Über die Resistenz exsiccatortrockener pflanzlicher Organismen gegen Alkohol und Chloroform bei höheren Temperaturen.

Von **Walter Schubert.**

Einleitung.

Es ist bekannt, daß viele trockene, pflanzliche Organismen und insbesondere ihre Dauerformen außerordentlich resistent gegen Alkohol, Äther, Chloroform und ähnliche Giftstoffe sind und monate- ja jahrelang ungeschädigt bei Zimmertemperatur [1]) in diesen Medien verweilen können. Ferner hat sich aus den Untersuchungen der verschiedensten Forscher ergeben, daß die erwähnten Objekte höheren Trockentemperaturen [2]) ganz erheblichen Widerstand entgegensetzen und ohne ihre Lebensfähigkeit einzubüßen längere Zeit hindurch Temperaturen von 100° C und kürzere Zeit sogar solche von 110 und 120° C vertragen.

Die Frage jedoch, wie sich derartige Organismen verhalten, wenn die oben angeführten Stoffe bei höheren Temperaturen auf sie einwirken, ist bislang nicht eingehend untersucht. Die einzigen Untersuchungen, die hierüber vorliegen, finden sich bei Kurzwelly [3]), der siedenden Äthylalkohol auf exsiccatortrockene Hefe und exsiccatortrockene Sporen von Aspergillus niger und Bacillus subtilis einwirken ließ. Es ergab sich dabei, daß Aspergillus, der ebenso wie Hefe und Bacillus subtilis bei Zimmertemperatur Monate hindurch ungeschädigt in Alkohol aufbewahrt werden konnte, bereits nach 3stündiger Einwirkungsdauer von siedendem Äthylalkohol abgetötet war, während die beiden anderen Untersuchungsobjekte selbst nach 15stündigem Aufenthalt in diesem Medium noch absolut keine Schädigung zeigten.

Die vorliegende Arbeit wird in erster Linie dazu dienen, die Versuche Kurzwellys weiter auszudehnen. Sie wird die Wirkung verschiedener giftiger Stoffe bei höheren Temperaturen auf exsiccatortrockene Samen und Früchte, Pilz- und Bakteriensporen und einige Vegetativformen untersuchen. Daneben werden Kontrollversuche mit denselben Trockentemperaturen oder mit indifferenten Medien bei diesen

---

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 1903, Bd. XXXVIII, pag. 291 bis 341; s. dort zitierte Literatur.

2) Lit. s. Pfeffer, Planzenphysiologie, II. Aufl., Bd. II, 1904, pag. 288—296.

3) Kurzwelly l. c. pag. 336—338.

Temperaturen angestellt werden, um speziell die den Giften zukommenden Wirkungen bestimmen zu können.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit behandelt werden soll, wird sich damit befassen zu entscheiden, worauf die Resistenz der Untersuchungsobjekte bei höherer- und Zimmertemperatur den erwähnten Giften gegenüber beruht. Es fragt sich zunächst, ob die Gifte überhaupt in das Untersuchungsmaterial eindringen und der trockene Protoplast sich ungeschädigt damit vollsaugen kann, oder ob die Widerstandsfähigkeit einzig und allein auf ein Nichteindringen der giftigen Medien, denen durch die Zellmembran oder durch derbe Schalen der Eintritt zum lebenden Zellinhalt verwehrt wird, hinausläuft.

Aufschluß hierüber wird man erlangen können, wenn man die Widerstandskraft geschälter und ungeschälter Objekte vergleicht, da dieselbe gleich sein muß, sobald es sich um eine Resistenz des Protoplasten dem Giftstoff gegenüber handelt. Anderseits wird man die Frage auch beantworten können, wenn man Objekte, an denen man das Eindringen der Medien positiv nachgewiesen hat, hierauf auf ihre Lebensfähigkeit prüft.

Versuche auf diesem Gebiete wurden bereits von verschiedenen Seiten ausgeführt. Sie beziehen sich zum Teil auf das Eindringen von verschiedenen Giftstoffen, zum Teil speziell auf das Eindringen von Alkohol, Chloroform usw.

So fand Pfeffer[1]), daß giftige Anilinfarben, Ammoniak usw. nur langsam in die mit einer schwerdurchlässigen Cuticula umkleideten Haare eindrangen und daher erst nach längerer Zeit Schädigungen im Protoplasten hervorriefen.

Ebenso führt Pulst[2]) die Unempfindlichkeit von Penicilliumglaucum gegen die zumeist überaus giftigen Kupfersalze auf das Nichteindringen derselben in das Protoplasma zurück.

Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiete liegen in einer Arbeit J. Adrian Browns[3]) vor. Derselbe beobachtete die Wirkung verschiedener Chemikalien auf Triticum, Avena, Secale und speziell auf Hordeum vulgare (var. caerulescens). Er konnte bei all diesen Gramineen die Gegenwart einer semipermeablen Haut konstatieren, die Wasser und Jod immer eindringen ließ, vielen anderen Stoffen aber den Eintritt verwehrte oder erschwerte. Von 1—36 %iger Schwefelsäure, von

1) Pfeffer, Unters. a. d. bot. Inst. zu Tübingen, 1886, Bd. II, pag. 201—203.

2) Pulst, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 1902, Bd. XXXVII, pag. 244—249; vgl. auch die daselbst zitierte Literatur.

3) Brown, Annals of Botany, 1907, Bd. XXI, pag. 79—87.

5 %igen Lösungen von Kupfersulfat, Eisensulfat, Silbernitrat, Kaliumchromat und Kaliumferrocyan, von 0,5 %iger Natriumhydratlösung und von 3,65 %iger Salzsäure drang stets nur das Wasser ein. Die umgebenden Lösungen wurden auf diese Weise konzentrierter und die in sie eingelegten Früchte durch die Wasseraufnahme schwerer. Sämtliche Objekte keimten nach dem Aufenthalt in den erwähnten Lösungen, nachdem sie gut ausgewaschen und in günstige Bedingungen versetzt waren, in wenigen Tagen aus. Während eine ½ %ige Natriumhydratlösung nicht durch die Membran hindurchdrang, trat dies sofort ein, wenn die Lösung 1 % und mehr Natriumhydrat enthielt. Salpetersäure wurde 1 und 5 %ig angewandt und drang stets durch die Membran hindurch, doch brauchte die 1 %ige Lösung bedeutend mehr Zeit als die 5 %ige, um in die Objekte einzudringen. Das eben Erwähnte zeigt, daß die pflanzlichen Membranen oder Schalen sich nicht nur bei den einzelnen Arten und verschiedenen Stoffen gegenüber verschieden verhalten, sondern auch ein und demselben Stoff, je nach der Konzentration, in der er ihnen zugeführt wird, verschieden starken Widerstand entgegensetzen.

In weiteren Versuchen tötete Brown die Samen durch Einwerfen in siedendes Wasser ab, ohne die Membran zu verletzen. Letztere zeigte auch jetzt noch den verschiedenen Stoffen gegenüber dasselbe Verhalten, wie im lebenden Zustande, und es ergab sich daraus, daß die Impermeabilität der Membran gegen gewisse Stoffe vom lebenden Protoplasten unabhängig war.

Becquerel[1]) erklärt die lange Erhaltung der Keimfähigkeit exsiccatortrockener Samen und Früchte in absolutem Alkohol, Äther und Chloroform dadurch, daß die Samenschalen die vorerwähnten Medien nur schwer durchdringen lassen. Das Protoplasma selbst ist nach seiner Anschauung in dem latenten Lebensstadium der trockenen Samen unfähig den Giftstoffen zu widerstehen. So büßten bei seinen Untersuchungen die Samen der Schminkbohne, deren Schalen sich jederzeit für die angewandten Agentien durchlässig erwiesen, schnell ihr Leben ein, während Samen von Klee, Luzerne usw. außerordentlich lange Zeit resistent blieben, da sich ihre Schalen durch große Schwerdurchlässigkeit auszeichneten. Wurden die Schalen der letztgenannten Objekte angestochen, so drangen die Medien rasch ein und führten in kurzem den Tod herbei. Versuche mit Getreide und Erbsen zeigten, daß die

---

1) Becquerel, Annales des Sciences Naturelles, 1907, 9. Serie V, pag. 211—219, 300.

Schalen dieser Organismen den Giften mit der Zeit den Durchlaß gewährten und die Objekte selbst nach dem Eindringen der Agentien abgetötet waren.

Die Samen und Früchte bleiben nach Becquerels Meinung in den giftigen Medien solange keimfähig, als das Tegument für diese undurchlässig bleibt. Da die Schalen einer untersuchten Spezies sich nicht gleichmäßig verhalten und die Undurchlässigkeit nicht bei allen Individuen gleichzeitig aufhört, so folgert sich nach Becquerel hieraus der allmähliche Rückgang des Keimprozentsatzes, den Giglioli[1]) auf die ungleiche Austrocknung der Individuen zurückführte. Nach Gigliolis Ansicht starben die am wenigsten ausgetrockneten Individuen zuerst in den Giften ab, während die trockensten diesen Medien lange Widerstand leisteten. Becquerel nimmt dagegen an, daß das wenige Wasser, welches die exsiccatortrockenen Samen noch enthalten, für die Resistenz der Objekte nicht in Betracht kommt. Aus den Versuchen Becquerels geht weiter hervor, daß sich die Hüllen der Samen und Früchte der verschiedensten Arten Giftstoffen gegenüber ganz verschieden verhalten, daß manche den Agentien den Eintritt sofort gewähren, andere dieselben niemals oder erst nach sehr langen Zeiträumen eindringen lassen.

Den Ansichten Becquerels pflichtet Alfred J. Ewart[2]) völlig bei, indem auch er angibt, daß Samen mit undurchlässigen Schalen jahrelang ungeschädigt in Giften und giftigen Gasen aufbewahrt werden können.

Weitere Versuche über den bedeutenden Schutz, den eine kontinuierliche Membran gegenüber Giften gewährt, finden sich bei Kurzwelly[3]). Derselbe setzte exsiccatortrockene geschälte und ungeschälte Früchte und Samen verschiedenen giftigen Medien aus und fand, daß die geschälten Objekte bedeutend eher zugrunde gingen als die ungeschälten. Diese Beobachtung spricht sicher dafür, daß die Resistenz der ungeschälten Samen im wesentlichen auf einem Nichteindringen der Gifte beruht.

Ganz Ähnliches ergaben die Versuche Rabes[4]). Derselbe konstatierte, daß ausgekeimte Samen von Brassica und Sinapis, die in diesem Zustande ein Austrocknen im Exsiccator ungeschädigt vertrugen,

---

1) Giglioli, Sur la vie latente des graines (Nature, 3. octobre 1895); vgl. Becquerel, Annales des sciences naturelles, 1907, pag. 201.

2) Ewart, On the longevity of Seeds. Proc. Royal Soc. Victoria, Vol. XXI (New Series), 1908, Pt. I.

3) Kurzwelly, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 1903, Bd. XXXVIII, pag. 315.

4) Rabe, Flora, Ergänzungsband 1905, pag. 293—294.

den Einwirkungen von wasserfreiem Alkohol und Benzin nur verhältnismäßig kurze Zeit Widerstand leisteten. Von Brassica zeigten nach $2^1/_2$ monatigem Aufenthalt noch 4 %, in Alkohol noch 2 % Leben, Sinapis dagegen war nach der erwähnten Zeit in beiden Medien abgetötet. Im ungekeimten Zustande zeichnete sich sowohl Brassica als auch Sinapis durch außerordentlich große Resistenz gegen Alkohol und Benzin aus. Entweder ist nun das Plasma im ungekeimten Zustande resistenter als im gekeimten, oder das verschiedene Verhalten gekeimter und ungekeimter Samen beruht auf der Verschiedenheit der Samenschale. Die Kontinuität letzterer ist beim Auskeimen unterbrochen worden, und den Agentien ist dadurch der Eintritt in die Objekte erleichtert, die nun in Kürze zugrunde gehen.

Ferner interessierte hier die Frage, ob es möglich sei, Objekte, die an und für sich gar nicht widerstandsfähig gegen giftige Medien sind, durch Imprägnationsmittel, die ein Eindringen der Agentien erschweren, dahin zu bringen, daß sie ungeschädigt in den Medien verweilen können. Falls dies möglich sein sollte, so wird dies sicherlich auch für andere Organismen ein Hinweis auf die Bedeutung der Impermeabilität von Membranen und Schalen für die Giftresistenz sein.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit erörtert werden soll, läuft darauf hinaus, zu untersuchen, ob der Tod der Untersuchungsobjekte, der beim Eindringen der Medien in diese früher oder später doch eintritt, nur durch das Eindringen der Gifte hervorgerufen wird oder eine Folge des Herauslösens von Stoffen aus den Zellen durch die giftigen Agentien ist. Zur Lösung dieser Frage wird man das Herauslösen auf irgend eine Weise ausschalten müssen und dann zusehen, ob nun in den Medien dasselbe eintritt, was beim Herauslösen der Stoffe erfolgte.

Untersuchungen ähnlicher Art wurden schon von Kurzwelly[1]) angestellt. Derselbe hatte konstatiert, daß Alkohol, Äther und andere Gifte in das Untersuchungsmaterial eindrangen und Reservestoffe aus diesen herauslösten. Er hatte zu seinen Beobachtungen die ölhaltigen Früchte von Helianthus annuus benutzt und dieselben mit und ohne Fruchtschale verwandt. Es hatte sich dabei herausgestellt, daß die ungeschälten Früchte den Agentien besser standhielten als die geschälten, daß also der Fruchtschale eine gewisse Bedeutung für die Resistenz gegen Giftstoffe zuzuschreiben ist. Zugleich ergab es sich, daß das

---

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 1903, Bd. XXXVIII, pag. 315 bis 318.

Herauslösen von Reservestoffen wesentlich erschwert wurde. Den ungeschälten Früchten wurden nur geringe Ölmengen entzogen, die vermutlich in der Hauptsache aus der Fruchtschale selbst stammten. Aus den geschälten Früchten wurde bedeutend mehr Öl herausgelöst. Demnach schien es, als ob durch den größeren Verlust an Reservematerial die geringere Resistenz der geschälten Objekte bedingt sei. Weitere Versuche, die Kurzwelly vornahm, zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall sein konnte, denn der Rückgang der Keimkraft hielt nicht mit der Menge des herausgelösten Reservematerials gleichen Schritt. So hatte z. B. Alkohol nach 140 Tagen nur 2,64 %, Äther dagegen 37,4 % Öl aus den Früchten ausgezogen und doch war die Schädigung ungefähr dieselbe. Im ersten Falle keimten 44 %, im zweiten 36 % aus. Ungleich schwerer war die Schädigung, die Schwefelkohlenstoff in der gleichen Zeit den Objekten zugefügt hatte. Der Ölauszug betrug 33,94 %, der keimfähige Prozentsatz 12 %.

Kurzwelly hat bei diesen Versuchen wohl konstatiert, daß die Agentien Stoffe aus den Untersuchungsobjekten herauslösten und trotzdem von den untersuchten Samen und Früchten noch ein gewisser Prozentsatz keimfähig blieb, doch ist er nicht näher auf diese Untersuchungen eingegangen. Es ist daher die Frage offen geblieben, ob die Medien in alle Objekte eingedrungen waren und aus allen Öl ausgezogen hatten, ferner, ob auch diejenigen Früchte ihres Öles beraubt waren, welche noch Keimung zeigten.

Auf Anraten meines verehrten Lehrers Herrn Geheimrat Professor Dr. Pfeffer war ich gern bereit, mich näher mit diesen und den bereits vorher aufgestellten Fragen, an die sich im Laufe der Arbeit noch mehrere Nebenfragen anschlossen, zu befassen.

Material und allgemein Methodisches.

Die von mir angestellten Versuche erstreckten sich auf ölhaltige und stärkehaltige Samen und Früchte, auf Moospflänzchen, Pilzsporen, vegetative Bakterienformen, Bakteriensporen und Hefen.

Von Samen und Früchten wurden Ervum lens, Pisum sativum, Setaria italica, Sinapis alba, Trifolium incarnatum und Helianthus annuus verwandt.

Von Moosen wurden Ceratodon purpureus, Bryum argenteum und Barbula muralis für die Versuchszwecke ausgewählt.

Von Pilzsporen dienten Sporen von Aspergillus niger, Penicillium glaucum und Phycomyces nitens als Untersuchungsmaterial.

Von vegetativen Bakterien wurde Micrococcus prodigiosus, von Bakteriensporen Sporen vom Bacillus mesentericus und von Hefen Saccharomyces cerevisiae zu den Versuchen herangezogen.

Nebenbei wurden noch einzelne Versuche mit Samen von Lepidium sativum, Sporen von Botrytis cinerea usw. angestellt.

Sämtliche Versuchsobjekte wurden im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Die Exsiccatoren standen, um die Wasserentziehung zu beschleunigen, im Wärmezimmer bei ca. 25° C und waren vor Licht geschützt, um vor allem Pilzsporen und Bakterien vor Schaden zu bewahren.

Alle 6 Tage wurde in einem peinlichst trockenen, sterilen und dicht verschlossenen Wägegläschen von jedem der zum Trocknen aufgestellten Objekte eine Probe und zwar selbstverständlich immer ein und dieselbe gewogen. Zeigte sich nun bei einer Wägung in bezug auf das für dieselbe Probe 6 Tage vorher gefundene Gewicht kein Unterschied, so wurde das Material als exsiccatortrocken bezeichnet. Als zur Austrocknung nötige Zeit zählte die Aufenthaltsdauer im Exsiccator bis zur vorletzten Wägung.

Da für alle Versuche Wasser ausgeschlossen sein sollte, machte es sich nötig, auch die verwandten Chemikalien davon zu befreien. Es handelte sich dabei um Chloroform, Äthylalkohol, Amylalkohol, Äther, Benzin, Paraffinöl, Sudan, Kakaobutter, Vaseline, Mandelöl und Ölsäure. Die letztgenannten vier wurden vor ihrer Anwendung einige Tage im Exsiccator gehalten, um sie zu trocknen. Ein nach diesem Aufenthalt etwa noch vorhandener Wassergehalt blieb unberücksichtigt. Die beiden Alkohole, Äther, Benzin und Chloroform wurden in Glasstopfenflaschen gebracht, mit reinem Ätzkalk beschickt und öfters tüchtig durchgeschüttelt. Sie konnten, nachdem sich der Ätzkalk zu Boden gesetzt hatte, als annähernd wasserfreie Medien verwandt werden. Aus dem Paraffinöl wurde das Wasser durch längeres Erhitzen in einer Kochflasche bei einer Temperatur von 110—120° C ausgetrieben. Die Flasche wurde dann mit einem Korkstopfen gut verschlossen und im Exsiccator aufbewahrt. Das Sudan wurde vor seiner Lösung in Alkohol im Exsiccator getrocknet.

Chloroform, Paraffinöl, Äthyl- und Amylalkohol wurden sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei höheren Temperaturen angewandt, die übrigen Chemikalien nur bei Zimmertemperatur. Die Versuche bei höheren Temperaturen erstreckten sich auf höchstens 48 Stunden, während sich die bei Zimmertemperatur vorgenommenen Untersuchungen auf bedeutend längere Zeiträume ausdehnten.

Die Versuchsanstellung war in letzterem Falle sehr einfach. Die Chemikalien wurden in kleine, trockene, eventuell auch sterile Fläschchen verteilt, mit dem jeweiligen Untersuchungsmaterial beschickt und gut verkorkt in Exsiccatoren aufbewahrt. In bestimmten Zeitintervallen wurden dann Proben von den eingelegten Objekten entnommen und diese, nachdem die chemischen Agentien völlig abgedunstet waren, auf ihre Lebensfähigkeit geprüft.

Das Abdunsten der Medien war von verschiedener Dauer. Chloroform verdunstete ziemlich schnell, während es bei Äthyl- und ganz besonders, Amylalkohol mehrere (bis 8) Tage dauerte bis die Agentien verschwunden waren.

Die Anwendung der Medien bei höheren Temperaturen erforderte eine andere, kompliziertere Methodik.

Kamen die Agentien bei Temperaturen zur Verwendung, die ihre Siedepunkte nicht überschritten, so wurden sie samt Untersuchungsmaterial in kleine Erlenmeyer gebracht, die im Wasserbade erhitzt wurden. Letzteres mußte, da sich die Versuche meist auf mehrere Stunden ausdehnten, durch eine Vorrichtung, die immer soviel Wasser, als abdampfte, wieder zulaufen ließ, auf konstantem Niveau gehalten werden.

Auf die Erlenmeyer, die zum Erhitzen der Objekte in den jeweiligen Flüssigkeiten dienten, waren ca. 2 m lange Glasröhren mittels Korkes luftdicht aufgesetzt. Diese Röhren verhinderten einerseits eine Wasseraufnahme der Chemikalien aus den Dämpfen des Wasserbades, und dienten anderseits als Steigrohre, wenn die Medien bis zum Sieden erhitzt wurden. In diesem Falle kondensierten sich die Dämpfe der Agentien in den Rohren und tropften in die Erlenmeyer zurück, so daß ein völliges Verdunsten der Untersuchungsflüssigkeiten ausgeschlossen war. Selbst nach 48 stündigem Sieden konnte kaum eine Abnahme der in die Erlenmeyer eingebrachten Flüssigkeitsmengen konstatiert werden.

Die Steigrohre, die vor Gebrauch peinlichst getrocknet und zuvor durch Ausspülen mit Sublimatlösung so gut als möglich auch desinfiziert waren, trugen an ihrem oberen Ende einen kleinen Aufsatz mit Chlorcalcium, so daß eine Wasseraufnahme der Objekte und Chemikalien in den Erlenmeyern ziemlich ausgeschlossen war. Steigrohr und Aufsatz waren durch einen sterilen Wattepfropf, der eine Infektion des ersteren von oben unmöglich machte, von einander getrennt. Den Abschluß des Ganzen bildete ein großer Wattebausch. Das Chlorcalcium wurde von Zeit zu Zeit durch Neues ersetzt.

Nach Schluß des jeweiligen Versuches wurden die Erlenmeyer einfach von den Steigrohren, die an Stativen befestigt waren, abgenommen, und erstere bis zum nächsten Versuche unten mit sterilen Wattepfropfen verschlossen. Der Inhalt der Erlenmeyer wurde nach dem Abgießen der Chemikalien wie das Material, auf welches die Agentien bei Zimmertemperatur eingewirkt hatten, weiter behandelt.

Die Siedetemperatur von Chloroform lag bei ca. 61° C, die von Äthylalkohol bei ca. 78° C und die von Amylalkohol bei ca. 137° C. Da letztgenannte Temperatur oberhalb der siedenden Wassers liegt, so mußte bei ihrer Anwendung ein Ölbad die Stelle des Wasserbades ersetzen.

Chloroform, Äthyl- und Amylalkohol wurden außer in siedendem Zustande noch bei einer Temperatur von 100° C angewandt, Paraffinöl nur bei 100° C.

Für das Experimentieren mit Chloroform und Äthylalkohol bei 100° C mußte eine neue Versuchsanstellung eingeführt werden, da die Siedepunkte dieser Medien nach dem oben gesagten weit unterhalb von 100° C liegen. Die Agentien wurden daher zusammen mit dem Untersuchungsmaterial in einseitig zugeschmolzene Glasröhren gefüllt, und diese dann am anderen Ende ebenfalls zugeschmolzen. Der Hohlraum der Röhren betrug ungefähr 30 ccm und war zu einem Drittel von dem betreffenden Medium erfüllt. Da bei dem durch das Erhitzen auf 100° C in den zugeschmolzenen Röhren entstehenden Druck, ein Springen letzterer nicht ausgeschlossen war, wurden diese in Messingzylindern im Wasserbade erhitzt. Die Zylinder waren nach oben offen, unten waren sie bis auf feine Öffnungen, die zum Einlaß des Wassers aus dem Wasserbade dienten, geschlossen. Bei einem Springen der Glasröhren konnten die Splitter nur oben herausgeschleudert werden und auf diese Weise keinen Schaden anrichten.

Das Wasser des Wasserbades stand in allen Fällen einige Zentimeter höher als der Spiegel der in Erlenmeyern oder Glasröhren eingeschlossenen Agentien.

Zum Vergleich mit der Wirkung der Chemikalien bei hohen Temperaturen wurden die Objekte Trockentemperaturen von 61° C, 78° C, 100° C und 120° C ausgesetzt. Das Erhitzen auf 61° C, 78° C und 120° C wurde im Trockenthermostaten vorgenommen und nur bei Versuchen mit Samen oder Früchten angewandt. Für Untersuchungen bei Trockentemperaturen von 100° C, die sich nicht nur auf Samen, sondern auch auf Pilzsporen erstreckten, wurde das Untersuchungsmaterial in Glasröhren, die zur Verhinderung der Wasserauf-

nahme mit etwas Calciumoxyd versehen waren, eingeschmolzen. Je nach dem Versuche wurden diese Rohre verschieden lange Zeit im siedenden Wasserbade gehalten. Nach Beendigung der Versuche wurden die Objekte genau wie die mit Giftstoffen behandelten auf Lebensfähigkeit geprüft.

Bei allen Untersuchungen, die bei 100° C ausgeführt wurden, betrug die Temperatur nicht genau 100° C, sondern nur reichlich 99° C, da das Wasser bereits bei dieser Temperatur siedete.

Sämtliche Chemikalien, ob mit, ob ohne Untersuchungsmaterial, wurden vor Licht- und Luftzutritt tunlichst geschützt. Von den Versuchen mit höheren Temperaturen wurden nur die mit Chloroform angestellten, wegen der Zersetzlichkeit dieses Mediums am Lichte, im Dunkeln ausgeführt. Zu diesem Zwecke wurde die ganze Kochvorrichtung mit schwarzen Tüchern verhängt. Direktes Sonnenlicht war bei allen Untersuchungen ausgeschlossen.

In allen Fällen wurde darauf gesehen, daß das zu den Untersuchungen verwandte Glasmaterial (Erlenmeyer, Pipetten, Steigrohre, Glasflaschen usw.) peinlichst trocken und steril war.

Die Objekte wurden, um jeder Wasseraufnahme und Infektion vorzubeugen, stets nur mit trockener, steriler Pinzette aus den Exsiccatoren in die Chemikalien übertragen und aus letzteren am Schluß der Versuche auf dieselbe Weise wieder entnommen. Auch die Agentien wurden stets mit besonderen, trockenen und sterilen Pipetten in die Versuchsgefäße gefüllt. Außerdem wurden all diese Übertragungen und damit verbundenen Handlungen (Zuschmelzen von Röhren, Verschließen von Flaschen usw.) möglichst beschleunigt, um auch auf diese Weise die Gefahr der Wasseranziehung tunlichst einzuschränken.

Das Untersuchungsmaterial, welches den chemischen Agentien bei höheren Temperaturen ausgesetzt werden sollte, wurde zuvor 24 Stunden bei Zimmertemperatur darin aufbewahrt. Es sollte hierdurch ein allzu plötzliches Eindringen der Medien in die Objekte, aus denen beim Erhitzen doch sicher Luft ausgetrieben wird, vermieden werden. Später angestellte Versuche ergaben jedoch bei Objekten, die in die Chemikalien eingebracht und sofort erhitzt wurden, keine anderen Resultate als bei solchen, die zuvor 24 Stunden bei Zimmertemperatur in den Agentien verweilt hatten. Wie sich später zeigte, waren die Medien nach eintägigem Einfluß auf das Untersuchungsmaterial noch gar nicht in dasselbe eingedrungen. Letzteres befand sich also bei beginnendem Erhitzen in demselben Zustande, als ob es gar nicht vorher schon bei Zimmertemperatur in den Agentien gewesen wäre.

Die Zeiten, welche in den im Laufe der Arbeit folgenden Tabellen angegeben werden, sind von dem Augenblick an gerechnet, in welchem: bei Anwendung von Trockentemperaturen von 61° C, 78° C und 120° C das Thermometer des Thermostaten die gewünschte Temperatur anzeigte, bei Versuchen mit siedenden Chemikalien diese zu sieden begannen, und bei Verwendung der Chemikalien und Trockentemperaturen bei 100° C das Wasserbad die Siedetemperatur erreicht hatte.

In den Tabellen, in denen nicht direkt Prozentsätze angegeben sind, bedeutet ein + die Erhaltung der Lebensfähigkeit, ein — den eingetretenen Tod der Objekte.

Alle ausgeführten Untersuchungen sind in der Hauptsache vergleichender Natur, und es war daher von größter Wichtigkeit, daß immer dieselben Bedingungen (Aufbewahrungsort, Nährboden usw.) eingehalten wurden und stets gleiches Ausgangsmaterial zur Verfügung stand.

Experimenteller Teil.

Die in diesem Teile ausgeführten Versuche verfolgen die Ziele, die bereits in der Einleitung kurz angegeben wurden. Die dabei mit den einzelnen Untersuchungsobjekten vorgenommenen Experimente laufen im großen Ganzen auf dasselbe hinaus, obwohl nicht mit jedem Objekt genau dieselben Untersuchungen angestellt wurden, sondern bei dem einen der oder jener Versuch wegfiel, der bei einem anderen zur Ausführung kam.

A. Versuche mit Samen und Früchten.

Die Anzahl der untersuchten Samen und Früchte schwankte bei den einzelnen Versuchen und den verschiedenen Samenarten. War es bei Trifolium incarnatum, Sinapis alba und Setaria italica leicht, für alle Versuche die Zahl 100 beibehalten zu können, da diese Samen durch ihre Kleinheit nur wenig Platz beanspruchten, so mußte bei Ervum lens, Pisum sativum und Helianthus annuus die Zahl der Samen wegen ihrer Größe auf 25 herabgesetzt werden, um bei Pisum und den ungeschälten Helianthusfrüchten bei der Behandlung mit Alkohol und Chloroform in zugeschmolzenen Röhren (100° C) eine weitere Herabsetzung auf 10 zu erfahren.

Da durch diese Verminderung der Versuchszahlen das Bild von der prozentualen Keimfähigkeit der Objekte leicht etwas entstellt werden konnte, wurde, um diesen Mangel zu beheben, jeder einzelne Versuch mindestens dreimal ausgeführt, und das Mittel aus den Ergebnissen

gezogen. Das Mittel wurde als Resultat in die Versuchstabellen aufgenommen.

Das öftere Wiederholen eines und desselben Experimentes lieferte zugleich eine Garantie dafür, daß keine Fehler dabei untergelaufen waren, da die einzelnen Untersuchungen, wenn auch nicht genau dieselben, so doch annähernd dieselben Resultate ergeben mußten.

Zunächst wurden die für die Untersuchungszwecke ausgewählten Samen und Früchte tunlichst ausgelesen und etwa vorhandene taube oder schlechte Individuen entfernt. Dann wurden die Objekte auf ihre Keimfähigkeit geprüft und diese prozentual festgestellt. Hierauf folgte das Trocknen des Materials in Exsiccatoren, das bei den einzelnen Objekten natürlicherweise verschieden lange Zeit in Anspruch nahm. Nach erlangter Exsiccatortrockenheit wurde nochmals die prozentuale Keimkraft der Samen resp. Früchte bestimmt, bevor sie zu den Versuchen verwandt wurden.

Diejenigen Objekte, die dabei den Einwirkungen von flüchtigen Giftstoffen (ganz gleich ob bei Zimmer- oder höheren Temperaturen) ausgesetzt waren, wurden nach Abschluß des einzelnen Versuches aus den Medien herausgenommen und auf Fließpapier ausgebreitet. Letzteres wurde sodann im Wärmezimmer bei ca. 33 ° C solange aufbewahrt, bis von den Chemikalien durch den Geruch absolut nichts mehr wahrgenommen werden konnte, diese also völlig verdunstet waren. War dies der Fall, dann wurden die Samen unter günstigen Bedingungen zur Keimung gebracht.

Bei den Versuchen, die sich mit der Einwirkung von Paraffinöl auf das Untersuchungsmaterial befaßten, wurden die einzelnen Objekte nach Beendigung des jeweiligen Experimentes sorgfältigst mit Fließpapier abgetupft, um zu verhindern, daß das Paraffinöl einen dicken, schmierigen Belag um die einzelnen Samen oder Früchte bildete und auf diese Weise das Auskeimen hemmte oder doch wenigstens ungünstig beeinflußte.

Dasjenige Material, das nur Trockentemperaturen ausgesetzt gewesen war, bedurfte keinerlei Vorbereitung zur Auskeimung, sondern konnte direkt angequellt und zur Keimung gebracht werden.

Der Keimung ging in allen Fällen ein Anquellen in Wasser voraus, das bei den einzelnen Objekten verschieden lange ausgedehnt wurde. Ervum, geschälte Helianthusfrüchte und vor allem Pisum wurden nur kurze Zeit angequellt, da sie sonst schlecht keimten und leicht in Fäulnis übergingen. Die übrigen Objekte konnten ruhig eine Quellung

bis zu 24 Stunden vertragen, ohne daß dadurch eine Schädigung zu bemerken gewesen wäre.

Nach dem Anquellen wurden die Objekte zum Auskeimen in leicht bedeckte Glasschalen gebracht und dort auf Fließpapier ausgebreitet. Letzteres lag auf erhöhter, rings von Wasser umgebener Glasplatte und tauchte mit überhängendem Rande in das Wasser ein. Auf diese Weise wurde eine konstante, mittlere Feuchtigkeit des Fließpapiers, auf dem die Objekte ausgekeimt wurden, erzielt.

In allen Fällen wurde die Keimkraft prozentual festgestellt.

Bei den Zimmertemperaturversuchen, die sich über längere Zeiträume erstreckten, mußte nach Abschluß eines jeden Versuches auch die prozentuale Keimkraft der Kontrollsamen bestimmt werden. Bei der Beurteilung eines durch Giftwirkung hervorgerufenen Rückganges im Auskeimen mußte dann ein event. schon bei den Kontrollsamen eingetretener Rückgang in Abzug gebracht werden.

Der Thermostat, der dazu diente, um die Samen und Früchte höheren Trockentemperaturen auszusetzen, war so eingerichtet, daß das Thermometer, welches von außen in den Thermostaten hineinreichte, direkt mit den Objekten in Berührung stand und so genau die Temperatur derselben anzeigte. Er wurde vor Einbringung des exsiccatortrockenen Untersuchungsmaterials auf ca. 30° C erhitzt, um jede Wasseraufnahme der Samen oder Früchte zu verhindern. Aus demselben Grunde wurde das Übertragen aus dem Exsiccator in den Thermostaten möglichst beschleunigt.

Sollten für die Untersuchungen Samen und Früchte ohne Schalen verwandt werden, so war es nötig, letztere zu entfernen. Bei Helianthus war dies einfach, denn diese Samen ließen sich leicht von der Fruchtschale befreien. Bei Trifolium incarnatum und Pisum sativum dagegen mußten die Objekte erst etwas gequellt werden, ehe die Schalen entfernt werden konnten. Dasselbe mußte bei geschälten Früchten von Helianthus geschehen, wenn das dünne Samenhäutchen, das diese umgibt, abgelöst werden sollte. Nach dem Trocknen im Exsiccator wurde von dem geschälten Material, genau wie es bei ungeschältem gehandhabt worden war, der keimfähige Prozentsatz bestimmt, bevor es zu den einzelnen Versuchen herangezogen wurde.

Einige weitere spezielle Versuchsmethoden werden der Einfachheit halber direkt bei den Versuchen mit angeführt werden.

Bevor Versuche mit den Giftstoffen bei höheren Temperaturen zur Ausführung kamen, wurde zunächst die Resistenz verschiedener Samen und Früchte gegen die Gifte bei Zimmertemperatur untersucht,

um Vergleiche zwischen der Wirkung eines Giftes bei höherer und Zimmertemperatur anstellen zu können. Die Versuche beschränkten sich auf die Untersuchung der Resistenz von Trifolium incarnatum, Sinapis alba und Helianthus annuus gegen Amylalkohol, da bereits von Kurzwelly[1]) eingehende Versuche mit den übrigen Medien vorlagen, die sehr gut mit zum Vergleich herangezogen werden konnten. Dieselben Versuche, die mit Amylalkohol angestellt wurden, kamen daneben mit Paraffinöl zur Ausführung, um auch für dieses Medium Vergleiche in der Wirkung bei höherer und Zimmertemperatur aufstellen zu können.

Die Ergebnisse der von mir angestellten Untersuchungen finden sich in der folgenden Versuchsreihe. Die Kontrollsamen sind daselbst mit K_1 und K_2 bezeichnet. K_1 gibt die Keimkraft bei Beginn, K_2 nach Abschluß der Versuche an. Die unter Amylalkohol und Paraffinöl stehenden Angaben sind die Keimungsprozentsätze nach 100tägigem Aufenthalt in den Medien.

1. Versuchsreihe.

Versuche bei Zimmertemperatur.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Untersuchungsobjekt	K_1	Amylalkohol	Paraffinöl	K_2
100	Trifol. inc. (Exsiccator = 30 Tage)	94 %	74 %	93 %	91 %
100	Sinap. alba (Exsiccator = 30 Tage)	95 %	82 %	89 %	92 %
100	Helianth. an. (Exsiccator = 42 Tage)	88 %	67 %	84 %	86 %

Wie aus der vorliegenden Tabelle ersichtlich ist, zeigten die mit Paraffinöl behandelten Objekte im Vergleich zu den Kontrollsamen keinen Rückgang. Die Samen und Früchte, auf welche Amylalkohol eingewirkt hatte, wiesen eine geringe Schädigung auf, aber trotzdem war die Resistenz der Objekte gegen dieses Gift verhältnismäßig sehr groß und der Rückgang der Keimkraft nur gering.

Ganz ähnliche Resultate hatte bereits Kurzwelly[1]) in bezug auf Äthylalkohol, Äther, Chloroform usw. erhalten. Er hatte in den Jahren 1900 bis 1902 Untersuchungen auf diesem Gebiete ausgeführt. Im Jahre 1905 untersuchte er verschiedene Samen und Früchte, die noch

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 1903, Bd. XXXVIII, pag. 309 bis 322.

seit seinen Versuchen her in den Medien stehen geblieben waren, aufs neue auf ihre Keimfähigkeit. Diese Resultate sind bisher nicht veröffentlicht. Sie wurden mir von Herrn Dr. Kurzwelly in liebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt, und ich lasse dieselben in der nächsten Tabelle folgen. Die daselbst neben den keimfähigen Prozentsätzen in Klammern angeführten Zahlen geben die Stückanzahl der zum Versuch angesetzten Objekte an.

2. Versuchsreihe.

Versuche bei Zimmertemperatur.

Untersuchungs-objekte	Dauer der Einwirkung	Alkoh.	Äther	Benzol	CS_2	Chloroform		Kontrolle
						Dampf	Flüssigkeit	
Trifol. incarnat. (exsiccatortrocken)	21. 6. 00 bis 6. 7. 05	34 % (100)	58 % (100)	52 % (50)	50 % (54)			65 %
Trifol. hybrid. (exsiccatortrocken)	23. 5. 00 bis 6. 7. 05	21 % (200)	21 % (200)	8 % (100)	13 % (100)			13 %
Trifol. hybrid. (1 Stde. in Wasser angequellt)	23. 5. 00 bis 6. 7. 05	10 % (38)	21 % (100)					
Sinap. alba (exsiccatortrocken)	12. 6. 00 bis 6. 7. 05	80 % (100)	70 % (30)	62 % (83)				75 %
Helianth. ann. (geschält, exsiccatortrocken)	12. 6. 01 bis 6. 7. 05	17 % (94)						
Lepidium sativ. (lufttrocken)	5. 6. 01 bis 6. 7. 05					72 % (100)	91 % (100)	100 %
Lepidium sativ. (exsiccatortrocken)	5. 6. 01 bis 6. 7. 05					77 % (100)	94 % (100)	100 %

Außerdem wurde von Kurzwelly noch konstatiert, daß exsiccatortrockene Samen von Pisum sativum und lufttrockene Früchte von Triticum sativum nach ca. vierjährigem Aufenthalt in Chloroform den Tod gefunden hatten.

Jedenfalls geht aus den angeführten Versuchen hervor, daß die Schädigung der Objekte durch die Giftstoffe auch nach Jahren im Vergleich zu den Kontrollsamen nur gering war, und daß sogar zum Teil die in den giftigen Medien aufbewahrt gewesenen Objekte höhere Keimungsprozentsätze als das Kontrollmaterial lieferten.

Von den von Kurzwelly angesetzten Versuchen standen mir noch Lepidium sativum und Triticum sativum zur Verfügung. Diese Objekte hatten ca. 8 Jahre in flüssigem Chloroform zugebracht und wurden von mir auf ihre Keimfähigkeit geprüft. Dabei lieferten die Samen von Lepidium, die in exsiccatortrockenem Zustande in das Chloroform eingebracht worden waren, einen Keimungsprozentsatz von

79 %, die lufttrocken diesem Medium ausgesetzt worden waren, einen solchen von 51 %, während die Früchte von Triticum, die exsiccatortrocken in Chloroform gelegt worden waren, nur noch zu 3 % auskeimten.

Gelegentlich dieser bei Zimmertemperatur angestellten Versuche wurden noch nebenbei einige andere Untersuchungen vorgenommen. Diese sollten zur Aufklärung der Frage führen, ob ein Giftgemisch eine andere Wirkung hervorrufe als die einzelnen Gifte. Zu diesem Zwecke wurden exsiccatortrockene Samen von Sinapis alba und Trifolium incarnatum der Einwirkung von einem Gemisch aus gleichen Teilen Alkohol und Äther ausgesetzt, und die Wirkung der einzelnen Agentien auf die Objekte damit verglichen. Die Versuche mit Alkohol konnten dabei zugleich als Kontrollversuche zu den Untersuchungen dienen, welche mit diesem Medium an Sinapis und Trifolium bei höheren Temperaturen angestellt wurden.

3. Versuchsreihe.

Sinapis alba.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (30 Tage) Materials:
bei Beginn der Versuche = 96 %; nach Schluß der Versuche = 87 %.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Alkohohl	Alkohol-Äther	Äther
8	91 %	88 %	90 %
24	83 %	85 %	86 %
48	80 %	81 %	80 %
123	78 %	76 %	76 %
198	75 %	75 %	75 %
270	71 %	74 %	72 %

4. Versuchsreihe.

Trifolium incarnatum.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (30 Tage) Materials:
bei Beginn der Versuche = 95 %; nach Schluß der Versuche = 79 %.

Dauer der Einwirkung in Tagen	Alkohol	Alkohol-Äther	Äther
8	88 %	91 %	92 %
24	81 %	80 %	84 %
48	74 %	70 %	72 %
123	69 %	68 %	68 %
198	65 %	66 %	64 %
270	64 %	63 %	61 %

Als Resultat der beiden Versuchsreihen ergibt sich kaum ein Unterschied in der Wirkungsweise der drei Medien. Es läßt sich auch hier kaum eine abweichende Wirkung des Giftgemisches gegenüber den Einzelgiften erwarten, da diese an und für sich ziemlich gleichmäßig wirken. Die Keimungsprozentsätze nach bestimmtem Aufenthalt in den Agentien zeigen nur wenig Differenz. Die Schädigung durch die Agentien ist im Verhältnis zum Rückgang der Keimkraft der Kontrollsamen gering.

Es schließen sich hier die Versuche bei höheren Temperaturen an.

Die ersten Untersuchungen wurden an Lepidiumsamen, die von Kurzwelly stammten, und bereits 8 Jahre in Chloroform zugebracht hatten, angestellt. Diese Samen wurden während 20 Stunden in siedendem Chloroform gehalten. Hierdurch hatten die Objekte, die von Kurzwelly lufttrocken in das Chloroform gebracht worden waren, sämtlich ihre Keimkraft eingebüßt, während das Material, das exsiccatortrocken in das Medium eingelegt worden war, noch zu 23 % auskeimte.

Die folgenden Versuchsreihen enthalten die Resultate über die Einwirkung giftiger Medien bei höheren Temperaturen neben indifferenten Medien und Trockentemperaturen derselben Höhe.

5. Versuchsreihe.

Ervum lens.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (30 Tage) Materials = 95 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Trocken-temperatur von 61° C	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Trocken-temperatur von 78° C
1	49 %	81 %	42 %	70 %
3	37 %	79 %	28 %	64 %
6	32 %	70 %	17 %	53 %
8	26 %	67 %	11 %	48 %
10	19 %	66 %	8 %	38 %
15	6 %	63 %	0 %	33 %

Die siedenden Medien wirkten erheblich nachteiliger auf Ervum ein als die betreffenden Trockentemperaturen allein. Die Trockentemperatur von 78° C wirkte schädigender als die von 61° C. Die Keimkraft der Objekte ging in siedendem Alkohol schneller zurück als in siedendem Chloroform. Die verschiedene Wirkungsweise der beiden siedenden Medien scheint hauptsächlich in dem Temperaturunterschied zu liegen, da Alkohol und Chloroform, wie weitere Versuche zeigten,

bei gleicher Temperatur dieselben Wirkungen hervorriefen. So keimten Samen von Ervum lens, die 150 Tage in Alkohol resp. Chloroform bei Zimmertemperatur gelegen hatten zu 38 resp. 36 % aus. Ebenso konnte bei Anwendung der beiden Agentien bei 100° C (siehe 7. bis 11. Versuchsreihe) kein Unterschied in der Wirkungsweise festgestellt werden.

6. Versuchsreihe.

Setaria italica.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (30 Tage) Materials = 100 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Amylalkohol bei 100° C	Paraffinöl bei 100° C
1	92 %	0 %	93 %	92 %
8	87 %	0 %	76 %	80 %
15	83 %	0 %	61 %	65 %
30	67 %	0 %	35 %	40 %
48	52 %	0 %	1 %	8 %

Ganz eigentümlich berührte es bei diesen Versuchen, daß die exsiccatortrockenen Früchte von Setaria siedendem Alkohol gegenüber gar nicht resistent waren und nicht einmal 1 Stunde in diesem siedenden Medium verbleiben konnten, ohne ihre Keimkraft einzubüßen. Siedendes Chloroform wurde verhältnismäßig sehr gut vertragen, und auch Amylalkohol und Paraffinöl von 100° C gegenüber zeigte sich Setaria recht widerstandsfähig. Die Wirkungsweise von Amylalkohol unterschied sich kaum von der des Paraffinöls.

Um festzustellen, ob Äthylalkohol in allen Fällen tötend auf Setaria einwirkt, oder ob dies allein bei höherer Temperatur der Fall ist, wurde das Versuchsmaterial auch bei Zimmertemperatur in dieses Medium eingelegt. Die Objekte blieben 35 Tage darin, und es zeigte sich, daß nach diesem Aufenthalt noch 74 % der Samen keimfähig waren. Hieraus geht deutlich hervor, daß Äthylalkohol bei Zimmertemperatur nur wenig, in siedendem Zustande dagegen stark schädigend auf Setaria einwirkt und in Kürze die Keimkraft der Objekte vernichtet.

(7. Versuchsreihe siehe nächste Seite.)

Der Unterschied der Wirkung der Medien bei verschiedenen Temperaturen bis 100° C auf Pisum ist nach vorliegenden Versuchen nicht groß, unterscheidet sich aber merklich von der Wirkung der angewandten Trockentemperatur resp. Paraffinöls bei derselben.

7. Versuchsreihe.

Pisum sativum.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (18 Tage) Materials = 88 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Chloroform von 100° C	Äthylalkohol von 100° C	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trocken-temperatur von 100° C	Siedender (137° C) Amylalkohol
1/4	48 %	45 %	43 %	44 %	56 %	65 %	68 %	0 %
1	38 %	35 %	33 %	31 %	43 %	53 %	56 %	0 %
3	36 %	33 %	32 %	29 %	34 %	44 %	42 %	0 %
6	19 %	16 %	6 %	7 %	17 %	29 %	28 %	0 %
8	11 %	4 %	0 %	0 %	4 %	17 %	19 %	0 %

8. Versuchsreihe.

Sinapis alba.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (30 Tage) Materials = 95 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Chloroform von 100° C	Äthylalkohol von 100° C	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trocken-temperatur von 100° C	Trocken-temperatur von 120° C	Siedender (137° C) Amylalkohol
1	79 %	66 %	62 %	60 %	94 %	86 %	91 %	18 %	0 %
8	76 %	59 %	56 %	55 %	66 %	85 %	87 %	0 %	0 %
15	66 %	50 %	31 %	32 %	46 %	82 %	81 %	0 %	0 %
30	46 %	32 %	16 %	14 %	28 %	79 %	73 %	0 %	0 %
48	8 %	0 %	0 %	0 %	12 %	68 %	67 %	0 %	0 %

9. Versuchsreihe.

Trifolium incarnatum.

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (30 Tage) Materials = 96 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Chloroform von 100° C	Äthylalkohol von 100° C	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trocken-temperatur von 100° C	Trocken-temperatur von 120° C	Siedender (137° C) Amylalkohol
1	80 %	77 %	72 %	66 %	89 %	85 %	87 %	21 %	0 %
8	75 %	75 %	62 %	60 %	67 %	84 %	83 %	0 %	0 %
15	74 %	73 %	56 %	53 %	62 %	81 %	80 %	0 %	0 %
30	61 %	60 %	49 %	46 %	54 %	77 %	76 %	0 %	0 %
48	44 %	40 %	25 %	24 %	45 %	62 %	64 %	0 %	0 %

10. Versuchsreihe.

Helianthus annuus (ungeschält).

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (42 Tage) Materials = 94 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Chloroform von 100° C	Äthylalkohol von 100° C	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trocken-temperatur von 100° C	Trocken-temperatur von 120° C	Siedender (137° C) Amylalkohol
1	78 %	75 %	72 %	69 %	78 %	89 %	93 %	71 %	0 %
3	63 %	66 %	56 %	55 %	72 %	88 %	89 %	0 %	0 %
8	58 %	45 %	40 %	42 %	68 %	83 %	84 %	0 %	0 %
15	49 %	39 %	29 %	26 %	52 %	78 %	80 %	0 %	0 %
30	40 %	31 %	22 %	12 %	32 %	73 %	75 %	0 %	0 %
48	33 %	17 %	0 %	0 %	0 %	50 %	48 %	0 %	0 %

Die letzten 4 Versuchsreihen zeigen, daß die einzelnen chemischen Agentien mit der steigenden Temperatur schädigender auf die Objekte einwirkten. Amylalkohol von 100° C wirkte weniger nachteilig als Chloroform und Äthylalkohol bei dieser Temperatur. Paraffinöl von 100° C und dieselbe Trockentemperatur riefen die gleiche Wirkung hervor, die Schädigung war in diesem Fall verhältnismäßig gering. Siedender Amylalkohol wurde nicht vertragen, doch ergaben Kontrollversuche an Helianthus und Sinapis, daß auch die Trockentemperatur von 137° C in ganz kurzer Zeit tödlich[1]) wirkte und der Temperaturhöhe also bei Einwirkung des siedenden Amylalkohols wohl die Hauptschädigung zuzuschreiben sein dürfte. Aus den letzten drei Tabellen geht ferner hervor, daß die Trockentemperatur von 120° C bedeutend schädigender als die von 100° C wirkte.

An den Samen resp. Früchten, die den Versuchen unterworfen gewesen waren, konnte noch verschiedenes Bemerkenswerte beobachtet werden. Sie quollen in Wasser genau so wie das Kontrollmaterial, ganz gleich, wie lange sie den Versuchen ausgesetzt gewesen waren. Auf diesem Wege konnten lebende und abgetötete Objekte nicht unterschieden werden. Doch zeigte sich bald nach Einbringen in die Keimschalen ein Unterschied zwischen lebendem und totem Material, da letzteres schnell breiig wurde und in Fäulnis überging.

Die Dauer der Versuche übte auch ihren Einfluß auf die Keimdauer der untersuchten Objekte aus. Je länger die Versuche ausge-

1) Schon eine Trockentemperatur von 120° C führte, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, bald den Tod herbei.

dehnt gewesen waren, desto länger dauerte es auch, bis eine ganze untersuchte Probe die Keimung absolviert hatte, desto länger auch bis das einzelne Samenindividuum sein Würzelchen hervorgestreckt und seine Keimblätter entfaltet hatte.

Unter normalen Bedingungen war der größte Teil der Samen resp. Früchte bereits nach 2 bis 4 Tagen ausgekeimt, und die gesamte Keimung nach ca. 8 Tagen völlig abgeschlossen. Nach längerer Behandlung der Objekte dagegen wurden zunächst die ersten Anzeichen der Keimung weit hinausgeschoben, und auch die Gesamtkeimungsdauer des einzelnen Individuums wesentlich verlängert.

So brauchten z. B. die einzelnen Samen von Sinapis alba, die einer 48 stündigen Einwirkung von Amylalkohol bei 100° C ausgesetzt gewesen waren und normal 1 Tag zu ihrer Auskeimung[1]) brauchten, nach dieser Behandlung 8 bis 10 Tage dazu. Die ersten Anzeichen von Keimung dieser untersuchten Samenprobe trat erst nach 16 Tagen auf, so daß ich schon nahe daran gewesen war die Objekte für tot zu erklären, wenn mich nicht ihr gutes Aussehen immer wieder davon abgehalten hätte. Die letzten Samen dieser Probe keimten erst nach 34 Tagen aus, hatten also eine ganz erhebliche Verzögerung in ihrer Auskeimungsfähigkeit erfahren.

Diese Verzögerungen und Verlängerungen beim Auskeimen waren bei allen Objekten nach länger andauernden Versuchen zu verzeichnen. Sie schwankten je nach Einwirkungszeit, Medium und Untersuchungsmaterial. Am auffälligsten waren diese Vorgänge bei den Versuchen mit Amylalkohol und da wiederum bei der Einwirkung dieses Mediums auf Sinapis alba (siehe oben angeführtes Beispiel).

Neben dem eben behandelten Verhalten zeigten die Objekte noch andere Erscheinungen, die auf Schädigungen durch die Gifte hindeuteten und bei langer Einwirkung der Agentien ganz besonders bemerkbar waren. Sie fielen bei Ervum und Pisum stark in die Augen, doch auch bei Helianthus, Setaria, Sinapis, und vor allem bei Trifolium zeigten sie sich. Nach längerer Einwirkung der Medien erschienen oft krankhafte, runzelige, dünne und lange Würzelchen, die sich äußerst schwächlich erwiesen. Die Kotyledonen waren dann gewöhnlich stark geschwollen und kamen nicht zur Entfaltung. Das gesamte so aussehende Material starb bald nach dem Auskeimen ab.

Die angeführten Erscheinungen, die sich beim Auskeimen der Samen und Früchte zeigten, traten sowohl bei Anwendung der Gifte

---

1) D. h. Hervorstrecken des Würzelchens und Entfaltung der Keimblätter.

bei Zimmer-[1]) als auch höherer Temperatur auf. Sie erschienen ebenso, wenn auch nur in geringem Maße, bei den Versuchen mit höheren Trockentemperaturen und Paraffinöl bei 100° C. Am auffälligsten waren sie nach Einwirkung der Agentien bei höheren Temperaturen.

Durch die Keimverzögerung wurde der Aufenthalt der Untersuchungsobjekte in den Keimschalen bedeutend verlängert. Die Samen und Früchte fielen dann leicht Pilzinfektionen zum Opfer. Diese zeigten sich besonders oft und leicht an Pisum, Ervum und ungeschälten Früchten von Helianthus, während geschälte Helianthusfrüchte besonders durch ein Bakterium von blaugrüner Farbe zu leiden hatten. Sinapis und Trifolium zeigten nur äußerst selten derartige Infektionen. Zur Vermeidung solcher Schädigungen durch Pilze und Bakterien wurden die Objekte, welche nach längerer Versuchsdauer leicht Infektionen anheimfielen in Erde zur Keimung gebracht, obwohl diese Methode einem Auskeimen auf Fließpapier in Keimschalen an Übersichtlichkeit nachstand.

Beim Eindunsten der Chemikalien, in denen sich die Objekte bei Zimmer- und höherer Temperatur befunden hatten, blieb besonders im letztgenannten Falle ein schwach gelblicher Rückstand fettartiger Natur in den Glasgefäßen zurück. Dieser Rückstand war zum Teil in Äther löslich. Wurde der Äther, der solchen Rückstand gelöst enthielt, auf einem sauberen, trockenen Uhrschälchen verdunstet, so hinterließ er eine deutlich sichtbare Fettschicht. Der Rückstand nahm mit dem längeren Aufenthalte in den Agentien zu und war besonders bei den stark ölhaltigen Samen auffällig.

Um derartige Stoffe herauslösen zu können, müssen die Agentien in die Objekte eindringen. Sie müssen zu diesem Zwecke die Membranen und Schalen der Untersuchungsobjekte passieren. Die Aufgabe der folgenden Versuche ist es nun, das Eindringen der Medien und das damit verbundene Herauslösen von Stoffen näher zu untersuchen und zu entscheiden, worauf eigentlich die Resistenz verschiedener Samen und Früchte gegenüber den angewandten Agentien beruht. Die Fragen, die hierfür in Betracht kommen, sind bereits in der Einleitung angeführt. Es handelt sich darum, zu untersuchen, ob die Objekte, in welche die Gifte eingedrungen sind, noch Leben zeigen, ob also der Protoplast befähigt ist, die Einwirkung der Medien eine gewisse Zeit ungeschädigt zu vertragen, oder ob die Resistenz des Untersuchungs-

---

1) Vgl. Kurzwelly, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 291—341.

materials darauf beruht, daß Schalen oder Membranen die Agentien nicht eindringen lassen. Ferner soll im folgenden entschieden werden, ob der Tod der Objekte speziell durch das Eindringen der Giftstoffe bewirkt wird oder eine Folge des Herauslösens von Stoffen ist.

Die ersten Versuche wurden mit geschälten Samen von Pisum sativum und Trifolium incarnatum ausgeführt. Pisum wurde der Einwirkung von Chloroform, Trifolium von Äthylalkohol ausgesetzt. Während die ungeschälten Objekte den Medien sehr lange Widerstand leisteten, zeigten die geschälten Samen bereits nach 24stündigem Aufenthalt in den Agentien (bei Zimmertemperatur) keine Keimung mehr. Trifolium war außerdem nebenbei 1 Stunde mit siedendem Alkohol behandelt worden und hatte auch dadurch den Tod gefunden. Die ungeschälten Samen von Pisum und Trifolium zeigten im Vergleich zum Kontrollmaterial nach 24stündigem Aufenthalt in den Medien absolut keine Schädigung und keimten zu 87 % resp. 94 % aus. Auch Samen von Trifolium, die ungeschält der Einwirkung von siedendem Alkohol ausgesetzt gewesen waren, keimten nach 1stündiger Einwirkungsdauer dieses Agens noch zu 77 %.

Aus diesen an Trifolium und Pisum angestellten Untersuchungen geht hervor, daß die Samenschale den beiden Objekten außerordentlich großen Schutz gegenüber chemischen Stoffen gewährt und wohl in der Hauptsache die Resistenz gegen diese giftigen Medien bedingt.

11. Versuchsreihe.

Helianthus annuus. (Fruchtschale entfernt.)

Keimfähigkeit des exsiccatortrockenen (36 Tage) Materials = 98 %.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Chloroform von 100° C	Äthylalkohol von 100° C	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trocken-temperatur von 100° C	Trocken-temperatur von 120° C	Siedender (137° C) Amylalkohol
1	72 %	71 %	64 %	63 %	76 %	90 %	95 %	69 %	0 %
3	66 %	58 %	53 %	50 %	69 %	87 %	84 %	0 %	0 %
8	50 %	40 %	33 %	31 %	64 %	85 %	80 %	0 %	0 %
15	38 %	29 %	19 %	17 %	50 %	80 %	78 %	0 %	0 %
30	25 %	16 %	9 %	5 %	30 %	70 %	65 %	0 %	0 %
48	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	45 %	42 %	0 %	0 %

1) Ähnliche Versuche führte bereits Kurzwelly an Pisum sativum und Triticum sativum mit Chloroform aus. Siehe Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 315.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, hat Kurzwelly für Helianthus annuus die Bedeutung der Fruchtschale konstatiert, indem er verschiedene Agentien auf geschälte und ungeschälte Früchte einwirken ließ. Als Parallele zu diesen Zimmertemperaturversuchen setzte ich geschälte Helianthusfrüchte denselben Einwirkungen bei höherer Temperatur aus, die auf ungeschälte Früchte von Helianthus angewandt worden waren (vgl. p. 87).

Ein Vergleich zwischen der 10. und 11. Versuchsreihe zeigt, daß der Fruchtschale bei höherer- ebenso wie Zimmertemperatur eine gewisse Bedeutung für die Resistenz gegen giftige Medien zukommt. Die geschälten Objekte sind den Giften gegenüber empfindlicher als die ungeschälten. Höheren Trockentemperaturen und Paraffinöl gegenüber verhielten sich geschälte und ungeschälte Früchte gleich.

Die Versuche Kurzwellys[1]) hatten ergeben, daß der Ölverlust von Helianthusfrüchten in Äther am stärksten war. Daher wurden von mir zunächst einige Untersuchungen mit diesem Medium ausgeführt. Die geschälten Früchte wurden teils in intaktem, teils in nichtintaktem Zustande der Einwirkung des Agens ausgesetzt. Zu jedem Versuche wurden 100 Stück verwendet. Diese Anzahl war hinsichtlich der Äthermenge, in welche die Früchte eingelegt wurden, äußerst gering. Es war ausgeschlossen, daß sich der Äther mit Öl sättigen und das Herauslösen einstellen konnte. Es ergab sich nun, daß diejenigen Objekte, deren Samenhäutchen (ein dünnes Häutchen, das den Samen der Helianthusfrüchte kontinuierlich umgibt) verletzt oder irgendwie unterbrochen waren, in Kürze dem Tode verfielen. Das Öl war in kurzer Zeit durch den eindringenden Äther herausgelöst und die Objekte abgetötet. Am schnellsten verschwand das Öl aus den Früchten, die eines Cotyledo beraubt in Äther eingebracht worden waren. Nach 4 bis 5 Tagen war sämtliches Öl aus den Früchten herausgelöst, die sich als abgestorben erwiesen. Etwas, aber auch nur wenige Tage, länger dauerte der erwähnte Vorgang bei mehrfach angestochenen Früchten und solchen, von denen das Samenhäutchen vorsichtig entfernt worden war.

Das andere Hundert Helianthusfrüchte, das sich aus lauter intakten Früchten zusammensetzte, blieb 5 Monate in Äther. Nach dieser Zeit wurde das Agens auf übliche Weise abdunsten lassen und das Material darnach näher untersucht. Dabei ergab sich, das von den 100 Objekten 81 ganz oder nahezu ölfrei waren, die übrigen 19 dagegen anscheinend noch ihren vollen Ölgehalt besaßen. Erwähnt sei,

---

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 315—318.

daß von den 81 ölfreien Früchten allerdings 8 noch ganz minimale Spuren von Öl zeigten, und von den 19 ölhaltigen Objekten zwei den Eindruck machten, als ob sie bereits etwas Öl verloren hätten. In erstgenanntem Falle war aber der Ölgehalt, in letztgenanntem der Ölverlust zu gering, als daß ihm Bedeutung zuzuschreiben sein dürfte.

Die ölhaltigen und ölfreien Früchte zeigten schon äußerlich die markantesten Unterschiede. Erstere sahen gelblichbraun aus und verhielten sich beim Schneiden wie eine weiche von Fett durchtränkte Masse. Nach dem Zerdrücken und Zerreiben im Mörser lieferten sie eine fettige Masse, die, in alkoholische Sudanlösung gebracht, unter dem Mikroskop zahllose rotgefärbte Öltropfen zeigte. Die ölfreien Objekte waren von weißer Farbe und sahen trocken aus. Beim Schneiden erwiesen sie sich als verhältnismäßig hart und hafteten nicht am Messer. In der Reibschale konnten sie zu einer weißen, pulverartigen Masse zerrieben werden, die nach Zusatz von Sudanlösung keine rotgefärbten Öltröpfchen zeigte.

Zu den eben angeführten Untersuchungen über den Ölgehalt wurden nicht die ganzen Früchte, sondern von jedem Objekt nur ein Stück, das von den Cotyledonen abgeschnitten wurde, verwendet. Bevor die abgeschnittenen Stücke in den Reibschalen zerrieben wurden, wurden zunächst noch einige dünne Schnitte mit dem Rasiermesser angefertigt und diese auf den Ölgehalt geprüft. Zu diesem Zwecke kamen die Schnitte in Uhrgläschen, die alkoholische Sudanlösung enthielten. Für jedes einzelne Objekt stand ein besonderes Schälchen zur Verfügung. Die Schälchen waren, um dem Verdunsten des Alkohols und dem damit verbundenen Ausfallen des Sudans vorzubeugen, zugedeckt. Nach ca. 1 stündigem Aufenthalt in der Sudanlösung wurden die Schnitte in einem Wassertropfen unter das Mikroskop gebracht. Hierbei zeigte sich dasselbe, was bereits an dem zerriebenen Material konstatiert worden war, 81 Früchte hatten ihr Öl verloren, 19 zeigten noch reichen Ölgehalt.

Einige von den ölfreien Objekten wurden dann noch an verschiedenen Stadien der Cotyledonen auf Öl untersucht, aber auch im Innersten derselben war keine Spur von Öl zu finden.

Nachdem die Untersuchungen auf Ölgehalt zu Ende geführt waren, wurden sämtliche Objekte in Keimschalen eingebracht. Das fehlende Stück Cotyledo bildete kein Keimungshindernis, da exsiccatortrockene Helianthusfrüchte, denen ebenfalls ein Stück Cotyledo abgeschnitten war, alle keimten. Die noch ölhaltigen Samen wurden von

den ölfreien dadurch unterschieden, das feine Glasnädelchen in die Objekte eingeführt wurden.

Bereits nach Verlauf von 1—2 Tagen zeigten die noch ölhaltigen Objekte Keimung, die ölfreien aber kamen auch nach langer Zeit nicht dazu, sondern fielen bald Bakterien zum Opfer.

Aus all diesen Untersuchungen geht ohne weiteres hervor, daß die Membran, welche die Samen von Helianthus umgibt, in intaktem Zustande für die angewandten Chemikalien nur langsam oder erst nach längerer Zeit durchlässig wird. Der Schutz, den die Fruchtschale den Objekten gewährt, ist bei einem Vergleich der 10. und 11. Versuchsreihe verhältnismäßig immerhin nur gering. Der Löwenanteil an der Erhaltung der Resistenz der Helianthusfrüchte scheint vielmehr der dünnen Samenschale zuzukommen. Wird diese Schutzhülle entfernt oder durchstochen, wird sie also an irgend einer Stelle unterbrochen, so dringen die Agentien bald ein, lösen das Öl heraus und töten das Untersuchungsmaterial ab. Sobald die Agentien im Innern der Objekte reichlich angelangt sind, ist auch der Tod der letzteren eingetreten.

Die Widerstandskraft, welche die Membran den Medien entgegensetzt, muß bei den einzelnen Individuen verschieden sein, denn nur so ist es erklärlich, daß der eine Same dem Tode eher anheimfällt als der andere. Bei genügend langer Einwirkung dürften bei Helianthus wohl in allen Fällen die Agentien durch die Membran dringen und die Objekte abtöten. Das dünne Samenhäutchen stellt demnach für die angewandten giftigen Medien keine völlig impermeable, sondern nur eine schwer permeable Membran dar. Es gibt aber auch solche Samen, deren Schalen in intaktem Zustande den Agentien den Eintritt niemals oder erst nach außerordentlich langer Zeit gestatten. Als Beispiel hierfür seien Trifolium incarnatum, Sinapis alba und vor allem Lepidium sativum angeführt. Diese Samen widerstehen in intaktem Zustande den Giften jahrelang, gehen aber, wenn sie geschält oder angestochen den Medien ausgesetzt werden, in kürzester Zeit zugrunde.

Eine weitere Bestätigung dafür, daß die Agentien nicht in alle Objekte einer Probe gleichzeitig eindringen, und diejenigen Individuen, in die sie genügend eindrangen, abgetötet sind, geben die folgenden Versuche. Diese wurden mit geschälten Früchten von Helianthus und ungeschälten Samen von Sinapis alba ausgeführt.

Von jedem der Untersuchungsobjekte wurden 6 Proben à 25 Stück untersucht. Sie wurden allesamt 8 Stunden lang der Einwirkung von siedendem Alkohol ausgesetzt. Je 3 Proben wurden nach dieser Behandlung wie gewöhnlich einige Tage bei 33° C zur Abdunstung des

Mediums aufbewahrt. Darnach wurden sie in günstige Bedingungen versetzt und zur Keimung gebracht. Es keimten im Mittel von Helianthus 43 %, von Sinapis 61 % aus.

Die übrigen Proben wurden anders behandelt. Sie wurden nur kurze Zeit abdunsten lassen, so daß wohl der außen anhaftende Alkohol, nicht aber der im Innern der Objekte befindliche verdunsten konnte. Darnach wurden diese Samen, jedes einzelne Individuum für sich, angequellt und zur Keimung gebracht. Es zeigte sich auch hier im großen ganzen derselbe Keimprozentsatz, wie bei den Objekten, die längere Zeit bei 33° C gelegen hatten, ehe sie ausgekeimt wurden.

Würde der Alkohol gleichzeitig in alle Samen und Früchte eindringen und dieselben gleichmäßig erfüllen, dann hätten hier sämtliche Objekte beim Anquellen und im Keimbett sterben müssen, da durch den Hinzutritt von Wasser zu dem Alkohol wässerige Lösungen dieses Mediums entstehen, die nach den Untersuchungen Kurzwellys[1]) in kurzer Zeit tödlich wirken.

Die Keimprozente beliefen sich bei diesen Versuchen bei Helianthus auf 35 %, bei Sinapis auf 53 %. Sie waren also etwas niedriger als die obigen Prozentsätze. Dies läßt sich vielleicht so erklären, daß hier bei einigen Objekten der Alkohol in geringem Grade eingedrungen war, aber noch nicht getötet hatte. Beim Anquellen wirkte dieser Alkohol durch den Wasserzutritt tödlich. Bei den ersten Versuchen waren derartige Samen und Früchte durch das längere Abdunsten bei 33° C gerettet worden, und es hatten sich somit höhere Keimungsprozentsätze ergeben.

Die nächsten Versuche dienten dazu, das Eindringen der Medien in die Objekte zu beobachten und zu entscheiden, ob das Herauslösen von Stoffen aus den Zellen irgend welchen Einfluß auf die Abnahme der Resistenz des betreffenden Organismus hat. Nach den früheren Versuchen war es sehr wahrscheinlich, daß das Herauslösen des Öls aus den Helianthusfrüchten den Tod derselben bedingt hatte, da die Früchte sämtlich abgetötet waren, nachdem sie ihr Öl verloren hatten.

Zum Nachweis des Eindringens der Medien in die Objekte wurde Alkohol benutzt, der mit exsiccatortrockenem Sudan versetzt wurde, so daß eine ca. 3 %ige Lösung entstand. Beim Eindringen des Alkohols wurde das Öl der Samen rot gefärbt und zeigte so den Weg, den das Medium eingeschlagen hatte.

---

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 309—311.

Das Eindringen des Agens und damit zugleich das Herauslösen des Öls geht von der Peripherie aus und schreitet nach innen vorwärts. Die Rotfärbung ließ sich schon makroskopisch sehr gut an den Objekten und an Schnitten durch dieselben erkennen. Die verwandte Menge von Sudanlösung war bei diesem Versuch im Verhältnis zur Anzahl der darin liegenden Helianthusfrüchte sehr klein. Die Lösung sättigte sich daher bald mit Öl, und dasselbe wurde nicht mehr herausgelöst, sondern verblieb im Zellinnern, wo es durch das eindringende Sudan gefärbt wurde. Trotzdem nun diese Samen ihr Öl zum größten Teil noch enthielten, keimten sie, nachdem das Medium abgedunstet war, doch nicht mehr aus.

Demnach scheint das Öl und damit die Reservestoffe für eine Widerstandsfähigkeit der Objekte gegen Gift nicht allein in Frage zu kommen. Es scheint vielmehr so zu sein, daß der Zellprotoplast durch das eindringende Medium abgetötet wird und das Herauslösen des Öls nur eine Erscheinung ist, die mit dem Eindringen des Agens Hand in Hand geht.

Die eben besprochenen Tatsachen wurden an geschälten Helianthusfrüchten beobachtet, die ca. 5 Monate der Einwirkung von alkoholischer Sudanlösung ausgesetzt gewesen waren. Sie waren fast alle durchgängig rot gefärbt und tot. Neben diesen Objekten, die in der Überzahl waren, befanden sich einige, in die das Medium trotz des fünfmonatigen Aufenthaltes darin noch nicht eingedrungen war, oder die nur in den äußersten Zellschichten eine schwache Färbung aufwiesen. Diese konnten alle zur Keimung gebracht werden, da das Medium in diesen Fällen noch nicht bis zum embryonalen Gewebe vorgedrungen war und dieses folglich noch nicht getötet hatte.

Samen mit absichtlich verletzter Membran und solche, die nur einen Cotyledo besaßen, wurden in der erwähnten Sudanlösung in kurzer Zeit durchgängig gefärbt und erwiesen sich als tot. Ab und zu kam es auch vor, daß Objekte, die für intakt gehalten worden waren, nach kurzer Zeit an ihrer Oberfläche Färbungen in Gestalt von feinen roten Pünktchen und Strichen zeigten. Bei näherem Zusehen stellten sich an diesen Stellen feine Verletzungen der Samenschale heraus, wodurch dem Medium der Eintritt in die Objekte erleichtert wurde. Derartige Verletzungen konnten sehr leicht beim Abschälen der Fruchtschale entstanden sein. Solche Samen wiesen dann auch binnen kurzem im Inneren Rotfärbungen auf und waren bald dem Tode verfallen.

Ausschlaggebend für die Ansicht, daß der Tod durch das eindringende Gift, nicht aber durch das Herauslösen von Reservestoffen hervorgerufen wird, waren vor allem die folgenden Versuche. Diese kamen mit öl- resp. fetthaltigen und fettarmen Samen zur Ausführung. Es wurden hierzu geschälte, exsiccatortrockene Samen resp. Früchte von Helianthus annuus, Trifolium incarnatum und Pisum sativum benutzt. Die Objekte wurden einerseits reinem, absolutem Alkohol, andererseits Alkohol, der mit den in ihm löslichen Reservestoffen des jeweiligen Untersuchungsmaterials gesättigt war, ausgesetzt. Für Helianthus wurden dieselben Versuche außerdem mit Äther ausgeführt.

Um den Medien, die in die Helianthusfrüchte ziemlich langsam eindringen, das Eindringen zu erleichtern, wurde den Früchten ein Stück von den Cotyledonen abgeschnitten. Bei Pisum und Trifolium war eine derartige Operation nicht nötig, da die Medien nach früher angestellten Untersuchungen sehr leicht in diese geschälten Objekte eindringen (vgl. pag. 90).

Die Anwendung der reinen, wie der reservestoffgesättigten Medien erfolgte auf zweierlei Weise. Für die einen Versuche wurden die Objekte einer im Vergleich zu ihrer Zahl sehr großen Flüssigkeitsmenge ausgesetzt, für die anderen gerade nur mit Flüssigkeit überdeckt.

Die Versuche wurden in Glasstopfenflaschen vorgenommen. Diese Flaschen fanden sämtlich bei gleicher, konstanter Temperatur in Exsiccatoren Aufnahme. Für die Versuche mit Pisum wurde dem reservestoffgesättigtem Alkohol ca. 2 % Lecithin zugesetzt.

Lecithin ist in ziemlicher Menge in Alkohol löslich. Pisum enthält in der Regel bis ca. 1,25 % Lecithin. Durch den Lecithinzusatz zu dem Alkohol sollte ein Herauslösen des Lecithins vermieden werden, da beim Eindringen des Alkohols nunmehr außen und innen ungefähr gleiche Lösungen von Lecithin entstanden.

Das Lecithin wurde vor der Lösung in Alkohol zu dünnen Platten auf Glastäfelchen ausgestrichen und im Exsiccator getrocknet. Zur Lösung wurden dann direkt diese Lecithinplättchen in den Alkohol gebracht.

Das Ausziehen der Reservestoffe aus den Samen mußte bei derselben Temperatur vorgenommen werden, bei der später die Aufstellung der Versuchsflaschen erfolgen sollte, da ja die Medien bei verschiedener Temperatur verschieden große Mengen lösen. Es wurde zu diesem Zwecke ein Ort mit konstanter Temperatur ausgewählt, wie ihn das im Institut vorhandene Wärmezimmer darbot.

12. Versuchsreihe.

Hängt die Abnahme der Resistenz und der eintretende Tod von Samen und Früchten in Giftstoffen mit dem Herauslösen von Reservestoffen durch letztere zusammen?

Untersuchungsobjekt	Versuchsanstellung	Aufenthaltsdauer im Medium			Aussehen der Objekte nach dem Tode
		1 Tag	3 Tage	5 Tage	
Helianthus annuus: (Keimfähigkeit der Kontrollobjekte = 100 %)	Früchte in ca. 30 ccm Alkohol resp. Äther	46 resp. 40 %	9 resp. 6 %	0 %	weiß, alles Öl ausgelöst
	Früchte gerade bedeckt von Alkohol resp. Äther	42 resp. 39 %	8 resp. 11 %	0 %	gelblich-weiß, nicht alles Öl ausgelöst
	Früchte in ca. 300 ccm ölgesättigtem Alkohol resp. Äther	45 resp. 44 %	6 resp. 5 %	0 %	gelblichbraun, vollständiger Ölgehalt
	Früchte gerade bedeckt von ölgesättigtem Alkohol resp. Äther	38 resp. 41 %	7 resp. 4 %	0 %	do.
	Früchte gerade bedeckt von übersättigtem (Öl zum Teil ausgefallen) Alkohol resp. Äther	43 resp. 42 %	9 resp. 8 %	0 %	do.
Pisum sativum: (Keimfähigkeit der Kontrollobjekte = 79 %)	Samen gerade bedeckt von Alkohol	0 %	0 %	0 %	kein Unterschied gegen frische Samen
	Samen gerade von reservestoffgesättigtem Alkohol bedeckt	0 %	0 %	0 %	do.
	Samen von reservestoffgesättigtem Alkohol + 2 % Lecithin gerade bedeckt	0 %	0 %	0 %	do.
Trifolium incarnatum: (Keimfähigkeit der Kontrollobjekte = 51 %)	Samen gerade von Alkohol bedeckt	0 %	0 %	0 %	do.
	Samen gerade von reservestoffgesättigtem Alkohol bedeckt	0 %	0 %	0 %	do.

Um die Medien mit löslichen Reservestoffen zu sättigen, wurde folgender Weg eingeschlagen. Die Früchte resp. Samen wurden fein gemahlen, und das Mehl im Exsiccator getrocknet. Bei Trifolium geschah das Trocknen des Mehles durch längeren Aufenthalt bei 100° C. Waren die gemahlenen Objekte trocken, so wurden sie in die Medien gebracht und längere Zeit darin gelassen. Es bedurfte einer ziemlich großen Menge Mehl, um nur eine geringe Flüssigkeitsmenge mit Reservestoffen zu sättigen. Die Agentien wurden dann mit trockener Pipette vor-

sichtig über dem Mehl abgehoben und in trockene Flaschen gebracht. Hier wurde soviel von den Medien abdunsten lassen bis eben eine Trübung eintreten wollte, die Agentien also gesättigt waren.

Nun wurden die Flaschen mit gutschließenden Glasstopfen, die zum Überflüsse noch mit einer Spur Vaseline eingefettet waren, verschlossen. Auf diese Weise wurde jeder weiteren Verdunstung der Medien vorgebeugt.

Die Ausführung der Versuche zerfällt in mehrere Abteilungen, in denen je 25 Objekte untersucht wurden. Jeder einzelne Versuch wurde dreimal ausgeführt und das Mittel daraus gezogen. Die Versuchsanstellung ist leicht aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich.

Nach all den angestellten Untersuchungen ist es kaum anzuzweifeln, daß die Resistenz der untersuchten Samen gegenüber Giften auf der Schwerdurchlässigkeit der Samenhüllen beruht, da der Tod in Kürze eintritt, wenn die Medien ungehindert in das Innere der Objekte eindringen können. Der Tod ist aber nach den zuletzt angestellten Versuchen nicht die Folge des Herauslösens von Reservestoffen. Er tritt auch ein, wenn dies Herauslösen unmöglich gemacht ist, und wird somit im wesentlichen durch die Wirkung des eingedrungenen Giftes hervorgerufen.

B. Versuche mit Schimmelpilzen, Hefe und Bakterien.

Die Versuche mit Mikroorganismen wurden von denselben Gesichtspunkten aus unternommen, wie die mit Samen und Früchten angestellten Untersuchungen. Doch erforderte hier die Gefahr einer Infektion größte Sorgfalt und Aufmerksamkeit, um falschen Resultaten vorzubeugen. Es mußte daher vor allem bei sämtlichen Versuchen peinlichst steril gearbeitet werden.

An Pilzen standen Phycomyces nitens, Aspergillus niger und Botrytis cinerea in Reinkulturen zur Verfügung. Penicillium glaucum wurde von neuem isoliert.

Da für die Versuche größere Mengen von Pilzsporen nötig waren, wurden die Pilze auf Brot gezüchtet, das mit schwach saurer, ca. 5 %iger Zuckerlösung getränkt und fraktioniert sterilisiert worden war. Von diesen Kulturen wurde das Material, sobald volles Wachstum und reichliche Sporenbildung eingetreten war, abgeerntet.

Die Sporen von Penicillium und Aspergillus wurden auf sterile Fließpapierstreifchen, die mit steriler Pinzette über die Kulturen hingezogen wurden, aufgeschmiert. Bei Phycomyces dagegen wurde der Pilzrasen einfach mit steriler Schere abgeschnitten und in kleinen

Portionen in sterile Fließpapierkapseln eingepackt. Beim Abernten von Botrytis wurde ähnlich verfahren. Die so mit Untersuchungsmaterial beschickten Kapseln und Streifchen wurden in sterilen Schalen im Exsiccator getrocknet.

Sobald die Objekte exsiccatortrocken waren, wurden sie nach vorheriger Prüfung auf ihre Keimfähigkeit zu den einzelnen Versuchen verwandt.

Für die Untersuchungen bei Zimmertemperatur wurde das Material einfach in die Medien eingelegt. Nach Beendigung des jeweiligen Versuches fanden die Objekte in einem sterilen, beiderseits mit Wattepfropfen verschlossenem Glasrohr Aufnahme. In diesem wurden sie so lange unter Lichtabschluß bei ca. 33° C aufbewahrt bis die Agentien völlig verdunstet waren. Hierauf erfolgte dann das Übertragen dieser mit Giftstoffen behandelten Pilzporen in sterile Nährlösung. Letztere fand zur Auskeimung der Sporen bei ca. 25° C im Dunkeln Aufstellung.

Wurde die Einwirkung der Gifte bei höheren Temperaturen untersucht, so kamen die Agentien samt Untersuchungsobjekten in sterile Erlenmeyer, die auf die übliche Weise an Steigrohren befestigt und im Wasserbade erhitzt wurden. Nach Abschluß eines jeden Versuches wurde die Übergangsstelle von Erlenmeyer und Steigrohr mit einer Flamme abgeglüht, der Erlenmeyer abgenommen, das betreffende Agens vorsichtig und schnell abgegossen, und der Erlenmeyer mit bereitgehaltenem sterilen Wattepfropf verschlossen. Die mit Pilzsporen behafteten Fließpapierstreifen oder Kapseln, die in den Erlenmeyern zurückblieben, wurden in diesen Gefäßen auf die übliche Weise bei 33° C zum Abdunsten der Medien aufgestellt und darauf direkt mit steriler Nährlösung beschickt.

Bei Versuchen mit Alkohol und Chloroform bei 100° C wurden die zugeschmolzenen Röhren nach Beendigung der Untersuchungen geöffnet, die Objekte aus den Agentien herausgenommen und in sterilen Glasröhren getrocknet. Dann wurden sie in Nährlösung übergeführt.

Die Nährlösung bestand für die Pilzkulturen aus $^1/_2$ % Fleischextrakt + 3 % Zucker und reagierte schwach sauer.

Das Überimpfen von den Reinkulturen auf die Brotkulturen, das Abernten von letzteren, das Übertragen in die Agentien, das Entnehmen aus diesen, das Einbringen in Nährlösung usw. erfolgte in einem sterilen Dampfkasten, wie er von Kurzwelly[1]) beschrieben wurde.

---

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 305.

Da es sich bei diesen Versuchen mit Pilzsporen nur darum handelte, die Grenze der Resistenz festzustellen, so wurde von quantitativen Unterschieden abgesehen, und es genügte die makroskopische Beobachtungsmethode. Ab und zu wurden auch einige mikroskopische Beobachtungen im hängenden Tropfen vorgenommen.

Jeder einzelne Versuch wurde zur Vermeidung von Irrtümern mindestens dreimal ausgeführt. Nebenbei lieferten die Beobachtungen im hängenden Tropfen eine Kontrolle für die Richtigkeit der Resultate.

Es war von Vorteil den Medien bei längerer Einwirkung nicht nur einen Fließpapierstreifen auszusetzen, sondern immer eine größere Anzahl zu jedem Versuch heranzuziehen. Es zeigte sich, daß bei längerer Einwirkungsdauer der Agentien immer nur wenige Sporen lebensfähig blieben. Oft waren dann auf einem Fließpapierstreifen sämtliche Sporen tot, während ein anderer noch vereinzelte keimfähige Individuen beherbergte. Es konnte daher, wenn nur ein Fließpapierstreifen mit Sporen verwandt wurde, leicht geschehen, daß die Pilze für tot erklärt wurden, während eigentlich noch ein kleiner Prozentsatz ihrer Sporen am Leben war, der sich durch größere Resistenz auszeichnete, sich zufällig aber an einem anderen Papierstreifen befand. Durch Verwendung vieler Streifen wurde die Möglichkeit derartig resistente Sporen mitzubekommen außerordentlich erhöht.

Während aller Versuche überzeugte ich mich durch Kontrollkulturen, daß die nicht mit Giftstoffen behandelten, exsiccatortrockenen Schimmelpilze unter denselben Bedingungen ein gutes Wachstum zeigten.

Die Versuche mit Bakterien und Hefen beschränkten sich im Gegensatz zu den Untersuchungen an Pilzen, die den verschiedensten Agentien ausgesetzt wurden, einzig und allein auf die Einwirkung von Äthylalkohol, der bei Zimmer- und Siedetemperatur zur Anwendung kam.

Micrococcus prodigiosus und Saccharomyces cerevisiae, eine untergärige Reinzuchthefe, wurden von Reinkulturen abgeimpft. Bacillus mesentericus wurde auf andere Weise erlangt.

Zur Erlangung reichlichen Untersuchungsmaterials wurde Micrococcus prodigiosus und die Hefe sowohl in Nährlösung als in Petrischalen auf Agar-Agar oder Gelatine gezogen. Die Nährlösung bestand für Micrococcus prodigiosus aus $^1/_2$ % Fleischextrakt + 2 % Pepton und war neutralisiert. Für die Petrischalenkulturen war dieser Nährlösung $1^3/_4$ % Agar-Agar zugesetzt. Als Nährlösung für Hefe diente ein Wasserauszug aus gemahlenem Malz. Durch Zusatz von 10 % Gelatine wurde daraus ein Nährboden für Kulturen in Petrischalen hergestellt.

Sobald die Kulturen ungefähr das Maximum ihres Wachstums erreicht hatten, wurden sie im sterilen Dampfkasten abgeerntet. Die Petrischalenkulturen wurden zu diesem Zwecke wie Aspergillus und Penicillium auf Fließpapierstreifen aufgeschmiert. Beim Abernten aus Nährlösungen wurden sterile Fließpapierstreifen in die Kulturen eingetaucht. Dann wurde je ein Streifen in einen kleinen, sterilen Erlenmeyer gebracht und in diesem tüchtig durchgeschüttelt, so daß die Bakterien oder Hefen in möglichst feiner Verteilung an die Wände des Gefäßes angeschmiert wurden und auch an den Papierstreifen keine dicken Schichten bilden konnten.

Durch dieses Verfahren sollte es vermieden werden, daß dicke Schichten von Bakterien oder Hefen in eingetrocknetem Zustande den Alkohol nur schwer oder gar nicht in sich eindringen ließen, und so im Innern dieser Lagen befindliche Organismen überhaupt nicht mit dem Medium in Berührung kamen und daher am Leben blieben. Es konnte sonst leicht in diesem Falle von Alkoholresistenz gesprochen werden, während die Objekte gar nicht mit dem Medium zusammengekommen waren.

Die Ernte aus den Petrischalenkulturen wurde in sterilen Gefäßen im Exsiccator getrocknet, dasselbe geschah mit den Erlenmeyern, die den Ertrag der Nährlösungskulturen in sich bargen.

Nach eingetretener Trockenheit wurden die Streifen aus den Petrischalen und Erlenmeyern entnommen und, nachdem sie auf ihre Lebenskraft geprüft worden waren, in sterile, mit Alkohol beschickte Gefäße gebracht. In diesen wurden sie wie die Pilzsporen, teils bei Zimmertemperatur im Exsiccator aufbewahrt, teils zum Sieden gebracht. Die Erlenmeyer, deren Wandungen durch das Umschütteln der Streifchen mit Bakterien oder Hefen beschmiert waren, wurden mit Alkohol gefüllt und ebenso wie die Fließpapierstreifen behandelt.

Die Untersuchungsgefäße waren sämtlich mit Wattepfropfen verschlossen. Nach Abschluß eines jeden Versuches wurden sie vorsichtig geöffnet und der Alkohol abgegossen. Dann wurden sie schnell wieder mit sterilem Wattebausch verschlossen und fanden zum Abdunsten der Medien bei ca. 33° C Aufstellung. Hierauf wurden sie mit Nährlösung beschickt und zum Auskeimen bei ca. 25° C im Dunkeln aufgestellt. Aus diesen Kulturen wurde dann sowohl Saccharomyces als auch Micrococcus prodigiosus noch auf Gelatine- resp. Agarröhrchen übergeimpft. Erst dann wurde der Versuch als gültig angesehen, wenn sowohl in der Nährlösung als in den Röhrchen Wachstum eingetreten war oder ausblieb. Bei Versuchen mit Micrococcus prodigiosus war das Über-

impfen auf Agarröhrchen direkt nötig, da die charakteristische rote Farbe desselben nur hier auftrat, in Bouillonkulturen aber verdeckt wurde. Die Bildung des roten Farbstoffes wurde in diesen Fällen als entscheidend für die Anwesenheit des Micrococcus prodigiosus angesehen.

Zur Erlangung des Bacillus mesentericus und zur Gewinnung reichlichen Sporenmaterials für die Untersuchungen wurde folgender Weg eingeschlagen:

Rohe, ungeschälte Kartoffeln wurden in kleine Stücke geschnitten und in einer Kochflasche ca. $^1/_2$ Stunde lang mit Wasser gekocht. Dann wurde die Flüssigkeit abfiltriert und in einer mit Wattebausch verschlossenen Flasche nachmals ca. 10 Minuten gekocht. Hierauf wurde diese Flasche im Wärmezimmer bei ca. 30° C aufgestellt.

Bereits am nächsten Tage zeigte sich in der Flüssigkeit Bakterienwachstum, und am zweiten Tage war eine deutliche Kahmhaut ausgebildet. Hiervon auf sterile Kartoffelscheiben abgeimpfte Kulturen zeigten in faltigen, wulstigen Erhebungen das charakteristische Bild des Bacillus mesentericus. In der Flüssigkeit waren inzwischen auch Sporen zu Boden gesunken und hatten sich dort angesammelt. Nach weiteren 2 Tagen wurde die Flasche tüchtig durchgeschüttelt, um das Absetzen der Sporen zu beschleunigen. Dasselbe wurde nach weiteren 2 Tagen abermals wiederholt. Nachdem sich auf diese Weise reichlich Sporen abgesetzt hatten, wurde die darüberstehende Flüssigkeit im sterilen Dampfraum abgegossen und durch steriles Wasser ersetzt. Durch tüchtiges Schütteln in letzterem wurden die Sporen ausgewaschen und so gut als möglich von den schleimigen Sekreten, die sie bei ihrem Wachstum in Kartoffelnährlösung zu umgeben pflegen, befreit. Durch dies Auswaschen sollte es vermieden werden, daß die Schleime in eingetrocknetem Zustande die Sporen fest umschlossen, denn es war denkbar, daß dadurch dem Alkohol der Zutritt zu den Sporen versperrt und so die Resistenz derselben ermöglicht wurde.

Nachdem sich die Sporen nach dem Auswaschen zu Boden gesetzt hatten, wurde das schleimige Wasser abgegossen und dafür frisches, steriles Wasser zugesetzt. Durch Schütteln wurde dann eine Sporenaufschwemmung erzielt, und aus dieser das Material abgeerntet. Das Verfahren war dabei dasselbe, wie es bei der Ernte von Micrococcus prodigiosus und Hefe aus Nährlösungen angewandt worden war. Ebenso schloß sich die weitere Behandlung völlig an diese Objekte an.

Als Nährlösung, in die das Untersuchungsmaterial nach Schluß der Versuche gebracht wurde, diente beim Bacillus mesentericus eine filtrierte sterile Kartoffelabkochung. Ein vierwöchiger Aufenthalt bei

ca 30° C lieferte in den Erlenmeyern, auf welche die sterile Kartoffelauskochung verteilt war, kein Wachstum und garantierte für die Sterilität derselben. Zur Kontrolle wurden die Sporen außerdem in allen Fällen auf sterile Kartoffelscheiben geimpft, auf denen sich ja der Bacillus mesentericus durch ganz typisches Wachstum auszeichnet und daher sicher zu erkennen ist. Nährlösung und Kartoffelscheiben, die mit Sporen geimpft waren, wurden stets bei ca. 30° C aufgestellt.

Die Kultur, von welcher der Kartoffelbazillus abgeerntet wurde, war keine Reinkultur im eigentlichen Sinne, da keine Isolierung des Bacillus mesentericus stattgefunden hatte. Es war leicht möglich, daß neben dem Kartoffelbazillus spärlich noch andere Bakterien vorhanden waren. Verschiedene untersuchte Proben hatten allerdings nur die Anwesenheit des Bacillus mesentericus ergeben. Da sich dieser bekanntlich durch große Resistenz auszeichnet, so war nicht anzunehmen, daß er von einem der event. noch vorhandenen Bakterien an Widerstandskraft übertroffen und im Wachstum unterdrückt werden würde.

Die ersten Versuche wurden mit Pilzsporen und zwar bei Zimmertemperatur vorgenommen.

Sowohl Penicillium glaucum und Aspergillus niger, als auch Phycomyces nitens keimten nach dreimonatigem Aufenthalt in Amylalkohol, Äther, Äthylalkohol und einem Gemisch der letzten beiden Medien in Kürze aus.

Nebenbei wurden noch einige Versuche mit Botrytis cinerea angestellt und dieser verschieden lange Zeit dem Einfluß von Äthylalkohol ausgesetzt. Auch nach 300tägigem Aufenthalt in diesem Medium keimte der Pilz binnen kurzer Zeit aus und zeigte an den Fließpapierstreifen üppiges Wachstum.

Die folgenden Tabellen zeigen die Versuche, die mit den Pilzsporen bei höheren Temperaturen ausgeführt wurden.

Die mit siedendem Chloroform behandelten Aspergillussporen zeigten nach $^1/_4$- bis 3 stündiger Einwirkung dieses Mediums noch keine Schädigung, sondern keimten ziemlich schnell aus und gaben darin den Kontrollsporen nichts nach. Nach 4 stündiger Einwirkungsdauer machte sich schon eine merkliche Keimverzögerung geltend, die sich bei 6- und 8 stündiger Einwirkungszeit noch wesentlich steigerte. Bei der Anwendung von siedendem Äthylalkohohl war kaum irgendwelche Keimverzögerung nachzuweisen, sondern es trat plötzlich völlig unvermittelt nach 3 stündiger Einwirkung der Tod ein. Amylalkohol wirkte auch hier, wie bei Samen und Früchten, weniger schädlich als Äthylalkohol. Die Sporen zeigten nach 2 stündigem Aufenthalt in Amylalkohol von

13. Versuchsreihe.

Aspergillus niger.

Aufenthalt im Exsiccator = 12 Tage.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trockentemperatur von 100° C
1/4	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	—	+	+	+
4	+	—	—	+	+
6	+	—	—	+	+
8	+	—	—	+	+

14. Versuchsreihe.

Penicillium glaucum.

Aufenthalt im Exsiccator = 12 Tage.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Amylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trockentemperatur von 100° C
1/4	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
8	+	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—

100° C Keimverzögerung, erhielten sich aber noch während 3 stündiger Einwirkungsdauer dieses Mediums am Leben. Die Einwirkung von Paraffinöl und einer Trockentemperatur von 100° C wurde von den Sporen 8 Stunden vertragen, doch tat sich hier die Schädigung schon ziemlich zeitig durch Keimverzögerung und spärlicher werdendes Auskeimen kund. Letzteres konnte schon makroskopisch sehr gut beobachtet werden. Nach 1/4 stündiger Einwirkung des Paraffinöls und der Trockentemperatur zeigten die Objekte noch dieselbe Keimgeschwindigkeit wie das unbehandelte Kontrollmaterial. Nach 1 Stunde stellte sich bereits Keimverzögerung ein. Nach 2 Stunden verlangsamte sich das Auskeimen noch mehr und es machte sich auch ein spärlicheres Wachstum geltend. Während sich die Fließspapierstreifen

sonst sofort mit einer üppigen Pilzkultur überzogen, trat das Wachstum jetzt nicht gleichzeitig an allen Stellen, sondern nur an einzelnen Punkten des Fließpapierstreifens ein. Die Keimverzögerung und das spärliche Wachstum erhöhten sich mit der Länge der Einwirkungsdauer immer mehr. Nach 8 stündiger Einwirkungszeit war das Wachstum minimal und setzte erst nach vielen (6, 8, ja 10 Tagen) Tagen ein.

Ganz Ähnliches wie an Aspergillus niger ließ sich an Penicillium glaucum beobachten. Doch trat bei letzterem in allen Fällen, wo die Versuche länger als 1 Stunde ausgedehnt wurden, Keimverzögerung ein, wärend an Aspergillus bei Einwirkung von siedendem Äthylalkohol keine Keimverzögerung zu verzeichnen gewesen war.

15. Versuchsreihe.

Phycomyces niteus.

Aufenthalt im Exsiccator = 18 Tage.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Siedendes (61° C) Chloroform	Siedender (78° C) Äthylalkohol	Chloroform von 100° C	Äthylalkohol von 100° C	Paraffinöl von 100° C	Trocken-temperatur von 100° C	Siedender (137° C) Amylalkohol
1/4	+	+	+	+	+	+	—
1	+	+	+	+	+	+	—
3	+	+	+	+	+	+	—
6	+	+	+	+	+	+	—
10	+	+	+	+	+	+	—
18	+	+	+	+	+	+	—
30	+	+	—	—	+	+	—
48	—	—	—	—	—	—	—

Bei Phycomyces nitens, der sich vor Aspergillus und Penicillium durch erheblich größere Resistenz auszeichnete, setzte die Keimverzögerung nach ca. 10 stündiger Einwirkungsdauer der Medien und Trockentemperatur ein und stieg mit der Verlängerung der Versuche.

Die Versuche mit Micrococcus prodigiosus und Saccharomyces cerevisiae lieferten in der Hauptsache nur negative Resultate. Von jedem Versuch waren 3 bis 5 Kölbchen angesetzt worden, um möglichst genaue Resultate zu erzielen.

Die in Nährlösung gezogenen Individuen von Micrococcus prodigiosus und von Hefe wurden schon durch einen 1/4 stündigen Aufenthalt in Alkohol bei Zimmertemperatur und ebenso bei 78° C getötet.

16. Versuchsreihe.

Versuche mit Bakterien und Hefen.

Dauer der Einwirkung in Stunden	Objekt	Micrococcus prodigiosus (Aufenthalt im Exsiccator = 8 Tage)				Saccharomyces cerevisiae (Aufenthalt im Exsiccator = 18 Tage				Bacillus mesentericus (Aufenthalt im Exsiccator = 18 Tage	
	Nährboden	Nährlösung		Agar-Agar		Nährlösung		Gelatine		Nährlösung	
	Temperat. des Alkohols	Zimmertemperat.	78° C	Zimmertemperat.	78° C	Zimmertemperat.	78° C	Zimmertemperat.	7 °C	Zimmertemperat.	78° C
1/4		—	—	+	+	—	—	+	—	+	+
1		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
2		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
4		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
8		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
16		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
32		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
48		—	—	+	—	—	—	—	—	+	+

Die auf Agar-Agar gewachsenen Individuen von Micrococcus prodigiosus waren resistenter. Sie blieben in Alkohol bei Zimmertemperatur innerhalb der Versuchszeit (48 Stunden) am Leben, in siedendem Alkohol erhielten sie sich nur 1/4 Stunde, und zwar konnte nur in zwei von fünf Untersuchungsgefäßen Wachstum konstatiert werden.

Auch bei den Untersuchungen mit Hefe zeigten die auf festem Nährboden gezogenen Individuen größere Resistenz als die in Nährlösung gewachsenen. Sie lebten nach 1/4stündigem Aufenthalt in Alkohol bei Zimmertemperatur noch, starben jedoch bei längerer Einwirkungsdauer in allen Fällen ab. Siedenden Alkohol vertrugen sie überhaupt nicht.

Weit widerstandsfähiger als diese vegetativen Formen waren Bakteriensporen, denen ebenso wie Pilzsporen und Samen durch eine derbe Membran sicherlich weitgehendster Schutz gewährt wird. Die Sporen vom Bacillus mesentericus, der ja hinlänglich durch seine große Resistenz bekannt ist, zeigten sowohl nach Behandlung mit Alkohol bei Zimmertemperatur, als mit siedendem Alkohol innerhalb der Versuchszeit noch Leben. Sie keimten in kürzester Zeit aus und zeigten im Vergleich zu Kontrollsporen nicht die geringste Schädigung.

C. Versuche mit Moospflänzchen.

Die frischen Moospflänzchen[1]) wurden zunächst sauber ausgesucht und zur Entfernung von Erde und Sand in fließendem Wasser öfters abgespült. Darnach wurden sie auf Fließpapier ausgebreitet und an der Luft getrocknet, woran sich zur weiteren Austrocknung ein 14tägiger Aufenthalt im Exsiccator anschloß.

Von den exsiccatortrockenen Moosen wurden dann Proben in Wasser eingeweicht und mit 5—10 %iger Salpeterlösung auf Plasmolysierbarkeit geprüft. Trat Plasmolyse ein, und zeigten sich die Objekte demnach noch lebensfähig, so wurde das betreffende Material zu den verschiedenen Versuchen benutzt.

Die Versuche wurden in der Hauptsache bei Zimmertemperatur vorgenommen, nur wenige fanden bei etwas höherer Temperatur statt.

Für die Versuche selbst wurden die Moospflänzchen in mehrere Gruppen eingeteilt, die mit verschiedenen fettigen oder öligen Substanzen imprägniert wurden. Zu diesem Zwecke kam eine Probe in Paraffinöl, eine zweite in Mandelöl, eine dritte in Ölsäure, eine vierte in eine Mischung der beiden letzgenannten, eine fünfte in Kakaobutter und eine sechste in Vaseline. Um bei Verwendung der letzten beiden Stoffe, die bei Zimmertemperatur fest sind, eine Imprägnation zu ermöglichen, wurden diese im Thermostaten bei 40—45° C aufgestellt und dadurch in flüssigem Zustande erhalten. Die übrigen Medien fanden in einem Exsiccator Aufstellung.

Die Moospflänzchen blieben ca. 8 Tage in den Imprägnationsmitteln, darauf wurden sie wieder mittels Plasmolyse auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Hierbei mußten ganz besonders die mit Kakaobutter und Vaseline imprägnierten Pflänzchen nach dem Entnehmen aus diesen Medien schnell und gründlich mit Fließpapier abgetupft werden, um zu verhindern, daß sich die Objekte mit einer festen Hülle aus Kakaobutter und Vaseline umgaben, und ein Anquellen in Wasser dadurch bedeutend erschwert wurde.

Hatten sich die mit Ölen und Fetten behandelten Moose durch Plasmolysierbarkeit als ungeschädigt erwiesen, so wurden sie den Einwirkungen von wasserfreiem Benzin, Äther, Chloroform, Äthyl- und Amylalkohol ausgesetzt. Als Kontrolle wurden zu gleicher Zeit nicht imprägnierte, aber exsiccatortrockene Moospflänzchen auf ihre Resistenz gegen diese Gifte untersucht. Diese Kontrollversuche entsprachen alle

---

1) Für das Methodische bei diesen Versuchen vgl. Kurzwelly, Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 302—303.

den Untersuchungen, die seinerzeit schon von Kurzwelly[1]) angestellt wurden und bestätigen zugleich die von diesem erhaltenen Resultate (siehe Versuchsreihe 17—19). Es fehlen hierbei allerdings die Versuche mit Benzol und Schwefelkohlenstoff, doch sind dafür Untersuchungen mit Benzin und Amylalkohol ausgeführt worden. An Stelle von Bryum caespiticium trat hier Bryum argenteum. Die Einwirkung der Medien wurde ebenso wie bei Samen und Früchten, Pilzsporen usw. in kleinen Glasfläschchen, die in Exsiccatoren standen, vorgenommen.

Jeder einzelne Versuch umfaßte 4 Abteilungen. Die erste wurde nach 20-, die zweite nach 44-, die dritte nach 68- und die letzte nach 92 stündiger Einwirkung aus den Medien herausgenommen. Nachdem dann die anhaftenden Agentien durch mehrtägiges Liegenlassen an freier Luft völlig abgedunstet waren, wurden von jeder Abteilung 6 Pflänzchen auf die übliche Weise auf ihre Lebensfähigkeit geprüft.

Bei denjenigen Versuchen, bei denen Kakaobutter und Vaseline nicht von den Medien weggelöst wurden und daher die Objekte mit

17. Versuchsreihe.

Bryum argentum.

Giftiges Medium	Zuvor angewandtes Imprägnationsmittel	Einwirkungsdauer des Giftes in Stunden			
		20	44	68	92
Äther	Kakaobutter	+	—	—	—
	Ölsäure	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Benzin	Kakaobutter	+	—	—	—
	Ölsäure	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Chloroform	Vaseline	+	—	—	—
	Ölsäure	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Äthylalkohol	Kakaobutter	+	—	—	—
	Vaseline	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	—	—	—	—
Amylalkohol	Kakaobutter	+	—	—	—
	Vaseline	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	—	—	—	—

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 308.

einer dichten Schicht umgaben, war es nötig, dieses Material vor dem Anquellen etwas zu quetschen, um den kontinuierlichen Überzug zu zerstören und dem Wasser den Eintritt in die Zellen zu gewähren.

Die Untersuchungen, die mit Moospflänzchen ausgeführt wurden, dienten in gewisser Hinsicht als Ergänzung zu den Versuchen an Samen und Früchten, die sich mit dem Eindringen der Agentien und dem Herauslösen von Stoffen durch dieselben beschäftigt hatten.

Die Zellen der Moospflänzchen enthalten nun an und für sich fast gar keine in den Agentien löslichen Stoffe und sind nach den Untersuchungen Kurzwellys (vgl. auch Kontrollversuche in den Tabellen 17—19) gegen wasserfreien Alkohol, Äther, Chloroform usw. nur kurze Zeit oder gar nicht resistent.

Es entstand daher die Frage, ob derartige wenig widerstandsfähige Moospflänzchen durch Imprägnation mit teils in den Medien

18. Versuchsreihe.

Barbula muralis.

Giftiges Medium	Zuvor angewandtes Imprägnationsmittel	Einwirkungsdauer des Giftes in Stunden			
		20	44	68	92
Äther	Vaseline	+	—	—	—
	Mandelöl-Ölsäure	+	—	—	—
	Paraffinöl	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Benzin	Kakaobutter	+	—	—	—
	Vaseline	+	—	—	—
	Paraffinöl	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Chloroform	Kakaobutter	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Äthylalkohol	Kakaobutter	+	—	—	—
	Vaseline	+	—	—	—
	Mandelöl-Ölsäure	—	—	—	—
	Paraffinöl	—	—	—	—
	Kontrollobjekte	—	—	—	—
Amylalkohol	Vaseline	+	—	—	—
	Mandelöl-Ölsäure	—	—	—	—
	Kontrollobjekte	—	—	—	—

löslichen, teils darin unlöslichen Stoffen resistenter gemacht werden können.

Die Ergebnisse lassen sich leicht aus den Versuchsreihen 17 bis 19 entnehmen.

19. Versuchsreihe.

Ceratodon purpureus.

Giftiges Medium	Zuvor angewandtes Imprägnationsmittel	Einwirkungsdauer des Giftes in Stunden			
		20	44	68	92
Äther	Mandelöl	+	+	—	—
	Vaseline	+	+	—	—
	Kontrollobjekte	+	+	—	—
Benzin	Ölsäure-Mandelöl	+	+	—	—
	Kontrollobjekte	+	+	—	—
Chloroform	Mandelöl	+	—	—	—
	Kakaobutter	+	—	—	—
	Paraffinöl	+	—	—	—
	Ölsäure-Mandelöl	+	—	—	—
	Kontrollobjekte	+	—	—	—
Äthylalkohol	Mandelöl	—	—	—	—
	Vaseline	+	+	—	—
	Kakaobutter	+	—	—	—
	Paraffinöl	—	—	—	—
	Ölsäure	—	—	—	—
	Ölsäure-Mandelöl	—	—	—	—
	Kontrollobjekte	—	—	—	—
Amylalkohol	Ölsäure	—	—	—	—
	Kontrollobjekte	—	—	—	—

Die Moose zeigten sich in allen Fällen empfindlich. Die Versuche mit imprägnierten Pflänzchen ergaben in der Hauptsache keine anderen Resultate, als die Untersuchungen, die mit nichtimprägnierten Objekten (Kontrollversuche) angestellt wurden. Nur die mit Kakaobutter und Vaseline erfüllten Pflänzchen zeigten Äthyl- und Amylalkohol gegenüber ein anderes Verhalten als ihre Kontrollobjekte. Sie konnten 20 und in einem Fall sogar 44 Stunden in den Medien verbleiben ohne Schaden zu nehmen, während die Kontrollobjekte durchgängig nach 20 stündigem Aufenthalt darin abgetötet waren.

Kakaobutter und Vaseline sind in Äthyl- und Amylalkohol unlöslich oder wenigstens schwer löslich, und es schien daher nach diesen Versuchen möglich, die Resistenz der Objekte durch Imprägnation mit unlöslichen Stoffen zu erhöhen. Kakaobutter und Vaseline bildeten in den beiden Alkoholen einen deutlich wahrnehmbaren Überzug um die Moospflänzchen. In den übrigen Agentien konnte ein derartiger Überzug nicht zustande kommen, da die beiden Stoffe in diesen weggelöst wurden. Bei diesen Versuchen war die Resistenz nicht erhöht worden. Ebenso trat eine Resistenzerhöhung nicht ein, wenn die Moospflänzchen mit flüssigen Stoffen imprägniert worden waren.

Es war demnach anzunehmen, daß der Vaseline- resp. Kakaobutterüberzug die Erhöhung der Widerstandskraft gegen Äthyl- und Amylalkohol hervorrief, indem er den Medien den Eintritt in die Mooszellen erschwerte.

Zur Aufklärung dieser Frage wurden Moospflänzchen, die mit Kakaobutter oder Vaseline imprägniert waren, vor dem Einbringen in die Alkohole etwas gequetscht und gedrückt, um die Kontinuität des Überzuges zu zerstören und den Medien den Eingang in die Zellen zu erschließen oder zu erleichtern. Die so behandelten Objekte zeigten genau dieselben Ergebnisse, wie sie bei Versuchen mit nichtimprägnierten Pflänzchen zu verzeichnen waren, und erwiesen sich nach 20 stündigem Aufenthalt in Äthyl- oder Amylalkohol als tot. Dasselbe trat ein, wenn das Zustandekommen des Überzuges auf andere Weise verhindert wurde. Wurden nämlich die imprägnierten Pflänzchen im Thermostaten bei einer Temperatur, bei der die Imprägnationsmittel flüssig waren, den Einwirkungen der beiden Agentien ausgesetzt, so war nach 20 Stunden keines mehr am Leben.

Mit der Zeit nimmt die Vaseline, die die Moospflänzchen umgibt, ein weichliches, schmieriges Aussehen an. Sie ist von den Medien durchdrungen. Diese sind in die Mooszellen gelangt und haben dieselben abgetötet. Zu gleicher Zeit war der schwachgelbe Kakaobutterüberzug durch die Agentien entfärbt, haftete in Äthylalkohol als weiße Masse an den Pflänzchen und war in Amylalkohol zum Teil abgesprengt und zu Boden gesunken. Sobald diese Zustände eingetreten waren, erwiesen sich die Objekte als tot.

Die Untersuchungen zeigen, daß die Resistenz der Moospflänzchen gegen die beiden Alkohole nur auf der Schwerdurchlässigkeit der Vaseline- resp. Kakaobutterüberzüge beruht und diese gewissermaßen schwerdurchlässige Schalen und Membranen vertreten.

Die durch die Agentien getöteten Moose unterschieden sich, wie schon Kurzwelly[1]) konstatieren konnte, äuserlich in nichts von ungeschädigtem Material, aber sie zeigten, wenn sie nach Verdunsten der Medien in Wasser eingeweicht unter dem Mikroskop untersucht wurden, den eingetretenen Tod. Das Protoplasma der Zellen war stark zusammengezogen, und die Chlorophyllkörner waren zumeist geschrumpft.

Vielfach fanden sich an den Moospflänzchen neben lebenden Zellen tote. Diese Erscheinung läßt sich verschieden erklären. Entweder sind die Protoplasten verschiedener Zellen eines und desselben Pflänzchens verschieden resistent gegen die Agentien, oder letztere dringen in die einzelnen Zellen mit verschiedener Geschwindigkeit ein, so daß die einen bereits länger den Wirkungen der Medien ausgesetzt und daher abgetötet waren, die anderen aber noch gar nicht oder erst kurze Zeit von den Agentien erfüllt waren, und daher noch Leben zeigten.

Allgemeine Erörterung der Versuche.

Die Resistenz des verschiedenen Untersuchungsmaterials war, ebenso wie das Verhalten der einzelnen Objekte den einzelnen Medien gegenüber, bei Zimmer- und hoher Temperatur verschieden groß.

Von den untersuchten Samen und Früchten zeigten Pisum sativum und Ervum leus[2]) bei Einwirkung der Agentien bei höheren Temperaturen die geringste Widerstandskraft. Pisum war im allgemeinen nach 8stündiger Einwirkungsdauer je nach Medium und Temperatur entweder bereits dem Tode überliefert oder nahe daran. Ervum war nicht viel resistenter. Nach 15stündigem Sieden in Chloroform keimten noch 6 % aus, nach gleichlangem Aufenthalt in siedendem Alkohol war der Tod aller Objekte eingetreten. Die angewandten Trockentemperaturen wurden von Ervum etwas besser ertragen als die Gifte bei diesen Temperaturen. Die übrigen Untersuchungsobjekte, Setaria italica, Trifolium incarnatum, Sinapis alba und Helianthus annuus waren bedeutend widerstandsfähiger als Ervum und Pisum. Trifolium hielt allen Versuchen, bei denen eine Temperatur von 100° C nicht überschritten wurde, während 48 Stunden stand. Sinapis und Helianthus zeigten ähnliches Verhalten. Erstere waren jedoch nach 48stündiger Einwirkungsdauer von siedendem Alkohol und Chloroform resp. Alkohol von 100° C bereits abgetötet, letztere hatten nach derselben Zeit durch Chloroform,

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 308.

2) Für Ervum leus wurde schon von Kurzwelly die geringe Resistenz gegen die Agentien bei Zimmertemperatur konstatiert; s. Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 312, 313.

Äthyl- und Amylalkohol den Tod gefunden, wenn diese Medien bei 100° C angewandt worden waren. Setaria war ebenso resistent wie Trifolium, konnte sich aber in siedendem Äthylalkohol unter keinen Umständen erhalten.

Am widerstandsfähigsten von den drei untersuchten Pilzen erwies sich Phycomyces nitens. Durch siedendes Chloroform, siedenden Äthylalkohol und Paraffinöl von 100° C wurde dieser Schimmelpilz erst nach 48 Stunden abgetötet. In Chloroform, Äthyl- und Amylalkohol von 100° C war er bereits nach 30 Stunden tot. Weit weniger resistent als Phycomyces waren Penicillium glaucum und Aspergillus niger. Auffällig war bei letzterem die große Empfindlichkeit gegen siedenden Äthylalkohol[1]), durch den er bereits nach 3 Stunden abgetötet war. Siedendem Chloroform, Paraffinöl von 100° C und einer Trockentemperatur von 100° C gegenüber blieb er während 8 Stunden resistent. Amylalkohol von 100° C tötete ihn nach 6stündiger Einwirkungszeit. Penicillium verhielt sich ähnlich wie Aspergillus und zeigte sich zum Teil noch weniger widerstandsfähig als dieser. Siedender Äthylalkohol wurde von ihm allerdings besser vertragen als wie von Aspergillus. Er wurde durch dieses Medium und ebenso durch Paraffinöl, Amylalkohol und eine Trockentemperatur von 100° C nach 8stündiger Einwirkungsdauer abgetötet. In siedendem Chloroform erhielt er sich während dieser Zeit am Leben, erwies sich aber nach 16stündigem Aufenthalt darin als tot.

Von den untersuchten Bakterien und Hefen waren nur die Sporen von Bacillus mesentericus durch größere Widerstandskraft ausgezeichnet und blieben während 48stündigem Aufenthalt in Äthylalkohol bei Zimmertemperatur und bei 78° C am Leben. Micrococcus prodigiosus wurde durch siedenden Alkohol schon nach 1 Stunde getötet, während er demselben Medium bei Zimmertemperatur 48 Stunden lang ungeschädigt Widerstand leistete. Die Hefe starb in siedendem Äthylalkohol in kürzester Zeit ab und hielt diesem Agens auch bei Zimmertemperatur nur während 15 Minuten stand.

Von den Laubmoosen, die zu Versuchen mit den Agentien bei Zimmertemperatur verwandt worden waren, zeichnete sich Ceratodon purpureus gegenüber Barbula muralis und Bryum argenteum durch etwas größere Resistenz aus. Im allgemeinen hielten alle drei Objekte den Medien, wenn sie die Einwirkung derselben überhaupt vertrugen, während 20 Stunden ungeschädigt stand.

---

1) Vgl. Einleitung pag. 68.

Was nun die Wirkung der Medien anbetraf, so zeigte sich zunächst bei Anwendung eines Giftes mit steigender Temperatur ein Anwachsen der schädlichen Wirkung desselben. Zwischen dem Einfluß eines indifferenten Mittels bei hoher Temperatur und der Temperatur allein war kein Unterschied bemerkbar. Eine recht ansehnliche Differenz zeigte sich zwischen den Wirkungen von Amylalkohol, Äthylalkohol und Chloroform bei 100° C. Amylalkohol rief nach kürzerem bis 1 stündigem Einwirken noch keine Schädigung hervor. Es ergaben sich dieselben Resultate, die bei Anwendung von Paraffinöl oder einer Trockentemperatur von 100° C hervorgerufen wurden. Bei längerem Aufenthalte der Objekte in Amylalkohol von 100° C machte sich jedoch seine schädigende Wirkung bald geltend. Das Untersuchungsmaterial, das seinem Einfluß ausgesetzt war, blieb an Keimkraft bald hinter den Objekten zurück, auf die Paraffinöl und Trockentemperatur eingewirkt hatten. Dabei erreichte der Amylalkohol aber nie die schädliche Wirkung, die Chloroform und Äthylalkohol bei 100° C hervorriefen. Seine Wirkung kam derjenigen siedenden Äthylalkohols am nächsten. Chloroform und Äthylalkohol bewirkten bei gleicher Temperatur gleiche Schädigung der Untersuchungsobjekte. Sie wirkten so auf das Untersuchungsmaterial ein, daß zunächst im Verlauf einer Stunde ein größerer Prozentsatz der Objekte getötet wurde, woran sich dann bei länger werdender Einwirkungsdauer ein weiterer, langsamer, gleichmäßiger Rückgang der Keimkraft anschloß.

Ohne Zweifel beruht nach den angestellten Untersuchungen der kürzere oder längere Widerstand, den die Untersuchungsobjekte den Giften entgegensetzen, auf dem schnelleren oder langsameren Eindringen der giftigen Medien, und die große Giftresistenz mancher Organismen wird sich darauf zurückführen lassen, daß ihr lebender Zellinhalt gar nicht mit den Giftstoffen in Berührung kommt, da diese überhaupt nicht in den pflanzlichen Körper eindringen. Wenn der Protoplast wirklich die Fähigkeit besäße den giftigen Agentien widerstehen zu können, dann müßten z. B. geschälte Samen und Früchte ebenso resistent sein wie ungeschälte. Dies ist aber nach meinen Versuchen (vgl. p. 90 usw.) nicht der Fall. Daselbst hat sich gezeigt, daß man den Giftstoffen den Eintritt in die Untersuchungsobjekte durch Zerstörung der umgebenden Schalen und Membranen erleichtern kann, dadurch aber zugleich in Kürze den Tod der Organismen herbeiführt. Weiterhin deuten noch andere Erscheinungen darauf hin, daß die Resistenz der Objekte gegen die angewandten Agentien auf einem Nichteindringen derselben beruht. Bei Zimmertemperatur wirken die Medien fast gar

nicht oder doch wenigstens erst nach längerer Zeit schädigend ein, da sie nur langsam durch die Membranen und Schalen, aus denen sie zu diesem Zwecke sicher Stoffe herauslösen, hindurchdringen. Bei höherer Temperatur, bei der ja im allgemeinen die Löslichkeit größer ist, geht das Eindringen rascher vor sich. Wäre nun das Protoplasma in der Lage die Wirkung der Gifte ungeschädigt ertragen zu können, so dürften die Agentien bei höheren Temperaturen nicht viel schädigender wirken als diese Temperaturen allein. Da ich dies bei meinen Untersuchungen nicht konstatieren konnte, so mußte ich auch hieraus schließen, daß dem Protoplasten im Höchstfalle nur eine sehr geringe Giftresistenz zukommt.

Aus der größeren Löslichkeit der Stoffe bei höherer Temperatur läßt sich eventuell auch erklären, daß Senfsamen, die bei Zimmertemperatur resistenter als Kleesamen waren, bei höherer Temperatur an Widerstandskraft hinter diesen zurückblieben[1]). Es ist vielleicht möglich, daß die Samenschalen von Sinapis Stoffe enthalten, die bei höherer Temperatur rascher, bei Zimmertemperatur langsamer als die in den Schalen von Trifolium enthaltenen Stoffe weggelöst wurden, wodurch ein schnelleres oder langsameres Eindringen und damit ein früherer oder späterer Tod der Objekte hervorgerufen wurde.

Amylalkohol der außerdem vielfach giftiger als Äthylalkohol wirkt, da die Giftigkeit der Alkohole in der Regel mit steigendem Molekulargewicht zunimmt, wirkte bei meinen Versuchen weniger schädigend als Äthylalkohol. Es läßt sich dies Verhalten wahrscheinlich auf das langsamere Eindringen des Amylalkohols zurückführen, denn, wenn die beiden Medien gleichmäßig eindrängen und dem Protoplasten eine gewisse Resistenz gegen dieselben zukäme, dann müßte doch die Schädigung durch Amylalkohol größer sein als durch Äthylalkohol.

Ferner zeigen die Versuche mit Moospflänzchen, daß Nichteindringen Giftresistenz, Eindringen dagegen Tod bedeutet. Die Moose, die an und für sich gegen Amyl- und Äthylalkohol absolut nicht widerstandsfähig waren, erwiesen sich als resistent, wenn den beiden Medien durch unlösliche Imprägnationsmittel der Weg in das Zellinnere versperrt wurde.

Daß mit dem Eindringen der Medien nach einiger Zeit der Tod der Objekte eintritt, geht aus den Versuchen mit Helianthusfrüchten hervor, von denen nur diejenigen noch keimfähig waren, in welche die Agentien noch nicht eingedrungen, oder wo sie wenigstens noch nicht zum embryonalen Gewebe gelangt waren. Aus diesen Versuchen an

1) Vgl. 3. und 4. sowie 8. und 9. Versuchsreihe.

Helianthus ist ferner ersichtlich, daß der Tod der Objekte erst dann eintritt, wenn die Gifte bis zum embryonalen Gewebe vorgedrungen sind und dieses abgetötet haben, daß aber ein Eindringen der Medien in äußere Zellschichten noch nicht tödlich auf die übrigen Zellen und die Vegetationspunkte wirkt.

Die Keimverzögerung spricht dafür, daß das Untersuchungsmaterial durch den Aufenthalt in den Medien geschädigt ist. Die Objekte sind wahrscheinlich in einen besonderen Zustand versetzt und brauchen nun längere Zeit, um in den für die Auskeimung nötigen, normalen Stand zurückzukommen. Es ist leicht denkbar, daß die Agentien in geringen Mengen in die Untersuchungsobjekte eingedrungen sind, und daher nicht tödlich, sondern nur schwächend oder vielleicht narkotisierend gewirkt haben. Das Protoplasma braucht dann längere Zeit, um sich erholen und seine Lebensfunktionen wieder aufnehmen zu können. Auf diese Weise kommt die Keimverzögerung zustande. Diese Ansicht wurde bereits von Hansen[1]) bei seinen Untersuchungen über Einwirkungen von Äthylalkohol auf Bacterium Pasteurianum ausgesprochen.

Das Auftreten krankhafter Erscheinungen beim Auskeimen läßt sich eventuell darauf zurückführen, daß die Agentien einen großen Teil Reservestoffe aus den Objekten herausgelöst haben und nun nicht mehr genügend Nährstoffe vorhanden sind, um ein normales Auskeimen herbeizuführen. Anderseits kann man auch annehmen, daß die Medien nur gewisse Stoffe weggelöst haben, die aber zu einem normalen Auskeimen unbedingt nötig sind. Es ist aber auch möglich, daß das Herauslösen von Stoffen überhaupt nicht den Anlaß zu dem annormalen Auskeinen gibt, sondern letzteres einfach durch Störungen, welche die Gifte im Protoplasten hervorrufen, bewirkt wird.

Wenn auch das krankkafte Auskeimen mancher Objekte event. durch das Herauslösen von Reservestoffen zu erklären sein wird, so ist damit noch nicht gesagt, daß eine weitergehende Schädigung und im besonderen der eintretende Tod auch eine Folge des Verlustes an Reservematerial ist. Im Gegenteil hat sich nach meinen Untersuchungen ergeben (vgl. p. 94—98), daß ein Herauslösen von Reservestoffen den Tod der Objekte nicht bedingt. Derselbe tritt auch ein, wenn das Herauslösen unmöglich gemacht ist. Er wird durch das eindringende Agens hervorgerufen. Auf welche Weise aber der Tod durch die Medien herbeigeführt wird, wie diese auf den lebenden Zellinhalt wirken, ob sie

1) Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., I. Abt., 1907, Bd. XLV, Orig., pag. 474.

Veränderungen irgend welcher Art im Protoplasten hervorrufen oder gewisse Stoffe aus diesem herauslösen, muß dahingestellt bleiben.

Bereits Kurzwelly[1]) hatte bei seinen Untersuchungen konstatieren können, daß die Dauerformen gegen die verschiedensten Giftstoffe weitaus widerstandsfähiger waren als Vegetativzustände[2]), eine Beobachtung, die auch durch meine Versuche bestätigt wurde.

Eine Ausnahme hiervon bildete bei den Untersuchungen Kurzwellys[3]) die Hefe, deren exsiccatortrockene, vegetative Teile den giftigen Medien äußerst lange Zeit ungeschädigt standhielten. Diese Resultate bestätigten die Beobachtungen Claude Bernards[4]), der exsiccatortrockene Hefe $1\frac{1}{2}$ Jahr lang in absolutem Alkohol keimfähig erhalten hatte.

Die eben erwähnten Ergebnisse stehen in Gegensatz zu den Erfahrungen, die Hansen[5]) bei Versuchen über Einwirkung von Äthylalkohol auf Hefen machte. Er konnte in keinem Fall eine derartige Resistenz dieser Organismen konstatieren. Auch die von mir verwandte Hefe zeigte nur eine sehr geringe Widerstandskraft gegenüber absolutem Alkohol (vgl. p. 106).

Hansen wies bei seinen Untersuchungen darauf hin, daß das Nährsubstrat, auf dem die Hefen gezogen würden, von gewisser Bedeutung für die Resistenz derselben gegen Alkohol sei. Er kultivierte seine Hefen einerseits auf Nähragar und Nährgelatine, anderseits in Nährlösung. Es zeigte sich dann, daß die aus der Nährlösung stammenden Hefen in Kürze durch den Alkohol abgetötet wurden, während die auf Gelatine und Agar[6]) gewachsenen Individuen eine gewisse Resistenz gegenüber absolutem Alkohol aufwiesen. Dasselbe konnte auch ich konstatieren (vgl. 16. Versuchsreihe, p. 106). Die beim Wachstum auf festem Nährboden außerordentlich reichen Schleimabsonderungen bilden beim Trocknen der Hefen sicher schwer durchlässige Hüllen, die außerdem durch abgestorbene Hefezellen und Gelatine- oder Agarpartikelchen verstärkt werden und so dem Alkohol den Zugang erschweren, während

1) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 322.

2) Vgl. die Unters. von Pasteur, Koch, Krönig und Paul, Epstein, Minervini usw. bei Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 293, 294.

3) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 326—327.

4) Claude Bernard, Leçons sur la phénom. de la vie, 1878, T. I, pag. 95.

5) Hansen, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., I. Abt., Bd. XLV, Originale, 1907, pag. 475—480.

6) Kurzwelly benutzte auf Agar-Agar gezogene Hefen. Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 304.

die in Nährlösung gezogenen Individuen diesem Medium sofort preisgegeben sind. Die Resistenz dieser Organismen gegenüber Alkohol beruht wahrscheinlich auch nur auf einem Nichteindringen dieses Mediums und dauert nur solange an, als dasselbe noch nicht zum lebenden Inhalt der Zellen vorgedrungen ist.

Nach den Untersuchungen Hansens kommt bei der Beurteilung der Widerstandskraft von Hefen und anderen Mikroorganismen nicht nur das Nährsubstrat, sondern auch die Methodik, die bei der Untersuchung des Einflusses von Alkohol auf die erwähnten Objekte angewendet wird, in Betracht.

Während früher die Mikroorganismen für derartige Versuche in der Regel durch Eintauchen von Seidenfäden aus den Nährlösungen geerntet wurden, wandte Hansen neben dieser Methode noch eine andere an. Er tauchte Platindrähte in die Nährlösung ein, brachte sie dann in leere, sterile Freudenreichsche Kölbchen und erzielte durch öfteres Schütteln, daß die Untersuchungsobjekte in ganz dünner Schicht an den Wänden des Gefäßes und am Platindraht angelegt wurden. Beim Abernten mittels Seidenfäden war dies nicht zu erreichen. Dieselben sogen sich beim Eintauchen in die Nährlösung voll und die Untersuchungsobjekte bildeten dicke Schichten an den Fäden.

Die Versuche Hansens erstreckten sich auf Bakterium coli und Bakterium Pasteurianum. Die an Seidenfäden geernteten Organismen hielten der Einwirkung von Alkohol 1 Minute stand, die auf die andere Methode geernteten Objekte wurden durch diese Behandlung abgetötet. Hansen führt diese Ergebnisse darauf zurück, daß durch das Ausbreiten des Untersuchungsmaterials in dünnen Schichten jede einzelne Zelle der Einwirkung des Alkohols zugänglich gemacht und so in Kürze abgetötet wird, während bei dicken Zellschichten der Alkohol nur langsam durch diese hindurchdringen kann und im Innern der Schichten liegende Zellen lange Zeit gar nicht mit ihm in Berührung kommen, und so am Leben bleiben.

Auf dieselbe Art und Weise führte Hansen noch weitere Versuche mit einem Bakterium coli aus, das stark schleimbildend wuchs. Bei diesen Untersuchungen zeigte nicht nur das Seidenfadenmaterial, sondern auch die mittels Platindraht geernteten Objekte nach der Behandlung mit Alkohol noch Leben. Dieses Resultat erklärt Hansen durch die Schleimbildung des Bakterium coli. Dasselbe umgibt seine Zellen mit einer Schleimhülle, welche dieselben vor dem Eindringen des Alkohols beschirmt. Derartige Schleimbildungen wurden von

Hansen[1]) und später von Will[2]) auch an Hefen konstatiert und Kurzwelly[3]) ist geneigt, diesen Bildungen die eminente Resistenz seiner Untersuchungsobjekte zuzuschreiben, eine Ansicht, der Hansen[4]) völlig beistimmt.

Aus all diesen Versuchen geht ebenso wie aus den von mir angestellten Untersuchungen mit Sicherheit hervor, daß bei Samen, Früchten, Moospflänzchen und Mikroorganismen in bezug auf die Einwirkung von Alkohol, Chloroform und ähnlichen Giften gleiche Verhältnisse herrschen, daß die Objekte sich in den giftigen Medien nur solange lebensfähig erhalten können, als diese nicht in sie eindringen. Eine so weitgehende Resistenz des Protoplasten ist dieser Annahme gegenüber weit weniger wahrscheinlich. Man kann daher auch eigentlich gar nicht von einer Alkoholresistenz, von einer Ätherresistenz usw. des Plasmas sprechen, da dasselbe überhaupt nicht mit den Medien in Berührung kommt. Man kann höchstens sagen, daß sich Schalen, Membranen, Schleimschichten usw., die irgend einen Organismus umgeben, gegenüber gewissen Giften durch hervorragende Impermeabilität auszeichnen und auf diese Weise die Giftresistenz des Objektes bedingen.

Die Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit eines Organismus gegen ein bestimmtes Gift, wie sie sich zwischen den Versuchen Claude Bernard's, Kurzwelly's, Hansen's und meinen Untersuchungen an Hefe ergaben, sind sicherlich nicht allein auf die verschiedenartige Methodik, auf verschiedene Nährböden usw. zurückzuführen. Es ist wohl vielmehr anzunehmen, daß sich innerhalb derselben Art ganz erhebliche Schwankungen in der Resistenz geltend machen können. Vielleicht bilden die einen undurchlässigere Membranen aus oder sondern dichtere Schleimschichten ab und sind daher widerstandsfähiger als die anderen.

Diese Erscheinungen treten aber nicht nur bei Untersuchungen mit Hefe ein, sondern finden sich wohl bei allen Organismen.

---

1) Hansen, Medd. fra Carlsberg Laborat., Bd. II, Rés. 126, Les voiles chez le genre Saccharomyces.

2) Will, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., II. Abt., Bd. IV, pag. 130, 201.

3) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, p. 299; vgl. auch Klöcker, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., II. Abt., Bd. XIV, pag. 753.

4) Unter anderem führt Hansen aus, daß die Widerstandskraft der Hefen durch Auswaschen des Schleimes sinkt, s. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., I. Abt., 1907, Originale, pag. 475—480.

So hatte z. B. Zehl[1]) bei seinen Versuchen verschiedene Kulturen von Penicillium glaucum und Aspergillus niger, die morphologisch übereinstimmten, physiologisch sich aber ganz abweichend verhielten. Die einen zeigten Cadmium und Kupfersulfat gegenüber ganz gleiches Verhalten, während die anderen der Einwirkung von Cadmiumsulfat nicht widerstehen konnten. Bei seinen Untersuchungen riefen ferner die sich chemisch nahestehenden Metallsalze von Kobalt- und Nickelsulfat gleiche Giftwirkungen hervor, ein Resultat, welches sich bei den Versuchen Pulst's[2]) nicht einstellte. Auch dies deutet darauf hin, daß sich die einzelnen Schimmelpilzrassen, wenn sie auch morphologisch gleich sind, doch durch verschiedenes physiologisches Verhalten auszeichnen.

Ein anderes Beispiel hierfür liefern Sporen von Aspergillus niger, die sich bei Kurzwellys[3]) und meinen Untersuchungen[4]) gegen siedenden Äthylalkohol ganz gleich verhielten, bei Einwirkung einer Trockentemperatur von 100° C aber die weitgehendsten Unterschiede in ihrer Widerstandskraft zeigten.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß man schon aus dem Widerstande, den die Objekte den Giften bei Zimmertemperatur entgegensetzen, einen Schluß auf die Resistenz gegen dieselben Medien bei höheren Temperaturen ziehen kann[5]). Organismen, die bei Zimmertemperatur schon wenig resistent sind, sterben bei höherer Temperatur rasch in den Giften ab, andere, die bei Zimmertemperatur lange ungeschädigt in den Medien verweilen können, setzen ihnen gewöhnlich auch bei höherer Temperatur erheblichen Widerstand entgegen.

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im botanischen Institut zu Leipzig ausgeführt. Es sei mir auch an dieser Stelle gestattet, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Geheimrat Prof. Dr. Pfeffer für die mir jederzeit in reichstem Maße zuteil gewordene Anregung und Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso fühle ich mich Herrn Prof Dr. Miehe gegenüber zu großem Dank verpflichtet.

1) Zehl, Zeitschr. f. allgem. Physiol., 1908, Bd. VIII, pag. 140—190.

2) Pulst, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1902, Bd. XXXVII, pag. 205—263.

3) Kurzwelly, Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 37.

4) pag. 104.

5) Vgl. Kurzwelly's Arbeit (Jahrb. f. wissensch. Bot., 1903, Bd. XXXVIII, pag. 291—341) mit der vorliegenden Arbeit.