetzt von den Beobachtern fast ausnahmslos vernachlässigt oder wenigstens nicht in vollkommen befriedigender Weise angewendet wurden.

Um eine ausschliessliche Schimmelvegetation zu erhalten, genügt es nicht, Schimmelsporen in das pilzfreie Glas einzutragen, denn mit denselben kommen immer auch Spaltpilze und zuweilen selbst Sprosspilze hinein. Ueber-

haupt ist es äusserst schwer, die winzigen Spaltpilze auszuschliessen, und es giebt wohl kaum ein anderes sicheres Mittel als folgendes, welches ich früher (1868) mehrfach anwendete, um zu zeigen, dass aus Schimmelpilzen sich weder Spaltpilze noch *Saccharomyces* entwickeln. Ein mit Blase zugebundenes Glas, welches die Nährflüssigkeit enthält, wird durch Erhitzen auf 120° C pilzfrei gemacht, die Blase dann mit Schimmelsporen bestreut und nur so lange durch Bedeckung mit einer Glasglocke feucht gehalten, bis die Schimmelfäden durch die Blase hindurch und längs der Glaswandung in die Flüssigkeit hinunter gewachsen sind. Statt der Blase kann auch ein Baumwollpfropf als Verschluss dienen. Auf diese Weise erhält man eine reine Schimmelvegetation ohne eine Spur von Spaltpilzen oder *Saccharomyces*zellen. — Mehrere in dieser Weise behandelte Gläser blieben 5 Jahre lang stehen, bis die Flüssigkeit vertrocknet war. Sie enthielten keine andern Organismen als Schimmelpilze. Andere Gläser, die schimmelfrei eintrockneten, waren ebenfalls nach 5 Jahren ganz frei von Pilzen und enthielten die unveränderten Nährstoffe.

Wenn eine bestimmte Art von mikroskopischen Pilzen ausschliesslich kultivirt werden soll, so lässt sich dies nur selten dadurch erreichen, dass man alle übrigen Formen bis auf die eine tödtet, z. B. durch Hitze. Gewöhnlich muss man auf einem andern Wege zu einer Reinkultur zu gelangen suchen und dann aus dieser die zu prüfenden Nährlösungen infiziren. Ich habe mir in den Jahren 1870 und 1871, theils um den Nichtübergang von *Saccharomyces* in Spaltpilze und umgekehrt darzuthun, theils um bei kleineren Versuchen mit Luftabschluss bloss eine einzige Pilzform zu haben, Reinkulturen auf zweierlei Art verschafft, und ich kenne auch jetzt noch kein anderes Mittel, um sie sicher zu erhalten.

Das eine Verfahren beruht auf der Thatsache, dass

die Gärthätigkeit eines Pilzes sein eigenes Wachsthum sehr befördert, dagegen die Ernährung und die Vermehrung der übrigen Pilze benachtheiligt. Mit Benützung dieser Thatsache kann man im Laufe einiger auf einander folgender Züchtungen durch Verdrängung der Mitbewerber leicht eine vollkommen reine Sprosshefe, weniger leicht einige reine Spaltpilzformen erlangen. Ich verweise hierüber auf das in der „Theorie der Gärung“ Gesagte.³⁾

Das andere Verfahren besteht darin, in eine pilzfreie Nährlösung womöglich einen einzigen Pilzkeim zu bringen, sodass die erwachsende Pilzvegetation bloss aus den Nachkommen desselben besteht. Zu diesem Zweck muss eine pilzführende Flüssigkeit, welche die gewollte Form in überwiegender Menge enthält, durch Wasser auf eine hinreichende Verdünnung gebracht werden. Das Verfahren wird am besten durch die Mittheilung eines bestimmten Versuches (1871) deutlich werden. Aus faulem Harn, in welchem sich ausser *Micrococcus* auch Stäbchen (Bakterien) befanden, sollte ersterer rein erhalten werden. Ein Tropfen, welcher etwa 0,03 ccm fasste und etwa 500000 Pilze enthielt, wurde in 30 ccm pilzfreies Wasser gegeben. Aus dieser 1000 fach verdünnten Flüssigkeit wurde, nachdem sie durch Schütteln wohl gemischt war, abermals ein Tropfen in 30 ccm Wasser eingetragen und somit eine millionfache Verdünnung hergestellt, in welcher je der zweite Tropfen (von 0,03 ccm) durchschnittlich einen Pilz enthalten musste. Von 10 pilzfreien Gläsern, von denen jedes mit einem Tropfen infiziert wurde, blieben 4 ohne Vegetation, in einem bildeten sich Bakterien und in 5 die gewünschten *Micrococcuszellen*.

3) Abhandl. d. k. b. A. d. W. II. Cl. XIII. Bd. II. Abth. 140 (66). Sep.-Ausg. 76.

Eine zweite Bedingung für vergleichbare Versuche ist die, dass jede Gärthätigkeit ausgeschlossen sei. Da diese das Wachsthum so ausserordentlich befördert, so wird die Vergleichung der Assimilationsfähigkeit zweier Nährsubstanzen, von denen die eine gärfähig ist, die andere nicht, unmöglich. Wenn man Schimmelpilze einerseits mit Zucker und anderseits mit Glycerin ernährt, so erhält man Resultate, welche genau dem Nährwerth der beiden Verbindungen entsprechen. Bringt man dagegen Sprosspilze (*Saccharomyces*) in die nämlichen zwei Nährlösungen, so wachsen dieselben in der Zuckerlösung unvergleichlich viel besser, weil sie darin Gärung verursachen. Das Glycerin ernährt sie nach dem seiner Constitution zukommenden Werthe, der Zucker dagegen ernährt sie nicht bloss nach Massgabe seiner Constitution, sondern überdem noch vermöge der Spannkraft, welche bei der Gärung frei und auf das lebende Plasma übertragen wird. — Die Spaltpilze können verschiedene Gärungen bewirken und sie schöpfen aus jeder derselben eine andere Kraftmenge. Man hat sich daher bei vergleichenden Ernährungsversuchen, die man mit Spross- und mit Spaltpilzen anstellt, immer die Frage vorzulegen, ob bei dem einen oder andern Versuch Gärung stattgefunden und um wie viel dieselbe wohl das Wachsthum begünstigt habe.

Zu den Umständen, welche bei Ernährungsversuchen mit verschiedenen Verbindungen nicht gleich gemacht werden können und daher störend sind, gehört die spezifische Wirkung, welche die Verbindungen, abgesehen von ihrer Assimilationsfähigkeit, auf die lebende Zelle ausüben. Ich habe bereits oben bei einer verwandten Frage von dieser Wirkung gesprochen. Sie besteht darin, dass jede Verbindung bei einer gewissen Concentration der Lösung die Lebensenergie herunterstimmt. Diese schädliche Concentration ist für jede Verbindung eine andere; für jede

Verbindung ist daher auch das Optimum der Concentration, bei welcher sie einen bestimmten Pilz am besten ernährt, ein anderes. Da nun bei vergleichenden Versuchen die Flüssigkeiten äquivalente Mengen von Nährstoffen enthalten müssen, so sind die Lösungen ungleich weit von ihrem Optimum entfernt, und man läuft überdem Gefahr, dass die eine oder andere Lösung einen geradezu schädlichen Concentrationsgrad erreicht habe. Es kann dieser Punkt nicht genug berücksichtigt werden, wenn man die Beziehung zwischen chemischer Constitution und Assimilationsfähigkeit beurtheilen will. Giebt es doch Verbindungen, welche an und für sich gut ernähren würden, wenn nicht ihre giftigen Eigenschaften sie schon in sehr verdünnter Lösung dazu untauglich machten.

Ein zweiter Umstand, welcher die Vergleichung der Versuche beeinträchtigt und nicht beseitigt werden kann, ist die ungleiche Fähigkeit der Nährverbindungen zu diosmiren. Derselbe macht sich besonders fühlbar beim Zusammenhalte der Albuminate und der ihnen nahestehenden Stoffe mit den krystallisirenden Nährsubstanzen. Die Pilzzellen müssen die Albuminate, um sie aufnehmen zu können, zuerst in eine diosmirende Form umwandeln. Von Peptonen giebt es bekanntlich verschiedene Modificationen, solche die den Albuminaten näher stehen und weniger gut diosmiren, und solche, die mehr verändert sind und besser durch Membranen hindurch gehen. Die Pilze müssen daher auch, wenn sie mit schwer diosmirenden Peptonen ernährt werden, zuerst durch ein ausgeschiedenes Ferment die Peptonisirung vollenden.

Dieser Process verläuft nicht nur bei verschiedenen Pilzen ungleich rasch, indem die meisten Spaltpilze sehr energisch, die Schimmelpilze weniger gut und die Sprosspilze fast gar nicht zu peptonisiren vermögen. Sondern es übt auch die Beschaffenheit der Nährlösung, namentlich

die Reaction derselben einen entscheidenden Einfluss aus. Viele Spaltpilze peptonisiren das Eiweiss in neutralen und in ziemlich stark alkalischen Lösungen sehr gut; die Schimmelpilze peptonisiren es noch in schwach sauren Flüssigkeiten, z. B. in $\frac{1}{2}$ proz. Phosphorsäurelösung ziemlich rasch, dagegen sehr langsam in 1 proz. Phosphorsäurelösung.

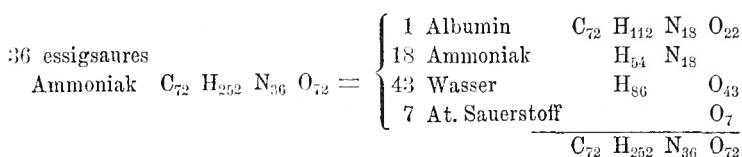
Wenn es sich also um Vergleichung von Albuminaten mit anderen Nährsubstanzen handelt, so ist zu berücksichtigen, welche Wahrscheinlichkeit der Peptonisirung unter den vorliegenden Umständen gegeben sei, und wenn Peptone verglichen werden sollen, so ist die Frage, welche Beschaffenheit und besonders welche Fähigkeit zu diosmiren dieselben schon besitzen und ob sie von den Pilzzellen noch verändert werden müssen. Man darf nicht etwa sagen, die Albuminate seien, weil sie von den Zellen nicht aufgenommen werden, überhaupt ernährungsuntüchtig. Dies trifft allerdings für gewisse Pilze und gewisse Umstände zu, während für andere Pilze und andere Umstände die Eiweissstoffe zu den allerbesten Nährsubstanzen gehören.

Andere störende Umstände sind die ungleiche Löslichkeit der Verbindungen und die damit zusammenhängende ungleiche Anziehung zu Wasser, — ferner ihre ungleiche Oxydationsfähigkeit, die bei Pilzkulturen eine so wichtige Rolle spielt, — ihr ungleiches Verhalten zur Temperatur, indem für jede Verbindung und einen bestimmten Pilz ein anderer Wärmegrad als Optimum erscheint, — dann der Luftzutritt, welcher bezüglich seiner grösseren oder geringeren Ausgiebigkeit einen so entscheidenden Einfluss auf das Wachsthum der Pilze ausübt und der doch mit Sicherheit fast nie in ganz gleicher Weise hergestellt werden kann. Ich will nicht näher auf diese Umstände eintreten. In manchen Fällen sind sie ohne Bedeutung; in andern aber können

sie das Kulturergebniss wesentlich beeinflussen, wesshalb sie nie ausser Acht gelassen werden dürfen. 4)

Endlich giebt es einen Umstand, der bei allen Ernährungsversuchen mitspielt und jedes Mal das Resultat in eigenthümlicher, nicht genau zu schätzender Weise mitbedingt. Er besteht darin, dass die Nährlösung durch die Pilzvegetation verändert wird, wodurch sie für die nämlichen oder für andere Pilze bald günstiger bald ungünstiger ausfällt. Wie schon längst bekannt ist, hört bei der Milchsäuregärung das Wachsthum der Spaltpilze nach einiger Zeit auf, wenn nicht die Säure durch Kalk neutralisirt wird. In diesem Falle haben wir es zwar mit einer Gärwirkung zu thun, welche die Flüssigkeit immer saurer und für das Gedeihen der Spaltpilze schädlicher macht. Aber die Ernährung selbst, wenn auch alle Gärwirkung mangelt, führt ebenfalls, zwar langsamere, doch oft sehr bemerkenswerthe Modificationen herbei. Besteht die Nährsubstanz z. B. in essigsauerm Ammoniak, so wird die Flüssigkeit durch kohlen-saures Ammoniak alkalisch, indem schon bei der blossen Eiweissbildung auf 6 Molecüle essigsaueres Ammoniak, ohne Berücksichtigung der Oxydation, 3 Ammoniak frei werden. Der Vorgang bei dieser Assimilation wird durch folgende Gleichung deutlich:

4) Was den Luftzutritt betrifft, so muss wenigstens als Bedingung festgehalten werden, dass die Pilze der zu vergleichenden Kulturen sämmtlich entweder an der Oberfläche der Nährlösungen oder untergetaucht in denselben leben. Viele Pilze (Schimmel-, Spross- oder Spaltpilze) können entweder als Decke auf der Flüssigkeit oder als Flocken in derselben wachsen, und zwar lässt sich, wenn die Gärthätigkeit ausgeschlossen ist, der eine oder andere Zustand beliebig hervorbringen, indem die Deckenbildung dem lebhafteren, die Bildung untergetauchter Flocken dem trägeren Wachsthum entspricht. Man kann beispielsweise einen deckenbildenden Pilz in einen untergetauchten verwandeln, indem man ihn in eine verdünntere Nährlösung oder in die nämliche Nährlösung, die eine antiseptische Verbindung enthält, umzüchtet.



Das essigsäure Ammoniak ernährt nicht, wenn nicht die Luft Zutritt und reichliche Oxydation veranlasst. Es dient somit nicht bloss der bei der Assimilation freiwerdende Sauerstoff, sondern auch noch eine gewisse Menge von aus der Luft aufgenommenem Sauerstoff zur Verbrennung von Essigsäure, so dass bedeutend mehr als die Hälfte des in dem Nährsalz enthaltenen Ammoniaks frei werden muss, damit sich Albuminate bilden.

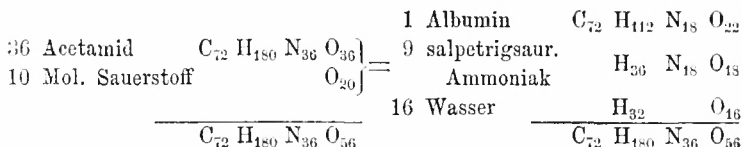
Die Pilzzelle erzeugt ferner nicht bloss Eiweissstoffe, sondern auch Kohlenhydrate und Fett. Berechnen wir die stickstofflosen Verbindungen als eine mit den Albuminaten gleichgrosse Cellulosemenge, so müssen bei der Entstehung der Pilzzellen, ohne die Oxydation durch den freien Sauerstoff zu berücksichtigen, von je 7 Ammoniumgruppen des essigsäuren Ammoniaks 5 als Ammoniak frei werden. — Bei der Assimilation von neutralem weinsaurem Ammoniak kann auf je 6 Ammoniumgruppen nur 1 verwendet werden; 5 gehen als Ammoniak in die Flüssigkeit.

Der nämliche Process wie der eben erörterte findet immer statt, wenn man das Ammoniaksalz einer organischen Säure als Nahrung verwendet. Die Nährlösung wird alkalisch und zuerst für Schimmel- und Sprosspilze, nachher auch für Spaltpilze ungünstiger. Enthält die angewendete Flüssigkeit freie Säure, so wird sie nach und nach neutral und dann alkalisch; die Schimmel- und Sprosspilze, die anfänglich begünstigt waren, werden nachher von den Spaltpilzen verdrängt. Ist eine Nährlösung so sehr alkalisch geworden, dass alles Pilzwachsthum darin aufhört, so vermindert sich bei längerem Stehen die alkalische Beschaffen-

heit durch Entweichen von Ammoniak und die Pilze können wieder wachsen.

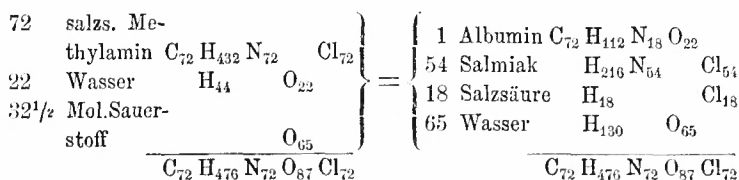
Auch bei der Anwendung von manchen organischen Verbindungen, die zugleich Kohlenstoff und Stickstoff enthalten (wie Asparagin, Kreatin, Harnsäure etc.), wird die Nährflüssigkeit bei der Assimilation durch Freiwerden von Ammoniak alkalisch. Doch kann, da die Pilze ein grösseres oder geringeres Oxydationsvermögen besitzen, unter Umständen der Fall eintreten, dass ein Theil des entstehenden Ammoniaks zu Salpetersäure oder salpetriger Säure oxydirt wird, welche sich mit dem übrigen Ammoniak verbindet.

Dieser Vorgang fand bei dem später unter Nr. 36 erwähnten Versuch statt. Die aus Acetamid bestehende Nährlösung behielt während der Pilzbildung ihre ganz schwach saure Reaction und es bildete sich unter Sauerstoffaufnahme viel salpetrigsaures Ammoniak, worüber, wenn wir bloss die Albuminbildung berücksichtigen, folgende Gleichung Aufschluss geben kann.



Wird ausser dem Albumin eine demselben gleiche Gewichtsmenge Cellulose erzeugt, so vermehrt sich die Menge des salpetrigsauren Ammoniaks um 15 Moleküle.

Ich führe noch einige Beispiele anderer Veränderungen der Nährlösung an. Eine neutrale Lösung von salzsaurem Methylamin (Versuch 35) wurde, indem sich eine Vegetation von Spaltpilzen bildete, schwach sauer. Sie enthielt wenig freie Salzsäure und viel Salmiak. Der Assimilationsvorgang bezüglich der Albuminate kann durch folgende Gleichung erklärt werden:



Noch grössere Mengen von Salmiak und Salzsäure als bei der Bildung von Albumin müssen entstehen, wenn gleichgrosse Gewichtsmengen von stickstofffreien Verbindungen assimiliert werden. — Die geringe Menge der in der Lösung zuletzt vorgefundenen freien Salzsäure mag theils dadurch erklärt werden, dass während der langen Versuchsdauer ein Theil der Salzsäure durch Verdunstung fortging, theils dadurch, dass ein Theil derselben sich mit Zersetzungsprodukten der Pilzsubstanz verbunden hatte.

Eine Nährlösung, welche Harnstoff und Aethylalkohol enthielt (Versuch 34), wurde im Brütkasten (36° C) mit der Bildung von Spaltpilzen sauer, indem diese einen Theil des Alkohols zu Essigsäure oxydirten. Die nämliche Nährflüssigkeit wurde bei Zimmertemperatur ebenfalls mit Erzeugung von Spaltpilzen schwach alkalisch, indem hier die Essigbildung entweder mangelte, oder wenigstens nicht ausreichte, um das aus dem Harnstoff gebildete kohlensaure Ammoniak zu neutralisiren. Die saure Reaction beim ersten Versuch war die Ursache, warum sich nur eine mässige Spaltpilzvegetation entwickelte und nach 14 Tagen durch reichliche Schimmelpilze abgelöst wurde, während beim zweiten Versuch die Spaltpilze sich stark vermehrten und die Schimmelpilze auch nach 6 Wochen noch ausblieben.

Wenn, wie dies in den soeben angeführten Beispielen der Fall war, die neuen Verbindungen bei der Assimilation in grösserer Menge entstehen, so haben dieselben auf die Vegetation der Pilze und auf die Ernte einen merklichen

Einfluss. Es bilden sich aber ausserdem auch neue Verbindungen in so geringer Menge, dass sie bei der Vergleichung verschiedener Nährsubstanzen vernachlässigt werden können. Die chemische Analyse weist einige solcher Verbindungen nach. Ich will hier nur von einer Erscheinung sprechen, die zwar schon beobachtet wurde, aber nicht die richtige Beurtheilung gefunden hat; es ist die Bildung eines gelösten Farbstoffes von gelbgrünem bis blaugrünem Ton bei der Kultur von Spaltpilzen.

Diese Färbung der Nährflüssigkeit wurde bei einer Menge unserer Kulturen beobachtet, vorzüglich wenn ein Ammoniaksalz oder eine andere einfach zusammengesetzte Nährsubstanz (z. B. Harnstoff mit Weingeist oder Asparagin) zur Anwendung kam. Dass das Wasser selbst gefärbt war, ergab sich deutlich in denjenigen Fällen, wo es die unveränderte Farbe behielt, während die Pilze sich als farbloser Niederschlag absetzten. Wie es scheint, tritt die Färbung nur bei alkalischer Reaction auf, wobei die Flüssigkeit nach Ammoniak riecht. Sie ist ferner Folge einer Oxydation. Denn sie beginnt an der Oberfläche und schreitet nach unten hin fort; — man beobachtet dies indess nur, wenn keine Bewegung (auch nicht von schwärmenden Spaltpilzen) in der Flüssigkeit vorhanden ist. Diese zeigt sich dann in einem früheren Stadium oben intensiv gefärbt, unten farblos. Bei Luftabschluss bleibt die Färbung ganz aus. Die Lösung fluoreszirt zuweilen sehr deutlich, indem sie im auffallenden Lichte grün, im durchfallenden Lichte gelb aussieht und einer Lösung von Fluorescein vollkommen gleicht.

Von den später angeführten Versuchen war beispielsweise die Flüssigkeit mit weinsaurem Ammoniak grünlich, diejenige mit milchsaurem Ammoniak gelblich, diejenige mit essigsaurem Ammoniak blaugrünlich (Versuch 24 a, b, c), diejenige mit salicylsaurem Ammoniak (Versuch 31) stark

grün, diejenige mit Asparagin (Versuch 21) hellgrün, diejenige mit Harnstoff und Weingeist (Versuch 34, das Glas in Zimmertemperatur) starkgrün und fluorescirend.⁵⁾

Eine grosse Zahl von vergleichenden Beobachtungen über die Ernährung des Bierhefenpilzes war schon 1869 von A. Mayer (Untersuchungen über die alkoholische Gärung) angestellt worden. Derselbe kam aber in dieser ersten Arbeit zu einem Resultat, welches im Gegensatze zu den oben ausgesprochenen Regeln steht. Es sollten nämlich in einer Zuckerlösung „diejenigen stickstoffhaltigen organischen Körper, die die complizirteste Zusammensetzung haben und verhältnissmässig sauerstoffarm sind“ (nämlich die Albuminate) fast gar nicht ernähren, „diejenigen stickstoffhaltigen organischen Körper, die verhältnissmässig hoch oxydirt sind und den Ammoniakverbindungen näher stehen“, sollten

5) Die besprochene Erscheinung ist ganz anderer Natur als die bekannten (namentlich rothen) Färbungen, welche die Spaltpilze selbst zuweilen zeigen, und daher nicht mit denselben zu vermengen. Auch ist die Entstehung sowohl der einen als der andern Färbung nicht ein Speciesmerkmal, wie Schroeter und Cohn irrthümlich angenommen haben, und beschränkt sich gleichfalls nicht auf Micrococcus-Formen.

Was den gelösten Farbstoff von grünlichem Ton betrifft, so entsteht derselbe erst nachträglich durch Oxydation aus einer noch unbekannten, bei der Assimilation frei werdenden farblosen Verbindung. — Was die Färbung der Spaltpilze selbst betrifft, so hat dieselbe ohne allen Zweifel ihren Sitz in den weichen Zellmembranen, und ist eine analoge Erscheinung wie die Färbung der Zellhäute vieler Nostochinen, die mit den Spaltpilzen in so naher morphologischer Beziehung stehen. Dass sie nicht zur spezifischen Unterscheidung benutzt werden darf, geht deutlich aus Kulturversuchen hervor. Ein Spirillum, welches intensiv rothe Decken auf Sumpfwasser bildete, gab bei der Kultur in verschiedenen Nährflüssigkeiten nur selten wieder roth gefärbte Spirillen; meistens wurden die Pilze farblos und verloren mehr oder weniger ihre schraubenförmige Gestalt, indem sie sich zu schwach gebogenen oder auch ganz geraden Stäbchen streckten.

besser und die Ammoniaksalze am besten ernähren. Bei einer spätern Untersuchung (Nobbe's Landwirthschaftliche Versuchsstationen 1871) wurden diese Aussprüche dahin modifizirt und ergänzt, dass die Ernährungstüchtigkeit einer stickstoffhaltigen Verbindung vorzüglich von ihrem Vermögen, durch Membranen zu diosmiren, abhängig und dass zu den bestnährenden auch Pepsin und die peptonartigen Stoffe zu zählen seien.

Die Untersuchungsmethode war folgende. Kleine Glasfläschchen wurden mit 20 ccm Nährlösung versehen, eine Spur Bierhefe zugesetzt, aus dem Gewichtsverlust die entwichene Kohlensäure Tag für Tag bestimmt und daraus auf die Intensität der Gärung, sowie aus dieser auf das Wachsthum der Hefe geschlossen. Vom chemischen Gesichtspunkte sind die getroffenen Vorsichtsmassregeln wohl als ausreichend zu betrachten, — und die Folgerungen, die aus den zahlreichen Versuchen nicht bloss rücksichtlich der Assimilationsfähigkeit der stickstoffhaltigen Verbindungen, sondern auch rücksichtlich der Wirksamkeit der Mineralstoffe (Aschenbestandtheile) gezogen wurden, wären ebenfalls nicht zu beanstanden, wenn die dabei obwaltende Voraussetzung zuträfe, dass in den verschiedenen Nährlösungen wenigstens in ganz überwiegender Masse die gleichen morphologischen und physiologischen Vorgänge, nämlich Bildung von Alkoholhefe und geistige Gärung, stattgefunden haben. Diese Voraussetzung konnte zur Zeit, als die Versuche angestellt wurden, nach dem, was damals bekannt war, von dem Chemiker unbedenklich gemacht werden. Sie hat sich aber durch die seitherige Erfahrung als irrthümlich erwiesen. Es giebt zwei Gründe, warum die fraglichen Versuche als unbrauchbar zu betrachten sind.

Der erste Grund besteht darin, dass die Kulturen nicht rein waren. Es giebt keine Bierhefe, die nicht eine grössere oder geringere Anzahl von Spaltpilzen enthielte. Besonders

unrein ist aber die Presshefe; in derselben befinden sich nicht nur grosse Mengen von Spaltpilzen, sondern auch Schimmelsporen (besonders von *Penicillium*) und wohl auch Sprosshefezellen, die keine oder nur geringe Gärung verursachen. A. Mayer verwendete zu seinen Versuchen Presshefe, wie unzweifelhaft daraus sich ergibt, dass es „käufliche Hefe“ war, in welcher „immer Stärkmehl gefunden“ wurde. Durch Schlämmen lassen sich wohl die Stärkekörner, nicht aber die anderen Pilze und Pilzkeime entfernen, da diese nahezu das gleiche spezifische Gewicht besitzen wie die Sprosshefezellen. Wenn man Presshefe zur Aussaat benutzt, so sät man nach den verschiedenen Proben, die ich davon untersucht habe, zwar ein viel grösseres Gewicht von Sprosspilzen, aber häufig eine gleiche oder grössere Individuenzahl von Spaltpilzen aus. Wären aber auch die Sprosspilze in stark überwiegender Anzahl vorhanden, so wäre dadurch bloss bei Aussaat von beträchtlichen Mengen ihre fast ausschliessliche Vermehrung gesichert, wie ich anderswo nachgewiesen habe (Theorie der Gärung).

Werden bloss Spuren in die pilzfreie Nährflüssigkeit ausgesät, wie dies bei den fraglichen Versuchen der Fall war, so entscheidet nicht mehr die relative Menge, in welcher ein Pilz in dieser Spur enthalten ist, darüber, ob er gegenüber den andern Pilzen sich zu behaupten vermöge. Sondern es hängt nun von der Beschaffenheit der Nährflüssigkeit, von der Temperatur, von dem Zutritte der Luft und von anderen noch unbekannten Ursachen ab, welche Pilze zur Entwicklung gelangen und die anderen mehr oder weniger verdrängen. Bei sehr zahlreichen Versuchen, welche ich vor Jahren mit verschiedenen neutralen Nährlösungen bei Aussaat kleiner Mengen von Bierhefe anstellte, erhielt ich fast nie eine nur einigermaßen reine Vegetation derselben, sondern damit gemengt geringere oder grössere Mengen von Spaltpilzen mit Milchsäure- und Buttersäure-

gärung oder Schleimbildung oder Mannitbildung; oft auch wurde die Bierhefe durch die Spaltpilze ganz verdrängt. ⁶⁾

In den Fläschchen von A. Mayer musste das Nämliche eintreten; — und dass es wirklich der Fall gewesen ist, geht auch aus den beiläufigen Bemerkungen über die beobachteten Organismen hervor (eine genaue und erschöpfende mikroskopische Untersuchung der Ernten, um die verschiedenen Pilze und ihre relativen Mengen festzustellen, wurde nicht vorgenommen). In manchen Fällen wurde nämlich eine schleimige Haut an der Oberfläche, ohne Zweifel aus Spaltpilzen bestehend, in andern „*Mycoderma vini*“, in noch andern Schimmelpilze, selbst fructifizierend, wahrgenommen.

Alle Pilze entwickeln Kohlensäure; bei Gärungen durch Spaltpilze (Mannit-, Milchsäure-, Buttersäurebildung) wird dieselbe in grösseren Mengen entwickelt. Nach den neueren Beobachtungen ist es auch ausser Zweifel gestellt, dass Alkohol durch Spaltpilze gebildet wird. Die entweichende Kohlensäure und der in der Flüssigkeit vorgefundene Alkohol kann also in keinem Falle, wie es von A. Mayer versucht wurde, als Massstab für das Wachsthum der Sprosshefe benützt werden. Dass Milchsäuregärung in manchem seiner Versuche, in denen sie nicht beobachtet wurde, stattgefunden habe, dafür spricht das Auftreten von Schimmelpilzen. Denn diese stellen sich nicht leicht in der unveränderten Nährlösung, noch in einer Flüssigkeit, die reich an Alkohol- oder Essigsäure ist, ein, wohl aber folgen sie mit Vorliebe auf Milchsäurebildung. — Die Kohlensäureent-

6) In Folge dieser Erfahrungen wurde die Methode der Aussaat minimaler Mengen von Sprosshefe ganz aufgegeben, insoferne nicht vorher durch besondere Versuche eine Reinzucht hergestellt werden konnte, oder in der hinreichend sauren Beschaffenheit der Flüssigkeit die Gewähr für die Existenzfähigkeit der Sprosspilze gegeben war.

wickelung nebst Alkoholbildung ist aber nicht bloss ungeeignet, über die Ernährung der Sprosshefe Auskunft zu geben. Sie kann auch nicht als Anhalt für die Ernährung der Pilze überhaupt dienen. Es wäre selbst möglich, dass ein Versuch mit den besten Nährsubstanzen die grösste Menge von Pilzsubstanz, aber die geringste Menge von Kohlensäure und Alkohol erzeugte.

Ein anderer ebenso schwer wiegender Grund, warum Versuche wie die in Frage stehenden als unbrauchbar zu erklären sind, besteht in dem mit denselben nothwendig verbundenen ungleichen Zutritt von Sauerstoff. Das Gedeihen der verschiedenen Pilze ist wesentlich von dem Grade der Oxydation abhängig, welche der Genuss des freien Sauerstoffs ihnen gestattet. Jeder Pilz zeigt in der nämlichen Nährflüssigkeit bei vollständigem Abschluss der Luft das geringste Wachsthum (resp. vollständigen Mangel an Wachsthum), und mit der allmäligen Zunahme des Luftzutrittes ein stetig zunehmendes Wachsthum. Die erste Regel für alle vergleichenden Untersuchungen über Ernährung der Pilze verlangt daher für alle eine gleichgrosse Betheiligung des freien Sauerstoffs. Diess kann dadurch geschehen, dass man denselben ganz ausschliesst, oder dadurch, dass man in offenen flachen Gefässen von gleicher Form ungehinderten Luftzutritt gestattet, oder endlich dadurch, dass man gleich grosse Mengen von Luft in Blasen von gleicher Grösse und in gleicher Zeit durch die sonst abgeschlossene Flüssigkeit durchstreichen lässt. Die Versuche von A. Mayer waren aber so angestellt, dass der Luftzutritt ganz ungleich ausfallen musste. An den Fläschchen befanden sich nämlich luftdicht befestigte Chlorcalciumröhrchen, die am Ende mit einem Kautschukventil verschlossen waren. Bei hinreichender Kohlensäureentwicklung konnte kein Sauerstoff eintreten; bei sehr schwacher oder mangelnder Kohlensäurebildung dagegen

drang Sauerstoff ein, wie dies deutlich aus dem Umstande hervorgeht, dass in manchen Fläschchen schon nach wenigen Tagen eine Gewichtszunahme, bei einigen abwechselnd Zunahme und Abnahme, in einzelnen Fällen selbst ein rasche Zunahme des Gewichtes beobachtet wurde. Es ist möglich, dass die Sauerstoffaufnahme nur in ganz wenigen Fällen, vielleicht auch in keinem einzigen vollständig gemangelt hat. Immerhin kann die jeden Tag beobachtete Gewichtsveränderung nur als die Differenz der entwichenen Kohlensäure und des eingedrungenen Sauerstoffs gelten. Sie ist daher theils aus diesem Grunde, theils desswegen, weil der in ungleicher Menge aufgenommene Sauerstoff die Vegetation in ungleichem Grade beeinflusste, kein Mass für die Assimilationsfähigkeit der Nährflüssigkeit.

Nach dem jetzigen Stande der Wissenschaft giebt es, wie ich glaube, keine andere auch nur einigermaßen genügende Methode für die vergleichende Untersuchung der Ernährungstüchtigkeit verschiedener Nährstoffe, als Gleichhaltung aller äusseren Umstände (namentlich auch des Luftzutrittes), Sicherstellung, dass die nämlichen Pilzvegetationen in den verschiedenen Versuchen auftreten, und quantitative Bestimmung des Ernteergebnisses, wenigstens der gesammten Gewichtszunahme und der Stickstoffzunahme.

Bezüglich der Ausführung unserer Versuche bemerke ich Folgendes. Im Jahr 1868/9 verwendete ich als mineralische Nährstoffe ausgeglühte Asche von Fichtenholz, von jungen Trieben der Rosskastanie und von Erbsen, die durch Phosphorsäure neutralisirt war, ferner ausgeglühte Asche von Bierhefe, — und zwar jeweilen 0,1 g auf 100 ccm Flüssigkeit. Für Spaltpilzkulturen wurden neutrale Nährlösungen benutzt, für Schimmelkulturen wurden dieselben mit der auf Assimilationsfähigkeit zu untersuchenden or-

ganischen Säure oder mit Phosphorsäure stark angesäuert. Für Kontrollversuche dienten immer die nämlichen Nährlösungen mit Ausschluss der zu prüfenden organischen Verbindung oder der Asche. Die Versuche beschränkten sich meistens darauf, fest zu stellen, ob eine Lösung ernähre oder nicht.

Ich führe einige der 1868/9 angestellten Versuche an. Die Nährflüssigkeit betrug jedes Mal 300 ccm.

1. Phosphorsaures Ammoniak 0,2 Proz., Citronensäure 1,4 Proz. — Sehr reichliche Schimmel- und Sprosspilze.

1,b. Der Kontrollversuch, in welchem nur das phosphorsaure Ammoniak fehlte, gab beide Pilze sehr spärlich; ebenso der andere Kontrollversuch (1,c), in welchem bloss die Citronensäure mangelte.

2. Essigsaures Ammoniak 0,4 Proz., essigsaures Natron 1 Proz. — Anfänglich kleine Schimmelrasen an der Oberfläche. Dann zahllose Spaltpilze, die Flüssigkeit trübend und eine Decke bildend.

2,b. Der Kontrollversuch, in welchem das essigsaure Ammoniak weggelassen war, gab nur ein äusserst dünnes Häutchen aus winzigen Spaltpilzen (*Micrococcus*) und spärlichen Monaden bestehend.

2,c. Der Kontrollversuch, in welchem bloss die Asche weggelassen war, gab einige untergetauchte Schimmelrasen, dann eine sehr dünne Schimmeldecke (*Mucor*).

3. Essigsaures Ammoniak 0,4 Proz., essigsaures Natron 1 Proz.; mit Phosphorsäure angesäuert, also von Nr. 2 durch die saure Reaction unterschieden. — Ziemlich reichliche Schimmel- und Sprosspilze. Später, als die Reaction neutral und alkalisch wurde, Spaltpilze, eine dünne Decke bildend und die Flüssigkeit trübend.

4. Essigsaures Ammoniak 0,4 Proz., essigsaures Natron 1 Proz., Essigsäure 1 Proz. — Nach einiger Zeit starke Schimmeldecke.

5. Salpetersaures Kali 0,4 Proz., essigsaures Natron 1 Proz. — Ziemlich reichliche Spaltpilze, die Flüssigkeit trübend und eine dünne Decke bildend.

6. Salpetersaures Kali 0,4 Proz., essigsaures Natron 1 Proz., Essigsäure 1 Proz. — Nach längerer Zeit starke Schimmeldecke.

7. Phosphorsaures Ammoniak 0,23 Proz., reinster Rohrzucker des Handels (derselbe enthielt 0,06 Proz. Stickstoff) 10 Proz. — Reichliche Spaltpilze, die Flüssigkeit stark trübend und eine dünne Decke bildend, in welcher ziemlich viele Monaden sich befanden. Dann trat ziemlich Gasentwicklung auf; die Flüssigkeit wurde sauer (Milchsäure) und es bildete sich eine dünne Schimmeldecke.

8. Phosphorsaures Ammoniak 0,23 Proz., reinster Rohrzucker 10 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,1 Proz., also von Nr. 7 nur durch die saure Reaction unterschieden. — Da die Flüssigkeit nicht sauer genug war (es wurden neben Schimmelpilzen auch ziemlich zahlreiche Spaltpilze beobachtet), so wurde nach einigen Tagen noch einmal die gleiche Menge Phosphorsäure zugesetzt, worauf die Spaltpilze verschwanden und eine starke Schimmeldecke sich einstellte.

Die Versuche 7 und 8 waren mit Holzasche (durch Phosphorsäure neutralisirt) angestellt. Mit Hefenasche gaben sie etwas schwächere Vegetationen.

9. Salpetersaures Kali 0,4 Proz., reinster Rohrzucker 10 Proz. — Reichliche Spaltpilze, die Flüssigkeit trübend und eine dünne Decke bildend, in welcher sich zahlreiche Monaden befanden. Dann wurde die Flüssigkeit sauer (Milchsäure) ohne sichtbare Gasentwicklung und es bildete sich eine Schimmeldecke. — Nach zwei Jahren waren die Schimmelpilze abgestorben, die Flüssigkeit roth und das Gewicht der bei 105° C. getrockneten Ernte (von 300 ccm Flüssigkeit) betrug 1,549 g.

10. Salpetersaures Kali 0,4 Proz., reinster Rohrzucker 10 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,13 Proz., also von Nr. 9 nur durch die saure Reaction verschieden. — Sehr starke Schimmeldecke. — Nach zwei Jahren waren die Schimmelpilze abgestorben, die 30 g Zucker vollständig verschwunden, grösstentheils durch Oxydation. Das Destillat enthielt geringe Mengen Weingeist, ein Beweis, dass sich auch etwas Sprosshefe gebildet hatte. Das Trockengewicht der Ernte betrug 3,7 g; darin befanden sich wenigstens 0,045 g Stickstoff, entsprechend 0,281 g Albumin, während die 30 g Kolonialzucker 0,018 g Stickstoff (0,06 Proz.) enthalten hatten. In Aether lösten sich 29,1 Proz. der Trockensubstanz, welche grösstentheils Fett sein mussten.

10,b. Bei einem Kontrollversuch zu Nr. 7, 8, 9 und 10, in welchem sich 10 Proz. des nämlichen Zuckers nebst Asche befanden, also die Stickstoffquellen (Ammoniak oder Salpetersäure) mangelten und in welchem die Flüssigkeit neutral war, trat ein sehr dünnes Häutchen von Spaltpilzen mit zahlreichen Monaden und, nachdem die Flüssigkeit sauer geworden, etwas Schimmelbildung auf. — Nach zwei Jahren ergab die zugleich mit Nr. 9 und 10 vorgenommene Untersuchung nur geringe Abnahme des Zuckergehaltes und bloss 0,070 g Trockensubstanz, also $\frac{1}{22}$ der Ernte des Versuches Nr. 9, welcher salpetersaures Kali enthielt.

10,c. Ein Kontrollversuch zu Nr. 7, bei welchem die Asche weggelassen wurde, der also in neutraler Flüssigkeit phosphorsaures Ammoniak und Zucker enthielt, lieferte zwar eine deutlich geringere Ernte als Nr. 7, aber zugleich eine deutlich beträchtlichere Ernte als der vorhin angeführte Kontrollversuch, bei welchem sich die Aschenbestandtheile, aber keine Stickstoffverbindungen befanden, so dass es scheinen könnte, als ob unter Umständen der Stickstoff die Mineralstoffe zu vertreten vermöge, was ja auch schon

behauptet wurde, aber um mit Grund angenommen zu werden, doch noch weiterer genauer Untersuchungen bedürfte.

10,d. Ein Kontrollversuch zu Nr. 7, 8, 9, 10, bei welchem sowohl die Stickstoffquellen (Ammoniak oder Salpetersäure) als die Aschenbestandtheile mangelten, der also nur Zucker enthielt, ergab eine äusserst schwache Vegetation zuerst von Spaltpilzen und Monaden und dann von Schimmelfäden in der sauer gewordenen Flüssigkeit. Die Vegetation war noch schwächer als in 10,b.

11. Phosphorsaures Ammoniak 0,11 Proz., Oxalsäure 0,12 Proz., welche dazu dienten um die bei diesem Versuche unverändert zugesetzte Holzasche zu neutralisiren. — Die Flüssigkeit blieb unverändert.

12. Phosphorsaures Ammoniak 0,13 Proz., aus Zucker dargestelltes Humin, welches vorher mit Ammoniak bis zu schwach alkalischer Reaction versetzt worden war, 0,66 Proz. — Die Flüssigkeit blieb unverändert. Das Humin war unlöslich.

Bei den Versuchen, welche ich im Jahr 1870/1 gemeinschaftlich mit Dr. Walter Nägeli anstellte, wurden die mineralischen Stoffe ebenfalls als Asche zugesetzt. Da der Hauptzweck dieser Versuche dahin ging, die Wirkung der Anwesenheit und des Mangels von freiem Sauerstoff zu prüfen, so wurden zum Theil wieder die nämlichen, zum Theil andere Nährstoffe verwendet, indem je einige Gläser mit Luftabschluss und einige zur Kontrolle mit Luftzutritt behandelt wurden. Ich will hier bloss von den letzteren sprechen, und zwar nur insofern sie von den bereits angeführten verschieden sind.

13. Essigsaures Ammoniak 0,7 Proz., reinster Rohrzucker 11 Proz. — Reichliche Spaltpilze, die Flüssigkeit trübend, und nachdem die Flüssigkeit durch Milchsäure-

bildung sauer geworden, Sprosshefen- und Schimmelbildung oder nur die letztere.

14. Essigsäures Ammoniak 0,8 Proz., reinster Rohrzucker 11 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz. — Sprosshefe und Gärung; dann Schimmelbildung. Die Ernte war etwas geringer als bei Nr. 13.

14,b. Ebenso, aber 0,4 Proz. P_2O_5 . — Wie Nr. 14, aber Gärung weniger lebhaft, Schimmelbildung fast gleich.

15. Salpetersäures Ammoniak 0,4 Proz., reinster Rohrzucker 11 Proz. — Spaltpilz- und Milchsäurebildung mässig, aber äusserst reichliche Schimmelbildung, wohl 20 mal reichlicher als bei Nr. 14 und 13.

16. Salpetersäures Ammoniak 0,4 Proz., reinster Rohrzucker 11 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz. — Sprosshefenbildung und Gärung ziemlich lebhaft, dann Schimmelbildung. Ernte ziemlich wie Nr. 14, aber mehr als 20 mal geringer als bei Nr. 15.

17. Harnstoff 1 Proz., 2 Proz. und 4 Proz. — Keine Pilze.

18. Harnstoff 1 Proz., Citronensäure 2 Proz. — Reichliche Schimmelbildung.

19. Harnstoff 1 Proz., reinster Rohrzucker 9 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz. — Sprosshefe und Gärung, dann reichliche Schimmelbildung.

20. Harnstoff 1 Proz., Glycerin 9 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz. — Reichliche Schimmelbildung.

21. Asparagin 1 Proz. — Die Nährflüssigkeit wird trüb und alkalisch, mit starkem ammoniakalischem Geruch und mit zahllosen kurzen stäbchenförmigen Spaltpilzen in Schwärmbewegung.

22. Asparagin 1 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,3 Proz. — Sehr geringe Schimmelbildung.

23. Asparagin 1 Proz., Citronensäure 1 Proz. —

Reichliche Sprosspilzbildung. Die Schimmelpilze waren durch die Versuchsanordnung ausgeschlossen.

Die Versuche, welche im Jahr 1875/6 gemeinschaftlich mit Dr. W. Nägeli ausgeführt wurden, hatten gleichfalls den Zweck, die Wirksamkeit der An- und Abwesenheit von freiem Sauerstoff zu untersuchen. Die Mineralsubstanzen wurden wieder als Asche von Hefe, Erbsen, Holz, Tabak, die durch Phosphorsäure neutralisirt war, zugesetzt, in vielen Fällen aber auch als Salzlösungen, nämlich phosphorsaures Kali, schwefelsaure Magnesia und Chlorcalcium in den entsprechenden Mengen. Von den zur Kontrolle angestellten Versuchen mit Luftzutritt mögen folgende, die nicht bereits früher angeführt sind, erwähnt werden.

24. Milchsäures Ammoniak 0,4 Proz., mineralische Nährsalze. — Reichliche Spaltpilzbildung. Ein bemerkenswerther Unterschied in der Erntemenge gegenüber gleichzeitig angestellten und in jeder Beziehung gleich behandelten Versuchen mit Lösungen b) von weinsäurem Ammoniak und c) essigsäurem Ammoniak ⁷⁾ war nicht zu beobachten.

25. Bernsteinsäures Ammoniak 0,5 Proz., mineralische Nährsalze. — Reichliche Spaltpilzbildung.

26. Oxalsäures Ammoniak 0,3 Proz., mineralische Nährsalze. — Keine Pilzbildung.

27. Oxalsäures Ammoniak 1 Proz., Oxalsäure 1 Proz., mineralische Nährsalze. — Keine Pilzbildung.

28. Oxalsäures Ammoniak 1 Proz., Oxalsäure 1 Proz., reinster Rohrzucker 13 Proz., mineralische Nährsalze. — Sehr reichliche Schimmelvegetation.

7) Bei andern Versuchen stand das essigsäure Ammoniak an Ernährungstüchtigkeit entschieden dem weinsäuren und milchsäuren Ammoniak nach.

29. Ameisensaures Ammoniak 0,1 Proz., mineralische Nährsalze. — Unverändert, sowohl im Brütkasten als bei Zimmertemperatur.

30. Phenol (Carbolsäure) 0,08 Proz., Ammoniak etwa 0,2 Proz., mineralische Nährsalze. Die Reaction der Nährflüssigkeit war fast neutral (ganz schwach alkalisch). — Ein Glas, das in den Brütkasten gestellt wurde, blieb unverändert. Die zwei in Zimmertemperatur befindlichen Gläser trübten sich und zeigten ziemlich zahlreiche Spaltpilze (eine winzige Micrococcusform), das eine überdem spärliche, das andere viele Sprosspilze.

31. Salicylsaures Ammoniak 0,1 Proz., mineralische Nährsalze. — Sehr reichliche Vegetation von Spaltpilzen (Micrococcus und Bacterium), welche die Flüssigkeit trübten, stark grün färbten und einen etwas fauligen Geruch verursachten; — dies in zwei Gläsern bei Zimmertemperatur. Ein im Brütkasten befindliches Glas blieb anfänglich unverändert; nach 2 Monaten bildeten sich ein paar Schimmelrasen an der Oberfläche; keine Spaltpilze.

32. Phosphorsaures Ammoniak 0,5 Proz., Glycerin 5 Proz., Asche, Kreide. — Aeusserst reichliche Spaltpilzbildung, und später auf der sauren Flüssigkeit eine Schimmeldecke.

33. Die Versuche über Ernährungstüchtigkeit der Humussubstanzen wurden mit Torf angestellt. Derselbe wurde in der Kälte oder in der Wärme mit Wasser, das 0,5 Proz. kohlen-saures Ammoniak enthielt, ausgelaugt und die Lösung zu den Versuchen benützt. Oder es wurden die Gläser zur Hälfte mit Torf und dann zu $\frac{3}{4}$ mit Wasser gefüllt, welches entweder keinen Zusatz erhielt, oder mit 0,2 bis 0,5 Proz. kohlen-saurem Ammoniak, mit 0,2 Proz. Ammoniak, mit 0,1 Proz. Kali versetzt war. Die Gläser erfuhren entweder keine weitere Behandlung, oder sie wurden zunächst während längerer Zeit (20 Stunden) einer Tem-

peratur von 90 bis 92° C. ausgesetzt. Die Lösungen, welche einen Zusatz von kohlensaurem Ammoniak, von Ammoniak oder von Kali erhalten hatten, reagirten schwach alkalisch oder sie waren beinahe neutral; diejenigen ohne Zusatz zeigten äusserst schwach saure Reaction.

Die Kulturresultate waren sehr verschiedene. Einige Male bildete sich in den Lösungen bald eine mehr spärliche bald eine reichliche Vegetation von Spaltpilzen (*Micrococcus* und *Spirillum*, seltener *Bacterien*), in welcher sich dann auch *Monaden* einstellten. Ein Mal blieb jede Pilzbildung aus, wie dies auch bei Anwendung von künstlichem Humus der Fall gewesen (Versuch 12). Ich setze den negativen Erfolg auf Rechnung der Unlöslichkeit der Humussubstanzen, nicht etwa, wie man allenfalls vermuthen könnte, auf den Mangel an mineralischen Nährsalzen, an denen mancher Torf sehr arm ist. Denn es stellte sich eine ziemlich reichliche Algenvegetation ein.

34. Harnstoff 0,5 Proz., Aethylalkohol 2,3 Proz., mineralische Nährsalze. — Ein Glas im Brütkasten zeigte mässige Spaltpilzbildung mit saurer Reaction, nachher eine dicke Schimmeldecke. Ein anderes Glas bei Zimmertemperatur ergab eine sehr reichliche Spaltpilzvegetation mit schwach alkalischer Reaction. Ueber den chemischen Befund habe ich bereits oben gesprochen.

34.b. Kontrollversuche, bei denen der Harnstoff mangelte, zeigten im Brütkasten eine äusserst spärliche Spaltpilzvegetation, bei Zimmertemperatur gar keine Veränderung.

35. Salzsaures Methylamin 0,5 Proz., mineralische Nährsalze. — Ziemlich reichliche Spaltpilzbildung. Das Auftreten von Salmiak und freier Salzsäure bei diesem Versuche wurde bereits erwähnt.

36. Acetamid 0,5 Proz., mineralische Nährsalze. — Reichliche Spaltpilzbildung. Von dem dabei entstehenden salpetrigsauren Ammoniak wurde oben gesprochen.

37. Oxamid 0,5 Proz., mineralische Nährsalze. — Nach zwei Jahren war die Flüssigkeit noch unverändert.

Ich halte es für überflüssig, anderer Versuche, die kein sicheres Resultat gegeben haben, wie z. B. mit buttersaurem Ammoniak, baldriansaurem Ammoniak, Glycocoll, Acetanilid, Tannin, Salicin besonders zu erwähnen. Wenn Pilzbildung ausbleibt, so ist ja immer die Frage, ob die angewendeten Verbindungen ernährungsuntüchtig sind oder ob in anderen Verhältnissen die Ursache zu suchen ist. Tritt nur spärliche Vegetation auf, so können die angewendeten Verbindungen schwer assimilirbar, oder die Ernährung kann durch verunreinigende Stoffe bewirkt sein. — Ebenso spreche ich nicht von allen anderen Versuchen, wo das Resultat selbstverständlich ist, wo z. B. Zucker- oder Glycerinlösungen mit den verschiedensten stickstoffhaltigen Verbindungen als Nahrung dienten.

Wie bereits erwähnt wurde, habe ich in der bisherigen Aufzählung nur diejenigen Versuche berücksichtigt, bei denen der Luftzutritt gestattet war. Wird die Nährflüssigkeit unter Luftabschluss gehalten, so besteht, wie ich dies in der „Theorie der Gärung“ angegeben, ausser der Assimilationsfähigkeit der organischen Verbindungen noch die fernere Bedingung für das Wachsthum der Pilzzellen, dass dieselben eine Gärthätigkeit von einem bestimmten Intensitätsgrad ausüben. Die Ernährung und Vermehrung der Pilze unterbleibt vollständig, wenn das Gärvermögen jenen Grad nicht erreicht, und ist um so lebhafter, je mehr es ihn überschreitet.

Die meisten Versuche, die ich über die Einwirkung des freien Sauerstoffs angestellt habe, betreffen die Spaltpilze. Bei diesen sind die Verhältnisse, wegen der verschiedenartigen Gärungen, die sie verursachen können, sehr

mannigfaltig und verwickelt. Um dennoch hier eine Vorstellung zu geben, wie die Assimilationstüchtigkeit der Pilze durch die Gärthätigkeit beeinflusst wird, will ich kurz die Ergebnisse der weniger zahlreichen Versuche mit Sprosspilzen mittheilen, bei denen sich die Sache, da sie nur Zucker zu vergären vermögen, viel einfacher gestaltet. Zur übersichtlicheren Darstellung fasse ich ganze Gruppen von Versuchen unter Nummern zusammen. Ich bemerke dazu, dass die Versuche zu verschiedenen Zeiten (in den Jahren 1868 bis 1876) und mit verschiedenen Nebenabsichten angestellt wurden. Daraus erklärt sich, dass die Mengenverhältnisse der angewendeten Nährstoffe oft ungleich ausfielen, was unerklärlich wäre, wenn sie mit Rücksicht auf einander angeordnet worden wären. Der Luftabschluss wurde immer durch Quecksilber bewirkt.

38. Es ist bekannt, dass der Traubenmost ohne Zutritt von Luft vergären kann. Richtig angestellte Versuche zeigen nun, dass die Gärung in dem nämlichen Most um so rascher eintritt, je länger derselbe vor dem Abschluss die Einwirkung der Luft erfahren hat und ebenso, je grösser bei gleicher Lufteinwirkung die Zahl der darin enthaltenen Keime ist, — dass es aber für die Menge der sich bildenden Hefe ohne Belang ist, ob der Traubensaft mit der Luft gar nicht in Berührung kommt, indem er unter Quecksilber ausgepresst wird, oder ob er bloss einige Minuten, einige Stunden oder $1\frac{1}{2}$ Tage mit der Luft in Berührung war, ob die Gläser, in die er gefüllt wird, ausgekocht und von der verdichteten Luftschicht an ihrer Oberfläche befreit waren oder nicht, ob bloss klarer Traubensaft benutzt oder ob demselben eine beliebige Menge Traubenfleisch mit oder ohne Schalen beigemischt wird (die Zugabe von Traubenschalen beschleunigt die Hefenbildung, weil dieselben eine grössere Menge von Keimen in die Flüssigkeit bringen). Der nämliche Traubenmost, der bei

Zutritt von Luft in 20 bis 30 Tagen vergärt, bedarf dazu unter Abschluss von Luft 4 bis 7 Monate; -- und von dem nämlichen Most bedürfen beispielsweise diejenigen Parteen, die sogleich nach dem Auspressen luftdicht abgeschlossen wurden, 15 bis 20 Wochen, diejenigen Parteen dagegen, die vor dem Luftabschluss während 18 Stunden in flachen Tellern der Luftwirkung ausgesetzt waren, 6 bis 9 Wochen zur vollständigen Vergärung.

Wenn man dem Traubenmost Zucker, Glycerin, Weingeist, ein Salz oder eine Säure zusetzt, so verläuft bei Luftzutritt die Gärung um so langsamer, je grösser der Zusatz ist; es vergärt auch nicht mehr aller Zucker und bei einer bestimmten Zusatzmenge tritt überhaupt keine Gärung mehr ein, während die Hefe sich zwar noch, aber sehr langsam und nur an der Oberfläche, wo sie in Berührung mit Luft ist, vermehrt. Bei Luftabschluss beobachtet man die gleichen Folgen schon bei viel geringeren Zusatzmengen, mit dem Unterschied jedoch, dass eine Vermehrung der Hefezellen ohne Gärung nicht stattfindet, und dass somit die gleiche Zusatzmenge die Gärwirkung und die Assimilation aufhebt.

39. Gekochter Traubenmost, dem man geringste Mengen von Hefe zusetzt, verhält sich ganz wie der unveränderte. Die Versuche mit demselben gewähren den Vortheil, dass man bei hinreichender Vorsicht eine grössere Gewissheit erlangt, es beginne die Vegetation in mehreren zu vergleichenden Gläsern mit Hefezellen von ungefähr gleicher Zahl und Beschaffenheit.

40. Kalte Auszüge oder Abkochungen von getrockneten Weinbeeren (Rosinen) verhalten sich nicht anders als Traubenmost mit der einzigen Ausnahme, dass der Zucker gegenüber den stickstoffhaltigen Nährstoffen in grösserem und daher weniger günstigem Verhältniss vorhanden ist. Werden die Rosinen wiederholt gekocht und fügt man dem

nicht mehr süß, sondern bloss etwas herb schmeckenden Kochwasser Zucker und Säure (Wein- oder Citronensäure) bei, so ernährt dasselbe bei Abschluss der Luft die Hefenzellen ähnlich wie Traubenmost.

41. Abkochungen von Pflanzentheilen, die mehr oder weniger Zucker enthalten (Mohrrüben, Kartoffeln). Bei Luftabschluss findet Vermehrung der Sprosshefe statt, sicherer, wenn bis 1 Prozent Wein- oder Citronensäure zugesetzt wird (wegen des Ausschlusses der Spaltpilze), aber lebhafter ohne Säurezusatz.

42. Malzauszug verhält sich wie Nr. 41.

43. Abkochung von Bierhefe oder kalter Auszug derselben, mit Zusatz von 0,5 bis 1 Proz. Citronensäure oder 0,4 bis 0,6 Proz. Phosphorsäure (P_2O_5) ernährt die Sprosshefe bei Zutritt von Luft; aber bei Abschluss derselben wird entweder gar keine oder nur eine minimale Menge von Zellen gebildet, Letzteres ohne Zweifel in Folge der äusserst geringen Menge von Zucker, die das Hefenwasser enthält.

Wird der Hefenabsud (welcher 1 Proz. feste Substanz enthält) mit 1 Proz. Glycerin oder 1 Proz. Mannit und überdem (zur Verhinderung der Spaltpilzbildung) mit 0,4 Proz. Phosphorsäure versetzt, so ist der Erfolg ganz derselbe, nämlich reichliche Hefenbildung mit Sauerstoff, und so gut wie keine Hefenbildung, wenn die Luft ausgeschlossen ist.

Erhält dagegen der Hefenabsud einen Zusatz von 1 bis 10 Proz. Zucker⁸⁾ und von 0,4 bis 1 Proz. Citronensäure oder 0,4 Proz. Phosphorsäure, so vermehrt sich die Sprosshefe ohne freien Sauerstoff und vergärt den Zucker fast vollständig.

8) Der hier sowie bei den folgenden Versuchen zugesetzte Zucker war Rohrzucker.

44. Fleischextractlösung verhält sich wie Hefenwasser, nur dass wegen vollständigen Mangels an Zucker auch die minimale Hefenbildung ausbleibt, wenn keine Luft Zutritt oder kein Zucker zugesetzt wird, wie sich aus folgenden Versuchen, die je mehrfach angestellt wurden, ergibt.

a) Wasser mit 1 Proz. Liebig'schem Fleischextract, ohne Luft. — Keine Sprosshefenbildung.

b) 1 proz. Fleischextractlösung mit 0,4 bis 0,6 Proz. Citronensäure mit Luft. — Reichliche Sprosshefe.

c) Ebenso, ohne Luft. — Keine Hefe.

d) Fleischextract 1 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,1 bis 6,2 Proz., mit Luft. — Hefe.

e) Ebenso, ohne Luft. — Keine Hefe.

f) Fleischextract 1 Proz., Glycerin 4,5 oder 9 Proz., mit Luft. — Sprosshefe, die aber leicht von Spaltpilzen verdrängt wird.

g) Fleischextract 1 Proz., Glycerin 4,5 oder 9 Proz., Citronensäure 0,5 Proz., mit Luft. — Reichliche Sprosshefe.

h) Ebenso, ohne Luft. — Keine Hefe.

i) Fleischextract 0,5 Proz., Glycerin 4 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 1 Proz., mit Luft. — Reichliche Hefe.

k) Ebenso, ohne Luft. — Keine Hefe.

l) Fleischextract 0,5 Proz., Zucker 4,5 Proz., oder Beides verdoppelt, ohne Luft. — Sehr reichliche Sprosshefe, wenn dieselbe nicht von Spaltpilzen verdrängt wird, und zwar zeigte sich die weniger concentrirte Lösung unter übrigens gleichen Umständen günstiger für die Sprosshefe.

m) Fleischextract 0,33 bis 1 Proz., Zucker 9 bis 13 Proz., Citronensäure 0,4 bis 0,8 Proz., ohne Luft. — Sehr reichliche Sprosshefe ohne Spaltpilze. Bei 2 Versuchen mit 0,33 Proz. Fleischextract, 13 Proz. Zucker und 0,7 Proz. Citronensäure fand vollständige weingeistige Vergärung statt. Bei 2 Versuchen mit 2 Proz. Fleischextract,

9 Proz. Zucker und 0,3 Proz. Citronensäure fand neben der geistigen Gärung etwas Spaltpilzbildung und Milchsäuregärung statt. Bei 3 Versuchen mit 1 Proz. Fleischextract, 20 Proz. Zucker und 0,8 Proz. Citronensäure trat nur geringe Vermehrung der Sprosshefenzellen und fast keine Alkoholbildung ein.

n) Fleischextract 0,4 bis 0,6 Proz., Zucker 9 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,3 bis 0,5 Proz., ohne Luft. — Sehr reichliche Sprosshefe ohne Spaltpilze.

o) Fleischextract 0,5 Proz., Zucker 9 Proz., Weingeist (absolut.) 4,2 Proz., ohne Luft. — Reichliche Sprosshefe, die aber nicht allen Zucker zu vergären vermag.

p) Fleischextract 0,4 Proz., Zucker 9 Proz., schwefelsaures Chinin 0,012 oder 0,0225 Proz., ohne Luft. — Reichliche Sprosshefe.

q) Fleischextract 0,5 Proz., Zucker 9 Proz., Alkohol (absolut.) 2 Proz., schwefelsaures Chinin 0,0066 Proz., ohne Luft. — Ziemlich viel Sprosshefe mit einer noch grösseren Menge von Spaltpilzen.

r) Fleischextract 0,5 Proz., Mannit 4,5 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz., mit Luft. — Sehr reichliche Sprosshefe.

s) Fleischextract 1 Proz., Mannit 1 Proz., Citronensäure 0,5 Proz., ohne Luft. — Reichliche Sprosshefe und Spaltpilze. Da der Mannit bei Ausschluss von Luft sonst nicht den Zucker ersetzen und die Sprosspilze ernähren kann, so hat ohne Zweifel bei diesem Versuch eine Umwandlung des Mannits in eine Glycoseform durch die Spaltpilze stattgefunden. Eine solche Umwandlung ist ja auch bereits früher von Berthelot nachgewiesen worden, und für den vorliegenden Versuch wird sie durch die beobachtete Entwicklung von Wasserstoffgas sehr nahe gelegt.

t) Fleischextract 1 Proz., Salicin 0,3 Proz., Citronensäure 0,5 Proz., ohne Luft. — Sprosshefe mit einer noch

grösseren Menge von Spaltpilzen, welche wahrscheinlich die Zuckerbildung aus dem Salicin bewirkten.

n) Fleischextract 1 Proz., Amygdalin 0,3 Proz., Citronensäure 0,5 Proz., ohne Luft. — Reichliche Sprosshefe, dabei Spaltpilze, denen wohl die Zuckerbildung aus dem Amygdalin zuzuschreiben ist.

45. Fleischauszug (aus gehacktem Fleisch mit der doppelten Menge destillirten Wassers, dem auf 125 ccm 1 Tropfen concentrirte Salzsäure und 0,6 g Kochsalz zugesetzt war, während 6 Stunden bei Zimmertemperatur bereitet) verhält sich ganz wie Fleischextract. Mit 0,2 bis 0,5 Proz. Phosphorsäure versetzt, ernährt derselbe bei Abschluss der Luft wohl noch spärlich die Spaltpilze, aber nicht die Sprosshefenzellen.

46. Harn ernährt bei Luftabschluss die Sprosspilze nicht, man mag ihn mit Säure versetzen oder nicht. Bei Luftzutritt vermag er ziemlich reichliche Sprosshefe zu bilden, wenn man ihm zur Abhaltung der Spaltpilze 0,5 bis 1 Proz. Weinsäure oder Citronensäure zufügt. — Bei Zusatz von Glycerin (4,5 bis 9 Proz.) vermehren sich die Sprosspilze, wenn die Luft abgehalten wird, ebenfalls nicht; dagegen begünstigt das Glycerin ihre Vermehrung bei Luftzutritt sehr beträchtlich.

Wird der Harn mit Zucker (9 Proz.) und Säure (0,5 oder 1 Proz. Citronensäure) versetzt, so findet bei Luftabschluss reichliche Sprosshefenbildung, dann aber auch Spaltpilzbildung statt, was wohl so zu erklären ist, dass der Harnstoff in kohlensaures Ammoniak übergeht, wo durch die Säure neutralisirt wird. — Enthält der Harn 9 Proz. Zucker und 4,5 Proz. Alkohol (absolut.), so bleibt bei Abschluss von Luft die Vermehrung der Spross- und Spaltpilze aus; während bei Luftzutritt zuerst die Spaltpilze sich vermehren und Milchsäure erzeugen, worauf die Sprosspilze zu wachsen beginnen.

47. Eiweiss und Eigelb von Hühnereiern mit oder ohne Säurezusatz kann bei Ausschluss von Luft die Sprosspilze nicht ernähren, wohl aber die Spaltpilze. Eine Nährlösung enthielt beispielsweise 33 Proz. Eiweiss oder Eigelb und 1 Proz. Citronensäure; in andern waren die Mengen von Eiweiss und Eigelb geringer.

48. Blutalbumin (4 Proz.) und Phosphorsäure (0,5 Proz.) mit etwas neutralisirter Erbsenasche ernähren die Sprosshefenzellen nicht, wenn die Luft abgehalten wird, — wohl aber bei Zutritt derselben.

49. Asparagin 1 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,3 Proz., Hefenasche, ohne Luft. — Keine Sprosshefe.

b) Ebenso mit Luft. — Mässige Sprosshefenbildung.

50. Harnstoff 1 Proz., Citronensäure 2 Proz., mit Phosphorsäure neutralisirte Erbsenasche, ohne Luft. — Keine Sprosshefe.

b) Ebenso, mit Luft. — Mässige Sprosshefenbildung.

c) Harnstoff 1 Proz., Glycerin (von 1,2 spezif. Gew.) 9 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz., neutralisirte Erbsenasche, ohne Luft. — Keine Sprosshefe.

d) Ebenso, mit Luft. — Reichliche Sprosspilze und Spaltpilze.

e) Harnstoff 1 Proz., Zucker 9 Proz., Phosphorsäure (P_2O_5) 0,2 Proz., neutralisirte Erbsenasche, ohne Luft. — Reichliche Sprosspilze und Spaltpilze.

51. Ammoniaksalze (z. B. der Weinsäure, Essigsäure) allein vermögen, wiewohl ziemlich kümmerlich, die Sprosspilze bei Zutritt von Luft zu ernähren, zu welchem Zwecke die Spaltpilze durch freie Säure und die Schimmelpilze durch Reinkultur auszuschliessen sind. Bei Abhaltung der Luft findet keine Ernährung statt.

Wenn die Nährlösung ausser dem Ammoniaksalz noch Glycerin enthält, so ist der Erfolg bezüglich der Sprosspilze der nämliche, nur dass das Wachsthum unter dem

Einfluss des freien Sauerstoffs viel lebhafter wird, während es ohne denselben gleichfalls ausbleibt.

Äusserst lebhaft ist das Wachsthum der Sprosspilze, wenn statt des Glycerins sich Zucker in der Flüssigkeit befindet und wenn reichlicher Sauerstoff Zutritt. Doch wird bei dieser Nahrung die Hefe geschwächt und stirbt zuletzt ab. Enthält beispielsweise die Nährlösung 9 Proz. Zucker, 1 oder 0,5 Proz. neutrales weinsaures Ammoniak und etwas mit Phosphorsäure neutralisirte Erbsen- oder Hefenasche, und wird diese Lösung je nach 2 Tagen erneuert, so kann während der ersten 4 Tage die Hefe sich auf das 4fache Gewicht vermehren, wenn die Trockensubstanz der jedes Mal zur Aussaat benutzten Hefenmenge 3 bis 4 Proz. der Nährflüssigkeit ausmacht. Aber das Wachsthum ist am Ende dieser kurzen Zeit schon viel träger geworden und es hört bei Fortsetzung des Versuches bald ganz auf, wobei die Spaltpilze die Oberhand gewinnen. Durch Erhöhung der Temperatur auf Brütwärme, durch reichliche Luftzufuhr, durch Zusatz einer grösseren Menge von Kaliphosphat und durch Anwendung von Nährsalzen statt der Asche wird zwar die Vegetation im Allgemeinen sehr befördert und durch etwas Säure werden die Sprosspilze gegenüber den Spaltpilzen begünstigt. Doch erleiden selbst unter den allergünstigsten Bedingungen die Sprosspilze, die den Stickstoff bloss in Form von Ammoniak erhalten, eine zunehmende Schwächung und gehen ihrem sicheren Untergang entgegen. Es lässt sich das Gewicht der Bierhefe mit Zucker und weinsaurem Ammoniak unter Durchleitung von Luft im Brütkasten während 64 Stunden auf das 12fache vermehren. Aber die Hefezellen sind dann viel fettreicher und stickstoffärmer geworden und sie sind in ihrer Lebensenergie geschwächt, indem sie an Gärtüchtigkeit eingeüsst haben und viel leichter der Concurrenz der Spaltpilze erliegen (vgl. auch Nr. 52, 53).

Wird der Zutritt der Luft verhindert, so vermögen Ammoniaksalze mit Zucker die Sprosspilze zwar noch durch viele Generationen zu ernähren, aber die Vermehrung ist jetzt eine viel geringere und hört in Folge von Erschöpfung nach viel weniger Generationen auf als bei Zutritt von Sauerstoff.

Das Gesagte gilt für alle Ammoniaksalze, wobei indessen zu bemerken ist, dass wenn dieselben für sich allein die Sprosspilze ernähren sollen, das weinsaure, citronensaure, bernsteinsaure Salz günstiger wirkt als das essigsaure, und dieses günstiger als das salicylsaure und benzoësaure Ammoniak. Befindet sich aber Glycerin oder Zucker in der Nährflüssigkeit, so verhalten sich die verschiedenen Ammoniaksalze fast gleich, insoferne sie nicht antiseptisch wirken; auch das salpetersaure Ammoniak giebt keine ungünstigeren Resultate als die übrigen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass bei Abschluss von Luft die Sprosspilze (wie alle Pilze) viel empfindlicher sind und daher ein allfälliger Säurezusatz sehr vorsichtig zu bemessen ist. So erweisen sich beispielsweise 0,8 Proz. Citronensäure in einer 9 proz. Zuckerlösung, welche 0,5 Proz. neutr. citronensaures Ammoniak und etwas Hefenasche enthält, entschieden als zu viel. Die Vermehrung der Sprosshefenzellen ist in diesem Falle äusserst träge; sie dauerte in mehreren Versuchen nach 2 Jahren noch fort; es hatte sich in dieser langen Zeit äusserst wenig Hefe gebildet und es war fast kein Zucker durch Gärung verschwunden. — Schädlicher als Citronensäure und Weinsäure wirken freie Essigsäure und freie Salpetersäure. Gänzlicher Mangel an freier Säure gewährt zwar die günstigsten Bedingungen für das Wachstum der Sprosspilze, aber auch die grösste Gefahr, dass sie durch die Spaltpilze verdrängt werden.

Die nachfolgenden Versuche sind von Dr. O. Löw ausgeführt und beschrieben worden.

52. Ernährung der Sprosshefe durch weinsaures Ammoniak und Zucker unter dem Einfluss von Luft und Wärme (Oct. 1877).

Es ist eine seit lange gemachte Erfahrung, dass Luftzutritt und mässige Erwärmung das Wachsthum der Sprosshefe begünstigen, allein über den relativen Einfluss dieser Factoren sind noch keine näheren quantitativen Angaben bekannt und wurden deshalb folgende Versuche angestellt:

Vier Flaschen a, b, c, d, erhielten gleiche Mengen Bierhefe, nämlich je 2,652 g Trockensubstanz entsprechend, und je einen Liter Nährflüssigkeit von folgender Zusammensetzung:

Zucker ⁹⁾	10	Prozent
Ammontartrat . .	0,5	„
Dikaliumphosphat .	0,035	„
Magnesiumsulfat .	0,006	„
Calciumchlorid . .	0,0015	„
Ammonsulfat . . .	0,0061	„

Die Flaschen a und c wurden in den Brütkasten (28—32° C) gestellt, b und d hatten Zimmertemperatur (15—19°); mit continuirlichem Luftstrom wurden a und b behandelt.

Nachdem so viel Zucker verschwunden war, dass man einen süssen Geschmack kaum mehr wahrnehmen konnte, wurde die überstehende Flüssigkeit von der Hefe abgossen und neue Nährlösung zur Hefe gegeben. Aus der abgossenen Flüssigkeit setzte sich nach längerem Stehen an einem kühlen Orte stets noch etwas Hefe ab, welche dann in die betreffenden Flaschen zurückgegeben wurde.

9) Unter Zucker ist hier stets der Colonialzucker des Handels zu verstehen.

Mit der fortschreitenden Gärung trat eine zunehmende saure Reaction ¹⁰⁾ auf, welche durch titrirte Ammoniakflüssigkeit neutralisirt wurde, um dem Hefenwachsthum keine ungünstigen Bedingungen erwachsen zu lassen. Bei a und c, also da wo höhere Temperatur einwirkte, erwies sich die Säurebildung am stärksten.

Am 10. Tage wurden die Versuche unterbrochen, die Ernten gewaschen und in Cylindergläsern absetzen lassen, um das Volum mit dem Gewichte vergleichen zu können, dann $\frac{1}{10}$ zur Trockensubstanzbestimmung verwendet.

Das Resultat war folgendes:

	Verbrauchte Liter Nährlösung	Erntegewicht	Erntevolum in cc	Ernte, im Viel- fachen der Aussaat	Gewicht eines cc Hefe, nach dem Trocknen	Verbrauchte Menge Ammoniak
a	7	7,72 g	43,7	2,91	0,176 g	6,32 g
b	4	6,04	36,7	2,27	0,164	3,75
c	6	4,29	26,5	1,62	0,162	5,81
d	5	2,81	18,1	1,06	0,155	4,20

Gleichzeitiger Einfluss von Luft und Wärme begünstigte also in dem verhältnissmässig kurze Zeit dauernden Versuche das Resultat ungemein; denn in a wurde nicht nur das grösste Erntegewicht, sondern auch die bestgenährte Hefe erhalten, was aus dem Vergleich der specifischen Gewichte sich ergibt.

Aus dem Resultat bei d ergibt sich aber, dass die angewandte Nährlösung bei mangelhaftem Luftzutritt und gewöhnlicher Temperatur keine günstige Ernährung herbeiführte.

10) Auf eintretender Milchsäuregärung beruhend.

Die Stickstoffbestimmungen in den Ernten ergaben folgendes Resultat:

	Absolute Menge Stickstoff:	Stickstoff in Prozenten:
a	0,529	6,85
b	0,347	6,18
c	0,299	6,97
d	0,197	7,03
Aussaat	0,238	9,00

Es geht daraus hervor, dass während bei gleichzeitiger Anwendung von Luft und Wärme die Eiweisssubstanzen um mehr als das Doppelte zunahmen, bei Abwesenheit dieser Factoren sogar eine Verminderung (durch Ausscheidung) eintrat. —

53. (März 1879). Bei einem andern Versuche mit Bierhefe wurde bei gleichem Zuckergehalt der Lösung die Menge des Ammontartrats auf 1 Prozent, und die des Dikaliumphosphats ebenfalls auf 1 Prozent erhöht; die Menge des Magnesiumsulfats betrug 0,01 Prozent, des Chlorcalciums: 0,0025 Prozent. Ammonsulfat wurde weggelassen. Das Gewicht der Trockensubstanz der angewandten Hefe¹¹⁾ betrug = 0,769 g; die angewandte Nährlösung anfangs 200 cc; sie wurde 3 mal erneuert und das letzte Mal auf 400 cc erhöht. Da es sich hier nur darum handelte, den Einfluss eines constanten Luftstroms näher zu bemessen, so wurden die Flaschen keiner höheren Temperatur ausgesetzt; es ergab sich nun für die Ernte

bei constant durchgeleitetem Luftstrom: 2,093 g

ohne Luftstrom: 1,478 g;

im ersten Falle also das 2,72 fache, im letzten nur das 1,92 fache der Aussaat.

11) Sie wurde unmittelbar nach Entnahme aus dem Bier-Gärbottig verwendet, nachdem sie einmal mit Wasser gewaschen war.

54. (März 1879). Vergleichung von Pepton und Ammontartrat bei Ernährung der Sprosshefe. Da Pepton einerseits dem Eiweiss ausserordentlich nahe steht ¹²⁾, andererseits im Gegensatz zu letzterem in einem gewissen Grad der Diosmose fähig ist, so lag es nahe zu vermuthen, dass es in Verbindung mit dem Cellulose liefernden Zucker die beste Nährmischung für Pilze abgeben müsse. In der That haben schon unsre Versuche mit Schimmel dieses Resultat voraussehen lassen (vgl. Mittheilung vom 3. Mai).

Die beiden Nährlösungen enthielten a) 1 Proz. Ammontartrat, b) 1 Proz. Pepton; im Uebrigen war die Zusammensetzung wie die soeben beschriebene (auf 100 Wasser, 10 Zucker, 1 Dikaliumphosphat etc.)

Angewandt wurde eine 0,773 g Trockensubstanz entsprechende Hefemenge ¹³⁾ und 200 cc Nährlösung, welche letztere nach erfolgter Vergärung erneuert und auf 400 cc erhöht wurde. Die Temperatur des Gärtraumes betrug 30 bis 32° C; ein Luftstrom wurde nicht durchgeleitet. Das Erntegewicht betrug

bei a = 0,966 g; Zunahme = 0,193 g = 24,97 Proz.,
 bei b = 1,611 g; „ = 0,838 g = 108,42 „

Die Zunahme ist also bei Peptonnahrung unter den gegebenen Umständen mehr als viermal so gross als bei Ammontartrat.

Es ist möglich, dass die Behandlung mit einem continuirlichen Luftstrom dieses Resultat im günstigen Sinne für Ammontartrat verändern würde. Ein Versuch in dieser Richtung musste wegen übermässiger Schaumbildung bei der Peptonnährlösung und des in Folge dessen eintretenden Verlustes unterbrochen werden. Ein weiterer Versuch,

12) Nach den neueren Untersuchungen von Maly ist es als depolymerisirtes Eiweiss zu betrachten.

13) Diese Bierhefe wurde nach zweitägigem Stehen an einem kühlen Orte verwendet.

wobei beide Nährlösungen im Brütkasten standen und nur die mit Ammontartrat mit einem Luftstrom behandelt wurde, ergab bei letzterer eine mehr als doppelt so hohe Ernte als bei der Peptonlösung. Doch lässt sich hieraus wegen der ungleichen Behandlungsweise kein Schluss ziehen.

55. Vergleich der Stickstoffernährung mit Ammoniak und Salpetersäure bei Sprosshefe (December 1877). Der Umstand, dass sowohl Schimmel- als Spaltpilze den Stickstoff aus der Salpetersäure zu assimiliren vermögen, die Sprosspilze aber hiezu unfähig sind, bildet eine zu auffallende Thatsache, als dass man sich nicht nochmals davon hätte überzeugen wollen. Die folgenden Versuche bestätigen diese Beobachtung vollständig.

Vier Flaschen wurden mit je 0,732 g Trockensubstanz entsprechender Menge Hefe ¹⁴⁾ und einer 9 prozentigen Zuckerlösung, deren Volum anfangs 200 cc betrug und mit der Hefezunahme auf 400, zuletzt auf 800 cc erhöht wurde, beschickt. Die Gärtemperatur betrug von 25—30°. Von den Nährsalzen wurde auf 100 Wasser: 0,035 Dikaliumphosphat, 0,006 Magnesiumsulfat und 0,0015 Calciumchlorid angewandt.

Die Flasche a erhielt nun 0,47 Prozent Ammontartrat und 0,005 Proz. Ammonsulfat.

Die Flasche b diente zum Controllversuch und mangelte hier jede Stickstoffquelle.

Bei c wurde als N-quelle eine dem Ammontartrat äquivalente Menge Natronsalpeter, und bei d Calciumnitrat zugefügt.

Bei a verlief die Gärung am schnellsten und da stets die Erneuerung der Nährlösung nach fast vollendeter Gärung stattfand, so kam es, dass schliesslich, bei Beendigung

14) Diese Hefe enthielt nach dem Trocknen bei 100° 9,29 Prozent N und 4,77 Prozent Asche.

des Versuches, nach 10 Tagen, a 2400 cc, b, c und d aber nur 1200 cc Nährlösung verbraucht hatten.

Das Erntegewicht betrug bei:

	Zunahme:
a = 2,836 g	2,104 g
b = 0,856	0,124
c = 0,880	0,148
d = 0,970	0,238

Die Stickstoff- und Aschebestimmungen gaben folgende Werthe:

	a	b	c	d	Ursprüngliche Hefe
Asche in Proz.	4,94	4,14	6,66	5,84	4,77
Stickstoff in Proz.	7,09	4,09	4,92	5,23	9,29
Absolute Menge Stickstoff in g	0,2011	0,0348	0,0377	0,0516	0,0680

Es geht also hieraus deutlich hervor, dass die geringe Gewichtsvermehrung bei b, c und d lediglich die Cellulose betraf, und eine Zunahme an Eiweisskörpern nur bei a, wo der Stickstoff in Form von Ammoniak dargeboten wurde, stattfand.

56. (Sommer 1879). Ein ähnlicher Versuch, bei welchem ausser der Temperatur des Brütkastens noch ein continuirlicher Luftstrom angewendet wurde, lieferte kein günstigeres Resultat.

Der Zuckergehalt der Nährlösung betrug 10 Prozent, die Menge des Dikaliumphosphats 1 Prozent, die angewandte Hefemenge = 1,280 g (Trockensubstanz), und die Nährlösung = 200 cc, welche 5 mal erneuert wurde. Es ergab sich bei a ohne jeden Zusatz eines N-haltigen Körpers als Ernte: 2,493 g; bei b mit Zusatz von 1 Prozent $\text{NO}_3 \text{ K}$:

2,368 g. Der Zusatz von Salpeter hatte also kein besseres Resultat herbeigeführt als Zucker allein und die erhaltene Vermehrung ist hier wohl fast ausschliesslich auf Kosten der Cellulosebildung zu setzen; da aber auch der reinste Zucker des Handels noch immer sehr geringe Mengen N-haltiger Materien enthält, so können diese wohl unter sonst günstigen Umständen bei der Hefe Verwendung finden und bei der Vermehrung mitgewirkt haben.

57. Assimilation der Salpetersäure durch Spaltpilze (Sommer 1879). Während Nitrate durch Sprosshefe nicht verändert werden, erfahren sie durch Spaltpilze bekanntlich verhältnissmässig rasch eine Reduction zu Nitriten und schliesslich zu Ammoniak. Durch folgenden Versuch konnte diese Reduction leicht dargethan werden:

Eine Nährlösung von der Zusammensetzung:

Wasser	200 g
Dikaliumtartrat . .	5
Natriumnitrat . .	2
MgSO ₄	0,08
Ca Cl ₂	0,02
K ₂ HPO ₄	1,0

wurde in einen 5—600 cc fassenden Kolben gebracht, dieser mit doppelt durchbohrten Kautschukpfropfen versehen und von Zeit zu Zeit Luft durch den Kolben gesaugt, welche concentrirte Schwefelsäure passirt hatte. Eine Aussaat von Spaltpilzen wurde nicht gemacht, diese entwickelten sich bald aus den aus der Luft ursprünglich in die Lösung gelangten Keimen und vermehrten sich anfangs ziemlich rasch. Die Reaction wurde bald entschieden alkalisch und schon nach 2 Wochen wurde eine nicht unbeträchtliche Reaction auf salpetrige Säure mit Jodkaliumstärkekleister nach dem Ansäuern erhalten. Nach 8 Wochen wurde die gebildete Pilzmasse abfiltrirt, sie wog 0,113 g.

Allein trotz dieser verhältnissmässig geringen Masse, war doch der grösste Theil des Tartrats zu Carbonat von den Pilzen oxydirt worden, während andererseits die Salpetersäure theils zu salpetriger Säure, theils zu Ammoniak reducirt worden war, welch' letzteres sich als Carbonat in der Flüssigkeit vorfand.

58. Assimilation der Salpetersäure durch Schimmelpilze (Sommer 1879). Salpetersäure wird zwar von den Schimmelpilzen assimilirt und sicherlich also zu Ammoniak hiebei reducirt, doch salpetrige Säure lässt sich als Zwischenprodukt nicht nachweisen. Dieses mag darin begründet sein, dass wir bei Schimmelculturen stets für saure Reaction sorgten, um die Spaltpilzentwicklung zu verhindern; es ist aber auch möglich, dass jedes Molecul des aufgenommenen Nitrats direct in Ammoniak verwandelt wird, ehe das intermediär wahrscheinlich gebildete Nitrit ausgeschieden werden kann.

Gleichzeitig mit dem Versuch mit Natrium-Nitrat wurden Nährlösungen mit Ammonnitrat und Harnstoff angestellt. Die Nährlösung besass folgende Zusammensetzung:

Wasser		400	g
Glycerin		30	
$K_2 HPO_4$		0,80	
$Mg SO_4$		0,06	
$Ca Cl_2$		0,02	

Zwei Flaschen, a und b erhielten je 0,8 Prozent Ammonnitrat, a blieb ohne Säurezusatz, b erhielt noch 0,25 Prozent Essigsäure, c erhielt die aequivalente Menge Natriumnitrat, d die aequivalente Menge Harnstoff; c und d wurden wie b mit 0,25 Prozent Essigsäure angesäuert. Bei a entwickelten sich in Folge der mangelnden Ansäuerung bald Spaltpilze, welche das Glycerin in Gärung versetzten, wo-

durch rasch eine saure Reaction auftrat. Letztre hatte nun die Entwicklung einer Schimmelvegetation zur Folge, welche die gebildete Säure oxydirte, in Folge dessen die Reaction schliesslich wieder schwach alkalisch wurde. Salpetersäure war zum Theil jetzt noch als solche vorhanden, salpetrige Säure aber liess sich nicht nachweisen. Die Ernte betrug 0,735 g. Bei b, c und d waren in Folge anfänglicher Ansäuerung keine Spaltpilze aufgetreten, die anfangs zugesetzte Essigsäure war fast völlig oxydirt worden, die Reaction der Lösungen nur noch sehr schwach sauer. Der Schimmel entwickelte sich zuerst am lebhaftesten auf c, später bei d. Der oberflächlichen Ausbreitung nach schien bei a die Schimmeldecke am bedeutendsten. Bei b war die Sporenbildung am stärksten. Die Ernten betrugen bei:

$$b = 1,655 \text{ g}$$

$$c = 1,770$$

$$d = 3,519$$

59. Verhalten von Methylamin und Aethylamin mit und ohne Zucker (Mai 1879). Da bei einem früheren Versuche, bei welchem eine Nährlösung von salzsaurem Methylamin 2 Jahre sich überlassen worden war (Versuch 35) Spaltpilze ernährt hatte, so wurde der Versuch mit Methylamin und Aethylamin bei Schimmelpilzen wiederholt: Hiezu dienten folgende Nährlösungen:

a	b
Wasser 200	Erhielt statt Methylamin
Salzsaures Methylamin 2,5	Aethylamin.
Dikaliumphosphat . . . 0,25	
Mg SO ₄ 0,08	
Ca Cl ₂ 0,02	
Phosphorsäure 1,25	

Die ausgesäten Sporen trieben kurze Fäden und starben dann ab. Als man sich nach mehreren Wochen für über-

zeugt halten konnte, dass auf dieser Nährlösung keine Pilz-Entwicklung möglich sei, wurden zu a noch 12 g Zucker gesetzt, worauf eine äusserst energische Schimmelentwicklung erfolgte; die Ernte betrug nach 41 Tagen 3,230 g (bei 100° getrocknet).

Was b betrifft, so wurde diese Lösung in 2 Hälften getheilt und die eine mit Kali neutralisirt und mit Spaltpilzen inficirt; aber nach mehreren Wochen zeigte sich hier keine Entwicklung.¹⁵⁾ Die andre Hälfte wurde nach dem Neutralisiren mit 5 g Zucker versetzt, worauf eine lebhaft Spaltpilzvegetation eintrat.

Der Stickstoff substituirt Ammoniak kann also von Schimmel- und Spaltpilzen leicht assimiliert werden; ja ein Vergleich ergab, dass salzsaures Methylamin mit Zucker ein besseres Resultat lieferte als Salmiak mit Zucker. Sprosshefe scheint sich auch hier wieder abweichend zu verhalten; denn in einem Versuch verhielten sich die Zunahmen bei salzsaurem Aethylamin und Salmiak nahezu wie 1:2; bei ersterem traten auffallend rasch Spaltpilze auf.

60. Verhalten des Propylamins (Juni 1879). Nach den Versuchen mit Methyl- und Aethylamin erschien es von Interesse, noch das nächst höhere Glied betreffs der C- und N-Assimilirbarkeit durch Pilze zu versuchen. Es wurden desshalb aus den salzsauren Verbindungen dieser 3 Basen Nährlösungen hergestellt und diese diesmal im Brütkasten¹⁶⁾ bei 30—32° längere Zeit stehen lassen. Die Zusammensetzung war:

15) Ein Kontrollversuch, bei welchem Methylamin und Aethylamin weggelassen wurden, gab in der nämlichen Zeit eine Schimmelernte von 0,0018 g, also nur den 1800ten Theil.

16) Bei gewöhnlicher Temperatur zeigte auch nach mehreren Wochen die Propylamin-Nährlösung keine Pilz-Entwicklung.

Wasser	200 g
Salzsaure Base	2,0
Dikaliumphosphat	0,5
MgSO ₄	0,04
Ca Cl ₂	0,01

Methyl- und Aethylamin-Nährlösung blieben diesmal wieder ohne Pilz-Entwicklung, bei Propylamin aber bildete sich langsam eine Vegetation von röthlich gefärbten Spaltpilzen. Es können letztere also aus Propylamin nicht nur ihren Bedarf an N, sondern auch den an C decken; wenn unter sonst gleichen Umständen bei Methyl- und Aethylamin dieses nicht der Fall ist.

61. Ernährung durch Trimethylamin und Zucker (Sommer 1879). Da Trimethylamin und Triäthylamin bei Abwesenheit irgend einer andern Kohlenstoffquelle für Spaltpilze ebensowenig günstig sich erwiesen ¹⁷⁾, als Methyl- und Aethylamin, so wurde ein Gemenge von Trimethylaminsalz und Zucker versucht, um zu sehen, ob wenigstens der Stickstoff dieser tertiären Base zur Assimilation dienen könne. Die Nährlösung besass folgende Zusammensetzung:

Wasser	100 g
Essigsäures Trimethylamin	0,5
Zucker	5,0
Dikaliumphosphat	0,2
Magnesiumsulfat	0,02
Calciumchlorid	0,002

Diese Lösung (a) wurde mit Spaltpilzen inficirt, während eine zweite (b), ganz gleich zusammengesetzte noch 1 Proz. Phosphorsäure erhielt und mit Schimmelsporen besät wurde. Gleichzeitig wurden hiezu 2 Kontrollflaschen ohne Trimethylaminsalz aufgestellt.

17) Diese Nährlösungen enthielten 1 Prozent der salzsauren Basen und die unorganischen Nährsalze, mit Spaltpilzen inficirt entwickelten sie selbst nach längerer Zeit keinerlei Vegetation.

Bei dem Kölbchen a trat bald eine rapide Spaltpilz-Vegetation ein, und in Folge dessen Milchsäurebildung. Letztere hatte, weil nicht neutralisirt, bald einen Stillstand zur Folge, welchen sich nun Schimmelpilze zu Nutze machten. Nach 3 Monaten wurde dieser Schimmelrasen abfiltrirt, er wog bei 100° getrocknet: 1,080 g. In dem Kontrollkölbchen trat anfangs ebenfalls eine wenn auch geringe Spaltpilz- und später Schimmelbildung auf (in Folge des geringen Gehalts des Zuckers an N-haltigen Materien), allein die Totalernte betrug hier nur 0,042 g.

Das Kölbchen b entwickelte von Anfang an Schimmel, ohne Spaltpilze, die Ernte betrug nach 2 Monaten 1,167 g, beim Kontrollversuch nur 0,120 g.

Der Stickstoff kann daher auch assimiliert werden, wenn 3 Atome H im Ammoniak durch Methyl ersetzt sind.

62. Verhalten von Ferrocyankalium bezüglich der Stickstoffassimilation (Juni 1878). Da Spalt- und Schimmelpilze ihren Stickstoffbedarf aus Nitraten sowohl als aus Ammoniak und Substitutionsprodukten des letzteren decken können, so fragte es sich weiter, wie sie sich in dieser Beziehung gegen Cyan- und Nitroverbindungen verhielten. Bei dem das Cyan betreffenden Versuch diente folgende Nährlösung:

Wasser		500
Zucker		15
Ferrocyankalium	.	3
Dikaliumphosphat	.	0,50
Magnesiumsulfat	.	0,16
Calciumchlorid	. .	0,04

Ausgesäte Schimmelsporen kamen hier nicht zur Entwicklung¹⁸⁾, dagegen stellte sich bald eine Spaltpilzvegetation

18) Bei Phanerogamen erwies sich Ferrocyankalium als Gift; die Keimlinge (Buchweizen) starben nach Entwicklung der Cotylen bald ab.

und in Folge dessen Milchsäurebildung ein. Allmählig trat ein schwacher Blausäuregeruch auf, das Nessler'sche Reagens deutete die Bildung von Ammoniak an, und am Boden zeigte sich ein schwachblau gefärbter Niederschlag. Offenbar hatte die gebildete Milchsäure Ferrocyanwasserstoffsäure in Freiheit gesetzt, welch' letztere leicht zersetzlich ist. Bei rascherer Zersetzung der hiebei auftretenden Blausäure würde eine hinreichende Menge Ameisensäure entstanden sein, die weitere Pilzvegetation ganz aufzuheben.

62, b. Ebensowenig wie Schimmelpilze sich entwickeln konnten, konnte es Sprosshefe. Die Nährlösung war wie folgt zusammengesetzt:

Wasser		100
Zucker		10
Ferrocyankalium		1
Dikaliumphosphat		1,0
Magnesiumsulfat		0,026
Calciumchlorid		0,006

Die gärende Mischung wurde bei 30° mit einem Luftstrom behandelt, allein die Zunahme der Hefe war nur unbedeutend; gleichzeitig hatten sich Spaltpilze gebildet und etwas Berlinerblau abgeschieden. —

63. Verhalten von Nitroverbindungen (Juni 1879). Picrinsäure und Nitrobenzoesäure dienten zu diesen Versuchen. Die stark antiseptischen Eigenschaften der ersteren liessen von vorneherein kein sehr günstiges Resultat erwarten. In der That blieb eine $\frac{1}{2}$ prozentige Lösung dieser Säure völlig unverändert. Doch da es möglich schien, dass bei günstiger Kohlenstoffquelle wenigstens der Stickstoff der Nitroverbindung Verwendung finden könnte, so wurde eine Nährlösung mit 2,5 Proz. Zucker und 0,2 Proz. Picrinsäure mit Schimmelsporen besät, aber es erfolgte nach 2 Wochen keine Spur von Entwicklung. Erst als diese Nährlösung mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt und die Menge

des Zuckers verdoppelt wurde, stellte sich eine äusserst kümmerliche Vegetation ein, die Ernte betrug nach vier Wochen nur 0,041 g.

Wegen der wenn auch sehr geringen Verunreinigungen des Zuckers war ein Kontrollversuch zu gleicher Zeit angestellt worden, bei dem die Picrinsäure fehlte; die Ernte betrug hier 0,052 g, also mehr als mit der Säure. Indessen trotzdem ist eine Mitwirkung der Picrinsäure wie erscheint nicht abzuspochen; denn im Kontrollversuch fehlten die Sporen fast ganz, während im Hauptversuch sie eine nicht unerhebliche Menge darstellten.

63,b. Bei einem Versuch mit Nitrobenzoesäure wurde eine Lösung von 3 Prozent essigsauerm Natron und 0,2 Prozent nitrobenzoesauerm Natron und den nöthigen Nährsalzen sich selbst überlassen, allein es zeigten sich keine Spaltpilze, nur langsam entwickelte sich etwas Schimmel, dessen Menge nach 6 Wochen kaum 1 cg überschritt. Im Kontrollversuch war allerdings noch viel weniger sichtbar.

Es geht also jedenfalls so viel daraus hervor, dass aromatische Nitrosäuren sehr schlechte Stickstoffquellen für die Pilze darstellen. —

64. Verhalten verschiedener anderweitiger Substanzen bei der Ernährung der Pilze.

64,a. Organische Basen, wie Chinin und Strychnin stellen sehr schlechte Nährstoffe für die Pilze dar. So bildeten Nährlösungen von 0,5 Proz. der Sulfate dieser Basen, die mit 0,1 Prozent Phosphorsäure angesäuert worden waren, nach vielen Wochen keine Spur von Schimmel. Erst nachdem nochmals das der Nährlösung gleiche Volum Wasser zugefügt wurde, bildete sich eine Minimalmenge in der Strychninlösung, aber noch immer keine Spur in der Chininlösung. —

64,b. Dass Halogensubstitutionsprodukte der Fettreihe eine schlechte Nahrung für Pilze darstellen würden, liess sich im Voraus vermuthen. Wir haben in dieser Richtung nur einen Versuch mit Chloral gemacht. Eine Nährlösung mit 0,5 Prozent dieses Körpers und 0,25 Ammonsulfat blieb selbst nach langer Zeit ganz unverändert. —

64,c. Von den Alkoholen der Fettreihe wurde der Isobutylalkohol versucht, und eine Nährlösung von:

Wasser	300 g
Isobutylalkohol . .	0,5
Ammonphosphat . .	0,25
Magnesiumsulfat . .	0,08
Calciumchlorid . .	0,02
Dikaliumphosphat . .	0,30

mit Schimmel besät. Die nach 8 Monaten abfiltrirte Ernte betrug 0,048 g.

64,d. Von den Hydroxyverbindungen der aromatischen Reihe diente Pyrogallol, Gerbsäure und Chinasäure zu Versuchen.

Eine 1 prozentige Pyrogallol-Lösung (200 cc) gab bei Gegenwart von 0,2 Prozent Ammonsulfat und den nöthigen Nährsalzen eine sich sehr langsam entwickelnde Schimmelvegetation, die verhältnissmässig reich an Sporen war; die nach 6 Wochen abfiltrirte Ernte betrug nach dem Trocknen bei 100° 0,235 g¹⁹⁾.

Wie Pyrogallussäure verhält sich Gerbsäure, auch sie ernährt den Schimmelpilz in einer Nährlösung mit 0,4 Proz. Gerbsäure und 1 Prozent Ammonphosphat.

64,d. Einen sehr guten Nährstoff giebt die der antiseptischen Benzoesäure so nahestehende Chinasäure ab, denn

19) Die Beobachtung von V. Bovet (Journ. f. pr. Chem. 19. 445), dass Pyrogallol als Antisepticum gute Dienste leiste, dürfte sich nur auf concentrirtere Lösung wie die hier angewandte beziehen.

auf einer Nährlösung mit 1 Prozent chinasauerm Kalk, 0,25 Ammonsulfat, und den nöthigen Mineralsalzen und mit 0,1 Phosphorsäure angesäuert entwickelte sich rasch eine üppige Schimmelvegetation wie nur auf einem der besseren Nährsubstanzen.

2. „Die Ernährung der niederen Pilze durch Mineralstoffe.“²⁰⁾

Die Pilze bedürfen, wie die übrigen Pflanzen, ausser den Verbindungen, die ihnen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff zuführen, noch gewisse mineralische Stoffe, deren Anwesenheit bei dem Chemismus nothwendig ist, oder deren Elemente in die Constitution der Substanz eintreten. Aber die Pilze machen bezüglich der Auswahl verhältnissmässig geringe Ansprüche. Sie können mit 4 Elementen auskommen, nämlich 1) Schwefel, 2) Phosphor, 3) einem der Elemente Kalium, Rubidium oder Caesium, 4) einem der Elemente Calcium, Magnesium, Baryum oder Strontium, während die höheren grünen Landpflanzen zugleich Calcium und Magnesium und überdem noch Chlor, Eisen und Silicium bedürfen.

Da nur geringe Mengen von Mineralstoffen nöthig sind, um die Pilze zu ernähren, so muss bei den Versuchen, die dieses Bedürfniss feststellen sollen, grosse Vorsicht bezüglich der Reinheit der angewendeten Verbindungen und Gefässe obwalten, und es muss stets das Ergebniss durch Kontrollversuche geprüft werden. Man könnte, wenn jene Vorsicht nicht geübt und wenn nicht scharfe Kontrolle gehalten wird, sonst leicht zu dem irrthümlichen Glauben kommen, dass entweder die Mineralstoffe nicht nöthig sind,

²⁰⁾ Ein Theil der erläuternden Versuche wurde von Hrn. Dr. Oscar Löw angeordnet und ausgeführt; dieselben sind von ihm am Schlusse beschrieben.

oder dass sie durch die Pilze in einander umgewandelt werden. Besonders sind die Spaltpilze geeignet, den Experimentator zu täuschen, da sie oft in sehr geringen Mengen starke Trübung der Nährlösung und starke Gärung bewirken, — in Mengen, welche nur Spuren von Mineralstoffen enthalten können. — Pilzkulturen sind daher in manchen Fällen als sehr feine Reagentien auf Verunreinigungen von chemischen Verbindungen zu gebrauchen.

Was zuerst den Schwefel betrifft, so ist derselbe als Bestandtheil der Albuminate unentbehrlich und kann auch durch kein anderes Element ersetzt werden. Es sind zwar in neuester Zeit die Albuminate der Spaltpilze als schwefelfrei erklärt worden. Allein diese Annahme erscheint wegen der Analogie mit den übrigen Organismen als wenig annehmbar und ihr widersprechen auch unsere Beobachtungen.

Die Pilze entnehmen den Schwefel den Albuminaten, wenn ihnen dieselben als Nahrung zugänglich sind. Sie können ihn aber unter allen Umständen auch aus der Schwefelsäure sich aneignen, und ebensogut aus der schwefligen und unterschwefligen Säure. Es giebt sogar Versuche, aus denen man zu dem Schlusse geneigt sein möchte, dass die letzteren Verbindungen besser ernähren als Schwefelsäure. Ein sicheres Urtheil darüber wäre erst aus grösseren Versuchsreihen zu gewinnen.

Bezüglich des Schwefels gilt nämlich in besonderem Grade, was ich vorhin von der Schwierigkeit, entscheidende Kulturversuche anzustellen, gesagt habe. Er findet sich sehr leicht in hinreichender Menge als Verunreinigung, besonders des Zuckers. Aber auch Nährlösungen, denen der Zucker mangelt, zeigen ohne Schwefelzusatz oft ziemlich reichliche Pilzvegetation. So befinden sich eben unter den Versuchen zwei Gläser mit starker Trübung und mässiger Gärung, von denen das eine auf 100 ccm Wasser 0,5 g Asparagin, 3 g Glycerin, 0,2 g Dikaliumphosphat, 0,02 g

Calciumchlorid und 0,05 g Magnesiumchlorid, das andere auf 100 cem Wasser 0,5 g Asparagin, 1 g Glycerin, 0,1 g Kaliumnitrat, 0,1 g Diammonphosphat und 0,1 g Magnesiumchlorid enthält (also beide Nährlösungen ohne eine Schwefelverbindung ²¹⁾).

Auf den Betrag der Verunreinigungen kann man einigermassen schliessen, wenn man solche „schwefelfreie“ Nährlösungen mit andern vergleicht, denen eine Schwefelverbindung zugesetzt wird. So wurden früher (1876) neben Gärversuchen mit 10 g Colonialrohrzucker, 0,5 g neutralem weinsaurem Ammoniak und 0,04 g (schwefelfreier) Hefenasche Kontrollversuche angesetzt, von denen die einen 0,033 g schwefelsaures Kali, die andern 0,033 g schwefelsauren Kalk erhielten. Bei Luftabschluss wurde von den Nährlösungen ohne Schwefelverbindung die erste ihrem Volumen gleiche Menge von Kohlensäure durchschnittlich nach 161 Tagen, von denen mit schwefelsaurem Kali durchschnittlich nach 45 Tagen, von denen mit schwefelsaurem Kalk durchschnittlich nach 54 Tagen entwickelt.

Was das Kalium als Nährstoff der Pilze betrifft, so ergeben die Kulturversuche, dass dasselbe nicht durch die folgenden Elemente: Natrium, Lithium, Baryum, Strontium, Calcium, Magnesium ersetzt werden kann, auch nicht durch Ammonium, — wohl aber durch Rubidium und Caesium. Salze der beiden letzten Elemente ernähren die Pilze ebenso gut, wo nicht besser, als Kalisalze, während sie für die höheren Pflanzen unbrauchbar sind.

Auch bei diesen Versuchen ist wegen der geringen Mengen von Kalium, welche die Pilze bedürfen, auf die

21) Nach der Untersuchung von Dr. O. Löw lassen sich in dem verwendeten destillirten Glycerin nach Verbrennung von 30 g mit Zusatz von Soda (cp) leise Spuren von Schwefel auffinden, während 5 g Asparagin keine Spur von Schwefelreaction gaben.

Reinheit der übrigen Nährstoffe und der Gefässe zu achten, auch darauf, dass während des Versuches weder aus der Gefässwandung Kalium in die Lösung gehe, noch dass Staub aus der Luft hereinfliege. Da es kaum möglich ist, das Kalium ganz auszuschliessen und da man oft nicht weiss, wie viel etwa von demselben sich in die Nährlösung einschmuggelt, so ist es immer nothwendig, einen Kontrollversuch ohne jedes Alkali der Versuchsreihe beizufügen. Es zeigt sich dann, dass diejenigen Versuche, welche Natrium-, Lithiumsalze u. s. w. enthalten, keine grössere Pilzernte geben, als diejenigen, denen kein Alkalisalz zugesetzt wird.

Ferner ist zu bemerken, dass zu diesen Versuchen die Schimmelpilze und die Sprosspilze viel geeigneter sind als die Spaltpilze, weil ihre Ernten viel mehr ins Gewicht fallen. Die Trockensubstanz einer Spaltpilzkultur ist an und für sich sehr gering, und überdem wird ein grosser Theil der Assimilationsprodukte bald wieder ausgeschieden und zugleich mit einem Theil der Nährverbindungen durch die grosse Oxydationstüchtigkeit der lebenden Zellen verbrannt. Es geschieht daher leicht, besonders wenn der richtige Zeitpunkt überwartet wird, dass im Endresultat der verschiedenen Versuche kein bemerkbarer Unterschied gefunden wird (Versuch 67). Bei den Spaltpilzen eignet sich desswegen zur Bildung eines Urtheils die Beobachtung anderer Erscheinungen besser als der Gebrauch der Waage. Man sieht nämlich deutlich, dass Nährlösungen, welche Kalium-, Rubidium- oder Caesiumsalze enthalten, sich rascher und viel stärker trüben, und dass sie rascher und intensiver grünlich gefärbt werden (vgl. die oben gemachte Bemerkung über diese Färbung) als Nährlösungen, denen die genannten Salze mangeln.

Was die Elemente Magnesium und Calcium betrifft, welche man gewöhnlich als unentbehrlich für die Nährlösungen betrachtet, so können dieselben einander ersetzen.

Ebenso können sie durch Baryum oder Strontium ersetzt werden, nicht aber durch Kalium, noch durch ein anderes der eigentlichen Alkalien. Die einzige Versuchsreihe, die über die Vertretung der 4 genannten Elemente durch einander angestellt wurde (Versuch 71), giebt aber nur im Allgemeinen Gewissheit darüber. Es bleibt ungewiss, ob dieselben gleichwerthig seien oder ob die Pilze durch die einen, sei es durch einzelne oder durch Combinationen von zweien, besser ernährt werden als durch die anderen. Man darf nämlich auf das Erntegewicht bei Schimmelkulturen keinen grossen Werth legen, wenn irgend ein die Vegetation störender Umstand eintritt. Dies war bei der fraglichen Versuchsreihe der Fall, da die für die Schimmelpilze ungünstige Essigsäure zum Ansäuern der Nährlösung benutzt werden musste. Es ergab sich als sicheres Resultat bloss, dass jedes der 4 genannten Elemente das Wachsthum der Pilze ermöglicht, und dass ohne eines derselben das Wachsthum unmöglich wird, wie dies schon während des Versuchs aus der äusserst kümmerlichen Vegetation in dem einen Glase (d) ganz deutlich hervorging. Um über die Vergleichung bezüglich der Wirksamkeit zwischen Kalk, Magnesia, Baryt und Strontian sicheren Aufschluss zu erhalten, müssten entweder die Versuche mit freier Essigsäure so wiederholt werden, dass von jeder Nummer ein halbes Dutzend Gläser angesetzt und so die Unregelmässigkeiten im Wachsthum möglichst eliminirt würden, oder es müsste ein anderes von alkalischen Erden vollkommen freies Spaltpilz-widriges Mittel angewendet werden.

Die Beobachtung, dass unter den basischen Elementen eine gegenseitige Vertretung bald möglich, bald unmöglich ist, führt zu der Frage, ob die Rolle, welche sie beim Chemismus übernehmen, dafür irgend eine Erklärung geben könne. Es sind in physiologischer Beziehung zwei Gruppen von solchen Elementen zu unterscheiden, die nämlich,

welche die Chemie schon längst unterschieden hat, die Alkalien und die alkalischen Erden. Eine Vertretung findet nur innerhalb jeder Gruppe statt; aus jeder Gruppe muss wenigstens Ein brauchbares Element in der Nährlösung enthalten sein. Dies beweist uns, dass die Stoffe der beiden Gruppen ungleiche Functionen in der lebenden Zelle vollbringen.

Die Salze der alkalischen Erden werden wohl nur als Einlagerungen in die organisirten Substanzen, Plasma und Zellmembran, verwendet, die ich mir als ein Festhaften der Salzmoleküle an der Oberfläche der Albuminat- und Cellulosemicelle denke. Möglicher Weise können beide Functionen durch jeden der 4 Stoffe Magnesia, Kalk, Baryt und Strontian erfüllt werden. Die in die Albuminate eingelagerten Salze sind Phosphate, und nach Analogie möchte man erwarten, dass in den Sporen vorzüglich Magnesiumphosphat enthalten sei. Aus der bereits angeführten und später beschriebenen Versuchsreihe (Nr. 71) darf man aber wohl schliessen, dass die Sporen ebensowohl das Kalksalz als das Magnesiasalz aufnehmen können, — da die bloss Kalk enthaltende Nährlösung (c) eine ebenso grosse Ernte und ebenso reichliche Sporenmasse ergab wie diejenige mit Kalk und Magnesia (a).

Ob und in wiefern die Membran von der Regel, Kalksalze einzulagern, bei den Pilzen eine Ausnahme zu Gunsten der übrigen alkalischen Erden machen könne, darüber ergiebt sich aus der nämlichen Versuchsreihe keine Gewissheit. Man könnte sogar, wenn man die Ernteergebnisse als massgebend betrachten dürfte, jene Frage verneinen. Da nämlich alle Nährflüssigkeiten, in denen der Kalk mangelte, nicht die Hälfte des Trockengewichts von den beiden kalkhaltigen (a und c) erzeugten, so liesse sich leicht der Grund davon in der mangelhaften Ernährung der

Membran beim Fehlen des Kalkes vermuthen, da die mangelhafte Ernährung des Plasmas nicht Schuld daran sein kann.

Während die Salze der alkalischen Erden als Einlagerungen, also eigentlich im festen Zustande, in den Zellen enthalten sind, kommen die Salze der Alkalien wohl nur als Lösung in der freien und in der die organisirten Substanzen durchdringenden Zellflüssigkeit vor. Ihre Funktion dürfte eine doppelte sein. Einmal wirken sie durch ihre blosse Anwesenheit (durch katalytische Kraft oder Contactwirkung), indem ihre molecularen und intramolecularen Bewegungen und die von ihnen ausgehenden Kräfte auf die verschiedenen Lebensprocesse einen begünstigenden oder hemmenden Einfluss ausüben. Ferner mag ein Theil des Alkalis als Stoffträger bei den Umsetzungen dienen, indem sich Säureradikale vorübergehend damit verbinden.

Ueber diese Fragen giebt uns die chemische Untersuchung nur wenig Aufschluss. Wenn wir die Aschenanalysen der Bierhefe auch für die übrigen niederen Pilze als gültig betrachten dürfen, so enthalten dieselben nur phosphorsaure und pflanzensaure Salze, denn die Asche weist bloss Phosphorsäure, Kali, Magnesia und Kalk in wägbarer Menge auf²²⁾. Und zwar müssen es saure Phosphate sein, wie sich aus den relativen Mengen ergibt, womit auch die Thatsache übereinstimmt, dass die Bierhefe immer eine saure Reaction zeigt.

Ein Theil der Phosphate muss jedenfalls als Salze mit der geringsten Menge von Basis (RH_2PO_4), ein anderer Theil als Salze mit 2 Aeq. Basis (R_2HPO_4) vorhanden

22) Die zwei wohl als die zuverlässigsten zu betrachtenden Analysen von Mitscherlich ergaben

	Phosphorsäure	Kali	Magnesia	Kalk	
Oberhefe . .	53,9	39,8	6,0	1,0	= 100,7
Unterhefe . .	59,4	28,3	8,1	4,3	= 100,1

sein. Es kann ferner nicht alle Phosphorsäure an Alkalien, ein Theil derselben muss an die alkalischen Erden gebunden sein; denn wenn auch alles Kali als Monokaliumphosphat in Anspruch genommen wird, so bleibt für einzelne Analysen doch noch eine ziemliche Menge von verfügbarer Phosphorsäure.

Mit Berücksichtigung der Aschenanalysen ergibt sich als die wahrscheinlichste Annahme, dass das Kali als Monokaliumphosphat (KH_2PO_4) und Dikaliumphosphat (K_2HPO_4) in der Zellflüssigkeit gelöst, ferner dass ein Theil der alkalischen Erden als Phosphate im Plasma und ein anderer Theil in Verbindung mit organischen Säuren (z. B. Oxalsäure) in der Zellmembran eingelagert sei.²³⁾

Wir können uns nun noch die Frage stellen, warum die chemisch einander nahe verwandten Elemente der Alkalien und alkalischen Erden sich physiologisch so ungleich verhalten, warum nur die alkalischen Erden zur Einlagerung dienen, warum nur die einen Alkalien in der Lösung wirksam sind. Der erstere Punkt erledigt sich vielleicht durch die Thatsache, dass die Salze der Alkalien durchweg leicht löslich sind, während diejenigen der alkalischen Erden, die hier in Betracht kommen, schwerer löslich oder unlöslich und daher der Anziehung der organisirten Substanzen eher zugänglich sind.

Was den andern Punkt betrifft, warum Kalium, Rubidium und Caesium, nicht aber Natrium und Lithium als Nährstoffe benutzt werden können, so liesse sich einmal an die wenn auch unwahrscheinliche Möglichkeit denken, dass die Salze der ersteren Elemente leichter durch Membranen und andere organisirte Stoffe hindurchgehen. Diosmotische

23) Diese Einlagerung von Oxalaten ist natürlich nicht zu verwechseln mit dem krystallinischen Vorkommen des oxalsauren Kalkes in und zwischen den Membranen, wie es bei andern Pflanzen bekannt ist.

Versuche mit phosphorsaurem Kali ($K_2 H P O_4$) und phosphorsaurem Natron ($Na_2 H P O_4$) ergaben aber, dass unter übrigens gleichen Umständen beide Salze in ganz gleichen Mengen durch eine Membran sowohl gegen Wasser als gegen einander hindurch gehen (Versuch 73).

Der Grund, warum Kalium, Rubidium und Caesium für die bestimmte Ernährungsfunktion bevorzugt sind, muss also in andern Eigenschaften gesucht werden. Ich finde nun zwischen den genannten und den übrigen Alkalien keinen andern Unterschied, der eine physiologische Erklärung für ihr ungleiches Verhalten zu geben vermag, als ihre verschiedene Verwandtschaft zu Wasser. Es scheint mir dieselbe aber vollkommen ausreichend zu sein und um so annehmbarer, als sie nicht bloss jene nährenden Alkalien, gegenüber den nicht nährenden Alkalien, sondern auch gegenüber den alkalischen Erden, als bevorzugt darthut und somit erklärt, warum auch die letzteren, soweit ihre Salze löslich sind, jene nicht ersetzen können.

Die Salze von Kalium, Rubidium und Caesium haben eine viel geringere Verwandtschaft zu Wasser, als die Salze von Natrium, Lithium, Calcium, Magnesium, Baryum und Strontium. Wir erkennen dies schon daraus, dass jene ohne und diese mit Krystallwasser fest werden, und ferner besonders aus der hiemit übereinstimmenden Thatsache, dass jene für 1 Molekül wasserfreies Salz bei der Lösung viel mehr Wärme absorbiren als diese. So beträgt beispielsweise die Lösungswärme für 1 Mol. neutrales schwefelsaures Kali ($K_2 S O_4$) — 6040 Cal. und für 1 Mol. schwefelsaures Natron ($Na_2 S O_4$) + 760 Cal. Das Natronsalz, ebenso wie es mit Wasser crystallisirt, bindet auch in der Lösung eine gewisse Menge Wasser viel fester als das Kalisalz; in Folge der dadurch bewirkten Verdichtung wird Wärme frei und das sich lösende Natronsalz verursacht

daher eine beträchtlich geringere Temperaturerniedrigung als das Kalisalz, beziehungsweise selbst eine Temperaturerhöhung wie in dem eben angeführten Fall.

Der Umstand, dass die Salze von Natrium, Lithium und die der alkalischen Erden im gelösten Zustande eine Hülle von festgebundenen Wassermolekülen haben (Hydropleonbildung), macht es nun begreiflich, dass dieselben die nährenden Alkalisalze nicht ersetzen können. Sie sind namentlich für die Contactwirkung ungeeignet, indem die Wasserhülle des Salzmoleküls sowohl die unmittelbare Annäherung an ein anderes Molekül als auch die Uebertragung der Schwingungen und die Wirksamkeit der anziehenden und abstossenden Kräfte auf dasselbe verhindern oder wenigstens sehr erschweren muss. Auch als vorübergehender Träger von Säureradikalen eignet sich das umhüllte Salzmolekül offenbar weniger gut als das freie Salzmolekül, welches in unmittelbare Berührung treten und seine Verwandtschaft kräftiger geltend machen kann. Desswegen werden Kalisalze von der Ackerkrume und von organisirten Substanzen viel energischer festgehalten als die Natronsalze; die letzteren sind durch ihre Wasserhüllen verhindert, anderweitigen Anziehungen in sehr wirksamer Weise zu folgen.

Zum Schluss scheint es nicht überflüssig, eine kurze Betrachtung über die absoluten und relativen Mengen der einer Nährlösung zuzusetzenden mineralischen Nährstoffe anzustellen, da in dieser Beziehung nicht immer rationell verfahren wird. Zur Beurtheilung stehen nur die Aschenanalysen der Bierhefe zu Gebote. Wir dürfen in derselben als mittleren Werth 7 Proz. Asche annehmen und 0,7 Proz. Schwefel, der nicht in der Asche erscheint. Die Nährsalze müssten, um diesem Verhältniss zu entsprechen, so bemessen werden, dass eine Lösung von Kohlenstoff- und Stickstoff-

haltigen Verbindungen, die muthmasslicher Weise 1 g Pilzsubstanz (trocken gewogen) giebt, 0,0077 g der nothwendigen Mineralstoffe enthält. Da indess die Pilzzellen aus einer sehr verdünnten Lösung die Verbindungen weniger leicht aufnehmen können, so sind besonders in Nährflüssigkeiten, die geringe Mengen von organischen Stoffen enthalten und daher nur eine geringe Ernte versprechen, die aschegebenden Theile in höheren Verhältnissen zuzusetzen.

Die Pasteur'sche Nährflüssigkeit besteht aus 100 ccm Wasser, 10 g Rohrzucker, 0,1 g weinsaurem Ammoniak und Asche von 1 g Hefe (also c. 0,07 g). Da aus 0,1 g weinsaurem Ammoniak, wenn der ganze Stickstoffgehalt zur Ernährung verwendet wird, sich nicht mehr als 0,095 g Albumin oder 0,13 bis 0,17 g Sprosshefe sowie überhaupt junger Pilzmasse bilden können, welche 0,009 bis 0,012 g Asche geben, so enthält jene Nährflüssigkeit das 6 bis 7,7-fache der Aschenmenge, welche im günstigsten Falle von den Pilzen aufgenommen werden kann. Das wirkliche Erntegewicht bei dem Versuche Pasteur's betrug 0,043 g; in demselben konnte also nur der 23. Theil der zugesetzten Asche Verwendung gefunden haben. — Da ferner die Hefenasche schwefelfrei ist, so können die Pilze nur gedeihen, insofern sie den nöthigen Schwefel in den Verunreinigungen des Zuckers finden. Es ist daher jedenfalls empfehlenswerth, der obigen Nährlösung ein Sulfat zuzusetzen. Auch wäre es zweckmässig, den Ammoniakgehalt zu vermehren und, insofern nicht Gärung eintreten soll, den Zuckergehalt zu beschränken.

Als Normalnährflüssigkeit aus Zucker, Ammoniak und Asche, die sich für die meisten ohne Gärung verlaufenden Kulturversuche eignet, kann folgende bezeichnet werden:

Wasser 100 ccm, Zucker 3 g, Ammoniaktartrat 1 g, mit Phosphorsäure neutralisirte Asche von Erbsen, Weizen-

körnern oder Cigarren 0,4 g, oder Hefenasche in etwas geringerer Menge.²⁴⁾

Da in dieser Nährlösung sich im günstigen Falle 0,5 g und mehr Pilzmasse bilden können, so ist die Aschenmenge nicht zu hoch angesetzt, in Anbetracht dass dieselbe sich oft langsam löst, und dass sie nicht die nämliche Zusammensetzung wie die Asche der entstehenden Pilze besitzt. Aus diesen Gründen ist es aber zweckmässiger, statt wirklicher Asche, die Mineralsalze für die Bereitung der Nährflüssigkeit zu verwenden. 1 g Hefe enthält 0,07 g (schwefelfreie) Asche und darin 0,042 g Phosphorsäure ($P_2 O_5$), 0,028 g Kali, 0,005 g Magnesia und 0,0028 g Kalk. Danach muss die Menge und Beschaffenheit der zuzusetzenden Salze bemessen werden. Von Adolf Mayer wurde schon im Jahr 1869 als Normalmischung empfohlen: 0,1 g saures phosphorsaures Kali ($KH_2 PO_4$), 0,01 g dreibasisch phosphorsaurer Kalk ($Ca_3 P_2 O_8$) und 0,1 g schwefelsaure Magnesia ($Mg SO_4$). Er bezeichnet als bestnährende Lösung für Sprosshefe:

Wasser 100 ccm, Zucker 15 g, salpetersaures Ammoniak 1 g, $KH_2 PO_4$ 0,5 g, $Ca_3 P_2 O_8$ 0,05 g, $Mg SO_4$ 0,25 g (oder crystallisirte schwefelsaure Magnesia 7 $H_2 O$ enthaltend 0,5 g).

In dieser Nährflüssigkeit könnten sich im günstigsten Fall, wenn nämlich alles Ammoniak für Albuminbildung

24) Bezüglich der Wahl dieser Aschen, ist zwar die Cigarrenasche am leichtesten zu beschaffen, ernährt aber, wie es scheint, am wenigsten gut. Bei einem zur Vergleichung angestellten Versuch (1876) bestand die Nährflüssigkeit aus 100 ccm Wasser, 10 g Zucker, 0,1 g neutralem weinsaurem Ammoniak. Drei Proben erhielten a 0,04 g Hefenasche und 0,033 g $K_2 SO_4$, — b 0,06 g mit Phosphorsäure neutralisirte Cigarrenasche, — c 0,04 g mit Phosphorsäure neutralisirte Erbsenasche. Die Spaltpilzvegetation war in a und c äusserst reichlich und fast gleich, in b ebenfalls reichlich aber doch merklich geringer.

verwendet würde (wozu bei Sprosshefe die Salpetersäure untauglich ist), 3 bis 4 g Sprosshefe bilden, welche den 2,3. bis 1,7. Theil der vorhandenen Mineralstoffe in Anspruch nehmen. Da sich in Wirklichkeit kaum 1 g Hefe bildet, so verbraucht dieselbe nicht mehr als $\frac{1}{7}$ der dargebotenen Salze, die übrigens in richtigem Verhältniss gemeugt sind. Nur wird sich der phosphorsaure Kalk sehr langsam lösen; er wurde später als überflüssig weggelassen.

Cohn bediente sich für Spaltpilzkulturen der von A. Mayer angegebenen Mischung, aus welcher er jedoch den Zucker wegliess, da sich, wie er behauptet, diese Aenderung günstig erweisen soll.²⁵⁾ Dadurch gestaltet sich seine „normale Bacteriennährflüssigkeit“ (1872) folgender Massen:

Wasser 100 ccm, weinsaures Ammoniak 1 g, $\text{K H}_2 \text{PO}_4$ 0,5 g, $\text{Ca}_3 \text{P}_2 \text{O}_8$ 0,05 g, Mg SO_4 0,25 g.

In dieser Nährlösung ist durch Weglassung des Zuckers das Verhältniss zwischen der Kohlenstoffquelle und den Mineralstoffen in bedenklicher Weise verrückt. 1 g weinsaures Ammoniak giebt, wenn keine anderen nährenden Kohlenstoffverbindungen zugegen sind, wie die Versuche erweisen, kaum mehr als 0,1 g organische Substanz, weil weitaus der grösste Theil der Weinsäure verbrannt wird; ohne diesen Verbrennungsprocess können die Pilze, bei Ausschluss von Zucker oder einer anderen leicht vergärenden

25) Die beobachtete günstige Wirkung des Zuckermangels mag in einzelnen Fällen dadurch bedingt sein, dass bei Anwesenheit von Sprosspilzen reichlichere Mengen von Zucker diese gegenüber den Spaltpilzen begünstigen, oder dass für solche Spaltpilze, die sich dem Fluss- oder Sumpfwasser angepasst haben, die 15 g Zucker auf 100 Wasser der Mayer'schen Nährflüssigkeit eine zu concentrirte Lösung darstellen. Im Allgemeinen aber befördert der Zusatz von Zucker ganz auffallend das Wachstum der Spaltpilze, und es ist im ersten der angeführten beiden Fälle bloss für Reinkultur der Spaltpilze zu sorgen und im zweiten der Zuckergehalt auf 2 bis 4 Prozent zu beschränken.

Verbindung, die Weinsäure gar nicht assimiliren. 0,1 g Pilzmasse enthält etwa 0,007 g Asche, und es kann die Pilzvegetation nicht mehr als etwa $\frac{1}{70}$ der in der Nährlösung befindlichen Mineralsalze assimiliren. — Ferner ist zu berücksichtigen, dass jedes Salz, das in einiger Menge gelöst ist, nachtheilig auf die Ernährung der Pilze und bei Spaltpilzkulturen in erhöhtem Grade nachtheilig wirkt, wenn es ein saures Salz und wenn die Nahrung schwer assimilirbar ist. Desswegen halte ich 0,5 Prozent des sauren Phosphats mit 1 Prozent Ammoniaktartrat für eine wenig geeignete Combination.

Damit soll jedoch nicht gesagt sein, dass die angegebene Nährlösung ganz unbrauchbar sei; für viele gröbere Versuche, bei denen es sich nur darum handelt, gewöhnlichere und zähere Formen von Spaltpilzen in irgend einer albuminat- und zuckerfreien Nährlösung zu kultiviren, mag sie genügen. Sie könnte aber bei vergleichenden Versuchen, bei Bestimmung der Grenzen, wo die Ernährungsfähigkeit aufhört, bei Züchtungen empfindlicherer Spaltpilzformen z. B. von Krankheitspilzen und bei Züchtungen stärkerer Formen unter ungünstigen anderen Bedingungen, z. B. auch bei höherer Temperatur, den Beobachter durch eine minimale oder ganz ausbleibende Vermehrung der Pilze leicht irre führen.

Nicht besser ist die Nährflüssigkeit, welche bei dem Aufsehen erregenden Schüttelversuche Horvath's diente, und deren Zusammensetzung in Paris als Geheimniss behandelt wurde, über dessen Entwendung Klage zulässig sei. Sie besteht aus:

Wasser 100 ccm, weinsaures Ammoniak 1 g, KH_2PO_4 0,5 g, Magnesiumsulfat (wahrscheinlich ist das crystallisirte Salz $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ gemeint) 0,5 g, CaCl_2 0,05 g ²⁶⁾.

26) Ich habe schon früher (Theorie der Gärung) die Mischung als unzweckmässig bezeichnet.

Für Kultur von Sprosshefe ist die Mayer'sche Normallösung ganz geeignet, weil die Sprosspilze in einer schwach sauren Flüssigkeit vortrefflich gedeihen und selber saure Salze in ihre Substanz aufnehmen. Für Spaltpilze dagegen, welche im Allgemeinen in alkalisch reagirenden Flüssigkeiten am lebhaftesten sich entwickeln und deren Wachsthum, besonders wenn Albuminate und Zucker mangeln, in manchen Fällen schon durch schwach saure Reaction gehemmt wird, muss eine Normallösung neutral sein. Ich habe daher, als ich die Verwendung von Asche aufgab (1876), mich folgender Mischung von Mineralsalzen bedient:

A. Dikaliumphosphat ($K_2 HPO_4$) 0,1035 g, Magnesiumsulfat ($Mg SO_4$) 0,016 g, Kaliumsulfat ($K_2 SO_4$) 0,013 g, Chlormalcium ($Ca Cl_2$) 0,0055 g (auf 100 ccm Wasser und 1 g weinsaures Ammoniak).

Diese Salze enthalten die Elemente Phosphor, Schwefel, Magnesium und Calcium in dem richtigen Verhältniss. Dagegen ist Kali in beträchtlichem Ueberschuss vorhanden, nämlich 0,063 statt 0,028 g. Dieser Ueberschuss bringt aber keinen Nachtheil, weil die geringen Mengen von freierwerdendem Kali als Carbonat in der Lösung enthalten sind und die alkalische Reaction etwas verstärken, in einzelnen Fällen auch organische Säuren neutralisiren.

Später wurde das Kalium im Sulfat durch Ammonium (NH_4) ersetzt, sodass die Mischung sich nun folgender Massen gestaltete:

B. $K_2 HPO_4$ 0,1 g, $Mg SO_4$ 0,016 g, $(NH_4)_2 SO_4$ 0,017 g, $Ca Cl_2$ 0,0055 g.

und noch später wurde dieser Posten ganz weggelassen und die Mischung vereinfacht auf

C. $K_2 HPO_4$ 0,1 g, $Mg SO_4$ 0,02 g, $Ca Cl_2$ 0,01 g.

In der Wirkung der Mischungen A, B, C war übrigens kein Unterschied bemerkbar. Dieselben dürften in allen Fällen, wo die Mineralstoffe nicht schon mit der organischen

Substanz in die Nährflüssigkeit kommen, wie dies z. B. beim Fleischextract der Fall ist, sich als brauchbar erweisen. Ist dagegen saure Reaction zulässig oder wünschbar, so kann das saure Phosphat angewendet werden:

D. KH_2PO_4 0,1 g, MgSO_4 0,02 g, CaCl_2 0,01 g.

Was die absolute Menge der Mineralstoffe in den Nährlösungen betrifft, so hängt dieselbe natürlich von der Menge der Verbindungen ab, welche organische Substanz bilden; sie kann zu niedrig, aber auch, wie ich bereits bemerkt habe, zu hoch gegriffen werden. Im Allgemeinen gilt die Regel, dass die Pilzzellen gelöste Stoffe sich um so leichter aneignen, in je grösserer Menge dieselben vorhanden sind; dass aber alle Nährsalze von einem gewissen Concentrationsgrad an einen merkbaren schädlichen Einfluss auf das Leben ausüben. Das Optimum ihrer Concentration liegt also wenig unter diesem Grad, und ist je nach der Beschaffenheit der Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen sehr ungleich, indem Lösungen mit Albuminaten (Peptonen) oder Zucker grössere Mengen von Nährsalzen ertragen als solche, die bloss ein Ammoniaksalz oder Asparagin enthalten.

Besonders kann bei Anwesenheit von Zucker das Kaliumphosphat in erheblichen Mengen mit günstigem Erfolge angewendet werden, wie sich dies beispielsweise aus folgendem Versuche (1875/6) ergibt.

65 a. Auf 100 ccm Wasser 10 g Zucker, 0,5 g neutrales weinsaures Ammoniak, 0,7 g Citronensäure, etwas mit Phosphorsäure gesättigte Erbsenasche.

b. Ebenso mit 0,1 g Dikaliumphosphat.

c. Ebenso mit 0,5 g K_2HPO_4 .

d. Ebenso mit 5 g K_2HPO_4 .

Die 4 Nährlösungen wurden mit einer geringen Menge Bierhefe, die beinahe spaltpilzfrei war, besät. Die Vegetation verlief in d am lebhaftesten, in a am trägsten. Der Zucker verschwand zuerst in d, zuletzt in a (nach 16 Tagen).

Die Sprosshefenzellen waren in a am kleinsten, in b deutlich grösser, in c und d sehr gross. Aber das phosphorsaure Kali hatte auf die Entwicklung der Spaltpilze einen noch viel günstigeren Einfluss als auf die Sprosspilze. a enthielt am Schluss zahlreiche Sprosspilze und wenig Spaltpilze; b etwas weniger Sprosspilze als a und ziemlich viel Spaltpilze; c viel weniger Sprosspilze als b, aber sehr viel Spaltpilze; d nur wenig Sprosspilze und äusserst zahlreiche Spaltpilze. In Uebereinstimmung mit diesem mikroskopischen Befunde war in a keine, in d sehr viel Milchsäure gebildet worden. Die Gewichtsbestimmung der Trockensubstanz der Ernte hatte wegen der ungleichen Vegetation keinen Werth.

Die günstige Wirkung einer grösseren Menge von phosphorsaurem Kali auf die Sprosshefe ergibt sich auch aus dem unten angeführten Versuche (Nr. 70), wo 2 Prozent K_2HPO_4 ein grösseres Erntegewicht ergaben als 1 Prozent, nämlich die 12fache Vermehrung der Aussaat gegenüber der 10fachen Vermehrung.

Von schlecht nährenden Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen darf in vielen Fällen nur eine verdünnte Lösung angewendet werden, von Ammoniaksalzen (mit einer organischen Säure), wenn dieselben allein vorhanden sind, im Allgemeinen nicht mehr als 1 Prozent. Da sich in einem solchen Falle bloss etwa $\frac{1}{10}$ des Gewichts in Pilzsubstanz umwandelt, so bedarf es dazu nur äusserst geringer Mengen von Mineralstoffen. Da aber dieselben in so weit gehenden Verdünnungen dem Wasser nur schwer von den Pilzzellen entzogen werden, so müssen sie in beträchtlich grösseren Mengen den Nährflüssigkeiten zugesetzt werden. In den obigen Mischungen A und B ist durchgehends (mit Ausschluss von Kali) der 10fache Betrag von dem, was die Pilzvegetation muthmasslich aufnehmen kann, angesetzt, in C für die Salze $MgSO_4$ und $CaCl_2$ wegen der geringeren absoluten Mengen ein noch höherer Betrag. Letztere Com-

bination dürfte wohl für die Mehrzahl der Fälle als Optimum zu bezeichnen sein. Die Normalnährflüssigkeit für Spaltpilze bei Anwendung eines Ammoniaksalzes ist demnach übereinstimmend mit C:

I. Wasser 100 ccm, weinsaures Ammoniak 1 g, $K_2 HPO_4$ 0,1 g, $MgSO_4$ 0,02 g, $CaCl_2$ 0,01 g.

Hierin kann das weinsaure Ammoniak durch gleiche Mengen von essigsauerm Ammoniak, milchsaurem Ammoniak, citronensaurem Ammoniak, bernsteinsaurem Ammoniak u. s. w. oder von Asparagin, Leucin u. s. w. ersetzt werden.

Bei Anwendung von besseren Kohlenstoff- und Stickstoff-haltigen Nährsubstanzen ist es zweckmässig, die Mineralstoffe zu vermehren. Als Normalnährflüssigkeiten für Spaltpilze können noch folgende zwei gelten:

II. Wasser 100 ccm, Eiweisspepton (oder lösliches Eiweiss) 1 g, $K_2 HPO_4$ 0,2 g, $MgSO_4$ 0,04 g, $CaCl_2$ 0,02 g.

III. Wasser 100 ccm, Rohrzucker 3 g, weinsaures Ammoniak 1 g, Mineralstoffe wie in II.

Statt 1 g weinsaures Ammoniak kann in III die gleiche Menge eines andern organischen Ammoniaksalzes oder 0,5 g salpetersaures Ammoniak oder 0,7 g Asparagin oder 0,4 g Harnstoff verwendet werden.

In den drei letzten Nährlösungen können die mineralischen Nährsalze durch Asche ersetzt werden und zwar am besten durch eine kalireiche Asche. Dieselbe muss mit Phosphorsäure gesättigt werden. Auf 100 ccm Lösung bedarf es für I 0,2 g, für II und III 0,4 g Asche.

Es giebt Spaltpilze, für welche die unter II und III angegebenen Nährlösungen mit Vorthail in ihrer Concentration erhöht werden; andere dagegen (besonders Krankheitspilze), die in einer verdünnteren Lösung besser gedeihen und für welche daher die in 100 Wasser enthaltenen Gewichtsmengen zweckmässig auf $\frac{2}{3}$ oder $\frac{1}{2}$ herabgesetzt werden. Die Nährflüssigkeiten II und III sind äquivalent der Nor-

mallösung von 1 Proz. Liebig'schem Fleischextract, welche für die Kultur der nämlichen Pilze weniger günstig sich erweist als eine 0,5 proz. Lösung. 1 g Fleischextract enthält im Mittel 0,2 g Aschenbestandtheile und 0,6 g lösliche organische Verbindungen.

Dagegen zeigt sich die nachtheilige Wirkung einer zu geringen Menge von Mineralstoffen bei guter Kohlenstoffnahrung deutlich aus den oben unter Nr. 52 angeführten Versuchen, wo die Sprosshefe in einer Nährlösung, die in 100 ccm Wasser 10 g Zucker, 0,5 g weinsaures Ammoniak, 0,035 K_2HPO_4 , 0,006 $MgSO_4$, 0,0061 $(NH_4)_2SO_4$ und 0,0015 $CaCl_2$ enthielt, nur mit Durchleitung von Luft sich vermehrte, ohne Durchleitung von Luft dagegen sehr geringe Zunahme oder selbst Abnahme ihrer Albuminate erfuhr.

Die folgenden Versuche wurden von Dr. O. Löw ausgeführt und beschrieben.

66. Ernährung mit Rubidiums Salzen bei Schimmelpilzen. Bei dieser Versuchsreihe (Mai 78) wurde eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung verwendet:

Wasser	500	g
Diammontartrat .	4	
Zucker	4	
Weinsäure . . .	4	
Diammonphosphat .	3,2	
Magnesiumsulfat .	0,08	
Ammonsulfat . .	0,08	
Calciumchlorid .	0,04	

Während diese Lösung beim Kolben a keinen Zusatz von Salzen fixer Alkalien erhielt, wurde sie beim Kolben b mit 1,2 g Mononatriumtartrat, bei c mit der äquivalenten Menge des Kalium- bei d des Rubidium-

salzes versehen (also mit 1,36 g des ersteren und 1,68 g des letzteren). Die ausgesäten Schimmelsporen entwickelten sich auf allen vier Lösungen, doch ungleich rascher bei c und d als bei a und b, welch' letztere auch weit weniger fructificirten.

Die Ernte betrug nach 7 Wochen bei:

		Stickstoffgehalt:
a . . .	0,520 g	. . . 4,24 Prozent
b . . .	0,575	. . . 4,03
c . . .	1,359	. . . 5,42
d . . .	1,237	. . . 5,48

Während bei a und b der getrocknete Schimmel sehr zähe und kaum in der Porcellan-Schale zu zerreiben war, vielleicht in Folge des grösseren Cellulosegehaltes, war er bei c und d äusserst leicht zum feinsten Pulver zerreiblich. Der Stickstoffgehalt bei c und d war wie die Analyse ergab nahezu gleich und nicht unbeträchtlich höher als bei a und b. Einen misslichen Umstand bei diesem Versuche bildete die Schwierigkeit, Zucker gänzlich frei von jeder Spur Kali zu erhalten. Die niedern Pilze können aber erstaunlich geringe Mengen von Mineralstoffen haushälterisch verwerthen und darauf beruht auch sicherlich, dass bei a und b sich überhaupt Schimmelvegetation entwickeln konnte. In der That liessen sich in der Asche dieser Ernten minimale Mengen Kali deutlich nachweisen, ein Umstand, welcher die Nothwendigkeit von Kontrollversuchen klar darlegt.

67. Ernährung mit Rubidiums Salzen bei Spaltpilzen. Dieser Versuch wurde gleichzeitig mit dem vorhergehenden angestellt und auch dieselben Nährlösungen verwendet, mit dem Unterschiede jedoch, dass mit Ammoniak neutralisirt wurde. Die Menge der Nährflüssigkeit betrug je 125 ccm. Die Spaltpilze entwickelten sich der eintretenden Trübung nach zu urtheilen am schnellsten in der Rubidiumnährlös-

ung; denn nach 5 Tagen war diese bereits ziemlich trübe, während bei der Kaliumnährlösung erst schwacher Anfang hierzu gemacht war. Nach weiteren fünf Tagen war bei der Rubidiumlösung eine starke grünliche Fluorescenz aufgetreten, die sich in etwas schwächerem Grade auch bei der Kalium-, gar nicht aber bei der Natrium- und Ammonium-Nährlösung zeigte. Diese beiden Lösungen waren schon ganz trüb, während diejenige mit Natriumtartrat und diejenige ohne fixe Alkalien noch klar blieben. Später indess trübten sie sich ebenfalls und diejenige mit Natriumtartrat nahm auch eine schwach gelbgrünliche Färbung an. Schliesslich waren die Pilze in allen 4 Lösungen reichlich entwickelt. Die in einer gewissen Zeit durch Oxydation verschwundene Menge organischer Substanz hätte hier ein Maas der Entwicklung und Lebensenergie geben können, indess als nach 7 Wochen diese Bestimmung vorgenommen werden sollte, zeigte es sich, dass dieser Zeitraum bereits ein zu langer und der Verbrennungsprocess in allen 4 Flaschen dem Ende nahe war.

68. Ernährung mit Rubidiumsätzen bei Sprosspilzen.
(Mai 78.)

Hiezu diente folgende Nährlösung:

a) Wasser	700	g
Zucker	60	
Ammonsulfat	1	
Diammonphosphat	10	
Mono-Ammontartrat	5	
Magnesiumsulfat	0,08	
Calciumchlorid	0,03	

Beim Kolben b wurde das Ammontartrat durch die aequivalente Menge des Natriumsalzes, bei c des Kalium- und bei d des Rubidiumsates ersetzt. Nach 12 Stunden wurden noch 40 g Zucker zugefügt. Die Gärung fand im

Brütkasten bei constantem Luftstrom statt. Nach 26 Stunden wurde absetzen lassen und der Versuch beendet. Es ergab sich bei einer Aussaat von 0,650 g frischer Bierhefe Ernte bei:

a	.	.	0,674 g
b	.	.	0,689
c	.	.	0,862
d	.	.	1,001

Also auch hier konnte Rubidium die Function des Kaliums nicht nur übernehmen, sondern in höherem Grade ausüben. Der Stickstoffgehalt der Rubidiumhefe betrug 8,34 Prozent; auch wurde das Rubidium in der Asche dieser Hefe nachgewiesen.

69. Ernährung mit Rubidium- und Caesiumsalzen bei Schimmelpilzen (Mai 1879).

Da bei den vorhergehenden Versuchen (66, 67 und 68) die Nährlösungen mit Ammon- und Natriumsalzen ziemlich reichliche Vegetationen ergeben hatten, was möglicher Weise auf Rechnung der Verunreinigung der übrigen Nährstoffe namentlich des Zuckers kam, so wurden jetzt nur Substanzen verwendet, welche leicht kalifrei zu erhalten sind und ferner die Glaskolben durch cylindrische gut verzinnte Blechgefäße ersetzt. Das Resultat war denn in der That erheblich verschieden und die Ernten bei mangelndem Kalizusatz relativ weit unbedeutender.

Die Nährlösung besass folgende Zusammensetzung:

Wasser	.	.	.	.	500
Glycerin	.	.	.	.	20
Ammonacetat	.	.	.		5
Ammonsulfat	.	.	.		0,1
Diammonphosphat	.	.			2,0
Magnesiumsulfat	.	.			0,08
Calciumchlorid	.	.	.		0,03
Essigsäure	.	.	.	.	4,0

Von den fünf mit dieser Nährlösung versehenen Gefässen erhielt:

- a) keinen weiteren Zusatz,
- b) 0,6 Mononatriumtartrat,
- c) die äquivalente Menge des Kaliumsalzes (0,7 g)
- d) „ „ „ „ Rubidiums Salzes (0,9 g)
- e) „ „ „ „ Caesiumsalzes (1,1 g)

Nach 2 Wochen war der Unterschied von a und b einerseits und c, d und e andererseits sehr auffällig geworden; letztere drei Gefässe schienen nahezu gleichgrosse Schimmelrasen zu haben, die bereits kräftig entwickelt waren, während bei a und b sich nur kümmerliche Anfänge zeigten. Nach drei Wochen betrug die Ernte bei:

a	. .	0,292 g
b	. .	0,081
c	. .	1,396
d	. .	2,233
e	. .	2,280

Es ergibt sich hieraus auf's entschiedenste, dass Rubidium und Caesium das Kalium bei den Schimmelpilzen vorthellhaft zu ersetzen vermögen. Natrium vermag dieses nicht und sind den Ernten bei a und b sicherlich wieder Spuren von Kali in der Nährlösung zuzuschreiben.

99.f. Auch Lithium vermag nicht das Kalium zu ersetzen, denn bei einem Versuche mit einer 3 Prozent Ammonacetat enthaltenden Nährlösung, in der Lithium- statt des Kaliumphosphats vorhanden war, entwickelte sich selbst nach 6 Wochen keine Spur von Schimmel.

70. Vermehrung des Kaliumphosphats bei der Kultur von Sprosshefe (April 1878). Da bei früheren Versuchsreihen mit Sprosshefe verhältnissmässig geringe Mengen des Dikaliumphosphats verwendet, später aber eine erhebliche Steigerung der Ernten bei der Vermehrung dieses Salzes beobachtet worden war, so schien es von Interesse,

nähere quantitative Angaben über den Einfluss dieser Steigerung zu erhalten. Gleichzeitig damit wurde ein Versuch mit gesteigerter Ammoniakmenge gemacht.

Die Nährlösung a bestand aus:

Wasser	200	g
Zucker	20	
Diammontartrat . .	1	
Dikaliumphosphat .	2	
Magnesiumsulfat .	0,012	
Ammoniumsulfat .	0,013	
Calciumchlorid . .	0,003	

Bei b war die Menge des Kaliumsalzes auf das Doppelte vermehrt, bei c aber gleichzeitig dieses und das Ammontartrat auf's Doppelte. Die Kolben wurden mit je 0,566 g Trockensubstanz entsprechender Hefemenge beschickt und im Brütkasten mit einem continuirlichen Luftstrom behandelt. Nach 12 Stunden war die Gärung beendet und zeigte die Hefe bereits beträchtliche Zunahme. Die Reaction war schwach sauer. Das Volum der Nährlösung wurde nun auf $\frac{1}{2}$ Liter erhöht und nach wieder vollendeter Gärung auf 1 Liter. Da bereits Spaltpilze sich einzustellen begonnen hatten, wie das Microscop erwies, so wurden die Ernten jetzt bestimmt. Es ergab sich bei

$$a = 5,56 \text{ g} = 9,82 \text{ faches der Aussaat }^{27)}$$

$$b = 6,41 \text{ g} = 11,32 \text{ „ „ „}$$

$$c = 6,77 \text{ g} = 11,92 \text{ „ „ „}$$

Da die Dauer der Gärungszeit nur 64 Stunden betrug, so ist diese Zunahme gegen frühere Versuche mit geringeren Phosphatmengen eine sehr bedeutende zu nennen.

27) Die Hefe a war locker und klumpig, b und c aber schlammig wie normale Bierhefe. Unter dem Microscope zeigte c mit sehr grossen Zellen die beste Entwicklung.

Ferner ergibt sich, dass die Erhöhung des Phosphats von 1 Prozent auf 2 bei diesem Versuch eine Vermehrung von 0,85 g im Gefolge hatte, die gleichzeitige Vermehrung des Phosphats und des Ammonsalzes eine solche um 2,21 g. Diese Mengen erscheinen gegenüber der Zunahme in allen 3 Fällen nur unbedeutende.

Von der Hefe c wurde eine 1,51 g Trockensubstanz entsprechende Menge in je 1 Liter Nährlösung (c) vertheilt, und die erste Flasche bei 15–18°, die zweite bei 28–30° mit einem continuirlichen Luftstrom behandelt; erstere gab eine Verdoppelung der Aussaat in 42 Stunden, letztere bereits in 18. Unerwähnt kann jedoch nicht bleiben, dass auch bei diesen so günstigen Resultaten allmählig Spaltpilze auftraten und nach jeder Erneuerung der Nährlösung zunahmen.

71. Ernährung mit Kalk, Baryt, Strontian und Magnesia bei Schimmelpilzen (Juni 1879).

Die Ersetzbarkeit der Kaliumsalze durch Rubidiumsalze bei den niedern Pilzen liess vermuthen, dass hier auch ein Ersatz des Calciums durch Magnesium, Baryum oder Strontium möglich sei. Der Versuch hat dieses im Allgemeinen bestätigt, wenn auch die Erntemengen in den verschiedenen Fällen sehr von einander abwichen. Zu den Versuchen diente Schimmel — wie immer *Penicillium* — welcher auf je $\frac{1}{2}$ Liter einer 3prozentigen Nährlösung von essigsaurem Ammoniak ausgesät wurde, welch' letzteres sehr leicht frei von allen fixen Mineralstoffen zu erhalten ist. Dikaliumphosphat war überall gleichviel vorhanden, nämlich 0,1 Prozent. Als Schwefelquelle diente unterschwefelsaures ²⁸⁾ Ammon (0,04 Prozent) da die Schwefelsäure wegen des vergleichenden Versuchs mit Baryumsalzen vermieden werden musste. Um

28) Aus Sulfiten und Hyposulfiten vermag der Schwefel ebensogut als aus Sulfaten assimilirt zu werden, wahrscheinlich auch aus Sulfosäuren; dagegen nicht aus Sulfoharnstoff und Rhodanammonium.

Spaltpilze auszuschliessen war anfänglich mit 1 Prozent Essigsäure angesäuert worden; da aber diese Menge bei solch' schlechten Nährstoffen auch für Schimmel antiseptisch wirkte, so wurde nach 2 Wochen die Säure zu dreiviertel mit titrirter Ammonflüssigkeit abgestumpft, worauf dann Schimmel sich entwickelte.

Die Normallösung erhielt 0,016 Prozent MgCl_2

und 0,006 Prozent CaCl_2

womit dann Lösungen mit Abwesenheit dieser Nährsalze und Ersatz des Ca durch Ba und Sr bei An- und Abwesenheit von Magnesiumsalz verglichen wurden. Die folgende Tabelle erläutert diese Combinationen (a—h). Da wo nur Calcium und nur Baryum vorhanden war, stellte sich eine Rothfärbung der Flüssigkeit ein, auch hatten sich hier nächst der Normallösung die meisten Sporen gebildet, während bei den übrigen die Sporenbildung nur sehr gering war oder fehlte. Die Sporen hatten überall eine röthliche Färbung.

Die nach 7 Wochen gesammelte und getrocknete Ernte betrug bei:

a) Mg, Ca . .	0,498 g
b) Mg, — . .	0,153
c) — Ca . .	0,491
d) — — . .	0,026
e) Mg, Ba . .	0,201
f) Mg, Sr . .	0,190
g) — Ba . .	0,216
h) — Sr . .	0,103

Es ergibt sich hieraus, dass bei Abwesenheit von alkalischen Erden bei d sich nur eine Minimalmenge Schimmel entwickelte ²⁹⁾, und dass jene 4 Elemente sich bei den Schimmel-Pilzen zu einem gewissen Grade vertreten können.

29) Vielleicht in Folge der haushälterischen Verwerthung der in den ausgesäten Sporen enthaltenen Mineralstoffe.

72. Ausschluss von Chlor und Schwefel bei Schimmelpilzkulturen. Als Nährmittel wurde Ammonacetat angewendet. Im einen und andern Falle entwickelte sich eine nicht unerhebliche Schimmelvegetation. Die Vermuthung jedoch, als sei bei dem Ausschluss von Schwefel auch ein schwefelfreier Proteinkörper entstanden, bewahrheitete sich nicht; denn die Ernte gab mit schwacher Kalilösung erwärmt, nach dem Ansäuern, auf einem darüber gehängten mit Bleiessig getränkten Papierstreifen sofort eine deutliche Reaction auf Schwefelwasserstoff zu erkennen.³⁰⁾ Entweder haben hier kaum nachweisbare Spuren von Sulfaten in den verwendeten Nährsubstanzen eine Rolle gespielt oder es fanden aus der Luft Spuren von Schwefelwasserstoff ihren Weg in die mit Baumwollpfropf verschlossenen Kolben, die dann zur Assimilation dienten.

73. Diosmose von Kalium- und Natrium-Phosphat. Bei den Fragen, die wir uns über die physiologische Rolle der Mineralstoffe vorlegten, schien es wünschenswerth, über die relative Schnelligkeit der Diosmose des Kalium- und Natriumphosphats in verdünnter Lösung einige Versuche anzustellen.

5 g Dikaliumphosphat, in 200 cc Wasser gelöst wurden in einem cylindrischen, oben offenen, unten mit Pergamentpapier verbundenen Gefäss 36 Stunden bei 18—20° diosmiren lassen. Das in die äussere Flüssigkeit übergegangene Phosphat betrug nach dem Abdampfen und Glühen 1,850 g, entsprechend 1,951 g K_2HPO_4 . Das Diaphragma hatte 44,1 qcm also waren per Stunde und Quadratcentimeter 0,00126 g diosmirt.

30) Auf diese Weise lässt sich auch der Schwefelgehalt des Spaltpilzproteins unzweifelhaft darthun. Schon sehr kurze Erwärmung der Pilze mit sehr verdünnter Kalilösung reicht hin, den Schwefel theilweise abzuspalten.

In ganz gleicher Weise wurde der Versuch mit der aequivalenten Menge Dinatriumphosphat angestellt und die Menge des per Stunde und Quadratcentimeter diosmirten Na_2HPO_4 zu 0,00133 g gefunden. Das moleculare Verhältniss des diosmirten Kalium- und Natriumsalzes ist daher 1:1,291. Im Anschluss hieran fragte es sich, wie sich die Diosmose dieser Salze gegeneinander gestalten würde. Es wurde desshalb eine Lösung von 5 g Dikaliumphosphat in 200 cc Wasser in den Dialysator (40 qcm) gegeben und gegen 200 cc Lösung der aequivalenten Menge Dinatriumphosphat diosmiren lassen. Die übrigen Verhältnisse (Zeit und Temperatur) waren genau dieselben wie oben. Aus der äussern Flüssigkeit wurde nachher erhalten: 2,679 Kaliumplatinchlorid. In der innern Flüssigkeit wurde der Gesamtglührückstand bestimmt und davon die darin enthaltene Phosphorsäure und Kali abgezogen. Aus der Differenz berechnete sich die Menge des Dinatriumphosphats zu 0,957 g. Es war also per Stunde und Quadratcentimeter 0,000666 g Dikaliumphosphat nach aussen und 0,000662 g Dinatriumphosphat nach innen diosmirt. Die Diosmose war also hier noch einmal so langsam wie oben, und als moleculares Verhältniss ergibt sich 1:1,217.
