

Untersuchungen über die Entwicklungs- und Ernährungsphysiologie einiger Chlorophyceen.

Von

HARUFUSA NAKANO, *Rigakuhakushi*.

Mit 3 Tafeln und 9 Textfiguren.

I. Einleitung.

Im Sommer 1910 stieß ich auf das spontane massenhafte Auftreten von *Gonium pectorale* in einem Kulturgefäße der Wasserpflanzen in unserem Laboratorium. Ich versuchte die Algen nach der Methode der mechanischen Isolierung, die oft für die Pilzkultur ideale Dienste leistet, weiter zu züchten. Meine Versuche schlugen aber fehl, und ich erhielt stattdessen zufällig eine Rohkultur von *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.

In demselben Jahre versuchte ich wieder, nach *Zumstein* (1900, S. 187), *Euglena* aus einem Abwasser bei Koishikawa (Tokyo) zu kultivieren. Das Ziel wurde wieder nicht erreicht, und anstatt der *Euglena* bekam ich eine Rohkultur von *Chlorosphaera putrida*, sp. nov.

Im December 1911 glückte es mir aber auf einer Richterschen Platte (siehe O. Richter, 1903, S. 496) Kolonien von *Navicula* und *Raphidium* aus einem Teich des hiesigen Botanischen Gartens zu erhalten. *Raphidium* ging aber bei der zweiten Überimpfung zu Grunde. Bei *Navicula* versuchte ich mehrere Überimpfungen. Ihre Entwicklung war dabei aber so schlecht, daß ich ihre Reinkultur nicht herstellen konnte.

Im April 1912 machte ich den Versuch nach dem Isolierungsverfahren von Chodat (1900)¹⁾ aus einem Teich bei Fukagawa (Tokyo) Algen zu isolieren. Nach etwa drei Monaten konnte ich glücklich drei Arten Chlorophyceen isolieren und rein züchten. Die Algen waren die folgenden:

Chlorella vulgaris Beij. var. *lutescens*, var. nov.

Stichococcus bacillaris Näg. var. *viridis*, var. nov.

Scenedesmus obliquus Ktg. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

Im Januar 1914 erhielt ich zwei weitere Reinkulturen von Chlorophyceen, *Chlorosphaera putrida*, sp. nov. und *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.; beide stammten aus den oben erwähnten Rohkulturen der betreffenden Algen.

In dieser Arbeit beabsichtige ich die Entwicklungs- und Ernährungsphysiologie der fünf²⁾ obigen reinen Algen zu schildern, d.i.,

- 1) Formwechsel,
- 2) Ernährungsphysiologie,
- 3) Systematik,
- 4) Farbenwechsel.

Im zweiten Abschnitt bestimmte ich, nach ernährungsphysiologischen Studien, die Abteilungen der fünf Algen als Leitorganismen für Wasserbeurteilung. In demselben Abschnitt wurde meine besondere Aufmerksamkeit auch auf die ernährungsphysiologischen Beziehungen zwischen den Algen und *Azotobacter* gelenkt.

Die Identifizierung der Algen geschah nicht nur nach morphologischen, sondern auch nach physiologischen Standpunkten.

Was nun den Farbenwechsel der Algen betrifft, so wurde dieser mit großer Mühe bearbeitet. Ich kam danach zu einem

1) Herr. Prof. Chodat war so liebenswürdig mir einen Separatdruck der oben genannten Arbeit zu übersenden, wofür ich ihm hier meinen besten Dank ausspreche.

2) Bis jetzt habe ich ferner die Reinkulturen von sechs anderen Chlorophyceen, zwei Diatomeen und einer Art von *Euglena* hergestellt.

etwas anderen Resultat als frühere Forscher. Die Sache ist aber so kompliziert, daß ich, trotz vieler verschiedenartiger Versuche, denselben noch nicht vollkommen zu erklären imstande bin.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden unter Leitung und Anregung von Herrn Prof. Dr. Miyoshi angestellt. Ich möchte demselben an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen. Ich bin auch Herrn Prof. Dr. K. Shibata, zu großem Dank verpflichtet, da er mir viele wertvolle Ratschläge und Unterstützungen, besonders in der chemischen Analyse, gegeben hat. Auch Herrn Dr. Hattori spreche ich für seine vielfachen Unterstützungen meinen besten Dank aus.

II. Bedeutung der Reinkultur.

Unter „Reinkultur“ der Algen hat man die folgenden beiden Fälle zu unterscheiden,

- a) Speziesreine oder artreine Kultur
- b) Absolute oder bakterienfreie Reinkultur.

Die erstere ist eine mit Bakterien verunreinigte, aber von anderen Organismen befreite Kultur, bei der letzteren ist die Kultur aber sowohl von anderen Algen, als auch von anderen Organismen befreit.

Streng genommen, ist die Speziesreinkultur nichts anderes als eine unreine Kultur mit Ausschluß von anderen Algen.

In unserem Sinne bedeutet die Reinkultur der Algen stets die absolute Reinheit der Kultur.

Frühere und sogar neuere Forscher begnügten sich sehr oft mit einer Rohkultur oder Speziesreinkultur der Algen, weil die Reinkultur derselben nicht leicht zu haben ist.

Die erste Reinkultur der Algen verdanken wir Beijerinck (1890, S. 727). Im Jahre 1890 gelang es demselben mit einer

Gelatineplattenkultur *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*, *Chlorosphaera limicola* und *Cystococcus humicola* bakterienfrei zu züchten.

Es ist ein großes Verdienst von Beijerinck, daß er uns damit zum erstenmal eine einwandfreie Versuchsmethodik der Algen gelehrt hat. Der Arbeit von Beijerinck folgten viele andere Arbeiten über die Reinkultur der Algen.

In seinen Untersuchungen der Chlorophyceen hat Chodat (1913) die Reinkulturmethode mit glänzendem Erfolge angewandt, indem er nicht weniger als siebenzig verschiedene Arten unter ihnen isolieren konnte.

Bei anderen Klassen der Algen ist die Reinkultur nicht so gut gelungen wie bei den Chlorophyceen. Es bedarf noch zukünftiger Arbeit, um weitere Fortschritte zu machen.

Immerhin brachten die bisherigen auf dem Wege der Reinkultur ausgeführten Untersuchungen schon viele wertvolle Resultate.

Zunächst möchte ich betonen, daß die Reinkultur der Algen uns mit Bestimmtheit die Möglichkeit einer heterotrophen Lebensweise der chlorophyllgrünen Pflanzen erkennen ließ. Nach den Untersuchungen von Beijerinck und den später erschienenen vermittels Reinkultur ausgeführten Arbeiten der verschiedenen Forscher konnten wir mit Gewißheit darauf schließen, daß es viele Algen gibt, die halbsaprophytisch sind, d. h. sie können durch die Aufnahme der organischen Kohlenstoffverbindungen die CO_2 -Assimilation teilweise ersetzen. Wir wissen aber noch nicht, ob es obligat saprophytische Algen gibt, weil nach E. Pringsheim (1913) *Euglena* (S. 26) und sogar Cyanophyceen (S. 74–80) noch autotroph leben können.

Unter anderen auf dem Wege der Reinkultur erhaltenen Resultaten möchte ich betreffs der physiologischen Erscheinungen der Algen die folgenden besonders hervorheben.

- 1) die Verflüssigung der Gelatine,
- 2) die Chlorophyllbildung im Dunkeln,
- 3) die Unmöglichkeit der Bindung des freien Stickstoffs.

Außerdem wurden noch andere wichtige Resultate festgestellt. Bezüglich derselben möchte ich auf eine dem folgenden Kapitel beigelegte Tabelle verweisen.

Auch für die Systematik der Algen ist die Reinkultur von fundamentaler Wichtigkeit. Chodat hebt (1913, S. 1–12) mit Recht hervor, daß die Reinkultur für die Identifizierung winziger Algen eine bevorzugte Methode liefert, weil dieselbe die Beobachtungen der Entwicklungsgeschichte der Algen erleichtert, und auch physiologische Merkmale erkennen läßt.

Ferner möchte ich betonen, daß die Reinkultur der Algen uns den Unterschied der Mutation und Modifikation (d. i. Polymorphismus) derselben am klarsten zeigen kann (vergl. Chodat, 1909, S. 146).

III. Methodik der Reinkultur.

Die Methoden der Reinkultur von Algen lassen sich, wie die von anderen Mikroorganismen, in zwei Gruppen einteilen:

- a) Mechanische Methode,¹⁾
- β) Biologische Methode.¹⁾

Die erstere Methode ist diejenige, welche ganz mechanisch ausgeführt wird. Die mechanische „Kapillarmethode“, das Isolierungsverfahren mittelst Augenwimpern eines Schweins und die „Verdünnungsmethode“ im ursprünglichen Sinne gehören hierher.

Nach der mechanischen Methode ist es sehr schwer, oder fast unmöglich, abgesehen von besonders glücklichen Fällen, reine Algen

1) Meine Auffassung ist etwas abweichend von der von Küster, (vergl. 1913 b, S. 54).

zu erhalten. Die nach dieser Methode hergestellten Kulturen werden meist unrein, höchstens speziesrein sein.

Bei der letzteren Methode spielen die physiologischen Eigentümlichkeiten der Lebewesen eine Hauptrolle. Das erste Isolierungsverfahren von Beijerinck (l.c.) war eine etwas modifizierte Methode der Kochschen Plattenmethode.¹⁾ Man nennt es daher oft das Koch-Beijerincksche Verfahren (O. Richter, 1903, S. 495).

Der Gelatine-Nährboden, der zuerst von Beijerinck angewandt wurde, war aber kein sehr gutes Medium, weil die Bakterien und Pilze denselben oft verflüssigen und die Algenentwicklung völlig sistieren. Später (1898) adoptierte Beijerinck (1898, S. 785–786) aber den Agarnährboden, und erhielt dadurch die Reinkultur von *Pleurococcus vulgaris*.

Die im Jahre 1900 von Chodat und Grintzesco veröffentlichte Verdünnungsmethode ist vortrefflich um eine Reinkultur von Algen zu erhalten. Hierüber will ich im folgenden kurz sprechen.

Einige Tropfen Wasser aus einem Teich oder einer Rohkultur werden mit destilliertem Wasser bis zu einer passenden Konzentration verdünnt. Ein Tropfen der verdünnten Lösung wird dann in die Mineralsalzagar enthaltenden Erlenmeyer-Kolben gegossen und tüchtig geschüttelt. Nach etwa 14 Tagen sieht man im Frühling oder im Sommer im Agar viele grüne Algenkolonien. Um die Bakterienfreiheit der Algen zu sichern, muß man ein und dasselbe Verfahren wenigstens zweimal wiederholen. Beim zweiten Verfahren kann man aber das Glukose enthaltende Nähragar anstatt des Mineralsalzagars verwenden. Weitere Kulturen in Nährbouillon, oder in einem Pepton enthaltenden Nährboden, können als Prüfung dienen, ob die erhaltenen Algen absolut rein sind oder nicht. Ge-

1) Bei dieser Methode ist die Koloniebildung die Hauptsache.

wöhnlich ist aber diese Prüfung überflüssig. Wenn man es mit unreinen Kolonien zu tun hat, treten bei dem zweiten und dritten Verdünnungsverfahren gleichzeitig viele Bakterienkolonien im Agar auf, was uns die Verunreinigung der Algen erkennen läßt.

Es ist natürlich zu erwarten, daß die Verdünnungsmethode die nicht gallertigen Algenzellen von einander und von den Bakterien trennen, und daß sie aus einem Individuum entstehende Kolonien hervorbringen kann. Man kann also auf diese Weise eine Individuallinie von Algen erhalten.

Nach dem oben erwähnten Verfahren wurden unsere Algen *Chlorella l.*¹⁾, *Stichococcus v.* und *Scenedesmus n.* gereinigt. Das Isolierungsverfahren von *Chlorosphaera p.* und *Chlamydomonas k.* war aber etwas anders. Diese Algen bilden gallertige Zönobien, die das Festsitzen der Bakterien sehr begünstigen. Beim ersten Isolierungsverfahren erhielt ich daher mit Bakterien vermischte Algenkolonien. So war es mir lange Zeit unmöglich die Reinkultur der betreffenden Algen zu erhalten. Später entdeckte ich aber, daß dieselben Algen in einer Mineralsalznährlösung, die insofern eine Abweichung von der gewöhnlich benutzten zeigte, als anstatt des Kalziumnitrats Ammonsulfat und Kalziumchlorid benutzt wurden, nur als kleine Zönobien oder als Individuen vorkamen. Dabei wurde die Nährlösung sauer, und die Bakterienentwicklung wurde demgemäß geringer. Diese Kultur lieferte mir daher ein gutes Impfmateriail. Ich habe bei demselben wieder das Verdünnungsverfahren benutzt und auf diese Weise die Reinkulturen der betreffenden Algen hergestellt.

Bei den vorliegenden Untersuchungen bediente ich mich verschiedener Nährmedien. Da ich auf dieselben später ausführ-

1) Der Kürze halber bezeichne ich in vorliegender Arbeit fünf von mir isolierte Algen mit *Chlorella l.*, *Stichococcus v.*, *Scenedesmus n.*, *Chlorosphaera p.* und *Chlamydomonas k.*

licher zurückkommen werde, so beschränke ich mich hier darauf nur das Folgende mitzuteilen.

Bevor ich aber in diesbezügliche Erörterungen eintrete, möchte ich mit einigen Worten die Bedeutung des „Prozent“ erwähnen. Unter dem „Gewichtsprozent“ versteht man in der Regel ein gewisses Gramm Chemikalien auf 100 Gramm destilliertes Wasser. Die Physiologen haben sich aber daran gewöhnt ein gewisses Gramm Chemikalien auf 100 cm³ der Grundnährlösung oder des Nähragars als ein gewisses Prozent anzunehmen. Noch eine andere Bedeutung kommt dem Worte „Prozent“ zu. So könnte man ein gewisses Gramm in 100 cm³ destilliertem Wasser oder anderen Lösungsmitteln, wie man bei Pfeffer findet, (Pflanzenphysiologie Bd. I. S. 127–'8) auch als ein gewisses Prozent bezeichnen. Bei den vorliegenden Untersuchungen bediente ich mich immer des Wortes „Prozent“ im letzteren Sinne, weil eine solche Behandlung bei der Verdünnung der Grundlösung sehr bequem ist.

Nun werde ich zur Beschreibung der Zusammensetzungen der Nährmedien übergehen.

- I. Mineralsalznährlösung (kurzweg $\frac{1}{2}$ M-L bezeichnet). Diese wurde durch eine doppelte Verdünnung der Detmerschen Grundnährlösung (kurzweg M-L) hergestellt) d. i.,

Ca(NO ₃) ₂	1.00 g
MgSO ₄	0.25
KCl	0.25
KH ₂ PO ₄	0.25
FeCl ₃	Spur

Diese Stoffe wurden in 1000 cm³ destillierten Wassers gelöst.

Diese Grundlösung wurde mit destilliertem Wasser zweifach verdünnt.

- II, Glukosenährlösung (kurzweg Gl-L)

50 cm³ M-L+Glukose 2g; diese wurde mit H₂O auf 100 cm³ gebracht.

III. Mineralsalznähragar (kurzweg M-Agar)

500 cm³ M-L+gewässertes Agar 20g; diese Mischung wurde mit H₂O auf 1000 cm³ gebracht.

IV. Glukosenähragar (kurzweg Gl-Agar)

M-Agar+Glukose 2%

V. Mineralsalznährgelatine nach Grintzesc o (1902)
(kurzweg M-Gelatine)

Ca(NO ₃) ₂	1.65 g
KCl	0.50
MgSO ₄	0.50
KH ₂ PO ₄	0.50
FeCl ₃	Spur
Gelatine	1.50 g

Alle diese Stoffe wurden in 1000 cm³ destillierten Wassers gelöst.

VI. Glukosenährgelatine (kurzweg Gl-Gelatine)

M-Gelatine+Glukose 2%

VII. M-Agar nach O. Richter (1903)

In 1000 cm³ H₂O werden je 0.2g von KNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄, und CaSO₄, und eine Spur von FeSO₄ zugesetzt. Agar in einer Dosis von 1%.

VIII. Gl-Agar nach O. Richter

M-Agar nach Richter+Glukose 2%

Das Isolierungsverfahren mittelst Kieselgallerte ist häufig sehr erfolgreich, besonders für Algen, die einer größeren Temperatur als 37°C (Erstarrungspunkt des Agars) nicht widerstandsfähig sind. Dies Verfahren wurde schon von Miquel (1892) für die Reinkultur

der Diatomeen und in neuerer Zeit von E. Pringsheim (1913, S. 57–59) für die Kultur der Schizophyceen angewandt.

Im folgenden werde ich tabellarisch zeigen, wieweit die Rein-
kultur bei den Algenklassen gelungen ist.

Autoren	Jahr	Methode d. Kultur	Reinheit	Algen
Artari	1901	(Nicht angegeben)	Zweifelloos rein	<i>Xanthoria parietaria</i> , <i>Gasparrina bacillaris</i> .
„	'01, '02 b, '04, '06	„	„	<i>Stichococcus bacillaris</i> .
„	1902 a	„	„	<i>Chlorococcum infusionum</i> .
„	1906, '09	„	„	<i>Chlorella communis</i> .
„	1913, '14	„	„	<i>Chlamydomonas Ehrenbergii</i> . <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>acutus</i> , <i>Chlorosphaera limi-</i> <i>cola</i> , <i>Cystococcus humicola</i> .
Beijerinck	1890 !	Gelatine-Plattenkultur	„	<i>Scenedesmus acutus</i> .
„	1893	Eine Kultur von 1890	„	<i>Pleurococcus vulgaris</i> .
„	1898	Agar-Plattenkultur	„	Viele Chlorophyceen.
Chodat u. Grintzesco	1900	Verdünnungsmethode	„	Viele Chlorophyceen u. einige Cyanophyceen.
Chodat	1909	„	„	Etwa 71 Arten Chlorophy- ceen.
„	1913	„	„	<i>Scenedesmus acutus</i> .
Grintzesco	1902	„	„	<i>Chlorella vulgaris</i> .
„	1903	„	„	<i>Cystococcus</i> u. <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>
Kossowitsch	1894	Auf Kieselsäuregallerte	„	<i>Chlorella protothecoides</i> . <i>Chlorothecium saccharophilum</i> .
Krüger	„	Wahrscheinlich Plattenkultur	„	<i>Stichococcus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>ch. protothecoides</i> u.a.
Krüger u. Schneidewind	1900	(Nicht angegeben)	„	<i>Chlorella luteo-viridis</i> var. <i>lutescens</i> .
Kufferath	1913	Methode von Chodat	„	<i>Stichococcus bacillaris</i> .
Matruchot u. Molliard	1900	Plattenkultur	„	<i>Navicula minuscula</i> , <i>Nitzschia palea</i> , <i>N. dissipata</i> .
Meinhold	1911	Nach Richter	„	Diatomeen.
Miquel	1892	Kieselsäuregallerte	„	<i>Chlorothecium saccharophilum</i> .
Palladin	1904	(Nicht angegeben)	„	„
Petraschewsky	„	„	„	<i>Euglena gracilis</i> .
Pringsheim, E.	1913	Plattenkultur	„	<i>Nostoc cuticulare</i> , <i>Oscillaria tenuis</i> , <i>O. brevis</i> .
„	„	Auf Kieselsäuregallerte	„	<i>Chlorella vulgaris</i> .
Radais	1900	(Nicht angegeben)	„	

Autoren	Jahr	Methode d. Kultur	Reinheit	Algen
Richter, O	1903	Plattenkultur	Zweifellos rein.	<i>Navicula minuscula.</i> <i>Nitschia palea.</i>
„	1906	„	„	„
„	1909	„	„	<i>Nitschia putrida.</i>
„	1909	„	„	Drei Arten, Diatomeen.
Tischutkin	1897	„	Teils unrein	Cyanophyceen (?), Konjugaten(?), Diatomeen, Chlorophyceen.

Man ersieht aus dem obigen, daß die Reinkultur hauptsächlich bei den Chlorophyceen, aber auch bei einigen Diatomeen und Cyanophyceen, und bei einer Art der Flagellaten zweifellos gelungen ist. Dies läßt sich jedoch keineswegs von den Klassen der Peridineen, Konjugaten, Phaeophyceen und Rhodophyceen sagen.

Die physiologischen Arbeiten über unreine resp. speziesreine Algen sind sehr zahlreich. Die hauptsächlichsten sind aber die folgenden :

Autoren	Jahr	Methode d. Kultur	Reinheit	Algen
Andreesen	1909	Kapillarmethode	Speziesrein	Desmidiaceen.
Benecke	1898	Überimpfung	Unrein	<i>Hormidium nitens.</i>
Boresch	1913	„	„	<i>Phormidium corium</i> , <i>Chlamydomonas</i> sp.
Burton u. Livingston	1900	„	„	<i>Stigeoclonium tenue.</i>
Frank, Th.	1904	„	Speziesrein	<i>Chlamydomonas.</i>
Jacobsen	1910	Kapillarmethode u. Plattenkultur	Speziesrein od. rein	<i>Chlamydomonas</i> , u. a. <i>Polytoma uvella.</i>
Klebs	1896	Überimpfung u. Kapillarmethode	Unrein oder speziesrein	Viele Algen.
Küster	1908	Überimpfung	Speziesrein	<i>Gymnodinium fucorum.</i>
Magnus u. Schindler	1912	Plattenkultur	Speziesrein	Schizophyceen.
Migula	1889	Wahrscheinlich Überimpfung	Unrein	<i>Spirogyra orbicularis</i> u. a.
Molisch	1895, '96	Überimpfung.	Unrein od. speziesrein	Chlorophyceen, Konjugaten.

Autoren	Jahr	Methode d. Kultur	Reinheit	Algen
Ogata	1893	Kapillarmethode u. Plattenkultur	Speziesrein od. rein(?)	<i>Polytoma wella</i> .
Ōno	1900	Überimpfung u. Plattenkultur	Unrein od. rein (?)	<i>Chroococcum</i> , <i>Protococcus</i> u. a.
Pringsheim, E.	1912	Plattenkultur	Speziesrein	Konjugaten, u. a.
Senn	1899	Überimpfung	Unrein	<i>Coelastrum</i> , <i>Scenedesmus</i> .
Schindler	1913	Plattenkultur	Speziesrein	Schizophyceen.
Ternetz	1912	Nach Zumstein	Speziesrein	<i>Euglena gracilis</i> .
Treboux	1905	(Nicht angegeben)	Speziesrein od. rein	Chlorophyceen, Konjugaten.
Walz	1868	Überimpfung	Unrein	Chlorophyceen.
Ward	1899	Kieselgallerte	Speziesrein	<i>Oscillaria tenerrima</i> .
Zumstein	1900	In Zitronensäure-Nährlösung	Speziesrein	<i>Euglena gracilis</i> .

Betreffs weiterer Besprechungen der Arbeiten, die sich auf die Ernährung der organischen Stoffe bei der Rohkultur beziehen, verweise ich auf das Werk von O. Richter (1911, S. 26).

Einige der obigen Arbeiten sind für uns auch heute noch sehr wertvoll. Sie werden natürlich in der Zukunft noch mehr oder weniger verbessert werden. Schon jetzt steht fest, daß die Resultate von Senn (1899, S. 97) und Grintzesco (1902, S. 241) betreffs der Zönobienbildung von *Scenedesmus acutus* von einander abweichend sind. Da aber die Arbeit des erstgenannten Autors sich auf eine unreine Kultur begründete, ist man berechtigt, die Resultate Grintzescos für die richtigeren zu halten. Gegen die Ansicht von Senn wurden neuerdings auch von Tscharna Rayss (1915, S. 22) Einwendungen gemacht.

IV. Formwechsel.

1. Wachstum und Ruhen der Algen.

Zunächst werde ich die Koloniebildung von Algen in oder auf

der Agarmasse behandeln. Die Koloniefornien der Bakterien wurden von vielen Forschern studiert. Nach Orsós (1910) sollen die Koloniefornien der Bakterien und Hefen in der Agarmasse durch die physikalischen Bedingungen der Nährböden bedingt sein. So bilden sich beim langsamen Wachstum kugelige Kolonien, beim schnellen Wachstum dagegen ellipsoidische oder tryphyllousförmige Kolonien. Meine eigenen Versuche bei den Algen ergaben ähnliche Resultate.

Algen	Versuchsdauer	Kolonieform im M-Agar	Kolonieform im Gl-Agar
<i>Chlorella l.</i>	Etwa zwei Monate	Ellipsoidisch.	Ellipsoidisch oder tryphyllousförmig.
<i>Stichococcus v.</i>	„	Winzig, kugelig.	Winzig, kugelig.
<i>Scenedesmus n.</i>	„	Winzig, kugelig.	Ellipsoidisch oder tryphyllousförmig.

Diese Resultate stimmen mit denen von Orsós überein. Tryphyllousförmige Kolonien kommen nur im Gl-Agar vor, wo die Algenentwicklung schneller als im M-Agar ist. Bei *Stichococcus* fand ich eine langsame Entwicklung auch im Gl-Agar, und daher weder ellipsoidische noch tryphyllousförmige Kolonien.

Natürlich sind die Koloniefornien auf der Oberfläche des Nähragars auch von physikalischen Bedingungen abhängig. Sie sind aber stark variabel, je nach den Verschiedenheiten der Arten oder Varietäten. Hiermit wurden die Koloniefornien in der Bakteriologie als ein wichtiges Merkmal betrachtet. Nach Chodat (1913) sind die Formen und Farben der Kolonien auf Gl-Agar imstande ein wichtiges Kriterium für die Systematik der Algen zu liefern. Diesbezügliche Merkmale sind bei unseren Algen wie folgt:

Algen	Oberflächliche Kolonie bei Mineralagarschüttelkultur	Oberflächliche Kolonie ¹⁾ bei Glukoseagarschüttelkultur
<i>Chlorella l.</i>	Klein, rundlich, oft dendritisch; lange grün.	Groß, rundlich; nach etwa 3 Monaten gelblich. Zonenbildung deutlich.
<i>Stichococcus v.</i>	Klein, rundlich; lange grün.	Groß, rundlich; nach etwa 3 Monaten gelblich. Zonenbildung deutlich. Grüner als <i>Chlorella</i> .
<i>Scenedesmus n.</i>	Klein, rundlich; lange grün.	Klein, rundlich; leicht vergilbt.
<i>Chlorosphaera p.</i>	Ziemlich groß, rund; lange grün.	Groß, rund, gallertig; später vergilbt.
<i>Chlamydomonas l.</i>	Groß, rund, gallertig; lange grün.	Ähnlich wie bei M-Agar.

Sehr interessanterweise fand ich eine Zonenbildung der Kolonien bei Gl-Agar-Kulturen von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.*

Die Zonenbildung der Bakterien und Pilze wurde schon von vielen Forschern beobachtet, und sie ist seit langer Zeit unter dem Namen „Hexenring“ bekannt. Die Bedingungen der Hexenringbildung wurden auch von früheren Autoren schon hervorgehoben. Man konnte aber keinen entscheidenden Schluß daraus ziehen. In neuerer Zeit haben Munk (1912) und noch ausführlicher Küster (1913 a) darauf aufmerksam gemacht, daß der Hexenring mit dem Liesegangschen Diffusionsfeld (also physiologisch-chemisch) im Zusammenhang stehe. Es ist jedoch noch unentschieden geblieben, ob die Diffusion der Stoffwechselprodukte der Organismen für das Wachsen wechselnde Bedingungen verursacht, und dadurch die Hexenringbildung zustande kommen läßt. Es scheint mir auch die von Schindler (1913, S. 569) geäußerte Ansicht zweifelhaft zu sein, wonach die Zonenbildung der Oscillarien auf eine Abwanderung der Fäden nach ihrem Gedei-

1) Man bekommt bei Stickskultur eine größere Kolonie.

hen günstigeren Stellen zurückgeführt werden soll.

Ich muß mich nunmehr der Erklärung der „Ruheperiode“ zuwenden.

Das Wachsen und Ruhen der Algen läßt sich am leichtesten an der Beobachtung der Meeresalgen klarlegen. Das Meer beherbergt die üppigste Vegetation im Winter. Vom Frühling an beginnen die meisten Algen zu verschwinden. Man möchte denken, daß der regelmäßig wiederkehrende Wechsel von „Wachsen“ und „Ruhen“ teils von der Temperatur, teils vom Licht abhängt. Berthold (1882) hat aber auf Grund seiner Beobachtungen im Golf von Neapel hervorgehoben, daß hier der Wechsel der Lichtintensität den größten Einfluß auf die Entwicklung der Algen ausübt. Gleiche Beobachtungen an Meeresalgen wurden später vielfach mitgeteilt.

Der Wachstumstillstand, den man im Winter bei den in der Luft oder im seichten Wasser lebenden Algen beobachtet, ist aber wahrscheinlich auf eine andere Ursache zurückzuführen, weil in diesem Fall der Temperaturwechsel sehr groß ist.

Miquel (1892), Grintzesco (1902, S. 420; 1903, S. 75), O. Richter (1909 a), und Kufferath (1913, S. 136) haben schon bei ihren reinen Algen das Temperaturminimum, -optimum und -maximum bestimmt. Mit Bezug auf Jahreszeiten können wir aber daraus keine nennenswerten Kenntnisse erlangen.

Bei meinen Untersuchungen bemerkte ich auch je nach den Arten mehr oder weniger schlechte Entwicklungen im Winter, nämlich:

Chlorella l. gedeiht im Winter mäßig.

Stichococcus v. zeigt etwas schlechtere Entwicklung.

Scenedesmus n., *Chlorosphaera p.* und *Chlamydomonas k.* zeigen merklich schlechtere Entwicklung.

Ich begann nun den Einfluß der Temperatur in den verschie-

denen Jahreszeiten auf die Algenentwicklung zu studieren. Um die Resultate mit einander zu vergleichen, benutzte ich eine quantitative Methode, d.i., ich berechnete die Zeitdauer, die von einem Individuum bis zur Bildung einer mit bloßen Augen sichtbaren Kolonie verfließt.

Die Versuche wurden am 19/Januar '14 angestellt. Die Resultate waren die folgenden:

Algen	Schüttelkultur im M-Agar		Schüttelkultur im Gl-Agar	
	im Treibhaus (18–20°C)	bei Zimmer- temperatur	im Treibhaus (18–20°)	bei Zimmer- temperatur
<i>Chlorella l.</i>	16 Tage	72 Tage	22 Tage	88 Tage
<i>Stichococcus v.</i>	19 „	72 „	—	—
<i>Scenedesmus n.</i>	16 „	72 „	33 Tage	—
<i>Chlorosphaera p.</i>	14 „	—	14 „	—
<i>Chlamydomonas k.</i>	14 „	—	14 „	—

Aus diesen Resultaten geht deutlich hervor, daß selbst im Winter bei passender Temperatur unsere Algen sehr gut zu wachsen imstande sind. Zu meiner Überraschung wachsen die Algen im Gl-Agar langsamer als im M-Agar. Dieses Resultat war ganz abweichend von einem solchen im Jahre 1912. Dabei ließ sich die folgende Zeitdauer feststellen.

Bei Zimmer- temperatur. Algen.	Schüttelkultur im M-Agar	Schüttelkultur im Gl-Agar
<i>Chlorella l.</i>	20/IV — 4/V = 14 Tage	20/IV — 1/V = 10 Tage
<i>Stichococcus v.</i>	27/VI — 20/VII = 23 „	27/VI — 20/VII = 23 „
<i>Scenedesmus n.</i>	6/V — 25/V = 19 „	27/VI — 4/VII = 7 „

Die Abweichung in den beiden Resultaten ist höchst wahrscheinlich in der Verschiedenheit der Virulenz des Impfmateri als zu suchen. Als Impfmateri al benutzte ich immer Gl-Agarkultur.

Bei den Versuchen im Jahre 1912 waren die Algen nach der Isolierung erst etwa ein Monat alt, bei den Versuchen im Jahre 1914 waren sie aber schon zwei Jahre alt. Die langsame Entwicklung im Gl-Agar im Jahre 1914 ist wahrscheinlich auf eine Anhäufung der organischen Substanzen in den Algenzellen und auf das infolgedessen entstandene latente Leben zurückzuführen.

Jedenfalls genügen meine Resultate zu zeigen, daß die Ruhezeit der Algen durch verschiedene Bedingungen bestimmt wird. Diese Tatsache wird durch die Theorie von Klebs (1915) und Lakon (1912) betreffs der Ruheperiode der Bäume unterstützt. Nach Klebs (1915, S. 734-792) wird die Ruheperiode der tropischen Baumarten und der Buche durch Licht, Nährsalzmangel, Temperatur, Feuchtigkeit der Luft, und den Wassergehalt des Bodens bestimmt. Er hebt die beiden ersten Bedingungen als Hauptursachen hervor.

2. Zönobien- und Familienbildung der Algen.

Zönobien und Familien beurteile ich nach der von Al. Braun begründeten und von Senn (1899, S. 96-97) etwas modifizierten Begriffen. Diese Autoren nennen eine mit einander verbundene Zellgruppe, die nur aus einer Generation besteht „Zönobien“, während dieselben Autoren eine mehrere Generationen enthaltende Zellgruppe als „Zellfamilien“ bezeichnen. Dieser Unterschied ist aber nicht, wie Senn (1899) schon hervorhob, immer stichhaltig, weil die Sache oft sehr verwickelt ist.

In den folgenden Zeilen werde ich diesbezügliche Beobachtungen bei den untersuchten Algen im einzelnen mitteilen

Chlorella l. bildet unter keinen Umständen Zönobien.

Stichococcus v. ist im normalen Zustande niemals zu Fäden vereinigt. Bei einer Verzögerung des Wachstums kommt *Stichococcus* aber oft als ein fadenförmiges Zönobium vor. Nach Senn

gehören diese Zönobien zur ersten Kategorie, d.i., sie kommen nur durch Adhesion der Zellen zustande. Artari (1904, S. 609) fand diese Zerrformen in konzentrierten Zuckerlösungen. Ich beobachtete bei unserer Veriät dasselbe Bild in 22%-Glukosenährlösung (vergl. Tafel I, Fig. 12).

Daher scheint es wahrscheinlich, daß *Stichococcus* mit *Hormidium* Verwandtschaft hat. *Hormidium* ist aber im normalen Zustande eine fadenförmige Algengattung und ist immer mit Pyrenoid versehen. Infolge dieser beiden Unterscheidungsmerkmale vereinigen wir, im Gegensatze zur Meinung von Wille (1911, S. 71), die beiden Gattungen nicht (vergl. Brand 1913, S. 64 und Chodat 1913, S. 144-145).

Scenedesmus n. bildet im normalen Zustande vier zellige Zönobien, die durch die Verbindung der äußeren gallertigen Schichten von vier Zellen zustande kommen.

Senn hat einst hervorgehoben, daß *Scenedesmus obliquus* in sauerstoffreichen Flüssigkeiten freie Zellen bildet, während in luftarmen Lösungen Zönobienbildung vor sich geht (S. 72).

Grintzesco (l.c. S. 241) studierte bei der reinen Alge dieselbe Frage, und kam zu entgegengesetzten Schlüssen. Nach diesem Autor bildet *Scenedesmus obliquus* in der Luft Zönobien, und in luftarmen Medien oder im Vakuum kommt *Scenedesmus* nur ganz vereinzelt vor. Nach Grintzesco verursachen feste Nährsubstrate oder konzentrierte Nährlösungen auch die Isolierung der Zönobienzellen.

Nach den Resultaten von Senn könnte man an der Oberfläche des Wassers bei *Scenedesmus obliquus* kaum eine Zönobienbildung erwarten. Sehr wahrscheinlich sind Senns Resultate, teils auf Verunreinigung der Algen teils auf unbefriedigende Versuchsanordnungen zurückzuführen. Es ist aber möglich, daß die Algen der beiden Autoren zu zwei verschiedenen Rassen gehören.

Ich beabsichtigte bei *Scenedesmus n.* einen sicheren Beweis zu liefern. Meine Resultate waren aber ganz andere als die der beiden oben erwähnten Autoren.

Ich konnte mehrere Zönobien und weniger, vereinzelte Zellen bei den Strichkulturen auf Agar- oder Gelatinenährböden beobachten. Beim tiefliegenden Teil der Stichkulturen in Gelatine-nährböden beobachtete ich auch nicht nur kugelige, vereinzelte Zellen, sondern auch mehrere Zönobien, die aus spindelförmigen, ellipsoidischen, oder sogar aus kugeligen Zellen bestanden (vergl. Tafel III, Fig. 6–9).

Ganz ähnlich verhielt sich auch die Glukoseagarstrichkultur im sauerstoffarmen Medium, das ich mit Pyrogallol und Kalilauge herstellte (siehe weiter unten).

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß die Zönobien unserer oben genannten Varietät, soweit unsere Untersuchungen reichen, gegen den Mediumwechsel ganz indifferent sind. Nach Senn ist eine ähnliche Erscheinung bei *Scenedesmus caudatus* zu finden. Es bleibt nun aber noch die Frage übrig, ob meine Resultate auf ein Rassenmerkmal, oder auf Verschiedenheiten in der Versuchsmethodik zurückzuführen sind, was noch zukünftiger eingehender Studien bedarf.

An dieser Stelle möchte ich noch einige Worte über das *Dactylococcus*stadium des *Scenedesmus obliquus* hinzufügen. *Dactylococcus* wurde zuerst von Nägeli entdeckt und für eine besondere Gattung gehalten.

Gegen die Ansicht Nægelis wurden aber später von mehreren Autoren, namentlich von Grintzesco Einwendungen gemacht. Der letztere bewies nämlich, daß *Dactylococcus infusionum* Nægeli nichts anderes als eine Entwicklungsstufe von *Scenedesmus acutus* ist (1902. S. 245).

Ich konnte auch bei unserer Varietät das *Dactylococcus* stadium auf M- und Gl-Agar finden. In dieser Beziehung habe ich aber keine ausführlichen Versuche angestellt und verweise daher auf die Arbeit von Grintzesco (1902).

Chlorospaera putrida, sp. nov.

Diese Art bildet eine Zellgruppe, die aus einigen bis zu zahlreichen Individuen besteht. Jede Zelle ist mit einer zweischichtigen Zellwand versehen. Die äußere Schicht ist gallertig und dient zur Verbindung der Zellen. Diese Zellgruppe kann durch die Zusammenlagerung von Aplanosporen an Größe zunehmen. Sie ist nach Senn als eine Zellfamilie aufzufassen, weil sie mehrere Generationen enthält.

Ich versuchte festzustellen, in welchem Zusammenhang die Formen der Zellfamilie und die Nährlösungen stehen. Die Resultate sind wie folgt:

Kulturdauer: 20/V—2/VI—22/IX.

M-L	m.M. ¹⁾ Große Zellfamilien.
M-L + Gl. 1%	s.g.M. Zellen kommen vereinzelt vor. Zahlreiche Zoosporen sprießen hervor.
M-L ohne $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{CaCl}_2$ 0.1%	ger.M. Ziemlich große Zellfamilien.
M-L ohne $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{CaCl}_2$ 0.1% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%	g. M. Zellwand dünn. Einige Zellen sind sehr lose mit einander verbunden. Die Nährlösung wurde deutlich sauer.
Dest. Wasser	s.ger.M. Ziemlich große Zellfamilien.

Die kleine Zellfamilie der dritten Kultur löste sich durch Schütteln leicht auf. Merkwürdigerweise konnten sich die Bakterien wegen der Säurebildung der Algen in dieser Kultur

1) Um die Wachstummenge der Algen qualitativ zu bezeichnen, werde ich später in meiner Arbeit die folgenden Abkürzungen brauchen:

s.g.M. = sehr große Menge, g.M. = große Menge, m.M. = mäßige Menge
ger.M. = geringe Menge, s.ger.M. = sehr geringe Menge, k.W. = kein Wachsen.

nicht stark entwickeln. Diese Kultur lieferte daher ein gutes Impfmateriel für die Herstellung einer Reinkultur.

Chlamydomonas koishikavensis, sp. nov.

An ihren natürlichen Standorten entwickeln sich die Chlamydomonaden plötzlich und schwärmen nur kurze Zeit, um bald zum Stillstand zu kommen.

Bei der Kultur von Chlamydomonaden sieht man den beweglichen Zustand auch nur kurze Zeit. Sie verwandeln sich bald in den „Palmellazustand.“ So beobachtete ich bei passender Temperatur den nur kurze Zeit dauernden beweglichen Zustand in $\frac{1}{2}$ M-L wie auch in der Gl-L und anderen passenden Nährlösungen. Weiteres hierüber findet sich im Abschnitt 5.

Auch im Palmellazustand können die Algen wachsen. Bei Agarkulturen sieht man nur ein solches Wachstum. Ich konnte aber nur einmal bewegliche Zellen auf dem Glukosenähragar im Treibhaus beobachten.

Das Vorkommen des Palmellazustandes beruht auf der Verquellung der Zellmembranen, wodurch einzelne Zellen sich mit einander verbinden. Die verbundenen Zellen besitzen eine allgemeine Membran. Infolge weiteren Teilungen bildet jede Zelle einen weiteren Zellkomplex. So können wir bei frischen Kulturen in einander geschachtelte Membranen beobachten. Dies wurde schon von Goroschankin (1890) vermittels ausgezeichneter Tafeln gezeigt.

Bei stickstoffarmer Nährlösung konnte ich leicht die Entwicklung solcher Membranen verfolgen, weil hier das Wachstum der Algen sehr langsam ist. Auf Mineralsalz- oder Glukoseagar bilden die Algen schnell einen großen Zellkomplex, den eine gemeinsame Membran umgibt. Dabei war jede Zelle mit zweischichtiger Gallerte umgeben, und die eigentliche Zellwand erschien etwas verdickt.

Mir scheint die Form des Palmellazustandes bei den Chlamydomonaden nicht anders zu sein als die von *Gloeocapsa*, *Gloeocystis* u.a. Man ist daher nach Senn berechtigt einen Zellkomplex im Palmellazustande der Chlamydomonaden eine Zellfamilie zu nennen.

In der $\frac{1}{2}$ M-L oder Gl-L bildete unsere Art einen großen Zellkomplex. In der M-L, die insofern eine Abweichung von der normalen zeigte, als anstatt Kalziumnitrats Ammonsulfat und Kalziumchlorid benutzt wurden, entwickelte sich ein kleiner lose verbundener Zellkomplex, und die Nährlösung wurde deutlich sauer. Diese Kultur gab ein vortreffliches Impfmateriel für die Erlangung der Reinkultur ab.

Im destillierten Wasser entwickelte sich *Chlamydomonas koishikavensis* zu einer aus 1–6 runden Zellen bestehenden Zellgruppe.

3. Polymorphismus der Algen.

Bezüglich des Polymorphismus der Algen kann man die Angaben von Senn (1899), Burton und Livingston (1900), Grintzesco ('02), Artari (1904) und besonders von Chodat (1909) zum Vergleich ziehen.

Es ist das Verdienst von Chodat, daß er mit Hilfe vieler reinen Kulturen die Entwicklungsgeschichte und damit die Beständigkeit der Algenarten bewiesen hat. Hansgirg (1885, S. 280) hatte sich einst dahin geäußert, daß einzellige Algen, wie *Protococcus*, *Palmella*, *Gloeocystis* und *Stichococcus*, aus fadenförmigen Algen, wie Ulotrichaceen und Chaetophoraceen entstehen. Diese Ansicht war ganz hypothetisch, weil Hansgirg keinen sicheren Beweis dafür gab. Nach Chodat (1909) geht eine Alge, wenn auch polymorph, nie in andere Algen über.

Chodat versteht unter „Polymorphismus“: „qu'une plante peut se présenter sous plusieurs aspects sans changer de nature.“ Somit

unterscheidet sich Polymorphismus klar von der Evolution. Chodat sagt in seiner Arbeit (1909, S. 148): „nous cultivons depuis de longues années toute espèce de Bactéries, de Mycètes, d'Algues et jamais nous n'avons constaté la moindre transformation de ces plantes les unes dans les autres.“

Im Folgenden will ich kurz meine Resultate zeigen:

Chlorella vulgaris, Beij. var. *lutescens*, var. nov.

Diese Alge ist in Bezug auf die Größe sehr variabel, d.i., ihr Durchmesser ist 3–10 μ , sogar 15 μ . Immerhin ist sie der Form nach ziemlich konstant (vergl. auch die Angaben von Chodat und Grintzesco).

Ganz eigentümlicherweise beobachtete ich aber in einer 24%-Glukoselösung unregelmäßig polygonalförmige Zellen. Die Zellwand verdickte sich sehr stark, und jede Zellwand bestand aus vielen Lamellen.

Die Form des Chromatophors ist stark veränderlich. Bei alten Kulturen in Glukosenährmedien wird das Chromatophor völlig zerbrochen, und es treten einzelne grüne Körper auf. In diesem Zustand kann man keine Merkmale der Gattung *Chlorella* wahrnehmen.

Stichococcus bacillaris Näg. var. *viridis*, var. nov.

Diese Varietät ist auch in der Größe sehr variabel; so schwankt die Länge der Zelle zwischen 3 bis 30 μ , die Dicke bleibt aber ziemlich konstant 2–3 μ .

Der Form nach ist sie ziemlich konstant, doch konnte ich einige interessante Variationsformen feststellen, wie aus dem folgenden ersichtlich ist:

$\frac{1}{2}$ M-L, M-Agar ¹⁾ und M-Gelatine	Die Zellen sind gerade, kurz zylindrisch.
Gl-Agar	Die Zellen sind gerade oder gekrümmt, länglich-zylindrisch, oft oval, kugelig, oder kurz zylindrisch.
Gl-Gelatine	Die Zellen sind gerade, länglich-zylindrisch, oft gekrümmt.
Gl-Agar + Ca(NO ₃) ₂ 0.5%	Zellformen wie bei Gl-Agar.
„ + Pepton 0.5%	Fast wie oben, aber etwas kleiner.
„ + KNO ₃ 0.5%	Die Zellen sind ziemlich polymorph: länglich-zylindrisch oval, ellipsoidisch oder kugelig.
„ + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5%	Die Zellen sind zylindrisch, oval oder unregelmäßig kugelig, oft am Ende verzweigt.
„ + NH ₄ Cl 0.5%	Die Zellen sind oval, oft sehr unregelmäßig.
„ + Harnstoff 0.5%	Die meisten Zellen sind am Ende verzweigt.
„ + Asparagin 0.5%	Die Zellen sind länglich zylindrisch, oft mit einem Fortsatze an der Seite der Zellen.

Die zu zweien, dreien, viere oder mehr in Verbindung bleibenden kettenförmigen Formen wurden schon von Artari (1904, S. 609) bei konzentrierten Zuckerlösungen beobachtet. Auch ich konnte sie bei unserer Varietät in 22% Glukoselösung wahrnehmen (vergl. Tafel I, Fig. 12).

Das Chromatophor ist im normalen Zustande der Algen plattenförmig; im schlechten Zustande wird es unregelmäßig und ganz zerbrochen.

Scenedesmus obliquus Ktz. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

Der Polymorphismus dieser Art wurde schon eingehend von Chodat (1909) und Grintzesco (a. a. O.) untersucht. Es scheint daher überflüssig hier näher darauf einzugehen. Die fol-

1) Die Agarkultur in dieser und folgenden Tabellen bezieht sich nur auf einer Strickkultur, die Gelatinekultur aber auf einer Stickskultur.

genden Beschreibungen könnten jedoch als eine Nachprüfung mit einer neuen Varietät gelten.

$\frac{1}{3}$ M-L	Die Zellen sind spindelförmig; Spitze der Zellen stark akut. Vereinzelt oder als Zönobien vorkommend.
M-Agar	Die Zellen sind spindelförmig. Spitze der Zellen schwach akut. Vereinzelt oder als Zönobien vorkommend.
Gl-L	Die Zellen sind spindelförmig, und mit schwach akuter Spitze versehen, oft ellipsoidisch. Vereinzelt oder als Zönobien vorkommend.
Gl-Agar	Ähnlich wie oben, oft kommen aber kugelige Zellen vor.
M-Gelatine	Einige Zellen sind spindelförmig; die meisten Zellen sind aber ellipsoidisch oder kugelig. Merkwürdigerweise entstehen die Zönobien oft aus kugeligen Zellen.
Gl-Gelatine	Die Zellen sind ellipsoidisch oder kugelig. Hier entstehen die Zönobien oft aus kugeligen Zellen.

Das Chromatophor ist im normalen Zustande patrietal und mit einer Spalte versehen; im schlechten Zustande ist es völlig zerbrochen,

Chlorosphaera putrida, sp. nov.

Diese Art ist auch in der Form ziemlich konstant. Sie ist kugelig oder ellipsoidisch. Dagegen ist die Größe der Zellen stark variabel.

$\frac{1}{3}$ M-L und M-Agar	Die Zellen sind 6–20 μ lang, die meisten Zellen aber 10–20 μ . Aplanosporen sind ellipsoidisch, etwa 4 \times 6 μ groß.
Gl-Agar	Schwärmerbildung findet statt; Schwärmer etwa 3 \times 6 μ groß.
7 und 10% Gl-L ¹⁾	Die Zellwand ist stark verdickt; jede Wand zeigt deutliche Lamellen.

Das Chromatophor ist netzförmig und hohlkugelig. Beim Stadium der Sporenbildung wird es undeutlich.

1) Der M-L wurden 7 und 10% Glukose zugesetzt.

Chlamydomonas koishikavensis, sp. nov.

Diese Art ist wie andere Chlamydomonaden stark polymorph. Im unbeweglichen, aber normalen Zustande ist sie oval oder kugelig; im abnormalen Zustande ist sie aber sehr unregelmäßig gestaltet.

$\frac{1}{2}$ M-L	Kugelig 8–10 μ , oder oval 8 \times 14 μ .
2% Gl-L	Kugelig 10–14 μ , oder oval 12 \times 14 μ .
3,4 und 5% Gl-L	Kugelig, nierenförmig oder sehr unregelmäßig gestaltet, oft kommen sehr große Zellen vor. Die äußere Zellwand quillt sehr stark und zeigt deutliche Lamellen (vergl. Tafel. I, Fig. 16, 17, 18).
M-Gelatine	Oval, kugelig oder sogar polyedrisch, 20–30 μ lang.
Gl-Gelatine	Kugelig 20–30 μ , oft sogar 40 μ groß.

Das Chromatophor ist im normalen Zustande tief becherförmig; im schlechten Zustande wird es stark granuliert, so daß die Form undeutlich wird.

Fassen wir die obigen Resultate zusammen, so können wir daraus schließen, daß unsere fünf Algen den Polymorphismus im höheren Grade bei den mit Glukose versehenen Nährmedien als bei den nicht damit versehenen zeigen. Bei Gl-L beobachten wir den Polymorphismus proportional zum Zuckergehalt in einem höheren Grade. Diese Resultate stimmen vollkommen mit denen von Senn, Burton und Livingston überein. Nach Senn (l.c., S. 71) wird die dicke Form von *Scenedesmus acutus* (= *Sc. obliquus*.) durch stark konzentrierte Lösungen verursacht. Ich konnte auch stark verdickte Zellen bei unserer Varietät derselben Art in 5%-Glukoselösung feststellen. Nach Burton und Livingston (l.c., S. 299) hängt der Polymorphismus von *Stigeoclonium tenue* auch mit dem osmotischen Druck der Nährlösung zusammen. Man kann aber nicht behaupten, daß der Polymorphismus der Algen ausschließlich

vom osmotischen Druck abhängt. In gewissen Fällen müssen wir den Polymorphismus tatsächlich eine Eigenschaft der Algen nennen. So müssen z. B. die kugeligen Zellen beim *Palmella*-Zustand von *Chlamydomonas*, oder die *Dactylococcus*-Form von *Scenedesmus obliquus* zu einer Entwicklungsform der betreffenden Alge gehören.

Hier muß ich noch einiges über die Unbeständigkeit der variierten Formen von polymorphen Algen hinzufügen. Grintzesco (l.c., S. 248-254) hat schon bei seinen ausführlichen Versuchen beobachtet, daß die Variation von *Scenedesmus acutus* nur vorübergehend ist. Dies wurde von Chodat (1909) bei zahlreichen Algen bestätigt. Meine Resultate stimmen ebenfalls mit denjenigen der oben genannten Autoren überein. Ich habe *Scenedesmus obliquus* Kütz. var. *non-liquefascies*, var. nov. schon drei Jahre lang in Glukoseagar kultiviert, indem ich die Überimpfungen darin schon mehr als zehn Male ausgeführt habe. Die ellipsoidischen und die mit schwach akuter Spitze versehenen, spindelförmigen Algen, die sich im Gl-Agar entwickelten, veränderten sich bald nach der Überimpfung in eine Minerallösung in der Weise, daß die Algen mit stark akuten Zellenden versehene, spindelförmige Zellen aufwiesen. Wir haben es also bei den Variation von *Scenedesmus* nach Jollos (1914) mit einem Beispiel von temporärer Modifikation zu tun.

4. Bedingungen der Schwärmer- und Gametenbildung.

Es ist ein großes Verdienst von Klebs (1896), zum ersten Mal ausführliche Untersuchungen über die Bedingungen der Zoosporen- und Gametenbildung durchgeführt zu haben. Es ist aber zu bedauern, daß sich seine konsequenten Resultate auf speziereine oder unreine Kulturen begründeten. Es scheint daher nicht überflüssig Nachprüfungen mit reinen Algen angestellt zu haben.

Zunächst schicke ich die Bedingungen für die Zoosporenbildung bei *Chlorosphaera putrida* voraus.

Klebs (l.c., S. 3-89) studierte besonders eingehend die Bedingungen der Zoosporenbildung bei *Vaucheria*. So wurde z. B. die Zoosporenbildung durch Lichtmangel, Mediumwechsel (Übergießen der Algen aus der Nährlösung ins Wasser), Temperatur-Wechsel (Übertragen von niedrigerer Temperatur in die Optimal-Temperatur) und durch Zuckerarten gefördert. Hingegen konnte er, im Gegensatz zur Beobachtung von Walz (1868, S. 499), keine fördernde Wirkung mittels Durchlüftung bestätigen.

Meine Resultate stimmten im großen und ganzen mit denen von Klebs überein. Sie seien im folgenden kurz angeführt.

a) Einfluß des Zuckers.

Chlorosphaera p. bildet üppige Zoosporen auf Glukosenähragar. Nach Klebs (l.c., S. 14) ist *Vaucheria* nur innerhalb der Flüssigkeit imstande Zoosporen zu bilden, was bei unserer Alge ganz anders ist.

Ich untersuchte den Einfluß der verschiedenen C-Verbindungen. Jede C-Verbindung wurde auf M-Agar in einer Dosis von 1% zugesetzt. Nach den Untersuchungen ließ sich annehmen, daß Glukose, Galaktose, Mannit, Raffinose, und Laktose, die Zoosporenbildung fördern. Die Wirkungen der Saccharose und Maltose waren sehr schwach. Bei Anwendung von Mannose und Glyzerin wurde die Zoosporenbildung völlig retadiert. Auch auf M-Agar entstanden die Schwärmer besonders im Sommer; dabei bildet jedoch ein großer Teil der Algen Aplanosporen.

Außerdem untersuchte ich die Beziehung der Zoosporenbildung zu den Konzentrationen von Glukose. Auf Glukoseagar, die 0.5-, 1- und 2%- Glukose enthielten, konnte ich eine üppige Zoosporenentwicklung finden, bei 10%-Gl-Agar aber nicht.

b) Einfluß der Temperatur.

Im Sommer entwickeln sich die Zoosporen nicht nur auf Glukoseagar, sondern auch auf Mineralagar. Im November bis Dezember ist das Wachstum und damit auch die Zoosporenbildung sehr schwach. Im Januar (Kulturdauer: 13/I–18/II) ist das Wachstum sehr schlecht, und die Zoosporenbildung ist völlig sistiert. Ein Kontrollversuch mit M-Agar im Treibhaus (ca. 20°C) produzierte dagegen reichlich Zoosporen. Da wir aber keinen Thermostat für Lichtkulturen besitzen, wurde der Einfluß der Temperatur noch nicht eingehend untersucht. Es ist jedoch sicher, daß die Zoosporenbildung von *Chlorosphaera* bei ziemlich niedriger Temperatur (im Dezember) stattfinden kann. Nach Klebs (l.c., S. 41) liegt die Minimal-Temperatur bei *Vaucheria* bei 3°C.

c) Mediumwechsel.

Nach Klebs (l.c., S. 60) wird eine Zoosporenbildung schon durch das Übertragen einer in 0.05% Nährlösung hergestellten Kultur ins Wasser hervorgerufen. Dabei ist aber Dunkelheit erforderlich, um eine lebhaftere Zoosporenbildung zu verursachen. Meine eigenen Versuche ergaben die gleichen Resultate. Auf M-Agar ins Ruhen getretene Algen wurden in destilliertes Wasser, oder Leitungswasser gegossen, und dann teils im Dunkeln gehalten, teils dem Sonnenlichte¹⁾ direkt ausgesetzt. Die Zoosporen entwickelten sich aber nur bei der Dunkelkultur.

d) Einfluß des Lichtes.

Der obige Versuch läßt erkennen, daß für die Zoosporenbildung von *Chlorosphaera p.* Dunkelheit notwendig ist. Weiterhin habe ich den Einfluß des Lichtes auf Glukoseagarkulturen untersucht. Die Zoosporen entwickelten sich ebenso reichlich in direktem Sonnenlichte¹⁾,

1) Das Sonnenlicht fiel durch das Fenster auf die Algen.

wie im Dunkeln. Die Zoosporen, die sich im Dunkeln entwickelt hatten, waren aber reichlich mit „Granula“ gefüllt und schmutzig grün.

e) Einfluß des Sauerstoffs.

Klebs (l.c. S. 72-81) fand, daß ein Wechsel des Wassers, eine Durchlüftung, und eine Durchleitung von Sauerstoff oder Ozon keine fördernde Wirkung auf die Zoosporenbildung ausübten. Derselbe Autor bestätigte auch, daß die Verringerung des Sauerstoffgehaltes den Prozeß nicht hindert.

Bei meinen Versuchen handelt es sich nur um StICKKulturen im Glukoseagar. Dabei entwickelten sich die Zoosporen an der Oberfläche bis zu einer Tiefe von 2.5 cm des Algenbelags. Tiefer als 2.5 cm konnte ich keine Zoosporen mehr finden. Diese Erscheinung läßt sich durch die Resultate von Klebs erklären. Nach Klebs findet keine Zoosporenbildung von *Vaucheria* bei einem Luftdruck von 0-20 mm statt; erst in einem solchen von 30 mm wurde sie veranlaßt.

Gametenbildung von *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.

Klebs (l.c., S. 429-438) konstatierte bei der Gametenbildung von *Chlamydomonas media* eine fördernde Wirkung infolge von Nährsalzmangel, Licht, und Temperaturwechsel (Übertragen aus niedriger Temperatur in die Optimal-Temperatur). Meine diesbezüglichen Untersuchungen bei *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov. waren unvollkommen. Jedoch konnte ich den durch Nährsalzmangel und Licht hervorgerufenen Einfluß bestätigen. Bezüglich des Temperaturwechsels konnte ich nichts Bestimmtes feststellen.

Als Impfmateriel diente mir Mineralsalzagarkultur. Dies wurde in destilliertes Wasser oder Leitungswasser gegossen, und teils im Lichte¹⁾ und teils im Dunkeln gehalten. Nach fünf Tagen

1) Das Sonnenlicht fiel durch das Fenster auf die Algen.

(19/XI-24/XI) sah ich in der Lichtkultur üppige Gametenbildung, während ich in der Dunkelkultur Zoosporenbildung an Stelle der Gametenbildung fand.

Die Form der Gameten ist derjenigen der Zoosporen sehr ähnlich. Auch in Bezug auf die Größe sind die beiden sich oft sehr ähnlich. Im allgemeinen sind die Gameten etwas kleiner als die Zoosporen. Das entscheidende Unterscheidungsmerkmal ist aber die An- oder Abwesenheit der Zygotenbildung.

Merkwürdigerweise wurde die Gametenbildung von *Chlamydomonas k.* auch durch das Übertragen der Algen von M-Agar-kultur in $\frac{1}{2}$ M-L veranlaßt. Dabei verwandelt sich aber der größte Teil der Algen in palmellaähnliche Zellen, und nur ein kleiner Teil davon ist an der Gametenbildung beteiligt. Nach Klebs hemmt 0.05%- NaNO_3 -Lösung schon deutlich die Gametenbildung bei *Chlamydomonas media*. Es ist sehr fraglich, ob die retardierte Gametenbildung bei unserer Alge sich auf die hemmende Wirkung des in der Nährlösung enthaltenen Nitrats zurückführen läßt. Daher versuchte ich nochmals den Einfluß der stickstoffarmen Nährflüssigkeit auf die Gametenbildung. Die Nährflüssigkeit war dabei die anstatt des Kalziumnitrats mit CaCl_2 versehene $\frac{1}{2}$ M-L. Die Kulturen wurden wieder an derselben Stelle teils dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, und teils im Dunkeln gehalten. Bei der Lichtkultur ergaben sich reichlich Gameten und weniger Zoosporen; bei der Dunkelkultur dagegen nur Zoosporen.

Es bleibt nun noch fraglich, ob die Gametenbildung bei der oben angegebenen stickstoffarmen Nährflüssigkeit wirklich auf den Stickstoffmangel, oder nur auf den Mediumwechsel, d.i., auf die Veränderung des osmotischen Druckes zurückzuführen ist.

V. Ernährungsphysiologie.

1. Reaktion der Nährlösung.

Betreffs der Reaktion der Nährlösung der Algen sind sich die Ansichten früherer Autoren nicht einig. Nach den Untersuchungen von Molisch (1896) sollten die Algen alkalische Reaktion bevorzugen. Später wurden davon aber viele Ausnahmen mitgeteilt, und wir haben keine allgemein gültige Reaktion. Man muß daher bei den einzelnen Algen spezifisch versuchen, ob die eine oder die andere Reaktion bevorzugt wird.

Aus dem folgenden sind die Resultate der verschiedenen Autoren ersichtlich. Es sollen hier aber nur die Resultate bei reinen Algen angeführt werden.

Autoren	Algen	Vorliebe für saure od. alkalische Nährmedien
Artari	<i>Chlorella vulgaris</i>	Alkalische Lösung
„	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Saure L.
„	<i>Chlamydomonas Ehrenbergii</i>	Saure L.
Beijerinck	<i>Chlorella vulgaris</i>	Kultivierbar auf saurem Gelatinenährboden
„	<i>Scenedesmus acutus</i>	Do.
Kufferath	<i>Chlorella luteo-viridis</i> var. <i>lutescens</i>	Saure oder alkalische Lösung ist gleichgültig
Meinhold	Diatomeen	Alkalische Medien
Pringsheim, E.	<i>Euglena viridis</i>	Saure Medien
„	Schizophyceen	Schwach alkalische Medien
Richter, O.	Diatomeen	Alkalische Medien
„ 1)	<i>Stichococcus bacillaris</i>	Üppiges Wachsen auf dem alkalischen Agar

Die Tabelle läßt uns klar erkennen, daß selbst bei ein und

1) Siehe 1911, S. 99.

derselben Alge die Resultate der verschiedenen Autoren nicht übereinstimmen. Dieser Widerspruch beruht sehr wahrscheinlich teils auf der Verschiedenheit der Rassen, teils auf den ungleichen Nährmedien.

Um die Frage zu entscheiden, ob unsere Algen in sauren oder alkalischen Nährlösungen besser gedeihen, stellte ich folgende Kulturversuche mit Artarischer Nährflüssigkeit an.

Artarische Nährflüssigkeit:

Glukose	1	%
NH ₄ NO ₃	0.25	„
KH ₂ PO ₄ od. K ₂ HPO ₄	0.2	„
MgSO ₄	0.025	„
FeCl ₃	Spur	

Die Nährlösung wurde zu je 50 cm³ in Erlenmeyer-Kolben von 200 cm³ Inhalt beschickt. Für jede Reaktion wurden zwei gleichartige Kulturen aufgestellt. Nach dreifacher Sterilisation im Dampftopfe wurden die Kolben mit Algen überimpft.

Impfmateriel: frische Glukoseagarkultur. Im diffusen Lichte. Zimmertemperatur. Versuchsbeginn: 11/VI.

Saure Nährlösung.

Protokolle am Algen	23/VI	3/VII	12/VII
<i>Chlorella l.</i>	g. M.	g. M.	g. M.
<i>Stichococcus v.</i>	ger. M.	ger. M.	ger. M.
<i>Scenedesmus n.</i>	s. ger. M.	s. ger. M.	m. M.
<i>Chlorosphaera p.</i>	m. M.	m. M.	m. M.
<i>Chlamydomonas k.</i>	ger. M.	ger. M.	ger. M.

Alkalische Nährlösung.

Protokolle am Algen	23/VI	3/VII	12/VII
<i>Chlorella l.</i>	g. M.	g. M.	g. M., ähnlich wie in saurer Lös.
<i>Stichococcus v.</i>	g. M.	g. M.	g. M., besser als in saurer Lös.
<i>Scenedesmus n.</i>	g. M.	g. M.	g. M., besser als in saurer Lös.
<i>Chlorosphaera p.</i>	m. M.	g. M.	g. M., besser als in saurer Lös.
<i>Chlamydomonas k.</i>	s. ger. M.	ger. M.	ger M., ähnlich wie in saurer Lös.

Hieraus geht deutlich hervor, daß *Stichococcus*, *Scenedesmus*, und *Chlorosphaera* in basischer Lösung besser als in saurer Lösung wachsen. Bei *Chlorella* ist es einerlei, ob sie in saurer oder basischer Lösung kultiviert wird. Eine Bevorzugung der sauren Lösung läßt sich bei *Chlamydomonas* aus obigem Versuche nicht erkennen; eine solche Vorliebe wurde aber bei der Untersuchung der Nährwerte der N-Verbindungen klar gestellt (vergl. V. 4).

Die Resultate bei *Chlorella* und *Stichococcus* sind ganz anders als die bei Artari. Hier liegt also sehr wahrscheinlich eine Verschiedenheit der Rassen zu Grunde. Meine Resultate schließen sich denen von Beijerinck über *Chlorella vulgaris*, und denjenigen von O. Richter bei *Stichococcus bacillaris* an. Es ist aber noch nicht entschieden, ob die Resultate von diesen Autoren auf einer Verschiedenheit der Rassen oder auf ungleichen Nährmedien beruhen.

Weitere Untersuchungen wurden mit einer anderen Nährlösung angestellt. Die Grundlösung war dabei die folgende:

NH_4NO_3	1 g
KCl	0.25 „
K_2HPO_4 od. KH_2PO_4	0.25 „
MgSO_4	0.25 „

Diese Stoffe wurden in 1000 cm³ destillierten Wassers gelöst.

Diese Grundlösung wurde mit der doppelten Quantität Wasser

verdünnt. Dann wurde nochmals Glukose in einer Dosis von 1% zugesetzt. Versuchsbeginn: 15/VII.

Saure Nährlösung.

Protokolle am Algen	23/VII	6/VIII	10/IX
<i>Chlorella l.</i>	ger. M.	g. M.	g. M.
<i>Stichococcus v.</i>	m. M.	g. M.	g. M.
<i>Scenedesmus n.</i>	ger. M.	ger. M.	m. M.
<i>Chlorosphaera p.</i>	ger. M.	ger. M.	g. M.
<i>Chlamydomonas k.</i>	m. M.	m. M.	g. M.

Alkalische Nährlösung.

Protokolle am Algen	23/VII	6/VIII	10/IX
<i>Chlorella l.</i>	ger. M.	g. M.	g. M., ähnlich wie in KH_2PO_4 .
<i>Stichococcus v.</i>	m. M.	g. M.	g. M., ähnlich wie in KH_2PO_4 .
<i>Scenedesmus n.</i>	s. ger. M.	s. ger. M.	ger. M., schwächer als in KH_2PO_4 .
<i>Chlorosphaera p.</i>	ger. M.	ger. M.	g. M., schwächer als in KH_2PO_4 .
<i>Chlamydomonas k.</i>	ger. M.	m. M.	g. M., ähnlich wie in KH_2PO_4 .

Aus diesen und den vorigen Versuchen folgt, daß das Verhalten der Algen bezüglich der Reaktion der Nährlösung von der Zusammensetzung der letzteren stark abhängig ist. Außerdem muß man die Azidität oder Alkalität berücksichtigen. Jedenfalls konnte ich zu dem Schluß kommen, daß, soweit meine Versuche in Betracht kommen, die Algen, abgesehen von *Chlamydomonas*, keine besondere Vorliebe für die saure oder alkalische Reaktion der Nährmedien haben. Die Sache liegt jedoch anders bei *Chlamydomonas*. Nach den obigen beiden Versuchen ist, wenn auch nur in geringen Maße, eine Bevorzugung der sauren Reaktion zu

bemerken. Dies wurde später bestätigt (vergl. Kapitel 4 des vorliegenden Abschnittes).

2. Verflüssigung der Gelatine.

In diesem Kapitel ist die Arbeit von Beijerinck an erster Stelle zu berücksichtigen. 1890 entdeckte Beijerinck (S. 729, 762) die Gelatineverflüssigung von *Scenedesmus acutus* und *Chlorosphaera limicola*. Dieses Vermögen ist aber bei *Scenedesmus acutus* nach wiederholter Züchtung verloren gegangen (vergl. Beijerinck 1893, S. 368).

Die Gelatineverflüssigung von *Scenedesmus acutus* wurde später auch von Grintzesco (1902, S. 407) und Chodat (1913) beobachtet. Nach dem letzteren Autor gibt es einige Rassen von *Scenedesmus acutus*, die durch mehr oder weniger merkliches Verflüssigungsvermögen ausgezeichnet sind (l.c., S. 30). Nach demselben Autor sind auch *Stichococcus bacillaris* und *St. minor*, wenn auch nur schwach, imstande die Gelatine zu verflüssigen (l.c., S. 148, 158).

Bei meinen eigenen Versuchen dienten mir sowohl M-Gelatine, als auch Gl-Gelatine. Diese hatten, wegen der Gelatine, ziemlich stark saure Reaktion. Die Versuchsanstellung war die bisherige: Zimmertemperatur; diffuses Licht.

Kulturdauer: 2/X, 1912 – 1/V, 1913.

	Stichkultur mit M-Gelatine	Stichkultur mit Gl-Gelatine
<i>Chlorella l.</i>	m. M., keine Verflüssigung.	m. M., keine Verflüssigung.
<i>Stichococcus v.</i>	m. M., keine Verflüssigung.	m. M., keine Verflüssigung.
<i>Scenedesmus n.</i>	ger.M., keine Verflüssigung.	ger.M., keine Verflüssigung.

Die Versuche bei *Scenedesmus n.* wurden mit anderen Nährböden, und zwar mit verschiedenen Konzentrationen der Glukose wiederholt.

Kulturdauer 2/X-2/XI.

Kontrolle (M-Gelatine)	m. M., keine Verflüssigung.
+0.05% Glukose	m. M., keine Verflüssigung.
+ 0.1 „ „	m. M., keine Verflüssigung.
+ 0.5 „ „	m. M., keine Verflüssigung.
+ 1.0 „ „	m. M., aber die größte M., keine Verflüssigung.
+ 2.0 „ „	m. M., keine Verflüssigung.
+ 5.0 „ „	ger. M., keine Verflüssigung.
+10.0 „ „	ger. M., keine Verflüssigung.

Weitere Versuche wurden mit anderen Nährböden ausgeführt. Dieselben wurden wie folgt hergestellt.

Mineralsalzgelatine : M-L+Gelatine 13%

Glukosegelatine : Mineralsalzgelatine+2% Glukose.

Versuchsdauer 22/XII - 6/III.

	Mineralsalzgelatine- stichkultur.	Glukosegelatinestichkultur.
<i>Chlorella l.</i>	m. M., keine Verflüssigung.	g. M., keine Verflüssigung.
<i>Stichococcus v.</i>	m. M., keine Verflüssigung.	g. M., keine Verflüssigung.
<i>Scenedesmus n.</i>	ger.M., keine Verflüssigung.	ger.M., keine Verflüssigung.
<i>Chlorosphaera p.</i>	ger.M., keine Verflüssigung.	g. M., mit deutlicher Verfl.
<i>Chlamydomonas k.</i>	ger.M., keine Verflüssigung.	m. M., keine Verfl.

Aus den obigen Versuchen geht hervor, daß die untersuchten Algen, abgesehen von *Chlorosphaera putrida*, kein Verflüssigungsvermögen besitzen. Auf Grund dieser Tatsachen ist es klar, daß sich die von mir kultivierten Algen, *Stichococcus v.* und *Scenedesmus n.* deutlich von ihren Stammarten unterscheiden lassen.

Das Verflüssigungsvermögen ist, wie Gr i n t z e s c o (l.c., S. 410) bei *Scenedesmus acutus* beobachtete, vom Wachstum abhängig.

So findet bei Glukosegelatinekultur von *Chlorosphaera p.* eine deutliche Verflüssigung statt, während dieselbe bei der Mineralsalzgelatinekultur völlig fehlt.

Zum Schluß seien noch einige Worte über die Abwesenheit der Gelatineverflüssigung bei *Scenedesmus n.* angeführt.

Im allgemeinen ist das Wachstum unserer Alge auf und in Gelatinenährböden schwach. Doch darf man hieraus nicht schließen, daß das schlechte Wachstum die Hauptursache der Abwesenheit der Gelatineverflüssigung ist, weil ich dieselbe Tatsache auch bei ziemlich guter Entwicklung der Algen beobachten konnte.

Diese Erscheinung ist auch nicht einem Verschwinden des Verflüssigungsvermögens zuzuschreiben, das durch wiederholte Überimpfungen der Kulturen hervorgerufen war; denn den frischen Kulturen fehlt dieses Vermögen gleichfalls. Die Abwesenheit des Verflüssigungsvermögens bei unserer Alge muß somit mit ihrer Natur im Zusammenhange stehen.

3. Anaërobismus bei *Scenedesmus obliquus* Ktz. var.
non-liquefasciens, var. nov.

Grintzesco (1902, S. 260) machte uns zum ersten Mal darauf aufmerksam, daß *Scenedesmus acutus* in Gl-Agar eine anaërobe Entwicklung aufweist. Er beobachtete auch die anaërobe Entwicklung von *Chlorella vulgaris* Beij. auf Glukosegelatinenährböden (vergl. Grintzesco 1903, S. 70, 81). Ich konnte bei *Scenedesmus n.* dieselbe Entwicklung beobachten. Der Anaërobismus von *Chlorella vulgaris* ist aber nicht so auffallend, wie der bei *Scenedesmus n.*

Die folgenden Versuche beziehen sich nur auf den Anaërobismus von *Scenedesmus n.*

Zuerst untersuchte ich den Einfluß verschiedener C-Verbindungen auf den Anaërobismus. Alle C-Verbindungen wurden in einer

Dosis von 1% dem M-Agar zugesetzt (siehe „die Nährwerte der verschiedenen Kohlenstoffverbindungen“).

Aus diesen Versuchen folgte, daß *Scenedesmus n.* bei Glukose, Galaktose, Sukrose, Laktose, Maltose, Mannose, und Mannit deutlich anaërob ist. Bei Raffinose, Inulin und Glyzerin ist das Wachstum schwach und der Anaërobismus infolgedessen undeutlich.

Nach Grintzesco (l.c., S. 425) ist *Scenedesmus acutus* in stande, wenn auch nur langsam, sogar im Vakuum zu wachsen. Um diese interessante Erscheinung und damit das Wesen des Anaërobismus klar zu stellen, stellte ich die folgenden Versuche an.

Dabei benutzte ich die Agarstrich- und Agarstichkultur sowohl im sauerstofffreien Medium, als auch in gewöhnlicher Luft. Für Bereitung des sauerstofffreien Mediums dienten mir Kalilauge- und Pyrogallollösung. Diese Mischung wurde in eine weite Röhre gegossen. Ein Drahtgestell, das sich am Boden der weiten Röhre befand, gestattete die Reagenzglaskultur hineinzusetzen. Die Röhre wurde mit einem Kautschukpfropfen luftdicht verschlossen, und einem diffusen Lichte ausgesetzt. Für jedes Medium wurden zwei gleichartige Kulturen hergestellt. Die Versuchsergebnisse waren die folgenden:

Kulturdauer: 18/II–10/V.

	Kontrollkultur in der Luft	O ₂ -freies Medium
M-Agar-Strichkultur.	ger. M. Algen grün, spindelförmig.	s.ger.M. Algen grün, spindelförmig od. ellipsoidisch.
M-Agar-Stichkultur.	ger. M. Algen grün, spindelförmig.	s.ger.M. Algen grün, spindelförmig od. ellipsoidisch.
M-Agar-Schüttelkultur.	Kolonien sind reicher tiefer im Agar.	Fast ähnlich wie die Kontrollkultur.
Gl-Agar-Strichkultur.	ger. M. Algen grün, spindelförmig od. ellipsoidisch.	s.ger.M. Algen grün, spindelförmig, ellipsoidisch sogar kugelig.
Gl-Agar-Stichkultur.	m. M. Algen grün, spindelförmig od. ellipsoidisch. Keine Gasbildung.	m.M. Algen grün, spindelförmig od. ellipsoidisch. Gasbildung wahrnehmbar.

Es ist interessant aus der obigen Tabelle zu ersehen, daß bei

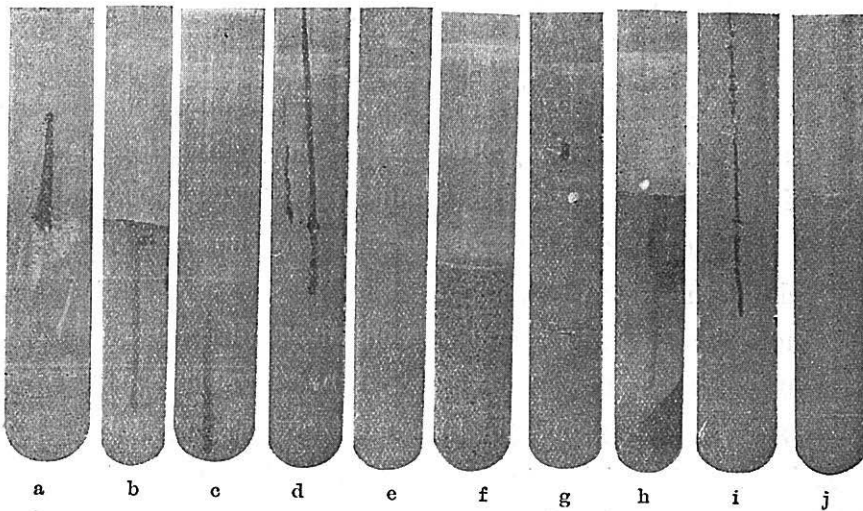


Fig. I.

Kultur von *Scenedesmus obliquus* Kütz. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

a. Gl-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 18/II-13/V.

b. „ -Stichkultur. „ „

c. Stichkultur bei Richters Gl-Agar. Kulturdauer: 11/I-13/V.

Aus den Entwicklungsformen des Belags in a, b und c erkennt man den Anaërobismus der Alge.

d. M-Agar-Strichkultur. Kulturdauer: 18/II-13/V.

e. „ -Stichkultur. „ „

f. Schüttelkultur bei Richters Gl-Agar. Kulturdauer: 11/I-13/V.

g. Gl-Agar-Strichkultur in O₂-freiem Medium. Kulturdauer: 18/II-13/V.

h. „ -Stichkultur „ „ „ „

man sieht hier eine bevorzugte Entwicklung und Gasbildung.

i. M-Agar-Strichkultur in O₂-freiem Medium. Kulturdauer: 18/II-13/V.

j. „ -Stichkultur „ „ „ „

Agarstrichkulturen die Alge eine schwächere Entwicklung im O₂-freien Medium als in der Luft aufweist. Bei Stich- und Schüttelkultur findet kein Unterschied der Entwicklung bei beiden Medien statt. Hieraus geht hervor, daß die geringe Menge des Sauerstoffs in der Agarmasse, die durch Pyrogallolösung nicht erschöpft werden kann, ausreicht, um *Scenedesmus* gedeihen zu lassen. Be-

merkwürdig ist auch, daß das fast vollkommen sauerstofffreie Medium ebensogut wie die Luft die Algenentwicklung schwächt.

Aus obigen Tatsachen geht deutlich hervor, daß unser *Scenedesmus* auf und im Gl-Agar fakultativ anaërob ist. Richtiger scheint es zu sagen, daß er mikroaërophil ist, weil seinem Gedeihen eine wenn auch nur minimale Menge von freiem Sauerstoff nützlich ist.

Hervorzuheben ist noch, daß beim sauerstofffreien Medium der Polymorphismus der Algen stark beschleunigt wurde.

Es fragt sich nun, ob die schwache Entwicklung bei Glukoseagarstrichkulturen nicht auf der Giftwirkung der Spaltungsprodukte der Glukose beruht. Wenn dies der Fall wäre, so sollte man erwarten, daß die Algenentwicklung sehr gut, oder wenigstens ziemlich gut sein müßte. Das trifft aber nicht zu.

Wenn man *Scenedesmus obliquus* var. *non-liquefasciens* eine gewisse Strecke lang auf einer Agarschräge abstreicht, so entwickelt sich die Alge nur auf einem kleinen Teil der überimpften Strecke (siehe, Tafel V, Fig. I. a).

Daß die Verfärbung bei der Strichkultur nur an der Außenseite des Algenbelags auftritt, und daß die Hinterseite desselben lange grün bleibt, zeigen uns auch zur Genüge, daß der Anaërobismus nie im Zusammenhange mit der Giftwirkung der Spaltungsprodukte der Glukose steht. Man darf annehmen, daß die schlechte Entwicklung, eventuell das Absterben von *Scenedesmus* auf der Oberseite der Strichkultur, auf eine direkte Wirkung der Luft zurückzuführen ist.

Die Veränderung der physiologischen Eigenschaften unserer Alge durch Mediumwechsel ist, wie schon Grintzesco (1903, S. 81) betonte, der veränderlichen Natur derselben zuzuschreiben. Man könnte an eine ökologische Bedeutung denken, weil die Alge

beim sauerstoffarmen und zuckerreichen Medium zweifellos im Kampf ums Dasein siegt.

4. Nährwerte der verschiedenen N-Verbindungen.

Es sind uns bei *Chlorella* einige Arten bekannt, die aber durch morphologische Merkmale von einander nicht deutlich zu unterscheiden sind. Artari (1906) beobachtete zum ersten Mal daß die *Chlorella*-Arten bezüglich ihrer physiologischen Merkmale sehr verschieden sind. So konnte er vermittels der Nährwerte der verschiedenen N- und C-Verbindungen eine neue physiologische Art, *Chlorella communis* feststellen (siehe Artari 1906, S. 189).

In seiner im Jahre 1913 erschienenen Arbeit beschrieb er aber die oben erwähnte Alge unter dem Namen von *Chlorella vulgaris* Ktz. var. *communis*¹⁾ Artari (siehe, S. 432, 451).

Nach Artari soll sich *Chlorella communis* durch die Nährwerte der N-Verbindungen von *Chlorella vulgaris* Beij. unterscheiden. Dieser Unterschied ist aber auf die Verschiedenheit der Nährmedien der beiden Autoren zurückzuführen. Beijerinck (1890) benutzte mit Leitungswasser gemischte Gelatine, der nochmals N-Verbindung zugesetzt wurde; dagegen benutzte Artari die Nährlösung. Grintzesco (1903) fand aber auf einem Gelatinenährboden, dessen Herstellung mit dem Beijerinckschen nicht identisch ist, daß für *Chlorella vulgaris* Pepton keine bessere N-Quelle als Nitrat ist.

Danach ist es klar, daß die Nährwerte der N-Verbindungen für *Chlorella*-Arten je nach den Nährmedien variabel sind. Man muß daher immer ein und dasselbe Nährmedium benutzen, um

1) Nach meiner Meinung scheint das sichere Unterscheidungsmerkmal von *Chlorella vulgaris* Grintz, und *Chlorella communis* die Verschiedenheit der Chlorophyllbildung im Dunkeln zu sein. Nach Grintzesco ist die erstere Art im Dunkeln schön grün, dagegen ist nach Artari die letztere im Dunkeln gelbgrün (vergl. auch VI).

die Nährwerte irgend eines Stoffes für die verschiedenen Algen zu bestimmen.

Was die Ernährung von *Stichococcus bacillaris* betrifft, so belehren uns darüber die Arbeiten von Artari (1906), Matruchot et Molliard (1902) und Chodat (1913).

Über die Ernährungsphysiologie von *Scenedesmus* haben uns die Arbeiten von Grintzesco (1902) und Chodat (1913) Aufklärung gegeben.

Über *Chlorosphaera* ist die diesbezügliche Literatur gering. *Chlorosphaera limicola* wurde von Beijerinck (1890) rein gezüchtet, doch nicht eingehend untersucht.

Bezüglich der Reinkulturen von *Chlamydomonas* sind die Arbeiten von Chodat über *Chlamydomonas intermedia* (1913) und bezüglich *Ch. Ehrenbergii* diejenigen von Artari (1913) hervorzuheben. Die Untersuchung des letzteren Autors ist ziemlich ausführlich, obwohl noch manches zu untersuchen übrig bleibt.

Im Folgenden werde ich nunmehr die Resultate unserer Versuche beschreiben.

Bei den Versuchen kam die Artarische Nährlösung in folgender Zusammensetzung zur Anwendung:

Glukose	1	%
K ₂ HPO ₄	0.1	„
MgSO ₄	0.025	„
FeCl ₃	Spur	
N-Verb.	0.5%	(nur Harnstoff in einer Dosis von 0.1%)

Die Nährlösung wurde zu je 50 cm³ in Kolben von 200 cm³ Inhalt verteilt. Nach dreimaliger Sterilisation im Kochschen Dampfstopfe wurden die Kolben mit frischen Algen aus einer Glukoseagarkultur überimpft.

Kulturbedingungen: diffuses Licht; Zimmertemperatur.

Um die relative Wachstummenge der Algen zu bezeichnen, werden später Ziffern dafür angewandt werden. So zeigt I, die größte Wachstummenge, und II, III....zeigen in der Reihenfolge die niedrigeren Wachstummengen.

a) *Chlorella vulgaris* Beij. var. *luteseens*, var. nov.

<div>Anfang: 20/XI</div> <div>N-Quelle.</div>	27/I	5/III
KNO ₂	s. ger. M. IX, hellgrün.	ger. M. IX, gelbgrün.
KNO ₃	ger. M. IV, gelbgrün.	m. M. V, dunkelgrün.
Ca(NO ₃) ₂	ger. M. V, gelbgrün.	m. M. VII, dunkelgrün.
NH ₄ NO ₃	g. M. II, gelbgrün.	g. M. IV, dunkelgrün.
(NH ₄) ₂ SO ₄	g. M. I, dunkelgrün.	g. M. I, dunkelgrün.
Harnstoff	g. M. III, gelbgrün.	g. M. III, dunkelgrün.
Glykokoll	ger. M. VII, gelbgrün.	g. M. II, dunkelgrün.
Asparagin	ger. M. VI, gelbgrün.	m. M. VI, dunkelgrün.
Pepton ¹⁾	ger. M. VIII, gelbgrün.	ger. M. VIII, gelbgrün.

Nach diesen Versuchen sind die besten N-Quellen: Ammonsulfat, Ammonnitrat, Harnstoff. Glykokoll ist aber eine bevorzugte N-Quelle nach längerer Kulturdauer, während dagegen Pepton und KNO₂ die schlechtesten N-Quellen sind. Diese Resultate stimmten im ganzen mit denen von Artari bei *Chlorella communis* überein. Der Harnstoff ist aber bei unserer Varietät eine bessere N-Quelle als bei *Chlorella communis*.

Beachtenswert ist der Nährwert von Pepton. Ich fand bei längerer Kultur mit Detmer's Nährlösung, der verschiedene N-Verbindungen zugesetzt wurden, daß Pepton eine gute N-Quelle war. Darauf werden wir später in VII C zurückkommen.

1) Pepton Witte kam in Anwendung.

b) *Stichococcus bacillaris* Näg. var. *viridis*, var. nov.

Anfang : N-Quelle 7/V	1/VI	1/VII
KNO ₃	m. M. V, dunkelgrün.	g. M. II, dunkelgrün.
Ca(NO ₃) ₂	m. M. VII, grün.	g. M. II, dunkelgrün.
NH ₄ NO ₃	g. M. II, dunkelgrün.	g. M. I, dunkelgrün.
(NH ₄) ₂ SO ₄	g. M. I, dunkelgrün.	g. M. I, braun (Nähr- lösung sauer !)
Harnstoff	g. M. III, dunkelgrün.	g. M. I, dunkelgrün.
Glykokoll	m. M. VI, grün.	g. M. I, dunkelgrün.
Asparagin	g. M. IV, dunkelgrün.	g. M. II, grün.
Pepton	m. M. VIII, grün.	m. M. III, grün.

Nach diesen Versuchen sind also die besten N-Quellen: Ammonsulfat, Ammonnitrat und Harnstoff. Glykokoll ist aber eine gute N-Quelle nach längerer Kulturdauer, während Pepton die schlechteste N-Quelle ist.

c) *Scenedesmus obliquus* Ktz. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

Anfang : N-Quelle 7/V	1/VI	1/VII
KNO ₃	g. M. I, dunkelgrün.	g. M. I, dunkelgrün. Zellen kugelig oder unregelmäßig polygonalförmig.
Ca(NO ₃) ₂	m. M. IV, grün.	g. M. II, grün. Z. ellipsoidisch od. kugelig.
NH ₄ NO ₃	g. M. II, dunkelgrün.	g. M. II, braun. Nährlös. sauer. Zellen ditto, oft <i>Dactylococcus</i> -ähnliche Formen.
(NH ₄) ₂ SO ₄	g. M. III, dunkelgrün.	g. M. II, braun. Nährlös. sauer. Verdickt spindelförmig, oft ovalförmig.
Harnstoff	m. M. V, grün.	g. M. II, dunkelgrün. Spindelförmig, ellipsoidisch oder kugelig.
Glykokoll	s. ger. M. VI, gelbgrün.	ger. M. IV, gelbgrün. Spindelf. od. ellipsoidisch.
Asparagin	s. ger. M. VI, gelbgrün.	g. M. II, grün. Spindelf. od. ellipsoidisch.
Pepton	k. W. VII.	ger. M. III, gelbgrün. Ellipsoidisch od. kugelig.

Die besten N-Quellen sind also KNO₃, NH₄NO₃ und (NH₄)₂SO₄. Harnstoff und Asparagin sind aber auch bevorzugte

N-Quellen bei längerer Kultur, während Glykokoll und Pepton keine guten N-Quellen sind.

d) *Chlorosphaera putrida*, sp. nov.

Anfang: 14/V N-Quelle	1/VI	1/VII
KNO ₃	g. M. II, grün.	g. M. III, dunkelgrün.
Ca(NO ₃) ₂	ger. M. V, grün.	m. M. IV, grün.
NH ₄ NO ₃	m. M. III, grün.	m. M. V, dunkelgrün.
(NH ₄) ₂ SO ₄	g. M. I, grün.	m. M. V, braun.
Harnstoff	k. W. VII,	g. M. I, dunkelgrün.
Glykokoll	s. ger. M. VI, grün.	ger. M. VI, gelbgrün.
Asparagin	m. M. IV, grün.	g. M. II, dunkelgrün.
Pepton	k. W.	ger. M. VI, grün.

Hier sind also die besten N-Quellen: Ammonsulfat und KNO₃; Glykokoll und Pepton dagegen nicht. Bei Harnstoff und Asparagin wird das Wachstum erst nach längerer Kulturdauer gefördert, was uns eine Bildung von Ammoniumverbindungen vermuten läßt.

e) *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.

Die Versuche bei dieser Art ergaben ein schlechtes Resultat. Sie wuchs in KNO₃, Glykokoll, Asparagin und Pepton nur spärlich. In andern N-Verbindungen zeigte sie keine Entwicklung. Dann stellte ich eine saure Nährlösung her, die KH₂PO₄ anstatt K₂HPO₄ in der oben genannten Nährlösung enthielt. Die Versuchsanordnung war die bisherige.

Anfang: 15/VII N-Quelle	23/VII	6/VIII	10/IX
KNO ₃	k. W.	ger. M., grün.	ger. M., grün.
Ca(NO ₃) ₂	k. W.	ger. M., grün.	ger. M., grün.
NH ₄ NO ₃	s. ger. M.	ger. M., grün.	ger. M., grün.

N-Quelle	Anfang: 15/VII	23/VII	6/VIII	10/IX
(NH ₄) ₂ SO ₄		s.ger.M.	ger. M. grün.	ger. M. grün.
Harnstoff		k. W.	k. W.	k. W.
Glykokoll		s.ger.M.	s.ger.M.	s.ger.M.
Asparagin		m. M. Schwärmer kommen vor.	g. M.	g. M. grün.
Pepton		k. W.	k. W.	ger. M. grün.

Aus den obigen Versuchen geht deutlich hervor, daß unsere *Chlamydomonas*, wie *Chlamydomonas Ehrenbergii*, eine besondere Vorliebe für saure Nährlösung hat. Die beste N-Quelle ist dabei Asparagin; dann folgen der Reihe nach Nitrat und Ammoniumverbindungen.

Zum Schluß dieses Kapitels möchte ich die Nährwerte von Bouillon angeben. Diese wurde wie üblich mit Liebig's Fleischextrakt hergestellt und tüchtig neutralisiert. Je 7 cm³ davon wurden in die Probierröhren gegossen. Diese wurden dann nach der Sterilisation mit Algen überimpft. Die Resultate waren die folgenden:

Algen	Anfang: 15/V	8/VI	3/VII
<i>Chlorella l.</i>		ger. M.	ger. M., grün. Keine Entfärbung!
<i>Stichococcus v.</i>		k. W.	k. W.
<i>Scenedesmus n.</i>		k. W.	k. W.
<i>Chlorosphaera p.</i>		ger. M.	ger. M., grün. Keine Entfärbung!
<i>Chlamydomonas k.</i>		k. W.	k. W.

5. Nährwerte der verschiedenen C-Verbindungen.

Bezüglich dieser Nährwerte sei auch auf die Arbeit von Artari über *Chlorella communis* verwiesen. Nach diesem Autor

(1906, S. 187) sind die besten N-Quellen für *Chlorella communis*, Glukose, Galaktose, Saccharose, und Laktose. In Anwesenheit von Xylose, Arabinose und Mannose wächst sie aber nicht.

Ich untersuchte mit einer Artarischen Nährlösung, die Nährwerte verschiedener C-Verbindungen bei *Chlorella l.* Die Nährlösung hatte die folgende Zusammensetzung:

NH_4NO_3	0.25	%
KH_2PO_4	0.20	„
MgSO_4	0.025	„
FeCl_3	Spur	
C-Verbindungen	1.0	%

Die Versuchsanstellung war wie früher. Die Resultate waren wie folgt:

a) *Chlorella vulgaris* Beij. var. *lutescens*, var. nov.

Anfang: 20/XI C-Quelle	23/XII	27/I	5/III
Glycerin	s. ger. M. X	X, hellgrün.	X, gelbgrün.
Mannit	ger. M. VIII	VII, gelbgrün.	III, dunkelgrün.
Glukose	g. M. I	I, dunkelgrün.	I, dunkelgrün.
Mannose	g. M. IV	IV, dunkelgrün.	V, dunkelgrün.
Galaktose	g. M. II	II, dunkelgrün.	VI, dunkelgrün.
Saccharose	g. M. III	III, dunkelgrün.	II, dunkelgrün.
Maltose	m. M. VI	V, dunkelgrün.	IV, dunkelgrün.
Laktose	s. ger. M. IX	IX, hellgrün.	IX, gelbgrün.
Raffinose	m. M. V	VI, gelbgrün.	VII, gelbgrün.
Inulin	ger. M. VII	VIII, gelbgrün.	VIII, gelbgrün.

Die weiteren Versuche wurden mit Agarnährboden ausgeführt, und ich wandte meine besondere Aufmerksamkeit der Farbenveränderung der Algen zu. Ich bediente mich dabei des Mineral-

salzagars, dem verschiedene C-Verbindungen in einer Dosis von 1% zugesetzt wurden. Für jede C-Verbindung wurden zwei gleichartige Kulturen hergestellt. Diese wurden im diffusen Licht und in der Zimmertemperatur aufgestellt.

Anfang 21/VI M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.		Stichkultur.	
	23/VIII	13/XI	23/VIII	13/XI
Glyzerin	ger. M., grün.	dunkelgrün.	ger. M., grün.	dunkelgrün.
Mannit	g. M., gelbgrün.	gelbgrün.	ger. M., grün.	gelbgrün.
Glukose	g. M., grün, teils gelbgrün.	gelbgrün.	ger. M., grün.	Oberfläche grün. Innerer Teil gelb- grün.
Mannose	g. M., gelbgrün.	gelbgrün-gelb.	ger. M., gelbgrün.	Oberfl. gelbgrün. Inn. gelb.
Galaktose	g. M., grün, teils gelbgrün.	gelbgrün.	ger. M., grün.	Oberfl. gelbgrün. Inn. gelb.
Saccharose	ger. M., grün.	m. M. dunkelgrün.	ger. M., grün.	Oberfl. gelbgrün. Inn. gelb.
Maltose	g. M., dunkelgrün.	dunkelgrün.	ger. M., dunkelgrün.	Oberfl. dunkelgrün. Inn. gelbgrün.
Laktose	ger. M., grün.	dunkelgrün.	ger. M., grün.	dunkelgrün.
Raffinose	ger. M., grün.	dunkelgrün.	m. M., grün, anaërob!	dunkelgrün.
Inulin	ger. M., grün.	dunkelgrün.	ger. M., grün.	dunkelgrün.
Kontroll (M- Agar)	ger. M., grün.	dunkelgrün.	ger. M., grün.	dunkelgrün.

Fassen wir die gewonnenen Resultate bei Flüssigkeits- und Agarkulturen zusammen, so sind die bevorzugten C-Quellen: Glukose, Galaktose, Saccharose, Mannose und Maltose. Im Gegensatz zu *Chlorella communis* liebt unsere Alge Laktose nicht. Der Nährwert von Mannose ist auch bei beiden Algen verschieden.

Um die Farbenveränderung im Laufe der Kultur näher zu beobachten, wurden die weiteren Versuche mit Agarkulturen angestellt. Die Versuchsanstellung war fast dieselbe wie früher; C-Verbindungen wurden aber in einer Dosis von 2% zugesetzt.

Anfang 4/XII M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.			Stichkultur.		
	10/II	3/III	29/IV	10/II	3/III	29/IV
Mannit	g. M., teils grün, entfärbt.	gelb- grün.	gelb- grün.	g. M., dunkelgrün, ohne Gasbil- dung.	grün.	ent- färbt!
Mannose	g. M., gelbgrün, entfärbt.	gelb- grün.	gelb- grün.	ger. M., dunkelgrün, mit Gasbil- dung.	ent- färbt!	
Galaktose	g. M., teils grün, entfärbt.	gelb- grün.	gelb- grün.	g. M., grün, mit Gas- bildung.	ent- färbt!	
Saccharose	g. M., dunkelgrün.	dunkel- grün.	ent- färbt!	g. M., grün, mit Gas- bildung.	ent- färbt!	
Maltose	g. M. grün.,	grün.	keine Entfärb- ung.	g. M., dunkelgrün, mit Gasbil- dung.	ent- färbt!	

Bezüglich der Farbenveränderung verweise ich auf den Abschnitt VII.

b) *Stichococcus bacillaris* Näg. var. *viridis*, var. nov.

Anfang 21/VI M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.		Strichkultur.	
	23/VIII	13/XI	23/VIII	13/XI
Glyzerin	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
Mannit	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
Glukose	g. M., grün.	gelbgrün, ent- färbt!	ger. M., grün.	gelbgrün, entfärbt.
Mannose	g. M., grün.	gelbgrün, ent- färbt!	ger. M., grün.	g. M., gelbgrün, entfärbt.
Galaktose	ger. M., dunkelgrün.	g. M., dunkelgrün.	m. M., anaërob.	g. M., dunkelgrün.
Saccharose	ger. M., grün.	grün.	g. M., grün.	grün.
Maltose	g. M., dunkelgrün.	dunkelgrün.	g. M., dunkelgr.	dunkelgrün.
Laktose	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
Raffinose	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
Inulin	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
M-Agar	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.

Nach diesen Resultaten sind die besten C-Quellen: Glukose, Mannose und Maltose. Galaktose fördert das Wachstum nach

längerer Zeitdauer. Glycerin, Mannit, Saccharose, Laktose, Raffinose und Inulin sind keine guten C-Quellen. Nach Matruchot und Molliard (1902, S. 193) sind die guten C-Quellen für *Stichococcus bacillaris*, Glukose, Glycerin, Mannit, Saccharose, Maltose, Laktose &c. Diese Resultate weichen von den meinigen ab. Nach Chodat (1913, S. 152) ist Laktose keine gute C-Quelle für *Stichococcus bacillaris*. Es ist noch zweifelhaft, ob bei der Angabe von Matruchot und Molliard nicht Wahres mit Falschem gemischt ist, oder ob eine neue Varietät vorliegt.

Weitere Versuche wurden mit einem Zusatz von zwei-prozentigen C-Verbindungen ausgeführt.

Anfang 4/XII M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.			Stichkultur.		
	10/II	3/III	29/IV	10/II	3/III	29/IV
Mannose	g. M., dunkelgrün.	keine Entfärbung.	entfärbt.	g. M., dunkelgrün.	entfärbt.	Entf. deutlich.
Galaktose	g. M., dunkelgrün.	keine Entf.	keine Entf.	g. M., dunkelgrün.	entfärbt. Gasbildung.	Entf. schwach.
Maltose	g. M., dunkelgrün.	keine Entf.	keine Entf.	g. M., dunkelgrün.	entfärbt.	Entf. deutlich.

c) *Scenedesmus obliquus* Ktz. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

Anfang 21/VI M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.		Stichkultur	
	23/VIII	13/XI	23/VIII	13/XI
Glycerin	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
Mannit	s. ger. M., gelbgrün.	gelbgrün.	ger. M., grün.	gelbgrün.
Glukose	s. ger. M., gelbweiß.	weiß.	g. M., gelbgrün. grün.	Oberfläche weiß. Innerer Teil gelbgrün.
Mannose	s. ger. M., gelbweiß.	weiß.	ger. M., gelbgrün.	g. M., gelbgrün.
Galaktose	s. ger. M., gelbweiß.	weiß.	ger. M., grün.	Oberfl. weiß. Inn. gelbgrün.

Anfang 21/VI M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.		Stichkultur.	
	23/VIII	13/XI	23/VIII	13/XI
Saccharose	s. ger. M., grün.	gelbgrün.	m. M., grün.	grün.
Maltose	s. ger. M., gelbweiß.	gelbweiß.	g. M., gelbgrün.	Oberfl. weiß. Inn. gelbgrün.
Laktose	s. ger. M., gelbgrün.	gelbweiß.	g. M., grün.	Oberfl. weiß. Inn. grün.
Raffinose	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
Inulin	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.
M-Agar	ger. M., grün.	grün.	ger. M., grün.	grün.

Scenedesmus obliquus ist, wie schon erwähnt, im kohlenstoffreichen Medium an seinem Anaërobismus leicht zu erkennen. Bei der Strichkultur übt die Luft eine giftige Wirkung aus. Man muß daher die Nährwerte der C-Verbindungen immer vermittels Stichkultur untersuchen. Nach den oben erwähnten Stichkulturen sind gute C-Quellen: Glukose, Galaktose, Maltose, Laktose und Mannose.

d) *Chlorosphaera putrida*, sp. nov.

Anfang 20/VI M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.			Stichkultur.		
	17/VII	10/IX	22/X	17/VII	10/IX	22/X
Glyzerin	ger. M., IV, grün. Fester Algenbelag.	II, grün.	grün.	ger. M. grün.	III, grün.	grün.
Mannit	g. M., II, grün. Flüssiger Belag.	I, grün.	gelbgrün.	m. M. grün.	III, gelbg.	gelbgrün.
Glukose	s. g. M., I, grün. Flüssiger Belag.	I, grün.	gelbgrün.	g. M. grün. Gasbildung!	I, grün.	grün.

Anfang M-Agar + C-Quelle 1% 20/VI	Strichkultur.			Stichkultur.		
	17/VII	10/IX	22/X	17/VII	10/IX	22/X
Mannose	g. M. IV, grün. Fester Belag.	II, grün.	grün.	m. M., grün.	II, grün.	grün
Galaktose	s. g. M. I, grün. Flüssiger Belag.	?	?	g. M., grün. Gasbildung!	II, grün.	grün.
Saccharose	m. M. III, grün. Fester Belag.	II, grün.	grün.	m. M., grün.	III, gelbg.	gelbgrün.
Maltose	m. M. III, grün. Fester Belag.	II, grün.	grün.	m. M., grün.	III, gelbg.	gelbgrün.
Laktose	g. M. II, grün. Flüssiger Belag.	I, grün.	gelbgrün.	m. M., grün.	III, gelbg.	gelbgrün.
Raffinose	g. M. II, grün. Flüssiger Belag.	I, grün.	gelbgrün.	m. M., grün.	III, gelbg.	gelbgrün.
M-Agar	m. M. III. Etwas flüssiger B.	II, grün.	grün.	m. M., grün.	III, grün.	grün.

Nach diesen Versuchen fördern Glukose, Galaktose, Mannit, Laktose und Raffinose das Wachstum von *Chlorosphaera putrida*. Diese Art gedeiht aber auch auf M-Agar, was uns den Vergleich der Nährwerte der verschiedenen Stoffe erschwert.

e) *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.

Anfang M-2 Agar -Quelle 1% 20/VI	Strichkultur.		Stichkultur.	
	17/VII	10/IX	17/VII	10/IX
Glyzerin	ger. M., grün.	II, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.
Mannit	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	I, grün.
Glukose	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.
Mannose	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.
Galaktose	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.
Saccharose	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	I, grün.
Maltose	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.

Anfang 20/VI M-Agar + C-Quelle 1%	Strichkultur.		Stichkultur.	
	17/VII	10/IX	10/IX	10/IX
Laktose	m. M., dunkelgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.
Raffinose	ger. M., gelbgrün.	I, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.
M-Agar	ger. M., gelbgrün.	II, dunkelgrün.	ger. M., grün.	II, grün.

Aus diesen Resultaten geht klar hervor, daß alle untersuchten C-Verbindungen, abgesehen von Glyzerin, das Wachstum von *Chlamydomonas koishikavensis* fördern. Die beschleunigende Wirkung aller C-Verbindungen war sich aber so ähnlich, daß ich keinen Unterschied finden konnte.

Bei dieser Art findet keine Entfärbung statt. Dieselbe Tatsache wurde auch bei Anwendung der Glukoselösungskultur konstatiert. Näheres darüber findet man im Abschnitt VII.

6. Nährwerte der organischen Säuren.

Miquel soll der erste gewesen sein, der sich mit der Ernährung der organischen Säuren durch reine Algen beschäftigte (vergl. Richter, 1911 S. 36). Ausführliche Untersuchungen findet man aber erst in der Arbeit von Treboux (1905, S. 432). Dieser benutzte die Kalium- und Ammoniumsalze der verschiedenen organischen Säuren, und die Untersuchung dehnte sich auf etwa 40 Arten von Algen aus. Ein Teil dieser Algen war aber ohne Zweifel unrein oder nur speziesrein, wenn er auch alle Arten für rein gehalten hat. Es ist daher schwer zu wissen, wieweit seine Resultate richtig sind.

Treboux arbeitete immer mit Dunkelkulturen, um CO₂-Assimilation zu beseitigen. Dabei fand er merkwürdigerweise, daß im allgemeinen Kaliumacetat eine gute C-Quelle ist.

Meine diesbezüglichen Untersuchungen wurden nur mit dem Kaliumsalz organischer Säuren und zwar im diffusen Lichte ausgeführt.

Da die untersuchten Algen im Lichte eine giftige Säure¹⁾ (Ameisensäure!) bilden, so war es nötig, die Nährwerte der Salze der organischen Säuren im Lichte zu untersuchen.

Als Grundlösung diente mir $\frac{1}{2}$ M.-L., der jedes Salz in einer Dosis von 0,1% (nach Treboux ist 0,5% schon giftig) zugesetzt wurde. Von dieser Nährlösung wurden je 20 cm³ in Kolben von 50 cm³ Inhalt gegossen. Nach der Sterilisation wurden die Kolben mit Algen beschickt. Die Kulturbedingungen waren die bisherigen: diffuses Licht und Zimmertemperatur.

a) *Chlorella vulgaris* Beij. var. *lutescens*, var. nov.

Anfang: 1/X Salz	22/X	5/XI	17/XII
Kalium formicum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	ger. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. aceticum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. butyricum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. lacticum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. oxalicum	g. M., grün.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. succinicum	ger. M.	ger. M., hellgr.	ger. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. malicum	m. M.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. tartaricum	g. M., grün.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. citricum	g. M., grün.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.
K. benzoicum	k. W.	k. W.	k. W.
M.-L.	ger. M.	ger. M., hellgr.	g. M., grün. Zellform normal. Pyrenoid deutlich.

1) Über den Nachweis von Ameisensäure verweise ich auf VII, E.

b) *Stichococcus bacillaris* Näg. var. *viridis*, var. nov.

Anfang: 1/X Salz.	22/X	5/XI	17/XII
K. formicum	ger. M.	ger. M., hellgr.	g. M., grün. Zellform normal, oft oval od. rund.
K. aceticum	m. M.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal.
K. butyricum	k. W.	k. W.,	s. ger. M. Zelle lang.
K. lacticum	ger. M.	g. M., grün.	g. m., grün. Zellform normal.
K. oxalicum	g. M.	g. M., grün.	g. m., grün. Zellform normal.
K. succinicum	ger. M.	m. M., grün.	g. m., grün. Zellform normal, oft oval od. rund.
K. malicum	m. M.	g. M., grün.	g. m., grün. Zellform normal.
K. tartaricum	g. M.	g. M., grün.	g. m., grün. Zellform normal.
K. citricum	g. M.	g. M., grün.	g. m., grün. Zellform normal.
K. benzoicum	k. W.	k. W.	k. W.
M-L	ger. M.	m. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal.

c) *Scenedesmus obliquus* ktz. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

Anfang: 1/X Salz.	22/X	5/XI	17/XII
K. formicum	k. W.	k. W.	k. W.
K. aceticum	k. W.	s. ger. M.	ger. M., grün !. Polymorph: spindelförmig oder stark verdickt.
K. butyricum	k. W.	k. W.	k. W. Zellform normal.
K. lacticum	ger. M.	g. M., grün	g. M., grün. Polymorph: oft verdickt.
K. oxalicum	s. g. M., grün.	s. g. M., dunkelgr.	s. g. M., teils, Zellform normal, gelb, 4-8 zellige Zönobien.
K. succinicum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	ger. M., grün. Zellform normal, 4-8 zellige Zönobien.
K. malicum	m. M.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal, 4-8 zellige Zönobien.
K. tartaricum	g. M.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal, 4-8 zellige Zönobien.
K. citricum	g. M.	g. M., grün.	g. M., grün. Zellform normal, 4-8 zellige Zönobien.
K. benzoicum	k. W.	k. W.	k. W.
M-L	ger. M.	ger. M., grün.	ger. M., grün. Zellform normal.

d) *Chlorosphaera putrida*, sp. nov.

Anfang: 1/X Salz	22/X	5/X	17/XII
K. formicum	k. W.	k. W.	Kein W.
K. aceticum	ger. M.	m. M., grün.	g. M., III, grün. Große Zönobien mit Aplanosporen.
K. butyricum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	ger. M., V, grün. Kleine Zönobien mit Aplanosporen u. Zoosporen.
K. lacticum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	ger. M., VI, grün. Große Zönobien mit Aplanosporen u. Zoosporen.
K. oxalicum	g. M.	g. M., grün.	s. g. M., I, grün. Große Zön. mit Aplanosp.
K. succinicum	k. W.	s. ger. M.	ger. M., VII, hellg. Keine Zön. mit Apl. u. Zoosp.
K. malicum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	g. M., III, grün. Große Zön. mit Apl.
K. tartaricum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	m. M., IV, grün. Große Zön. mit Apl.
K. citricum	ger. M.	ger. M., hellgrün.	s. g. M., II, grün. Große Zön. mit Apl.
K. benzoicum	k. W.	k. W.	K. W.
M-L.	ger. M.	ger. M., hellgrün.	ger. M., VII, grün. Große Zön. mit Apl. u. Zoosp.

e) *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.

Anfang: 1/X Salz	22/X	5/XI	17/XII
K. formicum	m. M.	g. M., VI, grün.	g. M., III, grün. Zygosporien reichlich.
K. aceticum	s. g. M., grün.	s. g. M., III, grün.	s. g. M., II, grün. Zygosporien reichlich.
K. butyricum	g. M.	s. g. M., III, grün.	s. g. M., III, grün. Zygosporien reichlich.
K. lacticum	ger. M.	ger. M., V, grün.	s. g. M., II, grün. Zygosporien reichlich.
K. oxalicum	s. g. M.	s. g. M., I, grün.	s. g. M., I, grün. Nur vegetative Zellen. Kugelig oder oval.
K. succinicum	m. M.	g. M., IV, grün.	g. M., III, grün. Nur vegetative Zellen. Kugelig oder oval.
K. malicum	g. M.	s. g. M., III, grün.	s. g. M., I, grün. Zygosporien reich.
K. tartaricum	s. g. M.	s. g. M., II, grün.	s. g. M., I, grün. Zygosporien reich.
K. citricum	g. M.	s. g. M., III, grün.	s. g. M., II, grün. Zygosporien reich.
K. benzoicum	k. W.	K. W.	k. W.
M-L	g. M.	s. g. M., III, grün.	s. g. M., I, grün. Zygosporien reich.

Nach obigen Resultaten seien hier übersichtlich die Nährwerte der organischen Säuren für die fünf Algen angeführt.

	Gute C-Quelle.	Schlechte C-Quelle.	Giftige Salze.
<i>Chlorella l.</i>	K. oxalicum, malicum, tartaricum, citricum.	K. formicum, succinicum.	K. benzoicum.
<i>Stichococcus v.</i>	K. oxalicum, malicum, tartaricum, citricum, aceticum, lacticum.	K. formicum.	K. benzoicum butyricum.
<i>Scenedesmus n.</i>	K. oxalicum, malicum, tartaricum, citricum, lacticum.	K. aceticum, succinicum.	K. benzoicum, formicum, butyricum.
<i>Chlorosphaera p.</i>	K. oxalicum, malicum, tartaricum, citricum, aceticum.	K. lacticum, succinicum.	K. benzoicum, formicum.
<i>Chlamydomonas k.</i>	K. oxalicum, tartaricum.	K. formicum, butyricum, succinicum.	K. benzoicum.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß Oxal-, Äpfel-, Zitronen- und Weinsäure, abgesehen von Äpfel- und Zitronensäure bei *Chlamydomonas k.*, die allgemein bevorzugten C-Quellen waren. Essigsäure war, im Gegensatze zum Resultate von Treboux, keine gute C-Quelle. Es ist aber möglich, daß dieser Widerspruch auf einer Verschiedenheit der Kulturbedingungen (im Licht oder im Dunkeln) oder auf ungleichem Versuchsmaterial beruht.

Benzoösaures Kalium ist für alle untersuchten Algen giftig. Ähnlich verhält sich ameisensaures Kalium. Die Giftwirkung dieser Säuren ist wahrscheinlich, wie K. Aso (1906, S. 24) schon vermutete, auf das Zurückbleiben der freien Säuren zurückzuführen.

Betrachten wir nun das Assimilationsvermögen der untersuchten Algen mit organischen Säuren, so sehen wir, daß *Scenedesmus n.* dieses am schwächsten besitzt. Daraus darf man den Schluß ziehen, daß *Scenedesmus n.* am schlechtesten an verunreinigten Orten in der Natur gedeiht, weil da die Gegenwart von Salzen der verschiedenen organischen Säuren am meisten zu vermuten ist.

Bei den obigen Resultaten ist noch zu bemerken, daß *Sticho-*

coccus v. und *Scenedesmus n.* in schlechten Medien Polymorphismus zeigen. Man sieht ihn bezüglich *Stichococcus v.* bei K. formicum, und succinicum, und bezüglich *Scenedesmus n.* bei K. aceticum und lacticum.

Beachtenswert ist auch, daß bei *Chlorosphaera p.* in schlechten Nährmedien Zoosporenbildung vor sich geht.

7. Grenzkonzentrationen der Glukose.

Bei einigen Pilzen und Bakterien hat man bereits feststellen können, daß sie gegen höhere Konzentrationen von Zucker widerstandsfähig sind, z. B., *Aspergillus repens* gegen 80%-Zucker, *Bacterium vernicosum* gegen 70%-Rohrzucker (vergl. Pütter, 1911, S. 190-191):

Bezüglich solcher Untersuchungen der Algen verweise ich auf die Arbeit von Artari (1906). Derselbe stellte fest, daß die Grenzkonzentration der Glukose für *Chlorella communis* etwa bei 22%, und für *Stichococcus bacillaris* etwa bei 25% liegt. Er fand ferner, daß die Grenzkonzentration der Monosaccharide doppelt so niedrig wie die der Disaccharide ist, weswegen man die Einwirkung des Zuckers für osmotisch hält (S. 209).

Nach dem Verhältnis zur Konzentration der N-Quellen unterschied schon Beijerinck (1901, S. 561) drei Arten von Mikroorganismen.

1. oligonitrophile.
2. mesonitrophile.
3. polynitrophile.

In Berücksichtigung aller Stoffe schlug aber Pütter (1911, S. 190-191) die folgenden Namen vor.

1. oligotrophophile.
2. mesotrophophile.

3. polytrophophile.

Artari (1913, S. 451) veränderte der Kürze wegen die obigen Namen zu:

1. oligotrophe.

2. mesotrophe.

3. polytrophe.

Dabei betonte Artari, daß diese Eigenschaften leicht durch die Grenzkonzentrationen der Glukose bestimmt werden könnten.

Um das Verhalten der untersuchten Algen gegen konzentrierte Glukoselösungen zu bestimmen, habe ich die folgenden Untersuchungen ausgeführt, bei denen ich mich $\frac{1}{2}$ M-L bediente, der Glukose¹⁾ in den verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt wurde. Diese Lösung wurde zu je 20 cm³ in Kolben von 50 cm³ Inhalt beschickt, und wie üblich sterilisiert. Nach der Sterilisation wurden Kolben mit frischen Algen aus Gl-Agar überimpft. Die Kolben standen im diffusen Licht und in der Zimmertemperatur.

Die Resultate waren die folgenden:

Erste Versuche, Versuchsdauer: 14/V-3/VII.

	<i>Chlorella l.</i>	<i>Stichococcus v.</i>	<i>Chlorosphaera p.</i>	<i>Chlamydomonas k.</i>
Gl. 5%	—	—	g. M., grün.	Spür.
10%	—	—	Spur.	k. W.
20%	ger. M., grün.	ger. M., hellgrün.	k. W.	k. W.
22%	ger. M., grün.	ger. M., hellgrün.	—	—
25%	ger. M., grün.	s. ger. M., hellgrün.	k. W.	k. W.

1) Pulverige Glukose von Merck wurde in Dessikator völlig getrocknet. Nach chemischer Analyse erwies sie sich als ganz wasserfrei und rein.

Zweite Versuche, Versuchsdauer : 22/X-12/XII.

	<i>Chlorella l.</i>	<i>Stichococcus v.</i>	<i>Scenedesmus n.</i>	<i>Chlorosphaera p.</i>	<i>Chlamydomonas k.</i>
3%	—	—	g. M., gelbg.	—	g. M., grün.
4%	—	—	g. M., gelbg.	—	g. M., grün.
5%	—	—	ger. M., grün.	—	g. M., grün.
7%	—	—	—	g. M., grün.	s. ger. M.
9%	—	—	—	m. M., grün.	—
10%	—	—	—	m. M., grün.	—
11%	—	—	—	Spur.	—
23%	ger. M. grün.	Spur.	—	—	—
24%	ger. M. grün.	Spur.	—	—	—
25%	Spur.	k. W.	—	—	—
26%	k. W.	Spur.	—	—	—

Dritte Versuche, Versuchsdauer : 20/I-30/VII.

	<i>Scenedesmus n.</i>	<i>Chlorosphaera p.</i>	<i>Chlamydomonas k.</i>
5%	g. M.	—	—
6%	k. W.	—	—
7%	—	—	ger. M.
8%	—	—	ger. M.
10%	—	—	Geringe Menge an der Glaswand außerhalb der Nährlösung.
11%	—	k. W.	—
12%	—	k. W.	—
13%	—	k. W.	—

Nach obigen Versuchen wurden die Grenzkonzentrationen wie folgt bestimmt:

Chlorella l. 25%

Stichococcus v. 24%

Scenedesmus n. 5%

Chlorospaehra p. 10%

Chlamydomonas k. . . . 8%

Hervorzuheben ist, daß die Grenzkonzentration von *Chlorella vulgaris* var. *lutescens* erheblich größer ist als die von *Chlorella communis*.

Die Bedeutung der Prozente war aber bei den Untersuchungen beider Algen ungleich. Artari gab ein gewisses Gramm auf (also +) je 100 cm³- Nährlösung als ein gewisses Prozent an, während ich unter solchem ein gewisses Gramm in (also inklusiv) je 100 cm³- Nährlösung verstehe. Meine gleichprozentige Lösung muß demnach etwas konzentrierter sein als die entsprechende von Artari. Wenn also unsere *Chlorella* mit *Chlorella communis* identisch wäre, so müßte die Grenzkonzentration bei unserem Versuch unter 22% liegen. Das ist aber nicht der Fall. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß hier eine Verschiedenheit der Rassen vorliegt.

Es war mir aber unmöglich die Fehlerquelle gänzlich fernzuhalten. Durch Sterilisation und Transpiration während der Kulturdauer wird die Kulturlösung immer konzentrierter. Die Virulenz des Impfmateri als soll gleichfalls einen Einfluß auf die Resultate ausüben. Somit stimmt das Resultat wiederholter Versuche mit den früheren nicht völlig überein.

Bezüglich der Grenzkonzentrationen der Glukose möchte ich die folgende Klassifikation vorschlagen.

- I. Oligotrophe Algen, die gegen schwächere Konzentrationen als 5 % Glukose widerstandsfähig sind.

Scenedesmus obliquus var. *non-liquefasciens*.

- II. β -mesotrophe Algen, die gegen Konzentrationen von 5% bis 10% Glukose widerstandsfähig sind.

Chlamydomonas koishikavensis.

Chlorosphaera putrida.

α -mesotrophe Algen, die gegen Konzentrationen von 10 bis 20% widerstandsfähig sind.

Beispiel fehlt.

III. Polytrophe Algen, die gegen größere Konzentrationen als 20% widerstandsfähig sind,

Chlorella communis (nach Artari).

Stichococcus bacillaris (nach Artari).

Chlamydomonas Ehrenbergii (Nach Artari).

Chlorella vulgaris var. *lutescens*.

Stichococcus bacillaris var. *viridis*.

Wieweit dieser Vorschlag in der Algenphysiologie Zustimmung finden wird, muß ich dahingestellt sein lassen.

8. Unsere Algen als Leitorganismen für die Wasser-
-beurteilung.

Bereits im Jahre 1853, lange bevor die Krankheitserreger entdeckt waren, gelang es Cohn, durch mikroskopische Wasseruntersuchungen zu bestimmten Schlüssen bezüglich des Reinheits- bzw. Verschmutzungsgrades des Wasser zu gelangen. Eine zusammenfassende Darstellung davon wurde aber erst 1875 veröffentlicht (siehe Cohn, 1875 I, S. 108 ff.). Dies Jahr wird deshalb gewöhnlich als das Geburtsjahr der mikroskopischen Wasseranalyse angesehen. Dieses Verfahren wurde später durch die bakterioskopischen Untersuchungen von Koch und anderen verdrängt, ohne für längere Zeit weitere Erfolge zu bringen. Dann erschienen aber wieder Untersuchungen der Abwässer auf mikroskopischem Wege und die mikroskopische Methode trat wieder in ihre Rechte. Hervorzuheben ist hier besonders das große Werk von Mez (1898).

Mez gebührt das Verdienst zusammenfassende Bearbeitungen

gemacht und zahlreiche Begleitorganismen der Abwässer beschrieben zu haben.

In neuerer Zeit ist die mikroskopische Wasseranalyse durch die gründlichen Arbeiten von Kolkwitz und Marsson (1902, '08) wieder auf eine Grundlage gestellt worden. Man nennt diese Methode „Saprobiensystem“; so konnten diese Autoren je nach den Verschmutzungsgraden drei Phasen der Wässer und die sie begleitenden Organismen feststellen. Sie seien hier kurz erwähnt.

I. Zone der Polysaprobien. Hier werden Eiweiß, Polypeptide und ihre hochmolekularen Abbauprodukte zersetzt.

II. Zone der Mesosaprobien. Diese Zone zerfällt in zwei Unterzonen.

α -mesosaprobe Zone.

Hier entstehen beim Abbau der hochmolekularen Verbindungen Aminosäuren und Ammoniaksalze.

β -mesosaprobe Zone.

Diese Zone ist etwas reiner als die vorige und durch die Gegenwart von Aminosäuren, Ammoniaksalzen und besonders von Nitriten und Nitraten charakterisiert.

III. Zone der Oligosaprobien.

Diese Zone ist die Zone der vollendeten Oxydation, und zeigt deswegen vorwiegend mineralisierte N-Verbindungen.

Bei jeder Zone lassen sich verschiedene Leitorganismen feststellen. Betreffs dieser Leitorganismen verweise ich auf das Original. Das Saprobiensystem von Kolkwitz ist für die praktische Anwendung schon ausreichend; es ist jedoch noch nicht wissenschaftlich genau, weil die Resultate vorwiegend auf ökologischem Wege erzielt wurden. Daher wäre eine genaue Nachprüfung auf experimentellem Wege sehr erwünscht, obgleich kaum anzunehmen ist,

daß dadurch an dem System etwas Wesentliches geändert werden würde.

Schon Artari (1913, S. 464) hat hierauf hingewiesen und hat auf experimentellem Wege *Chlamydomonas Ehrenbergii* für einen α -mesosaprogen event. polysaprogen Organismus gehalten, was etwas von dem Resultat von Kolkwitz abweicht (vergl. Kolkwitz, 1908, S. 514).

Nunmehr gehe ich zur Schilderung unserer Resultate über.

Die untersuchten Algen gedeihen nicht nur bei anorganischen, sondern auch bei Aminosäuren und Säureamiden. Sie lieben jedoch nicht die hochmolekularen N-Verbindungen, wie Pepton und Fleischextrakt (in der Nährbouillon). Demnach müssen sie den Mesosaprogen angehören.

Chlorella l., *Stichococcus v.*, *Chlorosphaera p.*, und *Scenedesmus n.* haben eine besondere Vorliebe anfangs für anorganische N-Verbindungen, bei längerer Kultur aber auch für Harnstoff, Glykokoll oder Asparagin. Sie trägt daher eigentlich den β -mesosaprogen Charakter. Etwas anders verhält sich aber *Chlamydomonas k.* Diese bevorzugt besonders Asparagin. Sie läßt sich daher eigentlich in die α -Mesosaprogen einreihen.

Vergleichen wir diese Resultate mit denen von Kolkwitz u. Marsson (l.c. 1908, S. 510 ff.), und Kolkwitz (1911, S. 389 ff.), so finden wir eine fast vollkommene Übereinstimmung.

Nach meinen Versuchen.	Nach dem System von Kolkwitz u. Marsson.
<i>Chlorella vulgaris</i> var. <i>lutescens</i> β -mesosaprob	<i>Chlorella vulgaris</i> α -mesosaprob.
<i>Stichococcus bacillaris</i> var. <i>viridis</i> β -mesosaprob	<i>Stichococcus bacillaris</i> .. β -mesosaprob.
<i>Scenedesmus obliquus</i> var. <i>non-liquefasciens</i> .. β -mesosaprob	<i>Scenedesmus acutus</i> β -mesosaprob.
<i>Chlorosphaera putrida</i> β -mesosaprob	
<i>Chlamydomonas koishikavensis</i> α -mesosaprob	

Bezüglich des Verhaltens von *Chlorella vulgaris*, so ist da eine Differenz. Ich weiß aber nicht, ob die von Kolkwitz

untersuchte *Chlorella vulgaris* einer Stammart oder einer Rasse angehört. Da die Tabelle des Saprobiensystems von Kolkwitz gerade die physiologische Rasse nicht berücksichtigt, so bedarf es einer neuen Bearbeitung vermittels experimenteller Untersuchungen.

9. Ernährungsphysiologische Beziehungen zwischen
Algen und *Azotobacter*.

a) Isolierung von *Azotobacter chroococcum* var. und die
Merkmale desselben.

Bereits im Jahre 1888 bemerkte B. Frank, daß der Sandboden durch die Entwicklung von Algen an Stickstoff bereichert wurde, (vergl. B. Frank 1889, S. 34). Das Stickstoffbindungsvermögen der Algen wurde später durch die Untersuchungen von Schloesing und Laurent (1891), Bouilhac (1897) und neuerdings Heinze (1906) festgestellt. Die Untersuchungen dieser Autoren gründeten sich aber auf unreine Algen. Wieweit daher die Tätigkeit echter Algen dabei beteiligt ist, bleibt noch nachzuweisen.

Freien Stickstoff bindende Bakterien wurden, wie bekannt, zum ersten Mal von Beijerinck (1901) isoliert, nämlich *Azotobacter chroococcum* und *Az. agilis*.

Andere N-bindende Bakterien wurden von Löhnis (1905) gefunden. Ihre Tätigkeit war aber schwächer als die von *Azotobacter*.

Es ist von Beijerinck und Delden (1902, Bd. IX, S. 30) behauptet worden, daß das reinkultivierte *Azotobacter* kein N-bindendes Vermögen besitzt, und daß solches nur unter der Mitwirkung von saprophytischen Bakterien, wie *Granulobacter*, und *Aërobacter* zustande kommt. Diese Auffassung wurde aber von Gerlach und Vogel (1902, Bd. IX, S. 820.) und Freudenreich (1903, Bd. X, S. 520) als unrichtig bewiesen. Wir können jetzt mit Bestimmtheit von dem N-bindenden Vermögen des reinen *Azotobacters* sprechen.

Was nun aber das N-bindende Vermögen der Algen betrifft, so wurde dasselbe den reinen Chlorophyceen von Kossowitsch (1894), und Krüger und Schneidewind (1900) abgesprochen.

Nach E. Pringsheim (1913, S. 54) scheint das N-bindende Vermögen der Schizophyceen, das von mehreren Forschern hervorgehoben wurde, auf der Ausnützbarkeit des von gemischten Bakterien assimilierten Stickstoffs durch gewisse Cyanophyceen zu beruhen.

Hinsichtlich der Symbiose zwischen Algen und *Azotobacter* gibt es auch mehrere Untersuchungen. Nach Reinke (1903 b) und Keutner (1903) beherbergen sowohl die Süßwasser- als auch die Meeresalgen, ja sogar die Planktonten, *Azotobacter* oder *Clostridium*.

Man darf aber die Symbiose zwischen den beiden Organismen nicht mit der Gegenwart von *Azotobacter* auf den Algen nachweisen wollen. Es ist eine Mischkultur der reinen Algen und des reinen *Azotobacter* erforderlich, um die Symbiose zwischen beiden klar zu stellen. Diesbezügliche Untersuchungen sind aber sehr spärlich. Beijerinck (1901, S. 576) bemerkt in seiner Arbeit, „Auch habe ich mehrere Versuche angestellt, um symbiotische Wachstumsförderung zu erreichen, zwischen niederen Algen und *Azotobacter*. Dafür verwendete ich einige Reinkulturen meiner Sammlung, nämlich die Chlorophyceen, *Stichococcus major*, *Chlorella vulgaris*, *Cystococcus humicola*, *Pleurococcus vulgaris*, *Chlorococcum infusionum*, und die Cyanophycee *Anabaena catenula*. Bisher konnte ich damit jedoch noch keine bedeutenden Resultate erzielen.“

Es drängen sich einem dann die Fragen auf: Können die Algen nicht den von *Azotobacter* gebundenen Stickstoff assimilieren? Können die ersteren tatsächlich nicht, worauf Beijerinck schon hinwies, die Wachstumsförderung des letzteren erreichen?

Um mir hierüber einige Klarheit zu verschaffen, unternahm ich die folgenden Untersuchungen. Ich ging dabei von der

Isolierung von *Azotobacter chroococcum* var. aus. Diese Varietät wurde aus dem Boden des hiesigen Botanischen Gartens isoliert. Die Isolierungsmethode war ähnlich derjenigen von Beijerinck (1901, S. 568, 574). Die Nährlösung wurde wie folgt hergestellt:

Leitungswasser	100 cm ³
Mannit	2 g
K ₂ HPO ₄	0.02 „

Die Nährlösung wurde mit einer kleinen Menge Bodenerde in Kolben von 200 cm³ Inhalt gegossen und im Thermostat bei 25°C gehalten. Nach einigen Tagen bildete sich auf der Oberfläche der Nährlösung eine dicke Kahmhaut. Eine Platinöse davon wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, und ein Tropfen dieser Lösung wurde dann ins Mannit-oder ins Glukoseagar gegossen, und so eine Plattenkultur hergestellt.

Mannit-und Glukoseagar wurden auch nach Beijerinck hergestellt, d.i.:

H ₂ O	100 cm ³
Mannit od. Glukose	2 g
K ₂ HPO ₄	0.02 „
Agar	2 „

Nach einigen Tagen erhielt ich bei 30°C viele Bakterienkolonien. Unter dem Mikroskop zeichnete sich *Azotobacter* durch seine Größe und Form vor anderen Bakterien deutlich aus. Aus einer *Azotobacter*kolonie wurde die zweite Plattenkultur hergestellt. Man muß schließlich durch das isolierte *Azotobacter* die Abwesenheit anderer Bakterien nachweisen können. Kultiviert man das erhaltene *Azotobacter* in Nährbouillon, und tritt keine Trübung der letzteren ein, so ist seine Reinheit erwiesen (vergl. Gerlach u. Vogel, 1902, Bd. IX, S. 820).

Ich erhielt reines *Azotobacter* zweimal; die erste Isolierung

fand im März 1913 statt, die zweite im Mai 1914. Seine Heimat war immer die Erde des hiesigen Bot. Gartens.

Im folgenden werde ich eine kurze Übersicht der wichtigsten Merkmale des isolierten *Azotobacter* geben.

Kolonie: unregelmäßig ründlich; kleisterartig und undurchsichtig. Eine 10 Tage alte Kolonie auf Mannitagar bei 30°C hatte den Durchmesser von etwa 8 mm.

Individuum: ellipsoidisch, aus zwei Zellen bestehend, d.i. *Diplococcus*-artig; die Länge eines Individuums betrug 4–10 μ ; die Breite 2–5 μ ; die Involutionsformen waren oft 20 μ und darüber lang.

Grammsche Färbung: Positiv.

Geißelfärbung: Peritriche Geißel. Zwei Geißeln an den Polen der Zellen sind beständig, die anderen fallen leicht ab. [Die Geißelfärbung ist ein schwieriges Problem. Ich arbeitete immer mit einer Kultur, jünger als 24 Stunden, und nach dem von Löffeler empfohlenen und von Fischer etwas modifizierten Verfahren (vergl. Strasburger, Bot. Pract. 1897, S. 405)].

Färbung mit Jodjodkaliumlösung: Winzige zahllose Körnchen sind mit dieser Lösung färbbar, die nach Jones (1913, S. 19) aus einer glykogenartigen Substanz bestehen.

Sporenfärbung: Mit dieser sind die einzelnen Granula in jeder Zelle färbbar; sie sind wahrscheinlich mit den „Gonidia-Spores“ von Jones identisch. (Beijerinck bemerkte am *Azotobacter* kein Vorkommen von Sporen, aber die Anwesenheit eines Kernes. Dagegen behauptete Prasmowski das

Vorhandensein von Endosporen beim *Azotobaeter*. Jones (l.c., S. 19) entdeckte die mit Anilinfarbstoffen färbbaren Granula und nannte diese „Gonidia-Spores.“ Nach Jones teilen sich diese Gonidiosporen beim Zerfallen der Zellen. Nach dem Zerfallen der Zellen sind sie oft mit Zilien versehen und bewegbar. Sie werden später zu neuen Zellen. Nach Jones scheinen die Gonidiosporen identisch zu sein mit den von alten Autoren als Kern oder Endosporen bezeichneten Körperchen.)

Kultur in Nährbouillon: Keine Trübung.

Mannitagar, Strichkultur: g. M.; der Belag zerfließt leicht.

Mannitagar, Stickskultur: m. M.; aërobe Entwicklung.

Glukoseagar, Strichkultur; s. g. M.; anfangs ist der Belag konsistent, später aber zerfließt er.

„; Stickskultur: ger. M., aërobe Entwicklung.

Farbstoffbildung: alte Kultur auf Mannit- oder Glukoseagar wird gelbbraun.

Infolge des Vorhandenseins peritricher Geißeln steht das isolierte *Azotobacter* dem von Jones am nächsten. Wegen des zerfließbaren Belags auf Agarnährböden identifiziere ich mein *Azotobacter* als *Azotobacter chroococcum*, var. *A*₁, Jones.

b) Kulturversuche mit Agarnährböden.

Es war mir viel daran gelegen festzustellen, ob der von *Azotobacter* gebundene Stickstoff leicht durch seine Zellen austreten kann. Um mir darüber einige Klarheit zu verschaffen, kultivierte ich Algen und *Azotobacter* auf Agarnährböden, die keine Stickstoffverbindung enthielten. Nach etwa einmonatlicher Versuchsdauer (5/V–10/VI) konnte ich noch keine bemerkbare Wachs-

tumsförderung der Algen beobachten. Die Parallelkulturen waren wie folgt:

	Auf Glukoseagar nach Beijerinck.	Auf Mannitagar nach Beijerinck.
<i>Chlorella l.</i>	m. M., der Belag vergilbt leicht.	s. ger. M., grün.
<i>Stichococcus v.</i>	s. ger. M., grün.	s. ger. M., grün.
<i>Scenedesmus n.</i>	s. ger. M., grün.	s. ger. M., grün.
<i>Azotobacter ch. A₁</i> . .	g. M.	g. M.

Bei gemischter Kultur war das Wachstum des *Azotobacter* gut; jedoch konnte ich nicht entscheiden, ob es von den Algen gefördert wurde. Die weiteren Versuche bezogen sich auf die Ernährungsbeziehung zwischen getötetem *Azotobacter* und Algen. Eine 19 Tage alte Kultur von *Azotobacter* wurde auf Mannitagar im Dampftopfe sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde ein und dasselbe Nähragar, ohne etwaigen Zusatz von Nährsalzen, mit Algen überimpft. Nach etwa zwei monatlicher Versuchsdauer erhielt ich die folgenden Resultate:

	<i>Chlorella l</i>	<i>Stichococcus v</i>	<i>Scenedesmus n</i>
Kontrollkulturen der Algen	s. ger. M.	s. ger. M.	s. ger. M.
Strichkultur der Algen mit getötetem <i>Azotobacter</i>	s. ger. M.	Etwas größere M. als die Kontrolle.	s. ger. M.
Stichkultur der Algen mit getötetem <i>Azotobacter</i>	Etwas größere M. als die Kontrolle.	Etwas größere M. als die Kontrolle.	k. W.

Bei diesen Resultaten sieht man also nur wenig Wachstumsförderung der Algen; der Förderungsgrad war aber so schwach, daß ich auf eine beschleunigende Wirkung des *Azotobacters* nicht mit Bestimmtheit schließen konnte.

Bei Agarkulturen war es ein großer Nachteil, daß die Algen sich dabei wegen der Spuren von beigemengtem Stickstoff ent-

wickeln können, was die Resultate sehr trübt. Die weiteren Versuche machte ich daher mit Flüssigkeitskulturen.

c) Kulturversuche mit Nährlösungen.

Die Nährlösung wurde nach Gerlach und Vogel (1902 Bd. IX, S. 818) hergestellt. Sie hatte die folgende Zusammensetzung:

H ₂ O	1000 cm ³
Glukose	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 „
CaCO ₃	0.5 „
NaCl	0.5 „
FeSO ₄	Spur.

Diese Lösung wurde zu je 100 cm³ in Kolben von etwa 200 cm³ Inhalt beschickt. Nach dreimaliger Sterilisation wurden die Kolben mit frisch gewonnenem *Azotobacter* und frischen Algen überimpft.

Eine Reihe dieser Kolben wurde in diffusem Licht und bei Zimmertemperatur gehalten; und andere wurden anfangs im Dunkeln und später im Licht kultiviert. Die Versuchsprotokolle waren die folgenden:

I. Kultur im Licht; Kulturdauer: 31/V '13–10/II '14.

Sterile Kolben.	2 kolben	Klar
<i>Azotobacter</i> .	4 kolben	Große Menge von <i>Azotobacter</i>
<i>Chlorella l.</i>	2 kolben	Klar
<i>Stichococcus v.</i>	„	Spur von Alge
<i>Scenedesmus n.</i>	„	Klar
<i>Chlorella l.</i> + <i>Azotobacter</i>	2 kolben	g. M. von Alge
<i>Stichococcus v.</i> + <i>Azotobacter</i>	„	m. M. von Alge
<i>Scenedesmus n.</i> + <i>Azotobacter</i>	„	m. M. von Alge

II. Dunkel- und Lichtkultur.

Kultur im Dunkeln: von 3/V-22/IX.

Nachfolgende Kultur im Lichte: von 22/IX-10/II.

		22/IX	10/II
Steril	(2 kolben)	Klar	Klar
<i>Azotobacter</i>	(4 kolben)	Große Menge von Az.	Größere Wachstumsmenge als bei Lichtkultur
<i>Chlorella l.</i>	(2 kolben)	Klar	Klar
<i>Stichococcus v.</i>	(2 kolben)	Klar	Klar
<i>Scenedesmus n.</i>	(2 kolben)	Klar	Klar
Ch + Az	(2 kolben)	Ein Kolben grün, anderer Kolben nicht grün	g. M. von Alge; grün
St + Az	(2 kolben)	Nicht grün	m. M. von Alge; hellgrün
Sl + Az	(2 kolben)	Nicht grün	ger. M. von Alge; hellgrün

Am 10/II konnte ich in den Kolben keine oder kaum merkliche Reaktion der Glukose finden. Die Nährlösung zeigte auch mit Diphenylaminlösung keine Nitratreaction. Daher wurde sie der chemischen Analyse unterworfen.

Die Nährlösung sammt den Organismen aus je zwei Kolben wurde in eine Abdampfschale gegossen. Sie wurde durch Zusatz von H_2SO_4 sauer gemacht und durch Abdampfen stark kondensiert. Dann wurde sie, wie üblich, nach Kjeldahl behandelt. Die Resultate waren die folgenden:

Lichtkultur	N-Gehalt in 200 cm ³ der Nährlösung	Zunahme von N	Differenz der Stickstoffmengen bei <i>Azotobacter</i> und Az. + Algen.
Steril	0.70 mg		
<i>Azotobacter</i>	5.32 } 5.41 "	4.71 mg	
<i>Chlorella l.</i>	5.49 }		
	0.56 "		
Ch + Az.	6.30 "	5.74 "	1.03

Lichtkultur	N-Gehalt in 200 cm ³ der Nährlösung	Zunahme von N	Differenz der Stickstoff- mengen bei <i>Azotobacter</i> und <i>Az.</i> + Algen
<i>Stichococcus v.</i>	0.63 mg		
<i>St.</i> + <i>Az.</i>	6.16 „	5.53 mg	0.82
<i>Scenedesmus n.</i>	0.56 „		
<i>Sc.</i> + <i>Az.</i>	6.16 „	5.60 „	0.89

Dunkel- und Lichtkultur	N-Gehalt in 200 cm ³ der Nährlösung	Zunahme von N	Differenz der Stickstoff- mengen bei <i>Azotobacter</i> und <i>Az.</i> + Algen.
Steril	0.56 mg		
<i>Azotobacter</i>	5.88 } 5.67 „	5.11 mg	
<i>chlorella l.</i>	5.46 }		
<i>Chlorella</i> + <i>Az</i>	0.56 „	7.15 „	2.04
<i>Stichococcus v.</i>	7.71 „		
<i>St.</i> + <i>Az.</i>	0.70 „	6.16 „	1.05
<i>Scenedesmus n.</i>	6.86 „		
<i>Sc.</i> + <i>Az.</i>	0.70 „	5.32 „	0.21
	6.02 „		

Aus den obigen Versuchen geht klar hervor, daß die untersuchten Algen den von *Azotobacter* gebundenen Stickstoff assimilieren können, ohne selbst ein N-bindendes Vermögen zu besitzen.

Merkwürdigerweise üben die Algen, wie man aus obigen Tabelle ersieht, eine beschleunigende Wirkung auf die N-Bindung von *Azotobacter* aus; und zwar bei *Chlorella l.* in der Lichtkultur, und bei *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* in der Dunkel- und Lichtkultur. Das zeigt eine symbiotische Beziehung zwischen *Azotobacter* und Algen. Die Algen assimilieren etwaige N-Verbindungen von *Azotobacter*, und dies wird von den Algen in seinem Wachstum gefördert.

Worauf die beschleunigte N-Bindung des *Azotobacter* beruht, ist noch nicht entschieden. Nach der Arbeit von Gerlach und Vogel (1902, Bd. VIII, S. 671) hängt der N-Gewinn des *Azotobacter* sehr von der Durchlüftung ab. So war der N-Gewinn pro 1000 cm³ bei

flach ausgebreiteter Glukosenährlösung 18 mg, während er bei dick ausgebreiteter Nährlösung nur 5.1 mg betrug.

Man sollte erwarten, daß bei einer Mischkultur der von Algen gebildete Sauerstoff eine fördernde Wirkung auf die N-Bindung von *Azotobacter* ausübt. Die Algenentwicklung beginnt aber erst im krankhaften Zustande von *Azotobacter*. Es scheint daher noch fraglich, ob die beschleunigte N-Bindung bei der Mischkultur wirklich auf der Durchlüftung der Algen beruht.

Nun noch einige Worte über die gebundene N-Menge. Aus den Arbeiten von Beijerinck (1902, Bd. IX, S. 33) und Freudenreich (1903, Bd. X, S. 520) läßt sich erkennen, daß die unreine Kultur des *Azotobacter* eine größere N-Menge als die Reinkultur bindet. Handelt es sich aber um die Reinkultur, so üben noch die Virulenz (Beijerinck und Delden l.c., S. 5. Gerlach u. Vogel, (1902, Bd. IX, S. 890), die Durchlüftung (Gerlach u. Vogel, a. a. 0) und die Zuckermengen (Gerlach u. Vogel Bd. IX, S. 819) auf die gebundene N-Menge ihre verschiedenen Einflüsse aus. Je nach den verschiedenen Kulturbedingungen ist die gebundene N-Menge so variabel, daß man die Resultate verschiedener Autoren nicht ohne Weiteres mit einander vergleichen kann.

Daher vergleiche ich meine Resultate nur mit denjenigen von Gerlach u. Vogel. Nach Gerlach und Vogel ist der N-Gewinn von *Azotobacter chroococcum* pro Gramm Traubenzucker durchschnittlich 8.9 mg (Bd. IX, S. 819). Nach meinen eigenen Versuchen ist derselbe pro Gramm Traubenzucker 4.7—5.1 Mg. Ob das schwächere N-bindende Vermögen von meinem *Azotobacter* sich auf schlechtere Kulturbedingungen oder auf eine Verschiedenheit von Rassen zurückführen läßt, muß noch dahingestellt bleiben.

Ich stellte dann eine abermalige Mischkultur von *Azotobacter*

und Algen her. In diesem Falle wurden die Versuche aber auf zwei weitere Algen ausgedehnt. Die Nährlösung wich insofern von der früheren ab, daß anstatt der Glukose Mannit verwandt wurde. Das Impfmateriel von *Azotobacter* wurde wiederum frisch gewonnen. Es erwies sich als identisch mit der früher isolierten Varietät. Die Versuchsanordnungen waren wie früher. Alle Kulturen standen aber nur im diffusen Licht.

Die Versuchsprotokolle:

Angestellt, 21/V	24/VII	10/IX	10/X
Steril (4 kolben) <i>Azotobacter</i> (4 k.)	Klar Große Menge von Az.	Klar Große Menge von Az.	Die meisten Bakterien wurden braun
<i>Chlorella</i> + Az. (3 k.)	Algenentwicklung deutlich	g. M. von Alge; grün	Grün
<i>Stichococcus v.</i> + Az. (3 k.)	Algenentwicklung deutlich	g. M. von Alge; grün	Grün
<i>Scenedesmus n.</i> + Az. (4 k.)	Algenentwicklung deutlich	ger. M. von Alge; grün	Gelbgrün
<i>Chlorosphaera p.</i> (2 k.)	Klar	Klar	
<i>Chlorosphaera p.</i> + Az. (3 k.)	Algenentwicklung deutlich	ger. M. von Alge; grün	Gelbgrün
<i>Chlamydomonas k.</i> (2 k.)	Klar	Klar	
<i>Chlamydomonas k.</i> + Az. (3 k.)	Algenentwicklung deutlich	ger. M. von Alge; grün	Gelbgrün

Gegen jede Erwartung wurden fast alle Kulturen von Pilzen befallen, so daß ich keine chemische Analyse ausführen konnte. Immerhin ließ sich feststellen, daß fünf der untersuchten Algen kein N-bindendes Vermögen besaßen, und daß sie erst infolge des von *Azotobacter* gebundenen Stickstoffs zu wachsen vermochten. Die Entwicklung von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* war dabei besser als die von *Scenedesmus n.*, *Chlorosphaera p.* und *Chlamydomonas k.*

Die Beziehung zwischen dem Zerfall des Körpers von *Azotobacter* und zwischen der Algenentwicklung erregten mein besonderes Interesse. Die Entwicklung von *Azotobacter* nimmt, je nach den verschiedenen Temperaturen, im Laufe von zwei Wochen bis zu dreißig Tagen nach der Überimpfung langsam ab. Dabei sind die Bakterienkörper reichlich mit Granula gefüllt. Bei noch älteren Kulturen zerfallen die Zellen und in der Nährlösung kommen vereinzelte Granula vor. Die Entwicklung der Algen beginnt um die Zeit, wenn die Bakterienentwicklung sich verlangsamt, und der Zerfall der Bakterienkörper beginnt.

Bei der Mischkultur von Algen und *Azotobacter* tritt ein schnellerer Zerfall der Bakterienkörper ein, als bei der Reinkultur von *Azotobacter* selbst.

Beachtenswert ist auch der schnellere Zerfall der Bakterienkörper bei der Glukosenährlösung als bei der Mannitnährlösung. Nach Beijerinck (1901, S. 578) hemmt die erstere die Bakterienentwicklung früher als die letztere, weil unter Spaltung der Glukose leicht Säurebildung stattfindet. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß der beschleunigte Zerfall der Bakterienkörper bei Glukosenährlösung mit der Säurebildung im Zusammenhange steht. Es ist aber noch nicht festgestellt, worauf der Zerfall der Bakterienkörper in der Mischkultur beruht. Bei den weiteren Versuchen handelt es sich um Mischkulturen von abgetötetem *Azotobacter* und Algen. Dabei benutzte ich die Glukosenährlösung. Die anderen Versuchsanordnungen waren die gleichen wie früher. Die Reinkultur von *Azotobacter* wurde im Laufe von 14/VI–21/VIII sterilisiert, und dann mit Algen überimpft. Nach etwa sechs Monaten war die Algenentwicklung wie folgt:

Kulturdauer 21/VIII–10/II.

<i>Chlorella l.</i> ohne <i>Azotobacter</i> (Kontrolle)	Klar
<i>Chlorella l.</i> + getötetes <i>Azotobacter</i>	Algenentwicklung deutlich; ger. M. von Alge; grün.
<i>Stichococcus v.</i> (Kontrolle) . . .	Klar.
<i>Stichococcus v.</i> + getötetes <i>Azotobacter</i>	Algenentwicklung deutlich; ger. M. von Alge; grün.
<i>Scenedesmus n.</i> (Kontrolle) ..	Klar.
<i>Scenedesmus n.</i> + getötetes <i>Azotobacter</i>	Algenentwicklung deutlich; ger. M. von Alge; grün.

Nach diesen Resultaten ist die Algenentwicklung merklich schwächer als bei der Mischkultur von Algen und lebendigem *Azotobacter*. Die Sterilisierung von *Azotobacter* im Dampftopfe erschwert ohne Zweifel die Absorption des Stickstoffs für die Algen.

Es ist bekannt, daß die meisten Fermente, ihre wässerige Lösung vorausgesetzt, etwa bei 70° C abgetötet werden. Man kann daher mit Recht annehmen, daß nach der Sterilisation keine Autolyse von *Azotobacter* mehr zustande kommt. Diese mußte demgemäß, wennauch nur geringfügig, schon vor der Sterilisation stattfinden.

Daraus folgt, daß eine geringere Menge von absorbierbaren Stickstoffverbindungen bei abgetötetem *Azotobacter* gebildet wird als bei lebendigem. Dies läßt die Verschiedenheit der Algenentwicklung bei den beiden verschiedenen Zuständen von *Azotobacter* erklären. Gerlach und Vogel (Bd. IX, S. 884) behaupten im Gegensatz zu den Ansichten von Beijerinck und Delden (S. 40), und Reinke (1903 a, S. 379), daß der von *Azotobacter* gebundene Stickstoff erst nach dem Tode desselben frei wird. Nach meinen eigenen Versuchen muß ich die Ansichten der ersten beiden Autoren

für die richtige halten, weil ich erst bei alten Kulturen von *Azotobacter* stets eine Algenentwicklung beobachten konnte.

Nun fragt es sich noch, was für eine Stickstoffverbindung von *Azotobacter* gebildet wird.

Beijerinck und Delden (l.c. S. 42) vermuteten bei N-bindenden Bakterien Ammoniak oder Nitritbildung; ihre Versuche fielen aber negativ aus. Sie versuchten auch vergeblich Hydrazin und Hydroxylamin festzustellen.

Dagegen machte Jones (l.c. S. 22) darauf aufmerksam, daß er im Körper von *Azotobacter chroococcum* var. eine deutliche Nitratreaktion beobachten konnte. Oft fand er eine Reaktion von Ammoniak¹⁾, wobei er aber das Vorhandensein von denitrifizierenden Bakterien nachweisen konnte.

Angeregt durch diese interessante Entdeckung von Jones, versuchte ich eine Nachprüfung zu machen. Als Nährlösung benutzte ich die Mannitnährlösung, deren Zusammensetzung ich schon erwähnt habe. Die Kulturen wurden im Thermostat bei etwa 25° C gehalten. Nach einmonatlicher Kulturdauer (14/X–14/XI) wurde die Bakterienmasse durch Dekantieren in die Abdampfschale gegossen. Die Bakterienmasse zeigte mit einer Diphenylaminlösung von Schwefelsäure behandelt eine deutliche Nitratreaktion; die Nährlösung zeigte aber keine solche.

Weder die Bakterienmasse, noch die Nährlösung zeigten mit Nessler's Reagens behandelt irgendeine Reaktion.

Nach siebenmonatlicher Versuchsdauer fand ich in der Bakterienmasse keine oder nur eine sehr schwache Nitratreaktion. Eine solche konnte ich auch in der Nährlösung nicht finden.

Dann filtrierte ich die Nährlösung mit dem Chamberandschen Trichter, und setzte diesem Filtrat einige Tropfen von Nessler's

1) Jones hält eine nur mit Nessler's Reagenz reaktionsfähige Substanz für Ammoniak.

Reagens zu. Es zeigte eine deutliche Reaktion. Ob aber diese Reaktion mit der Anwesenheit von Ammoniak im Zusammenhange stand, weiß ich nicht, weil mehrere andere Substanzen ähnliche Reaktion zeigen können.

Bei der Autolyse von Bakterienkörpern ist anzunehmen, daß eine Ammoniakbildung als Folge der Eiweißspaltung möglich ist. Es wäre wünschenswert, diesbezüglich eine einwandfreie Prüfung anzustellen.

Nun entsteht die Frage, was für eine Bedeutung die Nitratbildung bei *Azotobacter* hat.

Die Nitratbildung geschieht, wie schon erwähnt, im frischen Zustande der Bakterien, und sie fehlt bei alten Kulturen. Daraus kann man schließen, daß sie eine Stufe der Stickstoffassimilation ist. Es ist auch festgestellt, daß das gebildete Nitrat nicht durch die Bakterienzellen austreten kann, weil eine Nitratreaktion nie in der Nährlösung zu finden war. Die Vermutung liegt nahe, daß das Nitrat zum Aufbau der Bakterienkörper verwandt wird.

Die den Algen zur Verfügung stehende Stickstoffverbindung, wahrscheinlich Ammoniak, muß erst bei der Autolyse der Bakterienkörper entstehen.

d). Kritik über die Hypothese der Symbiose zwischen
Algen und *Azotobacter*.

Auf Grund der oben erwähnten Versuche seien an dieser Stelle einige Worte der Kritik der bisher aufgetretenen Hypothesen über die Symbiose zwischen Algen und *Azotobacter* gewidmet.

Nach Reinke (1903 b) und Keutner (1905) war klar, daß sowohl Süßwasser als auch Meeresalgen *Azotobacter* beherbergen. Bezüglich der symbiotischen Beziehungen machten sie keine Versuche. Ob *Azotobacter* sich epiphytisch oder symbiotisch gegen Algen verhält, wurde nicht festgestellt.

Aus meinen eigenen Versuchen läßt sich aber der Schluß ziehen, daß Algen den durch Autolyse von *Azotobacter* frei werdenden Stickstoff absorbieren, und daß die N-Bindung des *Azotobacter* durch Algen gefördert wird.

Soviel scheint heute festzustehen, daß man unter der Symbiose zwischen Algen und *Azotobacter* nur das oben erwähnte Verhalten versteht. Es unterliegt keinem Zweifel, daß das gleiche Verhalten auch in der Natur eine Rolle spielt. Allerdings muß man dabei, wie Hans und E. Pringsheim (1910, Bd. 26, S. 228) betonten, eine Mitwirkung von *Bacillus gelaticus* annehmen, weil *Azotobacter* allein keine agarlösende Wirkung aufweist.

Die Wirkung von *Azotobacter* ist im Haushalt der Natur in der Tat unerlässlich. Reinke (1903 a, S. 371) machte zum ersten Mal darauf aufmerksam, daß das Algen anhaftende *Azotobacter* eine disponible Quelle an Stickstoff bietet. Es schien aber, als ob er diese Quelle zu hoch bewertete. Man denke hier ans Mengenverhältnis zwischen Algen und *Azotobacter*. Nach meinen eigenen Beobachtungen sind viele tausend Individuen von *Azotobacter* nötig, um ein Individuum von einzelligen Algen wachsen zu lassen. Es ist aber unmöglich im Freien einzellige Algen zu finden, die je viele tausend von *Azotobacter* beherbergen. Es ist auch anzunehmen, daß der von *Azotobacter* frei werdende Stickstoff durch die Wasserbewegung der Algen verloren geht.

Es scheint mir auch zweifelhaft, ob *Azotobacter* alle Stickstoffbedürfnisse der großen Tange oder schnell wachsender Algen, wie *Porphyra* u. a., befriedigen kann.

Vom theoretischen Standpunkte können die Ernährungsbeziehungen zwischen Algen und *Azotobacter* ohne Zweifel behauptet werden. Ich möchte aber nicht behaupten, daß *Azotobacter* die hauptsächlichste Stickstoffquelle für Algen ist. Vor allem kommen dafür die

gelöst vorhandenen Stickstoffverbindungen in Betracht. Sowohl in Seen als auch im Meere gibt es nur geringe Mengen von Stickstoff (ich verweise hierfür namentlich auf die Arbeiten von Choda t (1898), Brand t (1897, 1902) und Gebbing (1910). Doch sind die Algen durch konstante Durcharbeitung imstande Stickstoff aus dem Wasser anzuhäufen.

Im Haushalte der Natur ist *Azotobacter* a priori eine unerläßliche N-Quelle. Durch den Zerfall ihrer Körper werden die Gewässer an Stickstoff bereichert. Neben dem organischen Detritus, den atmosphärischen Niederschlägen und den Zuflüssen ist *Azotobacter* ohne Zweifel als ein großes Magazin von Stickstoff anzusehen.

VI. Systematik.

I. Ernährungsphysiologische Merkmale der untersuchten Algen.

Unter diesem Kapitel möchte ich, wie in der Bakteriologie üblich, die untersuchten Algen physiologisch charakterisieren und sie dadurch von einander unterscheiden.

Diesbezügliche Merkmale werde ich hauptsächlich aus den schon erwähnten Ergebnissen ableiten. Einige Merkmale werden aber den weiter unten angeführten Resultaten entnommen werden. Die letzteren werden von den ersteren durch beigefügte Sternchen erkenntlich gemacht werden.

Chlorella vulgaris Beij var. *lutescens*, var. nov.

M-Agar-Strichkultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün
„ -Stichkultur	do.
Gl-Agar-Strichkultur	g. M. Kultur anfangs grün, später gelbgrün oder weiß.
„ -Stichkultur	do.

Gl-Agar-Schüttelkultur	Die aufliegenden Kolonien sind größer als die tiefer liegenden.
$\frac{1}{2}$ M-L-Kultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
Gl-L-Kultur	g. M. Kultur anfangs grün, später gelbgrün oder weiß.
M-Gelatine-Stichkultur	ger. M. Kultur grün. Keine Verflüssigung.
Gl-Gelatine-Stichkultur	m. M. Kultur grün. Keine Verflüssigung.
Nährbouillon-Kultur	ger. M.
K_2HPO_4 oder KH_2PO_4	Vorliebe für beide Reaktionen.
*Gl-Agar-Strichkultur im Dunkeln.	m. M. Kultur gelbgrün.
*Gl-L-Kultur im Dunkeln.	m. M. Kultur gelbgrün

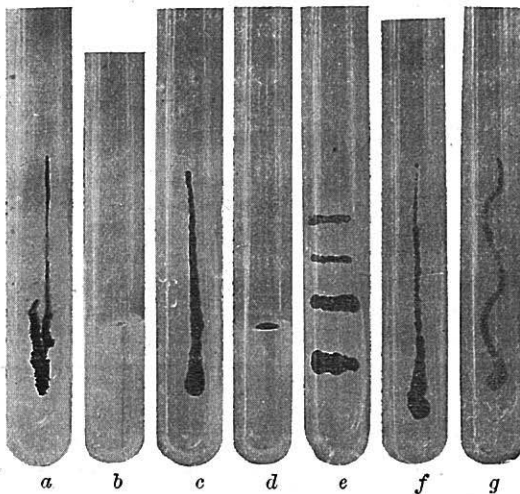


Fig. 2.

Kultur von *Chlorella vulgaris* Beij. var.
hulescens, var. nov.

- a. M-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 10/XI-25/III.
- b. „ -Stichkultur. Kulturdauer 10/XI-25/III.
- c. Gl-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- d. „ -Stichkultur. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- e. Gl-Agar-Stichkultur. Impfstich wurde horizontal ausgezogen. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- f. Gl-Agar-Stichkultur. Während des Versuches wurde die Kulturröhre invers gehängt. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- g. Gl-Agar-Stichkultur. Impfstich wurde wellenförmig ausgezogen. Kulturdauer 27/VI-25/III.

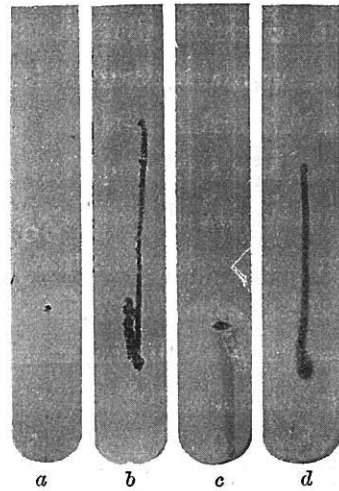


Fig. 3.

Kultur von *Stichococcus bacillaris*
Näg. var. *viridis*, var. nov.

- a. M-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 10/XI-25/III.
- b. M-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 10/XI-25/III.
- c. Gl-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 10/XI-25/III.
- d. Gl-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 10/XI-25/III.

Stichococcus bacillaris Näg. var. *viridis*, var. nov.

M-Agar-Strichkultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
„ -Stichkultur	do.
Gl-Agar-Strichkultur	g. M. Kultur anfangs grün, später gelbgrün sogar weiß.
„ -Stichkultur	do.
„ -Schüttelkultur	die aufliegenden Kolonien größer als die tiefer liegenden.
$\frac{1}{2}$ M-L-Kultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
Gl-L-Kultur	g. M. Kultur anfangs grün, später gelbgrün sogar weiß.
M-Gelatine-Stichkultur	ger. M. Kultur grün. Keine Verflüssigung.
Gl-Gelatine-Stichkultur	m. M. Kultur grün. Keine Verflüssigung.
Nährbouillon-Kultur	Entwicklungsunfähig.
K_2HPO_4 oder KH_2PO_4	K_2HPO_4 bevorzugt (mit Artarischer Nährlösung).
*Gl-Agar-Strichkultur im Dunkeln	m. M. Kultur grün.
*Gl-Agar-Stichkultur im Dunkeln	m. M. Kultur gelbgrün.
*Dunkelkultur in Artarischer Nährlösungen	N-Quellen in Formen von KNO_3 , NH_4Cl , Asparagin oder Pepton. Wachstum schwach bis mäßig; alle Kulturen gelbgrün (nie weiß!).

Scenedesmus obliquus Ktz. var. *non-liquefasciens*, var. nov.

M-Agar-Strichkultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
„ -Stichkultur	do.
Gl-Agar-Strichkultur	ger. M. Kultur leicht braun werdend.
„ -Stichkultur	g. M. Anaërobe Entwicklung. Nach einigen Monaten vergilbt.
„ -Schüttelkultur	Anaërobe Entwicklung. Die tiefliegenden Kolonien sind ziemlich groß.
M-L-Kultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
Gl-L-Kultur	g. M. Kultur anfangs grün, später gelbgrün.
M-Gelatine-Stichkultur	ger. M. Kultur grün. Keine Verflüssigung.

Gl-Gelatine-Stichkultur	ger. M. größere M. als in M-Gelatine. Kultur grün. Keine Verflüssigung.
Nährbouillon-Kultur	Entwicklungsunfähig.
*Gl-Agar-Strichkultur im Dunkeln.	m. M. Kultur gelbgrün.

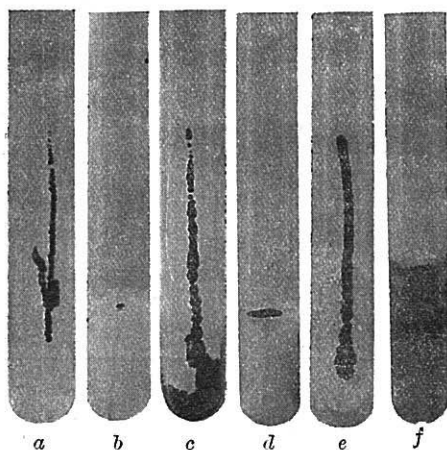


Fig. 4.

Kultur von *Chlorosphaera putrida*, sp. nov.

- a. M-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 21/X-25/III.
- b. M-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 21/X-25/III.
- c. Gl-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 21/X-25/III.
- d. Gl-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 21/X-25/III. Hier sieht man Gasbildung.
- e. M-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 27/VI-25/III.

Die Wachstummenge in e ist größer als in a. Diese Abweichung ist auf die Verschiedenheit der Jahreszeiten während der Kultur zurückzuführen, weil die Algenentwicklung im Frühling und Sommer üppiger ist als in den übrigen Jahreszeiten.

- f. Gl-Gelatinestichkultur. Man sieht hier eine ziemlich deutliche Gelatineverflüssigung. Kulturdauer 22/XII-25/III.

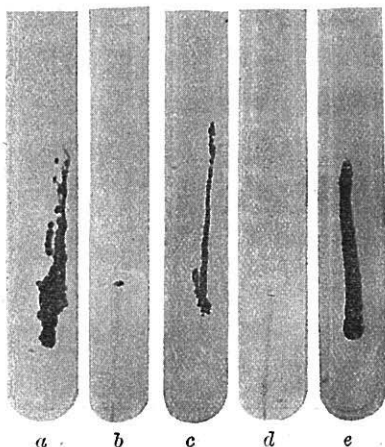


Fig. 5.

Kultur von *Chlamydomonas koishikawensis*, sp. nov.

- a. M-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- b. M-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- c. Gl-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 21/XI-25/III.

Die beschleunigende Wirkung der Glukose für die Algenentwicklung ist im Winter undeutlich. Dieselbe ist aber in anderen Jahreszeiten deutlich zu erkennen.

- d. Gl-Agar-Stichkultur. Kulturdauer 21/XI-25/III.
- e. 1% Mannit-Agar-Strichkultur. Kulturdauer 27/VI-25/III.

Chlorosphaera putrida, sp. nov.

M-Agar-Strichkultur	ger. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
„ -Stichkultur	do.
G1-Agar-Strichkultur	g. M. Leicht zerfließbarer Belag. Kultur später vergilbt.
„ -Stichkultur	m. M. Kultur anfangs grün, später vergilbt.
„ -Schüttelkultur	Aërobe Entwicklung. Gallertige Kolonien.
M-L	m. M. Kultur lange Zeit hindurch grün.
G1-L	g. M. Kultur anfangs grün, später vergilbt.
M-Gelatine-Stichkultur	m. M. Keine Verflüssigung.
G1-Gelatine-Stichkultur	g. M. Deutliche Verflüssigung.
Nährbouillon	ger. M.
*G1-Agar-Strichkultur im Dunkeln	m. M. Kultur gelbgrün.

Chlamydomonas koishikawensis, sp. nov.

M-Agar-Strichkultur	m. M. Kultur gallertig.
„ -Stichkultur	ger. M. Kultur gallertig.
G1-Agar-Strichkultur	g. M. Kultur gallertig. Keine Vergilbung.
„ -Stichkultur	do.
„ -Schüttelkultur	Aërobe Entwicklung. Gallertige Kolonien.
M-L-Kultur	m. M.
G1-L-Kultur	g. M. Keine Vergilbung.
M-Gelatine-Stichkultur	m. M. Keine Verflüssigung.
G1-Gelatine-Stichkultur	do.
Nährbouillon	Entwicklungsunfähig.
*G1-Agar Strichkultur im Dunkel	s. ger. M. Kultur grün.

Physiologische Unterscheidungsmerkmale der untersuchten Algen.

In Nährbouillonkultur.

I. Entwicklungsfähig

§ Gl-Agar-Strichkultur.

Fester Belag *Chlorella vulgaris* Beij. var.
lutescens.

zerfließbarer Belag.... *Chlorosphaera putrida.*

II. Keine Entwicklung

§ Gallertiger Belag *Chlamydomonas koishikavensis.*

§ Nicht gallertiger Belag.

§§ Bei Gl-Agar-Kultur.

anaërobe Entwicklung, *Scenedesmus obliquus* Ktz. var.
non-liquefasciens.

aërobe Entwicklung, *Stichococcus bacillaris* Näg.
var. *viridis.*

Diese Einteilung ist aber für die an Formen merklich differenzierten Algen unpraktisch. Bei der Bestimmung schwer unterscheidbarer Algen, wie die winzigen Protococcaceen und Naviculaceen es sind, möchten aber die Kulturmerkmale von einigem Vorteil sein. Schon O. Richter (1903, S. 498) widmete sein Augenmerk auf charakteristische Kulturmerkmale, bzw. Kolonieformen zur Diagnostierung der von ihm isolierten Diatomeen. Weitere Kulturmerkmale wurden von Chodat (1913) zur Diagnostierung der Chlorophyceen verwendet.

Jedenfalls ist es klar, daß die Kulturmerkmale für die Klassifikation der an Formen nicht stark differenzierten, physiologisch aber differenzierten Algen sehr nützlich sind, weil man danach die physiologischen Rassen klar von einander und von der Stammart unterscheiden kann.

2. Begriff der Spezies, Varietät, und physiologischen Rasse.

Der Begriff der Spezies ist nicht einheitlich. Bei den Bakterien und Pilzen verwenden wir oft die Kulturmerkmale, resp. die ernährungsphysiologischen Merkmale zur Diagnostierung einer Spezies.

Bei den Phanerogamen kommen außerdem noch die morphologischen Merkmale in Anwendung. Außerdem fasst man die „Spezies,“ bald im weiteren, bald im engeren Sinne auf, und so existieren s. g. Sammel- resp. Elementararten nebeneinander.

Die Unterscheidungsmerkmale der Spezies und der Varietät sind auch niemals beständig. Es ist ganz willkürlich, ob man eine in Frage kommende Pflanze als eine Spezies oder als eine Varietät betrachten will.

Die Systematik der Algen gründete sich seit langer Zeit vorwiegend auf die morphologischen Merkmale. Nach dem Auffinden der Reinkultur kamen aber die Kulturmerkmale, resp. die ernährungsphysiologischen Merkmale zur Diagnostierung einer Varietät oder sogar einer Art in Anwendung. Dies ist ohne Frage ein Fortschritt in der Systematik, weil die Klassifikation der an Formen nicht differenzierten, aber stark physiologisch differenzierten Algen, wie es bei Bakterien der Fall ist, nur durch Kulturmerkmale ausführbar ist.

Artari (1902, S. 173) machte uns zum ersten Mal darauf aufmerksam, daß unter den Algen physiologische Rassen existieren. Nach diesem Autor liebt *Chlorococcum infusionum* als Flechtengonidien besonders Pepton, während es als freie Alge Nitrat bevorzugt. Heutzutage kennen wir eine große Anzahl von physiologischen Rassen, bei denen man die Arbeit von Chodat ('13) benutzen kann.

Es fragt sich nun, wie eine Rasse in der Nomenklatur behandelt werden soll.

Im Jahre 1906 nannte Artari (l.c.) eine ernährungsphysiologische Art *Chlorella communis* Artari. In einer neuen Arbeit (1913 l.c.) beschrieb er aber dieselbe Alge als eine Varietät von *Chlorella vulgaris* Beij. Heute haben wir daher eine physiologische Art bei den Algen nicht mehr. Chodat (1913) unterscheidet viele Algen

durch Kulturmerkmale (Kolonieformen, Koloniefarben, Gelatineverflüssigungsvermögen u. a.), und läßt sie als Varietäten gelten; z. B. *Chlorella vulgaris* var. *genevensis*,—var. *viridis*,—var. *intermedia* u. a.

Die Ansicht der beiden oben genannten Autoren ist auch die meinige. Allerdings möchte ich hervorheben, daß ich zur Unterscheidung der Art nur die morphologischen Merkmale, zur Unterscheidung der Varietät aber die Kulturmerkmale benutze. Dieser Unterschied ist aber nur bei rein kultivierbaren Algen anzuwenden, bei den nicht rein kultivierbaren Algen ist er unanwendbar.

Nun bleibt die Frage zu beantworten, ob die physiologischen Eigenschaften beständig sind.

Artari (1906, S. 190) teilte schon mit, daß die Vorliebe von *Chlorella communis* für die Ammoniumverbindungen ziemlich konstant ist. Es ist jedoch oft möglich die physiologischen Eigenschaften bei wiederholten Kulturversuchen abzuändern. Nach Artari (1913 S. 453) wies die lange in 9% Glukoselösung kultivierte *Chlamydomonas Ehrenbergii* eine bessere Entwicklung auf als die lange in 1% Glukoselösung kultivierte, wenn beide später in 9% Glukoselösung überimpft wurden. Eine derartig modifizierte Alge soll aber, wie Artari behauptet, leicht zu ihrer ursprünglichen Natur zurückkehren. Nach Beijerinck (1893) ging die gelatineverflüssigende Eigenschaft von *Scenedesmus acutus* nach wiederholten Kulturen verloren. Der Verlust dieser Eigenschaft sollte auch als ein Beispiel der Modifikation gelten. Bis jetzt ist es aber niemandem gelungen ein erblich konstantes Merkmal der Algen auf experimentellem Wege hervorzurufen. Andere Kulturmerkmale, wie Kolonieformen und Koloniefarben sollen bei gleichen Bedingungen immer gleichartig bleiben.

Hieraus geht hervor, daß die Kulturmerkmale, resp. die ernährungsphysiologischen Merkmale für die Klassifikation von reinkultivierten Algen einwandfrei verwendet werden können.

3. Beschreibung und Identifizierung der gezüchteten Algen.

Die Bestimmung der mikroskopischen Algen ist keineswegs leicht, besonders infolge der unvollkommenen Beschreibung früherer Autoren.

Handelt es sich um eine physiologische Rasse, so ist die Schwierigkeit um so größer. Da die Versuchsmethoden bei den verschiedenen Arbeiten nicht immer ganz die gleichen sind, darf man nicht ohne weiteres die Alge des einen Autoren mit der Alge des anderen vergleichen. Es ist daher wünschenswert auch bei Algenkulturen die allgemein üblichen Nährmedien, wie Nährbouillon, Nähragar und Nährgelatine in der Bakteriologie, zu adoptieren. Dadurch würde die Identifizierung der physiologischen Rassen ohne Zweifel erleichtert werden.

Wir sollten die Kulturmedien in der ausgezeichneten Arbeit von Chodat (1913), „Monographies d'algues en culture pure“ adoptieren.

Die nachfolgenden Beschreibungen begründen sich, wie schon erwähnt, teils auf morphologische, teils auf physiologische Merkmale. Die Einteilung der Familien basierte sich völlig auf das System von Wille (1911, Nachträge zu „Die natürlichen Pflanzenfamilien von Engler.“)

Familie Volvocaceae.

Chlamydomonas koishikavensis, sp. nov.

Fundort; Kulturflasche der Wasserpflanzen im bot. Institut,
Koishikawa, Tokyo.

Größenverhältnis; Vegetative Zellen: Länge, 12–20 μ ; Dicke,
7–12 μ .

Gameten: Länge 6–11 μ ; Dicke, 4–5 μ .

Dies ist eine einzellige Alge mit zwei langen Geißeln, die fast

körperlang sind. Der Palmellazustand kommt bei verschiedenen Kulturen vor. Derselbe kommt durch Zellwandquellung zustande. So konnte ich durch Färbung mit Methylenblau oder Delafield'schem Haematoxylin zwei gallertige Schichten um jede Zelle nebst einer allgemeinen Gallertmasse finden. Die Zellform beim Palmellazustand ist, wenn der letztere frisch ist, ellipsoidisch, im älteren Zustande aber kugelig. Man kann daher den ellipsoidischen Zustand den Gloeothece- oder Gloeocystiszustand zum Unterschied vom kugeligen echten Palmellazustand nennen.

Die Zellwand ist mit Methylenblau färbbar. Sie gibt mit Chlorzinkjodlösung oder $I + H_2SO_4$ eine gelbe Reaktion. Goroschan-kin (1890-'91) konnte in der Zellwand von *Chlamydomonas* keine Zellulose-Reaktion wahrnehmen, er konnte aber eine solche bei den kopulierenden Gameten von *Chlamydomonas Brannii* finden. Die Zellwand ist dünn, oval-eiförmig, vorn mit einer kurzen Warze, aus der zwei Zilien hervorragen. An der Basis der Zilien liegen zwei Vakuolen.

Der Chromatophor ist tief becherförmig und grün. Assimilationsprodukt ist Amylodextrin.

Da ist nur ein Pyrenoid im normalen Zustand, rundlich, lateral in der Mitte der Zelle, aber nicht wandständig. Es können aber mehrere vorhanden sein, so konnte ich bei M-Agar-Kultur sogar fünf Pyrenoide finden. Jedes Pyrenoid ist von einer Amylodextrinherde umgeben.

Der Kern liegt vor dem Pyrenoid. Er ist mit Jodjodlösung behandelt deutlich zu sehen.

Der Augenfleck ist klein, eiförmig und wandständig in der Nähe des Vakuolen. Er ist schwach gerötet.

Die ungeschlechtliche Fortpflanzung geschieht durch Querteilung und Längsteilung, wobei 2-4 Individuen entstehen. Dabei findet

die erste Teilung immer querweise statt, die zweite aber längsweise. Die geschlechtliche Fortpflanzung geschieht durch Isogameten, die in den meisten Fällen je vier in einer Zelle entstehen. Die Gameten sind mit einer Zellwand versehen, und ihrer Form nach den vegetativen Zellen sehr ähnlich. Die ersteren sind aber etwas kleiner als die letzteren. Die Kopulation der Gameten ist gerade, und wird mit deren Vorderende vermittelt.

Die Zygosporen sind bald nach der Bildung grün und etwa $10\ \mu$ lang. Sie werden später braun und größer, etwa $20\ \mu$ und sind mit reinen Stärkekörnern gefüllt. Die Zygosporenmembran ist glatt und dreischichtig; die äußere und innere Schicht sind doppelkonturiert und glänzend, die mittlere Schicht ist matt und weiter als die beiden anderen. Die Organisation ist ähnlich wie die der Zygosporen von *Chlamydomonas Steinii* Goroschankin. Jedoch konnte ich, ungleich der letzteren, die vierte Schicht von außen nicht finden. Die Zygosporenmembran wird wie die der vegetativen Zellen mit Chlorzinkjodlösung oder $I+H_2SO_4$ gelb.

Im April hatte ich Gelegenheit eine Keimung der Zygosporen in einer Mineralsalzlösung zu beobachten. Aus jeder Zygospore schlüpften je vier vegetative Zellen (vergl. Tafel III, Fig. 13).

An dieser Stelle möchte ich einige Worte über die Vermehrung des Pyrenoids hinzufügen. Dill (1896, S. 329) beobachtete schon die Vermehrung des Pyrenoids bei *Chlamydomonas longistigma* Dill. Nach diesem Autor besitzt die Alge im normalen Zustande 2–3 Pyrenoide. Bei Kulturen in verschiedenen prozentigen Nährlösungen wachsen die Pyrenoide zu Bändern aus und es entstehen dann durch Abschnürungen mehrere Pyrenoide. Bei anderen Arten konnte Dill keine solche Vermehrung des Pyrenoids konstatieren. Die Vermehrungsfähigkeit war also ein charakteristisches Merkmal von *Chlamydomonas longistigma*.

Chlamydomonas koishikavensis ist erheblich kleiner als die obige Art, und der Augenfleck von *Chlamydomonas k.* ist viel kürzer als derjenigen der letzteren. Nach Größe und Form ist unsere Art *Chlamydomonas parietaria* Dill sehr ähnlich. *Chlamydomonas koishikavensis* läßt sich jedoch durch die Anwesenheit der Zellwand bei den Gameten, die nicht wandständigen Pyrenoide, und den eiförmigen Augenfleck von der letzteren Art unterscheiden. Hiermit möchte ich unsere *Chlamydomonas* für eine neue Art halten.

Familie Tetrasporaceae.

Chlorosphaera putrida, sp. nov.

Fundort; Ein übelriechendes Abwasser bei Koishikawa, Tokyo.

Größenverhältnis; Durchmesser der Zellen, 6–30 μ ; in meisten Fällen, 10–20 μ .

Im normalen Zustand bildet die Alge durch lockere Verbindung der zahlreichen Zellen eine gewebeartige Zellfamilie, und bildet so einen grünen Überzug auf dem Untergrunde des Abwassers. Die Größe der Zellfamilie ist je nach den Kulturbedingungen variabel.

Die Zellen sind beinahe kugelig; bei Bildung der Zellfamilie werden sie infolge gegenseitigen Druckes eckig.

Die Zellwand ist dick und besteht aus zwei Schichten, von denen die äußere dicker als die innere ist. Die äußere Schicht ist gallertig, und dient zur Bindung der Zellen. Mit Methylenblau und Delafieldschem Haematoxylin färbt sich die innere Schicht intensiver als die äußere.

Der Chromatophor ist hohlkugelig, netzförmig gelöchert, mit 1–3 Pyrenoiden. Durch Färbung mit Haidenhainschem Eisenalaun-Haematoxylin und Fuchsin ist die Struktur des Chromatophors deutlich sichtbar. Das Assimilationsprodukt ist reine Stärke und Amylodextrin.

Die Vermehrung geschieht durch Zweiteilung der Zellen,

außerdem findet eine Aplanosporen- und Zoosporenbildung statt. Die Aplanosporen sind ellipsoidisch, $4 \times 6 \mu$ groß. Die Zoosporen sind oval mit zwei Geißeln etwa $3 \times 6 \mu$ groß. Die Zahl der Zoosporen in einer Zelle übertrifft bei weitem diejenige der Aplanosporen.

Die geschlechtliche Fortpflanzung findet bei dieser Alge niemals statt.

Die *Chlorosphaera*-Gattung wurde vielfach mit der *Pleurococcus*-Gattung verwechselt. Doch läßt sich die erstere durch den netzförmigen Chromatophor und die Anwesenheit der Zoosporenbildung von der letzteren unschwer unterscheiden (Wille, 1911).

Es scheint daher nicht richtig, daß Migula (1907) *Chlorosphaera angulosa* Klebs als *Pleurococcus angulosus* Menegh. Klebs bezeichnete. De Toni teilte die Gattung *Pleurococcus* in zwei Sectionen, nämlich *Eupleurococcus* und *Chlorosphaera*. Nach diesem System müssen die Klebs'schen *Chlorosphaera*-Arten zur *Pleurococcus*-Gattung gerechnet werden.

Nach dem System von Wille rechne ich aber meine Alge zur Gattung *Chlorosphaera* Klebs.

Alle bis jetzt bekannten *Chlorosphaera*-Arten bilden, soweit meine Studien in der Literatur darüber reichen (Klebs, 1883; De Toni, 1889; Migula, 1907) eine kleine Zellfamilie, die höchstens aus 64 Zellen besteht. Meine Alge bildet dagegen auch in der Mineralsalznährlösung eine große Zellfamilie, die aus vielen Hunderten von Zellen besteht, so daß ich meine *Chlorosphaera*-Art für eine neue Art halten muß.

Familie Oocystaceae.

Chlorella vulgaris Beij. Beijerinck. 1890; Grintzesco, 1903.

Synonym: *Chlorococcum protogenitum* (Bias) Rab. 1868 III, S. 58.

Varietäten: var. *communis* Artari, 1913.
var. *genevensis* Chodat, 1913.
var. *viridis* Chodat, 1913.
var. *intermedia* Chodat, 1913.

Chlorella vulgaris Beij.

var. *lutescens*, var. nov.

Fundort; Aus einem Teich bei Fukagawa, Tokyo.

Durchmesser der Zellen: 3–10 μ , oft 15 μ .

Dies ist auch eine einzellige Alge, einzeln lebend und kugelig. Die Zellwand ist dünn und färbt sich mit Chlorzinkjodlösung oder I+H₂SO₄ gelb, wonach die Zellwandsubstanz keine reine Zellulose ist.

Der Chromatophor ist halbglockenförmig. Beim langen Aufenthalt in Glukosenährmedien desorganisiert er leicht und entfärbt sich.

Das Pyrenoid ist deutlich in Mineralsalznährmedien zu erkennen, aber undeutlich bei alten Kulturen in Glukosenährmedien.

Das Plasma ist im guten Zustande der Kultur klar und granuliert im schlechten Zustande (wie bei alten Kulturen in Glukosenährmedien u.s.w.).

Die Fortpflanzung geschieht durch Aplanosporen, 4–8 in jeder Zelle.

Das Assimilationsprodukt ist glykogenartig, wahrscheinlich Amylodextein. Beijerinck (1890, S. 758) fand bei *Chlorella vulgaris*, eine mit Jod sich braun färbende Substanz und nannte sie schlechthin Paramylum (vergl. weiter unten).

Ehe ich zur vergleichenden Betrachtung meiner Varietät mit anderen Varietäten übergehe, will ich kurz die Stammart, *Chlorella vulgaris* Beij. erwähnen.

Die physiologischen Untersuchungen von Beijerinck über die

Stammart sind nicht so genau, daß man daraus ein sicheres physiologisches Merkmal machen kann. Es ist daher kaum einwandfrei, wenn Artari *Chlorella communis* aus ernährungsphysiologischen Gründen von *Chlorella vulgaris* Beij. unterscheidet. Es ist auch fraglich, ob die von Grintzesco als *Ch. vulgaris* bezeichnete Alge völlig mit der Stammart identisch ist. *Chlorella vulgaris* Beij. dient daher heute nur als eine Sammelname von verschiedenen physiologischen Rassen. Sie ist physiologisch nicht bestimmbar. Unsere *Chlorella* läßt sich durch die schlechte Chlorophyllbildung auf Gl-Agar oder in Gl-L im Dunkeln von *Chlorella vulgaris* Grintzesco unterscheiden. Hinsichtlich dieser Eigenschaft ist unsere Alge *Ch. vulgaris* var. *communis* ähnlich. Abweichend im Charakter ist aber, daß meine Rasse, im Gegensatz zur Rasse von Artari, nicht nur in alkalischer Lösung, sondern auch in saurer gedeihen kann. Mit Bezug auf die bevorzugte N- und C-Verbindungen zeigen die beiden auch kleine Abweichungen.

Ich möchte noch die folgenden Eigenschaften bei meiner Varietät hervorheben, wodurch sie sich von den Rassen von Chodat (vergl. 1913, S. 88) unterscheiden läßt.

1. Unsere Varietät zeigt in ihrer Kolonie nicht die grüneren radialen Strahlen, was von var. *genevensis* abweicht.
2. Sie ist leicht vergilbbar auf Gl-Agar (Abweichung von var. *viridis*).
3. Sie zeigt keine Gelatineverflüssigung (Abweichung von var. *intermedia*).

Auf Grund der oben genannten Eigenschaften sehe ich meine Alge als eine neue Varietät (=physiologische Rasse) an.

Familie Coelastraceae.

Scenedesmus obliquus (Tur.) Kg.

Kützing, 1833; Rabenhorst, 1868 III, S. 64;
De Toni, 1889 I, S. 566; Brunthaler, 1913, S. 53;
Chodat, 1913.

Synonym: *Achnanthes obliqua* Turpin, 1828.

Scenedesmus acutus Meyen, 1828.

Scenedesmus acutus Meyen, bei Grintzesco, 1902.

var. *non-liquefasciens*, var. nov.

Fundort: Aus einem Teich für Fischkultur bei Fukagawa, Tokyo.

Länge : 8–11 μ , oft 20 (bei Gelatinekultur).

Dicke : 2–8 μ .

Gewöhnlich bildet die Alge 4–8 zellige Zönobien; häufig kommt sie aber auch vereinzelt vor. Die Zellen sind stark polymorph; im normalen Zustande sind sie spindelförmig, sehr oft werden sie aber ellipsoidisch oder sogar kugelig.

Die Zellwand ist dünn und besteht aus zwei Schichten. Die äußere Schicht ist gallertig und dient zur Bindung der Zellen. Die Zellwandsubstanz färbt sich mit $I+H_2SO_4$ gelb.

Der Chromatophor ist parietal, mit einem Ausschnitt und mit einem Pyrenoid versehen.

Im schlechten Zustande ist das Plasma sehr granuliert und damit desorganisiert auch der Chromatophor.

Das Assimilationsprodukt: unreine Stärke, wahrscheinlich Amylodextrin.

Die Vermehrung geschieht durch Aplanosporen, die je 2, 4, oder 8 in jeder Zelle vorkommen.

Petersen (1912, S. 170) machte darauf aufmerksam, daß *Scenedesmus acutus* an den Enden der Zellen je ein Bündel Borsten besitzt. Meine diesbezüglichen Versuche bei var. *non-liquefasciens* fielen ganz negativ aus. Die nach der Löfflerschen Methode oder nach Zettnow versuchte Färbung blieb erfolglos.

Auch unter Dunkelfeldbeleuchtung zeigte die Alge keine Borsten. Es ist möglich, daß die Borsten infolge langer Kultur verloren gingen.

Das Gelatineverflüssigungsvermögen fehlte bei unserer Varietät völlig. Nach Chodat (1913, S. 30) gibt es mehrere physiologische Rassen bei *Scenedesmus obliquus*, die sich durch ein mehr oder weniger starkes Verflüssigungsvermögen von einander unterscheiden lassen. Ich konnte aber in seiner Arbeit keine Rasse finden, der das Verflüssigungsvermögen fehlte. Damit ist meine Alge als eine neue Varietät anzusehen.

Familie Ulotrichaceae.

Stichococcus bacillaris Näg.

Nägeli, 1849, P. 76. Tafel, IV; Rabenhorst, 1868.

III, P. 47; Hansgirg, 1886, P. 139; De Toni, 1886.

I, P. 686. (Pyrenoide singulo instructa); Wille, 1911;

Chodat, 1913.

var. *viridis*, var. nov.

Fundort: Ein Teich für Fischkultur, bei Fukagawa, Tokyo.

Länge : 3–8 μ bei M-Agar oder M-L.

6–14 μ bei Gl-Agar oder Gl-L.

14–20 μ bei 22% Glukoselösung.

bis 30 μ bei Glukosegelatine.

Dicke : 2–3 μ .

Es ist eine einzellige Alge, die immer vereinzelt lebt. Die Zellform ist stäbchenförmig und oft an einem Ende der Zellen gabelig oder verdickt (polymorph).

Die Länge der Zellen ist sehr variabel; die Dicke aber ziemlich konstant.

Die Zellwand ist dünn und färbt sich mit Chlorzinkjodlösung oder $I+H_2SO_4$ gelb.

Die Alge ist mit einer parietalen Chlorophyllplatte versehen,

die niemals ein Pyrenoid besitzt.

Hansgirg, De Toni, und Wille halten eine mit Pyrenoid versehene Alge für *Stichococcus bacillaris*. Diese Ansicht kann ich aber nicht teilen. Ich schließe mich dabei völlig der Ansicht von Chodat (1913, S. 145) an. Nach Chodat ('09, S. 117) scheint das Körperchen in den Figuren von Nägeli identisch mit einem Öltropfen zu sein.

Das Plasma ist im guten Zustande der Kultur klar, bei schlechtem aber granuliert. Die Chlorophyllplatte wird bei allen Kulturen in Glukosenährmedien wellig, und teilt sich schließlich in mehrere Plättchen.

Die Vermehrung erfolgt durch Zweiteilung der Zellen.

Unsere Alge läßt sich deutlich durch ihre Größenverhältnisse von *Stichococcus pallescens* Chodat und *St. minor* (Näg.) Chodat unterscheiden. Durch das Fehlen der Gelatineverflüssigung läßt sich unsere Alge von *St. bacillaris* unterscheiden. Unsere Alge verblaßt nicht in einer als N-Quelle mit Kaliumnitrat versehenen Nährlösung im Dunkeln. Diese Erscheinung weicht von der von Artari (1902, S. 203) bei *Stichococcus bacillaris* konstatierten völlig ab. Das Verhalten gegen saure Lösung ist auch von der Stammart abweichend.

Aus diesem Grunde ist unsere Alge eine neue Varietät von *Stichococcus bacillaris*.

VII. Farbenwechsel.

Während der Untersuchungen über die Nährwerte der C-Verbindungen zog die Vergilbungerscheinung meine besondere Aufmerksamkeit auf sich. Dabei fand ich dieselbe Erscheinung bei Glukose wie auch bei den anderen bevorzugten Zuckernährmedien, während ich bei Mineralsalznährmedien keine solche beobachten konnte.

Die vergilbten Algen wurden nach längerer Kultur ganz farblos, um endlich abzusterben; die Algen in Mineralsalznährmedien blieben dagegen schön grün.

Der Entfärbungsvorgang trat bei den Glukosenährmedien, die eine N-Quelle in Form von Ammoniak enthielten, frühzeitig hervor.

Die ungenügenden bisherigen Erfahrungen betreffs des Entfärbungsvorgangs der Algen veranlaßten mich weitere Versuche anzustellen.

Nachdem wir einen Überblick über die bisherigen Angaben der in Frage stehenden Erscheinungen gewonnen haben, möchte ich zur Besprechung der Resultate unserer eigenen Untersuchungen übergehen. Als Erläuterung möchte ich zunächst die folgende Tabelle zeigen.

Autoren	Jahre	Algen	Am Lichte od. im Dunkeln	Kurze Darstellungen
Artari	1902	<i>Stichococcus bacillaris</i> .	Im Dunkeln.	Bei KNO_3 u. Leucin farblos, bei Asparagin u. Pepton grün.
„	1902	<i>Scenedesmus caudatus</i> .	Am L.	In 3-5% Glukoselösung farblos.
„	1906	<i>Chlorella communis</i> .	Im D.	In 1% Glukoselösung gelbgrün.
„	1913	<i>Chlamydomonas Ehrenbergii</i>	Im D.	Verhält sich wie <i>Ch. communis</i>
Boresch	1913	<i>Phormidium</i> u. <i>Chlamydomonas</i> .	Am L.	Durch N-Mangel entfärbt.
Chodat	1913	<i>Chlorella vulgaris</i> .	Am L.	Durch schlechtes Equilibrium zwischen den Mengen der C- und N-Verbindun- gen entfärbt.
Gaidukov	1903	<i>Oscillaria sancta</i> .		Komplementäre chromatische Adapta- tion.
Grintzesco	1902	<i>Scenedesmus acutus</i> .	Am L.	Bei 1-2% Glukosenährboden vergilbt.
„	1903	<i>Chlorella vulgaris</i> .	Am L.	Bei „ „ nicht vergilbt.
Krüger	1894	<i>Chlorella protothecoides</i> <i>Chlorothecium saccharophilum</i> .	Am L.	Bei verschiedenen N- und C-Verb. ver- blagt.
Kufferath	1913	<i>Chlorella luteo-viridis</i> var. <i>lutescens</i> .	Am L.	Bei „gelose glycerin-pomme de terre saccharose“ und bei verschiedenen Zuckerarten entfärbt.
Magnus u. Schindler	1912	Oscillarien.	Am L.	Durch N-Mangel entfärbt.
Schindler	1913	Oscillarien.	Am L.	Durch N-Mangel entfärbt.
Matruchot u. Molliard	1900	<i>Stichococcus bacillaris</i> .	Am L.	Bei 3% Dextrin- od. Lävulosegelatine vergilbt.

Autoren	Jahre	Algen	Am Licht od. im Dunkeln	Kurze Darstellungen
E. Pringsheim	1913	<i>Euglena gracilis</i> .		Die Ursachen der Entfärbung: Dunkelkultur, üppige Ernährung und N-Mangel.
Zumstein	1900	<i>Euglena gracilis</i> .	Am L. Im D.	In sehr reichen organischen Lös. farblos. (Zumstein kannte auch den Einfluß des Stickstoffs). In organischen Nährlösungen farblos.

Betreffs der früheren Angaben möge man auch die Angabe von Kufferath (1913) zum Vergleich ziehen.

Aus den oben angeführten Angaben geht hervor, daß die reiche Ernährung an Kohlenstoff selbst im Licht eine Vergilbung oder gänzliche Entfärbung hervorruft. Nach den Angaben von Boresch, Schindler und Chodat wissen wir, daß diese Erscheinung durch einen N-Mangel hervorgerufen wird.

Beachtenswert ist die Behauptung von Chodat (1903, S. 91). Er hat den Vergilbungsvorgang auf das schlechte Equilibrium zwischen den Mengen der C- und N-Verbindungen zurückgeführt. Diese Ansicht gründete sich aber nicht auf ausführliche Untersuchungen, sondern ist zum Teil hypothetisch, und die Frage, wie sich der Saprophytismus und der N-Mangel zu einander verhalten, blieb offen.

Bezüglich der Verblässung im Dunkeln, so führt Artari (1902, S. 206) sie auf die schlechten Nährbedingungen zurück. Nach diesem Autor kann *Stichococcus bacillaris* bei der Ernährung mit bevorzugten N-Verbindungen, wie Asparagin oder weinsaures Ammonium, selbst im Dunkeln schönes Chlorophyll bilden, während die Alge bei der Ernährung mit KNO_3 oder Leucin farblos wird.

Viele Abhandlungen äußern sich dahin, daß die Farbstoffbildung von der Lichtintensität abhängt. Berthold (1882) machte darauf aufmerksam, daß viele Florideen infolge starker Lichtintensität verblässen. Die Beobachtungen von Oltmanns (1892, S. 406 ff.)

stimmten weitgehend mit denen von Berthold überein. Nadson (1908)¹⁾ hat darauf hingewiesen, daß *Phormidium* im hellen Sonnenschein hellgelb wird. In der neueren Arbeit von Kylin (1912, S. 536 ff.) sieht man eine ganze Reihe solcher Beispiele bei Cyanophyceen und Florideen.

Schon Gaidukov in 1902 wies hin auf die komplementäre chromatische Adaptation der Algen (vergl. Gaidukov 1903). Dieser Autor kultivierte *Oscillaria sancta* und *Os. caldariosum* hinter farbigen Lösungen und fand, daß die Algen eine Komplementärfarbe der auf sie fallenden Strahlen annahmen. Schon im Jahre 1900 bemerkte Nadson¹⁾ eine ähnliche Erscheinung in der Natur. Nach diesem Autor sind die in Muschelschalen lebenden Cyanophyceen und *Conchocoelis*, sp. (eine Art der Chlorophyceae) im tiefen Wasser rot, im flachen dagegen grün. Es scheint daher, als ob die Algen eine Komplementärfarbe zu den in ihrem Standorte überwiegend auf sie fallenden Strahlen annehmen.

Die Theorie von Gaidukov ist heute aber nicht mehr stichhaltig. So konstatierte Schindler (1913) bei Oscillarien den Einfluß der Lichtintensität auf die Farbenveränderung, ohne eine Beeinflussung im Sinne von Gaidukov dabei wahrzunehmen. Dagegen hebt Schindler den Einfluß von N-Mangel auf die Farbenveränderung hervor.

Es ist klar, daß die Farbenveränderung der Cyanophyceen bald auf einem N-Mangel und bald auf der Zerstörung durch starke Lichtintensität beruht.

Die Zerstörungskraft des Lichtes gegen das Chlorophyll ist uns seit langer Zeit bekannt. Dies wurde hauptsächlich vermittels Anwendung alkoholischer Lösungen bestätigt. Ich verweise in dieser Beziehung namentlich auf die Arbeiten von Sachs (1864, S.

1) Zitiert nach Schindler, 1913.

362) und Reinke (1885, S. 128). Das lebende Chlorophyll ist aber ziemlich lichtfest.

N. Pringsheim (1879, S. 326 ff.) war der erste, welcher die Zerstörung des lebenden Chlorophylls durch intensives Licht bemerkte.

Nach Wiesner (1874) soll die Lichtfestigkeit des Chlorophylls im lebenden Körper eine nur scheinbare sein. Beim lebenden Chlorophyll findet fortwährend sowohl eine Zerstörung als auch eine Neubildung des Chlorophylls statt, und nur beim Gleichgewicht der beiden Prozesse bleibt die Totalmenge des Chlorophylls gleich. Diese Ansicht wurde später von Iwanowski (1913), und im etwas anderen Sinne, von Wager (1914) unterstützt. Nach Wager geht die Zerstörung des Chlorophylls im Lichte mit der CO_2 -Assimilation hand in hand. Die Folge der Zerstörung des Chlorophylls ist die Bildung von Aldehyd und einer anderen oxydierbaren Substanz.

Die Arbeiten von Sachs, Reinke und Wager zeigen, im Gegensatz zum Resultat von N. Pringsheim, übereinstimmend, daß rote Strahlen das Chlorophyll rascher als blaue Strahlen zu zerstören vermögen.

Beachtenswert sind hier die Resultate von Krüger (1894). Nach diesem Autor verblassen *Chlorella protothecoides* und *Chlorothecium saccharophilum* sowohl in verschiedenen C-Verbindungen als auch in verschiedenen N-Verbindungen. Die Verblassung in den letzteren Verbindungen muß aber einer Kritik unterzogen werden. Nach Krüger verblassen die oben genannten Algen sowohl in anorganischen als auch in organischen N-Verbindungen. Bemerkenswert ist, daß er denselben immer Glukose in einer Dosis von 1% zusetzte. Nach meiner Meinung muß die Verblassung bei KNO_3 auf die Wirkung der Glukose zurückgeführt werden. Die Verblassung bei anorganischen Ammoniumverbindungen konnte ich auch bei unseren Algen beobachten. Näheres darüber folgt später.

Nun fragt es sich, ob die Verblässung und Vergilbung der Algen bei reichen organischen Stickstoffverbindungen ohne Zusatz von Zucker vor sich gehen können. Nach meinen eigenen Untersuchungen bin ich geneigt zu denken, daß diese Erscheinungen dann nicht auftreten. Das von Krüger bei weinsaurem Ammonium, Asparagin, oder Pepton konstatierte Verblassen wird wahrscheinlich auf der Wirkung der Glukose beruhen.

A. BEDINGUNGEN DER VERGILBUNG.

1. Beziehungen zwischen der Vergilbung und den C-Verbindungen.

Wir haben schon bei den Untersuchungen über die Nährwerte der C-Verbindungen gesehen, daß *Chlorella l.*, *Stichococcus v.*, *Scenedesmus n.* und *Chlorosphaera p.* früher oder später bei Gl-Agar oder Gl-L vergilben. Bei *Chlamydomonas k.* konnte ich aber in diesen Nährmedien keine Vergilbung wahrnehmen. Im Winter sieht man aber, daß der an der Oberfläche der Nährlösungen (M-L od. Gl-L) und an der Glaswand liegende Teil der Kulturen sich braun färbt. Nach der Untersuchung wurde es aber klar, daß die Entfärbung durch die Gegenwart von gelben, kugeligen, mit Stärke gefüllten Zellen verursacht wird. Man könnte jene Entfärbung vielleicht als eine Überwinterungserscheinung betrachten.

Die Kontrollkulturen von *Chlorella l.*, *Stichococcus v.* und *Scenedesmus n.* auf M-Agar oder in M-L waren noch nach Verlauf von etwa einem Jahre frisch grün. Der Fall liegt bei *Chlorosphaera p.* etwas anders. So beobachtete ich oft die Vergilbungserscheinung nach längerer Kultur sowohl in M-L (Kontrollkultur) als auch in Gl-L. Ich konnte aber feststellen, daß bei diesen Lösungen die Lichtintensität von großer Bedeutung ist. So fand ich bei den Versuchen im Winter oder im Frühling keine Entfärbung in M-L.

Im Sommer passierte es mir aber gegen meine Erwartung, daß im Verlauf von drei Monaten fünf vor dem Fenster aufgestellte Kulturen vergilbten, und fünf andere vom Fenster entfernt aufgestellte Kulturen ganz grün blieben.

Es ist von einigem Interesse zu finden, daß sich bei Gl-Gelatine kein Vergilbungsvorgang zeigt. So konnte ich z. B. bei *Chlorella l.*, *Stichococcus v.* und *Scenedemus n.* denselben in einer Stichkultur sogar nach Verlauf von sieben Monaten noch nicht beobachten. Die Algenentwicklung auf Glukosegelatine steht derjenigen auf Gl-Agar bei weitem nach, woraus sich schließen läßt, daß die Assimilation der Glukose auf Glukosegelatine langsamer vor sich geht. Die Abwesenheit der Vergilbungserscheinung bei Anwendung von Gl-Gelatine ist augenscheinlich darauf zurückzuführen.

Nun will ich besonders auf die Versuche mit der Agarkultur, bei denen 1% C-Quelle enthalten war, etwas näher eingehen. Die Versuchsprotokolle sieht man im Kapitel 5, Abschnitt V. Die Resultate waren wie folgt:

Chlorella l.

Vergilbt sowohl bei Strich- als auch Stichkultur:

Glukose, Galaktose, Saccharose,
Mannose und Mannit.

Vergilbt nur bei Stichkultur: Maltose.

Vergilbt weder bei Strich- noch bei Stichkultur:

Raffinose, Inulin, Glyzerin und Laktose.

Die Algenentwicklung einer vergilbbaren Strichkultur übertrifft bei weitem die bei der nicht vergilbbaren Strichkultur. Das Verhalten bei der Stichkultur ist aber unregelmäßig.

Stichococcus v.

Vergilbt sowohl bei Strich-

als auch bei Stichkultur: Glukose und Mannose.

Vergilbt nur bei Stichkultur: Galaktose und Maltose.

Vergilbt weder bei Strich-

noch bei Stichkultur : Saccharose, Mannit, Raffinose,
Laktose, Inulin und Glyzerin.

Die Algenentwicklung übertrifft bei vergilbbarer Strichkultur bei weitem die bei der nicht vergilbbaren Strichkultur. Das Verhalten bei der Stichkultur ist aber unregelmäßig.

Scenedesmus n.

Vergilbt sowohl bei Strich-als

auch bei Stichkultur : Glukose, Galaktose, Mannit,
Maltose und Mannose.

Vergilbt nur bei Strichkultur: Saccharose und Laktose.

Vergilbt nicht bei Strichkultur: Raffinose. Inulin und Glyzerin.

Vergilbt nicht bei Stichkultur: Saccharose, Laktose, Raffinose,
Inulin und Glyzerin.

Beim nicht vergilbbaren Zustande bei Stichkultur weisen die Algen in den meisten Fällen geringere Entwicklung als beim vergilbbaren Zustande auf. Bei der Strichkultur liegt der Fall ganz anders. Bei dieser ist der Anaërobismus stark ausgeprägt, und daher ist die Algenentwicklung sehr schlecht. Ungeachtet dessen vergilbt die Alge frühzeitig, woraus wir schließen können, daß die Luft als solche bei dieser Kultur eine giftige Einwirkung ausüben kann.

Chlorosphaera p.

Vergilbt bei Strichkultur : Glukose, (Galaktose?) Mannit,
Raffinose und Laktose.

„ bei Stichkultur : Saccharose, Maltose, Mannit,
Raffinose und Laktose.

Vergilbt nicht bei Strichkultur: Saccharose, Maltose, Mannose
und Glyzerin.

Vergilbt nicht bei Stichkultur: Glukose, Galactose, Mannose und Glyzerin.

Bei der Strichkultur konnte ich beobachten, daß die bessere Algenentwicklung eine Vergilbung mit sich bringt. Bei der Stichkultur ist es umgekehrt. Bei Glukose, Galaktose und Mannose ist die Entwicklung besser als bei Saccharose, Maltose, Mannit, Raffinose und Laktose. Die Vergilbungserscheinung tritt nur bei den letztgenannten C-Quellen auf. Bei Glyzerin ist die Algenentwicklung schwach, und da ist keine Vergilbung.

Chlamydomonas k.

Bei keinen der zu den Versuchen angewandten C-Verbindungen trat eine Vergilbung ein.

Von den oben erwähnten Resultaten seien die folgenden besonders hervorgehoben.

- a). *Stichococcus v.* vergilbt nicht bei der Galaktoseagarstrichkultur; dagegen vergilbt er bei der Stichkultur im selben Medium. Ähnlich verhalten sich die Maltoseagarkulturen von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.*
- b). Bei ein und derselben Kulturweise rufen die verschiedenen C-Quellen früher oder später Vergilbung hervor (siehe Kapitel 3 dieses Abschnitts).

Betrachten wir die Beziehung zwischen Vergilbung und Algenentwicklung, so sehen wir, daß die beiden Erscheinungen in vielen Fällen parallel gehen, z. B. bei den Strichkulturen von *Chlorella l.*, *Stichococcus v.* und *Chlorosphaera p.*, und bei den Stichkulturen von *Scenedesmus n.* und *Stichococcus v.* In diesen Fällen übertrifft die Algenentwicklung der vergilbbaren Kulturen bei weitem diejenige der nicht vergilbbaren. Es mag sein, daß die C-Verbindungen bei den nicht vergilbbaren Kulturen für die Algen schwer assimilierbar sind. Man kann daher bei der vergilbbaren Kultur eine sapro-

phytische Lebensweise vermuten, als dessen Folge die Vergilbungserscheinung eintritt. Ob. aber diese Vermutung richtig ist, wird später diskutiert werden.

Bei der Strichkultur von *Scenedesmus n.* und bei der Stichkultur von *Chlorosphaera p.* ist das Wachstum bei der vergilbbaren Kultur viel geringer als das bei der nicht vergilbbaren Kultur. Das Verhalten von *Scenedesmus n.* ist aber begreiflich, wenn man an die stark mikroaërophile Eigenschaft dieser Alge bei den vergilbbaren Kulturen denkt. So scheint es natürlich, daß die Algenentwicklung bei der vergilbbaren Strichkultur der nicht vergilbbaren Kultur nachsteht. Wie ist nun das Verhalten von *Chlorosphaera p.* bei der Stichkultur erklärlich? Es scheint mir hier eine besondere Eigenschaft der Alge vorzuliegen. Die Entwicklung in Glukose-, Galaktose- und Mannoseagarstichkulturen übertrifft diejenige der vergilbbaren Stichkulturen. Man findet aber keine Vergilbung bei den erst genannten Kulturen. Die Entwicklung bei Glyzerinagarstichkultur ist ähnlich wie die bei den vergilbbaren Stichkulturen. Glyzerin ist für *Chlorosphaera p.* schwer assimilierbar. Die Abwesenheit der Vergilbungserscheinung versteht sich daher von selbst.

Ähnlich verhält sich die Stichkultur von *Chlorella l.* Die Entwicklung bei Raffinoseagarstichkultur übertrifft erheblich diejenige der vergilbbaren Stichkulturen. Trotzdem findet man keine Vergilbung bei der ersteren. Die Entwicklung bei Inulin- Glyzerin- und Laktoseagarstichkultur ist ähnlich wie die bei den vergilbbaren Stichkulturen. Diese drei C-Verbindungen sind für *Chlorella l.* schwer assimilierbar, womit die Abwesenheit der Vergilbungserscheinung erklärlich ist.

Es ist noch besonders hervorzuheben, daß die Entwicklung bei den vergilbbaren Stichkulturen oft der bei den nicht vergilbbaren Stichkulturen nachsteht. In diesem Falle sieht man einen ziemlich deutlichen Mikroaërobismus bei den letzteren Kulturen.

Es ist aber auf eine besondere Eigenschaft der *Chlorosphaera p.* und *Chlorella l.* zurückzuführen, daß bei den nicht vergilbbaren Stichkulturen trotz größerer Entwicklung der Algen keine Vergilbung zustande kommt.

Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß die Algen bei verschiedenen Wachstumsgraden zu einer saprophytischen Lebensweise übergehen können. Dies sollte ein Beweis dafür sein, daß die Vergilbung eine ökologische Erscheinung ist.

Weiterhin stellte ich Versuche an, um die Beziehungen zwischen Vergilbung und Konzentration der Glukose bei *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* festzustellen. Betreffs der Versuchsprotokolle verweise ich auf den Unterabschnitt C.

Als Resultat ergab sich, daß die beiden Algen auch auf einem mit 1%, 2%, 5% oder 10%-Glukose versehenen Agarnährboden vergilbten.

Bei *Chlorella l.* machte ich weitere Versuche mit Nährlösungen. Die Resultate waren ähnlich wie die bei Agarkultur. Ein Zusatz 0.5%-Glukose, sowohl bei Lösungs- als auch bei Agarkultur, rief keine Vergilbung hervor.

Zum Schluß dieses Kapitels will ich meinen Versuch über den Einfluß von Maltose auf die Vergilbung von *Scenedesmus n.* beschreiben.

Nach Beijerinck (1890) wird *Scenedesmus acutus* bei Malzextraktgelatine farblos, die 12% Maltose enthält. Er sagt „Das Chromatophor verliert auf solchem substanzreichen Nährboden aber die frisch grüne Farbe, und ausschließlich sieht man von Chlorophyllfarbstoff kaum etwas mehr“ (siehe S. 730).

Da aber sein Nährboden eine unbekannte Zusammensetzung hatte, war es sehr fraglich, ob die Verblassung wirklich mit dem „substanzreichen Nährboden“ im Zusammenhang stand. Es schien mir

daher nötig eine Nachprüfung vorzunehmen. Dabei bediente ich mich eines Nährbodens mit folgender Zusammensetzung.

M-L ohne $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{Ca Cl}_2$ 0.1%

+ Gelatine 15%

+ Maltose

Mit oder ohne weitere Zugabe von N-Verbindung.

Das Nährsubstrat wurde zu je 7 cm³ in Proberröhren gegossen. Nach der Sterilisation wurde eine Stichkultur hergestellt. Die Versuchsprotokolle sind die folgenden:

Kulturdauer: 10/XII '13–19/V '14.

+ 2% Maltose	ger. M. farblos!
+ 5 „	do.
+ 12 „	„
+ 2% Maltose + 0.2% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	„
+ 5 „ + „	„
+ 12 „ + „	„
+ 2% Maltose + 0.2% Asparagin	„
+ 5 „ + „	„
+ 12 „ + „	„

Weitere Versuche wurden mit Maltoseagarstichkultur gemacht.

Kulturdauer: 28/VI–22/IX.

M-Agar + 2% Maltose	g. M.; grün
„ + 5 „	do.
„ + 10 „	s. g. M.; grün

Bei Maltosegelatine trat die Entfärbung deutlich auf. Diese läßt sich aber nicht auf reiche Ernährung, sondern vielmehr auf eine schlechte Ernährung zurückführen, weil die Entwicklung dabei sehr schlecht war. Die Richtigkeit dieser Annahme folgt auch

daraus, daß die Alge bei Agarkultur keine Entfärbung hervorruft. Wir haben schon im Abschnitte V beobachtet, daß *Scenedesmus* beim 1% Maltoseagar im Verlaufe von fünf Monaten vergilbte aber keineswegs weiß wurde. Jedenfalls ging die Entfärbung im Sinne von Beijerinck nie vor sich.

Daher halte ich die verblässende Wirkung von Maltose im Sinne von Beijerinck kaum für möglich. Es ist unbestimmt, ob die von Beijerinck erforschte Alge nicht einer anderen Rasse von *Scenedesmus obliquus* angehört.

2. Vergilbungsstand bei Glukosenährmedien.

Um das Wesen der Vergilbungserscheinung klar zu stellen,

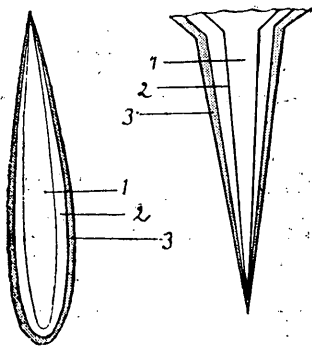


Fig. 6. Fig. 7.

Schematische Darstellungen vom Wachstumsstande bei *Chlorella l.* und *Stichococcus v.*

Fig. 6. Strichbelag von oben gesehen.

Fig. 7. Stichbelag von den Seiten gesehen.

Erste Vergilbungszone geschwärzt (Erklärung im Text.)

beobachtete ich besonders vorsichtig den Vergilbungsstand bei Glukosenähragar. Der Vergilbungsstand ist besonders kompliziert. Es ist zunächst zu bemerken, daß der Vergilbungsstand je nach der anaëroben oder aëroben Entwicklung deutliche Verschiedenheiten aufweist. Hiermit unterscheidet sich der Vergilbungsstand bei *Scenedesmus n.* deutlich von dem der anderen untersuchten Algen.

a). Vergilbungsstand bei *Chlorella l.* und *Stichococcus v.*

Der Wachstumsstand dieser Algen bei Glukoseagar-Strichkultur und-Stichkultur ist aus den beigegeführten Abbildungen zu ersehen. Dabei zeigt, (1) erster Wachstumsbezirk,

(2) zweiter und (3) dritter. Die Vergilbung bei der Strichkultur tritt zuerst im dritten Wachstumsbezirk ein. Die Vergilbung des folgenden Wachstumsbezirks hängt von der Bestrahlung ab. Bestrahlt an der Oberfläche der Agarschräge schreitet die Vergilbung bis in die Mitte des an der Oberfläche befindlichen Teils des Algenbelags fort; die hinteren und zentralen Teile des Algenbelags bleiben dabei lange grün. Schließlich vergilbt auch der hintere Teil, und nur der zentrale Teil behält eine grüne Farbe. Wird die Hinterseite des Agars bestrahlt, so vergilbt der hintere Teil gleichzeitig mit der Oberfläche.

Bei Stichkultur tritt die Vergilbung zuerst am peripherischen Teil des Algenbelags auf. Die Oberfläche bleibt dabei lange grün. Dies zeigt, daß in diesem Fall die Luft eine hemmende Wirkung auf die Vergilbung ausübt. Bei der Vergilbung in der Stichkultur konnte ich keinen Einfluß einseitiger Beleuchtung konstatieren. Der Algenbelag vergilbte in gleicher Weise, einerlei von welcher Seite er beleuchtet wurde.

Um eine einseitige Beleuchtung zu erhalten, genügt es diffuses Licht durch das Fenster direkt auf eine Seite der Kulturröhren fallen zu lassen, oder die Kulturröhren mit durchlöchertem schwarzen Papier zu bedecken, durch dessen Löcher das Licht auf die Kultur fällt.

Der Vergilbungsstand von *Chlorosphaera p.* hängt gleichfalls von der Beleuchtung ab. Bei Strichkultur fand ich aber eine gleichmäßige Vergilbung der Oberfläche des Algenbelags, wenn die Strichkultur von der Oberfläche beleuchtet wurde; die hintere Seite behielt aber lange ihre grüne Farbe.

b). Vergilbungsstand bei *Scenedesmus n.*

Glukosestrichkultur weist, wie schon erwähnt, eine schlechte Entwicklung auf, und es zeigt sich nur ein kleiner Algenbelag.

Dieser wird frühzeitig gelbraun und dann weiß. Die Entfärbung beginnt in der Mitte der Oberfläche des Belags, dann verfärbt sich der periphere Teil. Der hintere Teil bleibt dagegen lange grün, und ich konnte keinen Einfluß der einseitigen Beleuchtung konstatieren. Der Vergilbungsstand war der gleiche, ob die Kultur von der Oberfläche oder von der Hinterseite des Agars beleuchtet wurde. Daraus kann man schließen, daß der Vergilbungsstand in diesem Falle völlig von der Luft abhängt (vergl. Fig. 8; 1, Erste Wachstumszone, 2, zweite, 3, dritte; entfärbte Teile geschwärzt).

Bei der Stichkultur vergilbt der obere der Luft ausgesetzte Teil des Belags frühzeitig. Daraus ersieht man die nachteilige Einwirkung der Luft. Bei längerer Kulturdauer vergilbt der periphere Teil des Belags. In diesem Falle konnte ich den Einfluß einseitiger Beleuchtung beobachten. Die Vergilbung beginnt auf der beleuchteten Seite des Belags. Bei alter Stichkultur verblaßt der obere Teil des Belags völlig, der innere Teil aber behält eine gelbgrüne Farbe (vergl. Fig. 9, Bezeichnung dieselbe wie in 8).

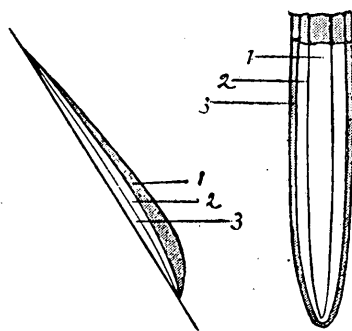


Fig. 8. Fig. 9.

Schematische Darstellungen vom Wachstumsstande bei *Scenedesmus n.*

Fig. 8. Strichbelag von den Seiten gesehen.

Fig. 9. Stichbelag von den Seiten gesehen.

(Erklärung im Text.)

Nun noch einige Worte über den Vergilbungsstand bei der Glukoselösungskultur. Bei dieser befindet sich die Algenmasse am Boden der Kolben. Bei *Chlorella l.* und *Scenedesmus n.* beginnt die Vergilbung zuerst an der oberen Schicht der Algenmasse. Wir können also einen Einfluß des Lichtes annehmen. Bei *Stichococcus v.* und *Chlorosphaera p.* tritt die Vergilbung gleichmäßig bei allen Teilen der Algenmasse auf.

Aus obigem geht hervor, daß Luft und Licht bei der Vergilbungserscheinung von großer Bedeutung sind. Es fragt sich nun, ob sie die hauptsächlichsten Ursachen der Vergilbung sind. Sie können allerdings oft einen großen Einfluß auf die Vergilbung ausüben; die hauptsächlichste Ursache bilden sie jedoch nie. Die Vergilbung bei der Strichkultur von *Scenedesmus n.* muß ohne Zweifel auf der Gegenwart der Glukose und der schädigenden Einwirkung der Luft beruhen. In diesem Falle ist die Gegenwart der Glukose die Hauptursache, weil die Verfärbung nie beim M-Agar auftritt. Einen großen aber untergeordneten Einfluß übt auf die Entfärbung auch das Licht aus.

Man denke auch an die Vergilbung sowohl bei der Strich- als auch bei der Stichkultur von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* und bei der Stichkultur von *Scenedesmus n.* Die Vergilbung beginnt bei der Strichkultur zuerst an den Rändern des Algenbelags und bei der Stichkultur am peripherischen Teil des Belags. Es ist sehr wohl möglich, daß die zuerst vergilbenden Teile mit reicherer Ernährung und bevorzugten Wachstumsbedingungen ausgestattet sind. So kann man bei jenen Teilen des Algenbelags immer eine weitere Entwicklung beobachten. Daher könnte man bei den zuerst vergilbenden Teilen an die neueste Generation der Algen denken. Bei der Vergilbung von Strichkultur ist sowohl die Luft, als auch das Licht nur von untergeordneter Wichtigkeit, denn, obgleich alle Teile der Luft und dem Lichte in gleicher Weise ausgesetzt sind, vergilben zunächst die Ränder des Belags, während die Vergilbung des mittleren Teils erst später einsetzt. Bei der Stichkultur übt das Licht oft eine bedeutende Wirkung aus, doch kann auch die beschattete Seite des Belags später vergilben.

Aus dem oben erwähnten ergibt sich, daß die hauptsächlichste Ursache der Vergilbung im Vorhandensein von Glukose liegt.

3. Von der Überimpfung bis zur Vergilbung vergangene Zeitdauer.

Die vergilbbaren Kulturen besitzen im frischen Zustande eine fast gleich grüne Farbe, wie die Kulturen auf und in Mineralsalznährboden. Erst nach mehr oder weniger langer Zeitdauer beginnen sie zu vergilben. Diesbezügliche Beobachtungen sind sehr spärlich. Ohne besondere Vorsicht soll man oft die Endfarben für normal halten. Um diese Lücke etwas auszufüllen, teile ich die folgenden Beobachtungen mit, aber die gewonnenen Resultate sind nicht ganz präzise. Sie genügen jedoch die Verschiedenheit der Zeitdauer, die von der Überimpfung bis zur Vergilbung verfließt, zu zeigen. Alle Daten wurden dem Abschnitte V entnommen.

Kulturbedingungen: Zimmertemperatur; diffuses Licht.

Zeitdauer bei Agarkulturen.

Chlorella l.

M-Agar	Strichkultur	Stichkultur
+ 2% Glukose	Etwa 94 Tage (22/XI-14/II)	101 Tage (22/XI-2/III)
+ 2% Galaktose	„ 68 „ (4/XII-10/II)	89 „ (4/XII-3/III)
+ 2% Mannose	„ 68 „ (4/XII-10/II)	89 „ (4/XII-3/III)
+ 2% Mannit	„ 68 „ (4/XII-10/II)	146 „ (4/XII-29/IV)
+ 2% Saccharose	„ 146 „ (4/XII-29/IV)	89 „ (4/XII-3/III)
+ 2% Maltose	Keine Vergilbung	89 „ (4/XII-3/III)

Stichococcus l.

M-Agar	Strichkultur	Stichkultur
+ 2% Glukose	118 Tage (5/VI-1/X) 117 „ (29/XI-26/III)	94 Tage (29/XI-3/III)
+ 2% Galaktose	146 „ (4/XII-29/IV)	113 „ (4/XII-27/III)
+ 2% Mannose	Keine Vergilbung	113 „ (4/XII-27/III)
+ 2% Maltose	Keine Vergilbung	113 „ (4/XII-27/III)

Scenedesmus v. (C-Quelle, 1%)

M-Agar	Strichkultur	Stichkultur
+ Glukose	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Gelbgrün nach { 2 M. (21/VI-23/VIII) 5 M. (29/XI-29/IV)
+ Galaktose	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Gelbgrün nach 2 M. (29/VI-23/VIII)
+ Mannit	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Gelbgrün nach 2 M. (29/VI-23/VIII)
+ Maltose	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Gelbgrün nach 2 M. (29/VI-23/VIII)
+ Mannose	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Gelbgrün nach 2 M. (29/VI-23/VIII)
+ Saccharose	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Keine Vergilbung
+ Laktose	Gelbweiß nach 2 Monaten (21/VI-23/VIII)	Keine Vergilbung

Chlorosphaera p. (C-Quelle, 2%)

M-Agar	Strichkultur	Stichkultur
+ Glukose	4 Monate (20/VI-22/X)	Keine Vergilbung
+ Galaktose	?	Keine Vergilbung
+ Mannit	4 M. (20/VI-22/X)	3 M. (20/VI-10/IX)
+ Raffinose	4 M. (20/VI-22/X)	3 M. (20/VI-10/IX)
+ Laktose	4 M. (20/VI-22/X)	3 M. (20/VI-10/IX)
+ Maltose	Keine Vergilbung	3 M. (20/VI-10/IX)

Fassen wir die Resultate zusammen, so ergibt sich, daß die Zeitdauer bei ein und derselben Kulturweise je nach den Arten der C-Verbindungen verschieden ist. Zeitdauer und Vermehrungsmenge gehen dabei keineswegs parallel. Hieraus könnte man den Schluß ziehen, daß der Übergang der Algen zur saprophytischen Lebensweise sich je nach den Arten der C-Verbindungen verschieden verhält.

Vergleichen wir die Zeitdauer bei Strich- und Stichkultur, so zeigt sich da auch eine Unregelmäßigkeit. Bald kommt die Vergilbung bei der ersteren früher, bald später als bei der letzteren vor. Dabei ist die Zeitdauer je nach den Arten der C-Verbindung und der Algen veränderlich. Bei *Scenedesmus n.* kommt die Verfärbung immer später bei der Stichkultur als bei der Strichkultur vor. Der Fall ist bei *Stichococcus v.* umgekehrt. Bei *Chlorella l.* ist das Verhalten ganz unregelmäßig, doch vergilbt die Alge in den meisten Fällen später bei Stichkultur als bei Strichkultur.

Zum Schluß dieses Kapitels sei noch die Zeitdauer bei Flüssigkeitskulturen hinzugefügt.

Zeitdauer bei 2%-Glukoselösung

<i>Chlorella l.</i>	Etwa 2 Monate (8/VII-22/IX).
„	„ 3 „ (12/XII-6/III).
<i>Stichococcus v.</i>	ditto.
<i>Scenedesmus n.</i>	ditto.
<i>Chlorosphaera p.</i>	Etwa 5 Monate (12/XII-6/V).

4. Einfluß des Lichtes auf die Vergilbung.

Im vorigen Kapitel habe ich gezeigt, daß das Licht die Vergilbung befördert, und möchte jetzt den Einfluß des farbigen Lichtes auf die Kulturen feststellen. Um farbiges Licht zu erhalten, habe ich verschiedenfarbige Glasplatten benutzt, die an einer Seite des Holzkastens eingesetzt wurden. Eine Glukoseagarkultur wurde in einen Kasten gestellt und diffusem Licht ausgesetzt.

Die hergestellten Lichtarten waren die folgenden:

Rotes Licht: durch eine rote Glasplatte.

Blaues Licht: durch eine blaue Glasplatte.

Weißes Licht: durch eine matte Glasplatte.

Intensives weißes Licht: die Kultur wurde direkt vor das Fenster gestellt, dessen Glasscheiben mit dünnem weißen Papier bedeckt wurden.

Schwaches weißes Licht: die Kultur wurde an einem vom Fenster etwa 2 m. entfernten Ort aufgestellt, und das Licht wurde, wie im obigen Falle, durch mit dünnem weißen Papier bedeckte Fensterscheiben bestrahlt.

Die Versuchsprotokolle sind die folgenden:

Chlorella l. bei Strichkultur.

Versuchsbeginn 15/XI	14/II	3/III
Rotes L.	Gelbgrün, noch nicht vergilbt!	Vergilbung deutlich.
Blaues L.	Gelbgrün, noch nicht vergilbt!	Vergilb. schwach grüner als vorige Kultur.
Weißes L.	Gelbgrün, noch nicht vergilbt!	Vergilb. schwach.
Intensives L.	Gelbgrün, noch nicht vergilbt!	Vergilb. schwach.
Schwaches L.	Gelbgrün, noch nicht vergilbt!	Vergilb. schwach.

Stichococcus v. bei Strichkultur.

Angestellt 15/XI	14/II	3/III	26/IV
Rotes L.	Grün	Hier und da vergilbt!	Vergilb. deutlich.
Blaues L.	Grün	Grün, noch nicht vergilbt.	Vergilb. begann.
Weißes L.	Grün	Grün, noch nicht vergilbt.	Vergilb. begann.
Starkes L.	Grün	Vergilb. schwach	Vergilb. deutlich.
Schwaches L.	Grün	Grün, noch nicht vergilbt.	Vergilb. begann.

Scenedesmus n. bei StICKkultur.

Augestellt 15/XI	14/II	3/III	26/III	26/IV
Rotes L.	Grün	Grün, Oberfläche vergilbt!	Ähnlich wie in 3/III.	Vergilb. des Be- lags begann.
Blaues L.	Grün	Grün, Oberfläche nicht gelb.	Ähnlich wie in 3/III.	Vergilb. des Be- lags begann.
Weißes L.	Grün	Grün, Oberfläche nicht gelb.	Grün, Oberfläche vergilbt.	Vergilb. des Be- lags begann.
Starkes L.	Grün	Vergilb. des Be- lags begann.	Vergilb. deutlich.	Vergilb. deutlich.
Schwaches L.	Grün	Grün.	Grün.	Vergilb. schwach.

Aus den oben mitgeteilten Resultaten geht hervor, daß die Vergilbung früher und stärker im roten Licht als im blauen auftritt. Dieses weist darauf hin, daß die Zerstörung des Chlorophylls rascher im ersteren als im letzteren vor sich geht. Dieses Resultat schließt sich im allgemeinen dem von Sachs, Reinke und Wager an. Die Resultate im weißen Lichte waren ähnlich wie die im blauen Lichte. Dieses ist aber wahrscheinlich auf die schwache Lichtintensität hinter der matten Glasplatte zurückzuführen.

Wenn man die Resultate im starken und schwachen Lichte mit einander vergleicht, so ist es klar, daß die Lichtintensität einen nennenswerten Einfluß auf die Vergilbung ausübt.

5. Einfluß der Dunkelheit auf die Chlorophyllbildung.

Über das Verhalten der Algen gegen die Dunkelheit verweise ich namentlich auf die Arbeiten von Artari (1902 b). Bei seinen Untersuchungen ist besonders hervorzuheben, daß die Chlorophyllbildung von *Stichococcus bacillaris* im Dunkeln stark von den Nährstoffen abhängig ist.

Es lag mir daran festzustellen, ob etwas ähnliches auch auf die von mir isolierte Alge zutraf. Da die Reaktion der Algen sich je nach den Nährböden ändert, bediente ich mich einer Nährlösung, die völlig nach Artari (1902 b, S. 202) hergestellt wurde.

Grundlösung: Glukose	1 %
KH ₂ PO ₄	0.3 „
Mg SO ₄	0.1 „
Ca Cl ₂	0.1 „
FeCl ₃	Spur

Dieser Lösung wurde jede benutzte N-Verbindung in einer Quantität von 0.5% zugesetzt. Die Nährlösung wurde zu je 50 cm³ in Kolben von ca 200 cm³ Inhalt gegossen. Nach dreimaliger Sterilisation wurden die Kolben mit frischen Algen aus einer Gl-Agarkultur überimpft. Kulturbedingungen: Zimmertemperatur; diffuses Licht.

Versuche mit *Stichococcus bacillaris* Näg. var. *viridis*, var. nov.

Lichtkultur; Kulturdauer 28/VI-22/IX.

+K NO ₃	g. M., dunkelgrün.
+NH ₄ Cl	m. M., gelbgrün.
+Asparagin	g. M., grün.
+Pepton	g. M., grün.

Dunkelkultur; Kulturdauer gleich wie oben.

+KNO ₃	m. M., gelbgrün, deutliche Chlorophyllbildung
+NH ₄ Cl	ger. M., ditto.
+Asparagin	m. M., „
+Pepton	m. M., „

Unsere Resultate weichen also von denen von Artari erheblich ab, da unsere Alge das Chlorophyll im Dunkeln nicht nur bei or-

ganischen, sondern auch bei anorganischen N-Verbindungen zu bilden vermag. Die Farbentöne bei beiden Medien sind fast die gleichen. Es war aber außer Zweifel, daß die Chlorophyllbildung im Dunkeln deutlich schwächer als im Lichte war. Jedenfalls ist es sicher, daß der von mir isolierte *Stichococcus* im Dunkeln eine stärkere Chlorophyllbildung als der von Artari aufweist. Man darf vielleicht diese Verschiedenheit als ein Rassenmerkmal betrachten.

Dasselbe Verhalten wurde auch mit Agarkultur bestätigt, wie man aus den folgenden Versuchen ersieht, die sich nicht nur auf die Chlorophyllbildung von *Stichococcus*, sondern auch auf die von anderen Algen beziehen.

Versuchsbeginn : 20/VI, 1914.

<i>Chlorella l.</i>	17/VII	6/VIII.
M-Agar-Strichkultur	s. ger. M., grün.	s. ger. M., grün.
„ -Stichkultur	s. ger. M., grün.	s. ger. M., grün.
Gl-Agar-Strichkultur	g. M., gelbgrün.	g. M., gelbgrün-gelb
„ -Stichkultur	ger. M., gelbgrün, Oberfläche grün.	g. M., Oberfläche auch gelbgrün.
<i>Stichococcus v.</i>	17/VII	6/VIII
M-Agar-Strichkultur	s. ger. M., gelbgrün.	s. ger. M., weißgrün.
„ -Stichkultur	s. ger. M., gelbgrün.	s. ger. M., grün.
Gl-Agar-Strichkultur	m. M., grün	g. M., grün !
„ -Stichkultur	m. M., gelbgrün, Oberfläche grün.	m. M., gelbgrün, Oberfläche grün.
<i>Scenedesmus n.</i>	17/VII	6/VIII
M-Agar-Strichkultur	m. M., gelbgrün.	s. ger. M., weißgrün.

<i>Scenedesmus n.</i>	17/VII	6/VIII.
M-Agar-Stichkultur	m. M., gelbgrün.	s. ger. M., weißgrün.
Gl-Agar-Strichkultur	m. M., gelb.	m. M., weiß.
„ -Stichkultur	m. M., gelbgrün.	m. M., weißgrün !
<i>Chlorosphaera p.</i>	17/VII	6/VIII.
M-Agar-Strichkultur	s. ger. M., gelbgrün.	s. ger. M., weiß.
„ -Stichkultur	s. ger. M., gelbgrün.	s. ger. M., weiß.
Gl-Agar-Strichkultur	m. M., gelbgrün.	m. M., grün !
„ -Stichkultur	m. M., gelbgrün.	m. M., gelbgrün.
<i>Chlamydomonas k.</i>	17/VII	6/VIII.
M-Agar-Strichkultur	s. ger. M., grün.	s. ger. M., weißgrün.
„ -Stichkultur	s. ger. M., grün.	s. ger. M., weißgrün.
Gl-Agar-Strichkultur	s. ger. M., grün.	s. ger. M., weißgrün.
„ -Stichkultur	s. ger. M., grün.	s. ger. M., weißgrün.

Aus den oben erwähnten Resultaten sieht man zunächst, daß die Chlorophyllbildung von *Stichococcus v.* im Dunkeln stärker bei Agarkultur als bei Flüssigkeitskultur ausgeprägt ist. Wir sehen ferner eine stärkere Chlorophyllbildung bei Gl-Agar als bei M-Agar, während der Fall bei *Chlorella l.* umgekehrt ist, wo man bei Gl-Agarstrichkultur einen gelbgrünen Belag erhält. Ich erhielt auch bei Glukosenährlösung eine gelbgrüne Kultur von *Chlorella l.* Nach Grintzesco (1903, S. 74) bildet die von ihm isolierte *Chlorella vulgaris* bei Gl-Agar einen grünen Belag. Die von mir isolierte *Chlorella* ist daher betreffs Chlorophyllbildung im Dunkeln von der von Grintzesco ganz verschieden. Das Verhalten unserer Alge

ähnelt vielmehr dem von *Chlorella communis* Artari, die nach Artari (1906, S. 186) in der Glukosenährlösung eine gelbgrüne Farbe aufweist.

Im allgemeinen retardiert die Dunkelheit deutlich die Chlorophyllbildung. So sind die Glukoseagarstrichkulturen von *Chlorella* l., *Scenedesmus* n. und *Chlorosphaera* p. im Dunkeln schon im frischen Zustande der Kultur gelbgrün oder gelb. Die Glukoseagarstrichkultur von *Stichococcus* v. ist grün, jedoch deutlich weniger grün als bei der Lichtkultur. Die Retardierung der Chlorophyllbildung im Dunkeln zeigt sich aber viel deutlicher bei der Glukoseagarstichkultur. Auch bei Mineralsalzagarkultur sieht man ziemlich deutlich retardierte Chlorophyllbildung. Da aber dabei die Algenentwicklung schwach ist, so ist die Retardierung nicht ausgeprägt.

Die Algenentwicklung ist ebenfalls im Dunkeln stark gehemmt. Sowohl bei M-Agar als auch bei Gl-Agar konnte ich eine retardierte Entwicklung bei allen untersuchten Algen beobachten. Die Retardierung war besonders bei *Chlamydomonas* k. beträchtlich.

6. Einfluß der Temperatur auf die Vergilbung.

Es steht uns kein Zimmer mit konstanter Temperatur zur Verfügung. Daher habe ich den vorliegenden Versuch im Winter ausgeführt, um die Kulturen im Laboratorium und im Treibhaus zu vergleichen. Im Treibhaus herrschte fast immer eine Temperatur von 20° C. Der Temperaturwechsel an anderen Plätzen wurde mit einem selbstregistrierenden Thermometer bestimmt. Bei den Versuchen sollte aber die Lichtintensität der Kulturorte berücksichtigt werden, und für diese Zwecke wählte ich Orte von fast gleicher Lichtstärke, die aber quantitativ nicht bestimmt wurde.

Um den Zeitpunkt der Vergilbung zu bestimmen, wurde die Zeitdauer gemessen, die von der Überimpfung bis zur Vergilbung verfloß. Als Nähboden benutzte ich immer das Glukosenähragar.

<i>Chlorella l.</i> bei Strichkultur	Zeitdauer bis Vergilbung
Treibhaus, wo eine Temperatur von ca 20° C herrschte	36 Tage (4/XII-9/I)
Treibhaus, wo T. von 0° bis 14° C fluktuierte	72 „ (4/XII-14/II)
Laboratorium, wo T. unter 8° fluktuierte	84 „ (22/XI-14/II)
<i>Stichococcus v.</i> bei Strichkultur	Zeitdauer bis Vergilbung
Treibhaus von 20°	89 Tage (4/XII-3/III)
Treibhaus von 0°-14°	112 „ (4/XII-26/III)
Laboratorium unter 8°	117 „ (29/XI-26/III)
<i>Scenedesmus n.</i> bei Stiechkultur.	Zeitdauer bis Vergilbung
Treibhaus von 20°	89 Tage (4/XII-3/III)
Treibhaus von 0°-14°	112 „ (4/XII-26/III)
Laboratorium unter 8°	151 „ (29/XI-29/IV)

Die Tabelle läßt erkennen, daß die Algen im Treibhaus, wo eine Temperatur von ca 20° C herrschte am frühesten vergilbten. Zu meiner Überraschung vergilbte *Chlorella l.* schon im Laufe von etwa einem Monat.

Die Vergilbungszeit im Treibhaus mit niederer Temperatur und im Laboratorium war bei *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* fast gleich, während sich bei *Scenedesmus n.* eine ziemlich deutliche Verschiedenheit zeigte. Diese Abweichung ist aber damit erklärlich, daß *Scenedesmus n.* bei Zimmertemperatur im Winter eine schlechtere Entwicklung als die beiden anderen Algen aufweist.

Es drängt sich einem dann die Frage auf, wie die höhere Temperatur eine beschleunigende Wirkung auf die Vergilbung der Algen ausüben kann. Es scheint mir höchst wahrscheinlich, daß

diese Wirkung auf das geförderte Wachstum zurückzuführen ist, weil ich sowohl im Treibhaus bei niedriger Temperatur als auch im Laboratorium ein langsames Wachstum als im Treibhaus von 20° C beobachten konnte. Mir scheint daher der Einfluß der Temperatur auf die Vergilbung indirekt zu sein. Es bleibt noch unentschieden, ob eine höhere Temperatur als 20° C an und für sich eine beschleunigende Wirkung auf die Vergilbung ausüben kann.

7. Mikrochemische Untersuchungen über den Zellinhalt.

Es wurde schon im Abschnitt VI erwähnt, daß die vergilbten Algen mit mehr oder weniger zerstörtem Chromatophor und reichlichen Granula versehen sind.

Zunächst habe ich die vergilbten Zellen von *Chlorella l.* aus Glukoseagarkultur mit Sudan III behandelt. Überraschend war dabei die rote Färbung der großen flüssigen Körper, die mit Osmiumsäurelösung tingierbar waren, womit eine Fettanhäufung in den vergilbten Zellen von *Chlorella l.* nachgewiesen wurde.

Die folgenden Prüfungen beziehen sich auf die Veränderung des Zellinhaltes bei allen untersuchten Algen und zwar bei verschiedenen Kulturen. Zunächst seien die Resultate der Prüfungen mit Sudan III mitgeteilt:

a) Resultate der Prüfungen mit Sudan III.

Chlorella l. bei Strichkultur.

M-Agar, frische Kultur	Schwache Reaktion nur in Sporen und krankhaften Zellen. Chromatophor normal.
„ „ , alte Kultur	Schwache Reaktion. Chromatophor normal.
Gl-Agar, frische Kultur	Schwache Reaktion. Chromatophor normal.

Gl-Agar, alte Kultur	Reaktion deutlich. Chromatophor desorganisiert.
0.5%-Gl-Agar, alte Kultur	R. deutlich. Fettmenge geringer als die vorige. Chromatophor normal.

Stichococcus v. bei Strichkultur.

M-Agar, alte Kultur	Reaktion negativ. Chromatophor normal.
Gl-Agar, frische Kultur	Reaktion negativ. Chromatophor normal.
„ , alte Kultur	Fettkugel reichlich. Chromatophor zerstört.

Scenedesmus n. bei StICKkultur.

M-Agar, alte Kultur	Keine Reaktion. Chromatophor normal.
Gl-Agar, frische Kultur	Keine Reaktion. Chromatophor normal.
„ , alte Kultur	Keine Reaktion. Chromatophor zerstört.

Chlorosphaera p. bei Strich- und Flüssigkeitskultur.

M-Agar, alte Kultur	Keine Reaktion. Chromatophor normal.
Gl-Agar, frische Kultur	Keine Reaktion. Chromatophor normal.
„ , alte Kultur	Reaktion deutlich. Chromatophor zerstört.
M-L , alte Kultur	Reaktion deutlich. Chromatophor zerstört.
Gl-L , alte Kultur	Reaktion schwach. Chromatophor zerstört.

Chlamydomonas k. bei Strich- und Flüssigkeitskultur.

M-Agar, alte Kultur	Keine Reaktion.
Gl-Agar, frische Kultur	Keine Reaktion.
„ , alte Kultur	Reaktion deutlich. Fett kommt wahrscheinlich im Chromatophor vor.
M-L , alte Kultur	Reaktion ziemlich deutlich.
Gl-M , alte Kultur	Reaktion deutlich.

Aus obigem geht hervor, daß, abgesehen von *Scenedesmus n.*, bei alten Glukoseagarkulturen reichlich Fett vorkommt. Bei M-

Agarkultur ist das Fett selbst im alten Zustande gar nicht oder nur spurweise vorhanden. Daher halte ich das betreffende Fett für kein normales Assimilationsprodukt, sondern für ein Stoffwechselprodukt.

Die Anhäufung des Fettes geht, abgesehen von *Scenedesmus n.*, mit der Vergilbung hand in hand. Es fragt sich daher, ob die Anhäufung des Fettes auf die Vergilbung einen Einfluß ausübt. Die ziemlich große Anhäufung von Fett bei 0.5% Glukoseagarkultur spricht gegen diese Annahme, weil in diesem Fall keine Vergilbung vor sich geht. Die Abwesenheit der Vergilbung bei der mit Fett gefüllten *Chlamydomonas k.* zeigt auch das Gegenteil. Nach meiner Meinung ist die Fettbildung nichts anderes als eine mit der Vergilbung parallel gehende Erscheinung. Man könnte vielleicht der Fettbildung eine ökologische Bedeutung beimessen, weil die Algen damit überschüssige Glukose kondensieren können. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß in den vergilbten Zellen von *Scenedesmus n.* ziemlich reichlich Stärke an Stelle des Fettes vorkommt.

Ich gehe nunmehr zur Besprechung der Stärke über.

b). Prüfungen mit Jodjodkaliumlösung.

Es ist bekannt, daß unter den Phanerogamen zwei Arten Stärkekörner vorkommen; d. i., reine Stärkekörner, die sich mit Jod blau färben, und Amylodextrinkörner, die sich dabei braun oder weinrot färben. Die beiden haben dieselbe empirische Formel. Da Amylodextrin durch die Einwirkung von Diastase aus Stärke gebildet wird, so kann man die Amylodextrinkörner als partiell umgewandelte reine Stärke betrachten (Pfeffer, I, S. 472).

Nach Bruns (1894, S. 173 ff.) hat die Florideenstärke erhebliche Ähnlichkeit mit den Amylodextrinkörnern (sogenannte rote

Stärkeköerner) bei den Phanerogamen. Bei roten Algen kommt aber auch eine sich mit Jod verschieden färbende Stärke vor. So konnte Kolkwitz (Oltmanns II, S. 148) einen Laurentiatypus mit brauner Färbung und einen Furcellariatypus mit blauvioletter Färbung unterscheiden. Bei Florideen kommen oft sich mit Jod blau färbende Körper vor, deren Farbenton von dem der reinen Stärke nur wenig abweicht.

Über das Vorkommen von Stärke bei den Chlorophyceen vergleiche man die Angaben von Kraus (1869), Beijerinck (1890), Goroschankin (1890, 1891) und Ernst (1903, 1904 a, 1904 b). In den früheren Angaben finden sich selten Mitteilungen über die Reaktionsfarben, und wir können daher nicht wissen, ob es sich um reine Stärke oder um Amylodextrin handelt. Dies ist der Fall bei den Angaben von Kraus und Goroschankin. Von Ernst erfahren wir aber, daß reine Stärke bei *Dichotomosiphon tuberosus* (1903), den *Codium*-Arten (1904 a) und bei *Derbesia* (1904 b) vorkommt.

Besonders beachtenswert ist hier die Mitteilung von Beijerinck (1890, S. 758). Er fand bei *Chlorella vulgaris* eine sich mit Jod braun färbende Substanz und nannte sie Paramylum, und bei *Chlorosphaera limicola* fand er eine blau färbbare Substanz, die er für identisch mit Stärke hielt.

Paramylum ist aber eine Substanz, die sich nie mit Jod färben läßt. Bezüglich der näheren Eigenschaften desselben verweise ich auf die Angabe von Klebs (1883). Die Benennung von Beijerinck halte ich nicht für richtig, vielmehr halte ich die betreffende Substanz für amyloextrinartig.

Beim Nachweis von Stärke muß man nicht nur die Stromastärke, sondern auch die Pyrenoidstärke in Betracht ziehen, weil beide in den Chlorophyceen als ein Assimilationsprodukt gelten können (vergl. Oltmanns, II, S. 114).

Im folgenden teile ich meine eigenen diesbezüglichen Unter-

suchungen mit. Als Kontrolle untersuchte ich zunächst die Stärke von einer *Spirogyra*-Art. Mit Jod färbte sich die Pyrenoidstärke blauviolett, während das Chromatophor unverändert blieb, weswegen ich auf das Vorhandensein von reiner Stärke schließen konnte.

<i>Chlorella l.</i>	Reaktion mit Jodjodkaliumlösung
M-Agar, frische Kultur	Chromatophor gleichmäßig braun. Pyrenoidstärke auch braun.
M-L , frische Kultur	Chromatophor gleichmäßig braun. Pyrenoidstärke auch braun.
Gl-Agar, frische Kultur	Chromatophor gleichmäßig braun. Pyrenoidstärke auch braun.
„ , alte Kultur	Keine Reaktion. Chromatophor zerstört.
<i>Stichococcus v.</i>	Reaktion mit Jodjodkaliumlösung
M-Agar, frische Kultur	Chromatophor gleichmäßig braun.
„ , alte Kultur	Chromatophor gleichmäßig braun.
Gl-Agar, frische Kultur	Chromatophor gleichmäßig braun.
„ , alte Kultur	Keine Spur. Chromatophor zerstört.
<i>Scenedesmus n.</i>	Reaktion mit Jodjodkaliumlösung
M-Agar, frische Kultur	Nur das Pyrenoid färbt sich braun.
„ , alte Kultur	Kleine Körner im Chromatophor braun (Stromastärke !)
Gl-Agar, frische Kultur	Pyrenoid und kleine Stärkekörner im Chromatophor braun.
„ , alte Kultur	Ziemlich große Körner braun. Chromatophor zerstört.
<i>Chlorosphaera p.</i>	Reaktion mit Jodjodkaliumlösung
M-Agar, frische Kultur	Pyrenoid, wie auch Chromatophor gleichmäßig blau (reine Stärke)
Gl-Agar, frische Kultur	Pyrenoid, wie auch Chromatophor braun (Amylodextrin).
„ , alte Kultur	Zellen gleichmäßig braun. Chromatophor zerstört.

<i>Chlamydomonas k.</i>	Reaktion mit Jodjodkaliumlösung
M-Agar, frische Kultur	Nur das Pyrenoid braun.
Gl-Agar, frische Kultur	Pyrenoidstärke- und kleine Stromastärkekörner braun:
„ , alte Kultur	Amylodextrinkörner wahrscheinlich im Chromatophor reichlich. Pyrenoidstärke auch mit Jod braun.
M-L , alte Kultur	Vegetative Zellen: { Amylodextrinkörner reichlich Pyrenoidstärke auch braun. Zygosporen mit reichlicher reiner Stärke.

Aus obiger Tabelle geht hervor, daß Amylodextrin bei den untersuchten Algen vorherrschend war. Reine Stärke ließ sich aber nur bei M-Agar-Kultur von *Chlorosphaera p.* und bei den Zygosporen von *Chlamydomonas k.* finden.

Vom Interesse ist, daß das Vorkommen von Stärke bei ein und derselben Alge je nach der Ernährung und Generation verschieden ist.

Ich konnte bei *Chlorella l.* und *Stichococcus v.*, wie man aus obiger Tabelle ersieht, eine gleichmäßig braune Färbung des Chromatophors durch Jod beobachten. Diese Reaktion weist aber nach der Meinung von Ernst (Flora 1904 b, S. 519) darauf hin, daß das Chromatophor, abgesehen von Pyrenoidstärke, keine Stärke besitzt. Das Chromatophor von *Spirogyra*-sp. färbte sich jedoch, abgesehen von den Pyrenoiden, gar nicht durch Jod. In diesem Falle war daher die Abwesenheit der Stromastärke ohne weiteres klar.

Die Gegenwart von Stärke bei *Stichococcus v.* kann ich nicht mit Sicherheit behaupten, während ich bei *Chlorella l.* nur die von Pyrenoidstärke nachweisen konnte; bei den drei anderen Algen konnte ich aber deutlich sowohl Pyrenoidstärke als auch Stromastärke feststellen.

Fassen wir die Resultate der Prüfungen mit Jod und Sudan III zusammen, so erkennen wir, daß bei vergilbten Algen reichlich Stärke oder Fett oder oft beide vorkommen. Daß aber die Anhäufung dieser Stoffe keinen Einfluß auf die Vergilbung ausübt, läßt sich daraus erkennen, daß die mit Stärke und Fett gefüllte *Chlamydomonas k.* keine Vergilbungserscheinung aufweist. Die Vergilbung ist in Wirklichkeit einer besonderen Eigenschaft der Algen zuzuschreiben, die später erörtert werden wird.

8. Untersuchungen über die Zerstörung der Farbstoffe.

Nach den spektroskopischen Untersuchungen von Kraus (1872), Nebelung (1878) und Reinke (1885), wurde der grüne Farbstoff der Chlorophyceen für identisch mit dem Chlorophyll der Phanerogamen gehalten. Dies wurde neuerdings durch die bahnbrechenden chemischen Untersuchungen von Willstätter und seinen Schülern (vergl. „Literaturverzeichnis“) bestätigt.

Über die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche, bzw. bei Algen verweise ich auf die Arbeit von Tammes (1900).

Nach Willstätter enthält *Ulva lactuca* neben Chlorophyll a und b, Xanthophyll und Carotin.

Nun fragt es sich aber noch, in welchem Grade jeder Farbstoff bei der Vergilbung zerstört wird. Schon Schindler (1913 S. 562) und Boresch (1913 S. 149–150) haben diesbezügliche Versuche gemacht. Nach diesen Autoren beruht die Entfärbung der Cyanophyceen auf dem Verschwinden des Phykocyanins und einer starken Abnahme des Chlorophylls. Boresch (l.c., S. 180) bestätigte bei einer entfärbten *Chlamydomonas*-Art ein Verschwinden des Chlorophylls und ein Zurückbleiben des Carotins.

Ich habe mich mit dieser Frage sowohl mikrochemisch als

auch spektroskopisch beschäftigt. Die Untersuchungen wurden aber nur auf *Chlorella l.* beschränkt.

Zuerst stellte ich Versuche nach der Kalimethode von Molisch (1896, S. 19) an. Nach dreitägigem Liegen in einer 20%-Kalilauge-lösung von 40%-Alkohol zeigten sich bei den vergilbten Zellen, eine ziemlich große Menge von Carotinkristallen. Der Kontrollversuch mit frischen grünen Zellen zeigte ebenfalls nach gleicher Behandlung eine große Anzahl Carotinkristalle (vergl. Tafel II, Fig. 60).

Ferner habe ich den Versuch nach Liebalddt (1913 S. 69) mit 50% Äthylalkohol ausgeführt. In diesem Falle entstanden in jeder vergilbten Zelle eine rote Masse (wahrscheinlich Carotin) und einige tropfenartige hellgrüne Körner; in den frisch grünen Zellen zeigten sich wenige Carotinkristalle, und eine dunkelgrüne, bald tropfige, bald kristallinische Masse, (vergl. Taf. II, Fig. 59).

Die beiden oben erwähnten Versuche sind ausreichend daraus den Schluß zu ziehen, daß bei den vergilbten Zellen eine starke Abnahme des Chlorophylls und ein Zurückbleiben des Carotins stattfindet.

Später wurde dann noch eine spektroskopische Untersuchung ausgeführt. Dazu diente mir als Versuchsmaterial die Flüssigkeitskultur. Die filtrierten Algenzellen samt dem Filtrierpapier wurden sechs Tage lang mit kaltem Alkohol extrahiert. Um die Konzentrationen der Farbstoffe möglichst ähnlich zu halten, wurde die ganze Algenmasse immer aus einem Kolben mit 60 cm³ 95% Alkohol extrahiert. Als Kontrolle wurde auch eine alkoholische Chlorophyll-lösung von *Coelopleurum Gmelini* untersucht, die eine fast gleiche Konzentration mit einer aus ergrünter Kultur hergestellten Chlorophyll-lösung hatte. Das Spektrum vom Eisenbogen wurde dann hinzugefügt, um die Lage der Absorptionsbänder zu verdeutlichen. Die Herstellung der Spektrogramme wurde von Herrn Prof. Dr. Y. Shibata,

und zwar in den verschiedenen Dicken des Absorptionsmediums ausgeführt. Dafür spreche ich ihm hier meinen besten Dank aus.

Die Resultate waren die folgenden (vergl. hierzu Tafel V Fig. 2).

- a. Absorptionsspektren von *Coelopleurum Gmelini* (Eine Blütenpflanze). Das erste Absorptionsband charakterisiert das Chlorophyll. Das zweite ist auch auf die Absorption des Chlorophylls zurückzuführen.

Das III und IV Bd. sind wahrscheinlich die Absorptionsbänder des Phaeophytins.

Das V Bd.: Xanthophyll (wahrscheinlich auch Carotin) mit Chlorophyll zusammen bildet dieses breite Absorptionsband.

- β. Absorptionsspektren bei M-L-Kultur.

Absorptionsbänder sind ähnlich wie die von *Coelopleurum*; nur fehlen dabei Bd. III und IV (Absorptionsbänder von Phaeophytin).

- γ. Absorptionsspektren bei der wiederergrüneten Kultur.

Einer vergilbten Kultur wurde $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ zugesetzt, und im Verlauf von zwanzig Tagen erhielt ich eine wiederergrünte Kultur.

I Bd. charakterisiert das Chlorophyll; das Band ist aber schmaler. II Bd. ist kaum merklich.

Bd. III u. IV fehlen. V Bd. ist ähnlich wie das bei α und β; bei kleineren Schichtdicken erscheinen aber die Absorptionsbänder von Xanthophyll.

- δ. Absorptionsspektren bei vergilbter Kultur (2% Gl-L-Kultur).

I Bd. fehlt; Chlorophyll ging gänzlich verloren.

Bd. III u. IV fehlen.

V, VI u. VII Bd. charakterisieren das Xanthophyll.

Aus obigen Untersuchungen geht deutlich hervor, daß bei vergilbten Kulturen eine starke Abnahme oder oft ein Verschwinden des Chlorophylls und ein Zurückbleiben des gelben Pigments stattfindet.

Hervorzuheben ist noch, daß bei vergilbten Kulturen eine neue Chlorophyllbildung durch einen Zusatz von Nitrat hervorgerufen wurde.

B. BEDINGUNGEN DES WIEDERERGRÜNENS.

1. Nährwerte der verschiedenen Stickstoffverbindungen beim Wiederergrünen.

Nach Schindler (l.c. S. 546 ff.) und Boresch (l.c. S. 160 ff.) nehmen entfärbte Blaualgen durch einen neuen Zusatz von N-Verbindungen ihre Anfangsfarbe wieder an. Nach Boresch ist dies auch bei *Chlamydomonas*-sp. der Fall. Nach diesem Autor sind bei dieser Alge Nitrat und Äthylurethan vortreffliche Nährmittel für die Regeneration der Farbstoffe. Den Einfluß des Ammoniaks konnte er aber nie konstatieren (S. 181).

Die von beiden Autoren gebrauchten Algen entstammten einer Speziesreinkultur. Es war daher sehr erwünscht eine Nachprüfung mit einer bakterienfreien Reinkultur zu machen. Besonders wichtig war es die Nährwerte der verschiedenen organischen N-Verbindungen beim Wiederergrünen festzustellen. Meine eigenen Untersuchungen wurden daher sowohl mit anorganischen als auch mit einer Anzahl organischer N-Verbindungen ausgeführt.

Als Versuchsmaterial diente mir hauptsächlich die Glukose-agarkultur (Gl. 1 u. 2%), bei der die Algen deutlich vergilbten. Dem vergilbten Belag wurden die im Dampftopfe sterilisierten Lösungen der verschiedenen N-Verbindungen von je etwa 0.5 cm³ zugesetzt. Die Konzentration dieser Lösungen war in den meisten

Fällen 1%. Es kann aber die Menge und Konzentration der zuzusetzenden N-Verbindungen willkürlich sein.

Die unter höherer Temperatur leicht spaltbaren organischen N-Verbindungen, wie Harnstoff und Asparagin, wurden umkristallisiert und dann mit Alkohol und Äther behandelt, um die Keime der Mikroorganismen zu töten. Schließlich wurden sie in sterilisiertem Wasser gelöst und auf den vergilbten Belag gegossen.

Alle Experimente wurden bei Zimmertemperatur und im diffusen Lichte ausgeführt. Die gewonnenen Resultate waren die folgenden :

Chlorella l. bei vergilbter Glukoseagarstrichkultur.

Zugesetzte Salze	Zeitdauer bis Anfang der Regeneration	Regeneration und regenerierte Farben
$\{(M-L)-Ca(NO_3)_2\} + CaCl_2$ 0.1%	18/X-4/XI	Keine Regeneration.
$Ca(NO_3)_2$	18/X-22/X	Deutlich, dunkelgrün.
KNO_3	18/X-22/X	Deutlich, dunkelgrün.
KNO_2	18/X-22/X	Deutlich, dunkelgrün.
NH_4Cl	18/X-22/X	Deutlich, dunkelgrün.
NH_4NO_3	18/X-22/X	Deutlich, dunkelgrün.
$(NH_4)_2SO_4$	18/X-22/X	Deutlich, dunkelgrün.
Acetamid $C_2H_5.O.NH_2$	6/XI-15/XI	Keine Regeneration.
Harnstoff $CO(NH_2)_2$	18/X-22/XI(2/VI-4/VI)	Deutlich, dunkelgrün.
Glykokoll $CH_2 \begin{smallmatrix} \swarrow NH_2 \\ \searrow COOH \end{smallmatrix}$	18/X-22/X(2/VI-6/VI)	Deutlich, dunkelgrün.
Asparagin $\begin{smallmatrix} NH_2.CH.COOH \\ \\ CH_2.CO.NH_2 \end{smallmatrix}$	18/X-25/X(2/VI-6/VI)	Deutlich, dunkelgrün.
Asparagin-säure $\begin{smallmatrix} CH.NH_2(COOH) \\ \\ CH_2.COOH \end{smallmatrix}$	2/VI-6/VI	Deutlich, dunkelgrün.
Leucin $CH_3.(CH_2)_3.CH.NH_2.CO_2H$	18/X-27/X	Schwache Reg., grün.
Tyrosin $OH.C_6H_4.CH_2.CH.NH_2.CO_2H$	18/X-27/X	Schwache Reg., grün.

Zugesetzte Salze	Zeitdauer bis Anfang der Regeneration	Regeneration und regenerierte Farben
Alanin $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	18/X-27/X	Schwache Reg. grün.
Phenylalanin $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{COOH}$	18/X-27/X	Schwache Reg. grün.
Glykokollan- hydrid. $\begin{array}{c} \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO} \\ \\ \text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH} \end{array}$	18/X-27/X	Schwache Reg. grün.
Leucyglycin $(\text{CH}_3)_2\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}\cdot\text{NH}_2\cdot\text{CO}$ $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	18/X-27/X	Schwache Reg. grün.
Hippursäure $\text{COOH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{C}_6\text{H}_5$	2/VI-11/VI	Keine Regeneration.
Pyrrolidonkarbonsäure $\text{COOH}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ $\begin{array}{c} \\ \text{NH}-\text{CO} \end{array}$	2/VI-11/VI	Keine Regeneration.
Pepton	2/VI-11/VI	Keine Regeneration.

Stichococcus v. bei vergilbter Glukoseagarstrichkultur.

Zugesetzte Salze	Zeitdauer bis Anfang der Regeneration	Regeneration u. regenerierte Farben
$\{(M-L)-\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\} + \text{CaCl}_2$ 0.1%	6/XI-15/XI	Keine Regeneration.
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	6/XI-12/XI	Deutlich, dunkelgrün.
NH_4Cl	6/XI-12/XI	Deutlich, dunkelgrün.
Acetamid	6/XI-12/XI	Schwache Reg. grün.
Harnstoff	6/XI-12/XI(2/VI-4/VI)	Deutlich, dunkelgrün.
Glykokoll	6/XI-12/XI(2/VI-6/VI)	Deutlich, grün.
Asparagin	6/XI-18/XI(2/VI-6/VI)	Deutlich, grün.
Asparaginsäure	2/VI-6/VI	Deutlich, grün.
Leucin	6/XI-18/XI	Undeutlich.
Tyrosin	6/XI-18/XI	Undeutlich.
Alanin	6/XI-18/XI	Schwache Reg.!
Phenylalanin	6/XI-18/XI	Undeutlich.

Zugesetzte Salze	Zeitdauer bis Anfang der Regeneration	Regeneration u. regenerierte Farben
Glykokollanhydrid	6/XI-18/XI	Undeutlich.
Leucylglycin	6/XI-18/XI	Undeutlich.
Hippursäure	6/XI-18/XI	Undeutlich.
Pyrrolidenkarbonsäure	6/XI-18/XI	Undeutlich.
Pepton	6/XI-18/XI	Undeutlich.

Scenedesmus n. bei vergilbter Glukoseagarstichkultur.

Zugesetzte Salze	Zeitdauer bis Anfang der Regeneration	Regeneration u. regenerierte Farben
$\{(M-L)-Ca(NO_3)_2\} + CaCl_2 0.1\%$	18/X-22/X	Keine Regeneration.
$Ca(NO_3)_2$	18/X-22/X	Deutlich, grün (weiße Oberfläche nicht reg.).
KNO_3	18/X-22/X	Deutlich, grün (weiße Oberfläche nicht reg.).
KNO_2	18/X-22/X	Deutlich, grün (weiße Oberfläche nicht reg.).
NH_4Cl	18/X-22/X	Deutlich, grün.
NH_4NO_3	18/X-22/X	Deutlich, grün.
$(NH_4)_2SO_4$	18/X-22/X	Deutlich, grün.
Acetamid	18/X-22/X	Deutlich, grün.
Harnstoff	18/X-22/X (2/VI-4/VI)	Deutlich, grün.
Glykokoll	18/X-27/X (2/VI-6/VI)	Deutlich, grün.
Asparagin	(2/VI-11/VI)	Undeutlich.
Asparaginsäure	(2/VI-11/VI)	Undeutlich.
Leucin	18/X-22/X	Undeutlich.
Tyrosin	18/X-22/X	Undeutlich.
Leucylglycin	6/XI-15/XI	Undeutlich.
Hippursäure	(6/VI-11/VI)	Undeutlich.
Pyrrolidenkarbonsäure	(6/XI-11/VI)	Undeutlich.
Pepton	6/XI-15/XI (2/VI-11/VI)	Undeutlich.

Aus obigen Versuchen geht hervor, daß ein Zusatz N-freier Mineralsalzlösung bei den vergilbten Algen keine Regeneration des Chlorophylls hervorruft. Die Regeneration wird durch den Zusatz der verschiedenen N-Verbindungen, namentlich der anorganischen und organischen Verbindungen, wie Urea und Glykokoll, hervorgerufen.

Nitrat ist eine bevorzugte N-Quelle für die Regeneration, doch Ammoniumverbindungen sind noch besser. So konnte ich vielfach bei den letzteren eine frühere Regeneration als bei Anwendung des Nitrats beobachten. Diese Tatsache läßt sich klar mit der Konstitution des Chlorophylls erklären. Nach Willstätter enthält das Chlorophyll einen Pyrrolkern $\left(\text{NH} \begin{array}{l} \text{CH}=\text{CH} \\ \text{CH}=\text{CH} \end{array} \right)$. Daher kann das Nitrat sich erst nach der Reduktion zur Chlorophyllbildung benutzen lassen. Der Fall liegt aber anders bei Ammoniumverbindungen.

Harnstoff und Glykokoll verhalten sich bei der Regeneration des Chlorophylls ähnlich wie Ammoniak. Das ist einleuchtend, wenn man bedenkt, daß diese Stoffe eine leicht abspaltbare NH_2 -Gruppe enthalten. Asparagin und Asparaginsäure sind schwer oder kaum zur Regeneration verwendbar. Die höheren Aminosäuren und andere höhere organische N-Verbindungen, wie Pepton, waren dazu ganz ungeeignet.

Hier kehren wir zu den Resultaten von Boresch bei *Chlamydomonas* zurück. Nach diesem Autor beeinflussen Ammoniumverbindungen das Wiederergrünen nicht (l.c. S. 181). Das war bei unseren Algen anders, und ich möchte daher die Resultate von Boresch für irrig halten. Es scheint mir wahrscheinlich, daß eine verunreinigte Kultur für seine Resultate verantwortlich ist.

Es erübrigt sich nun noch einige Worte über den Wiederergrünungsstand bei Agarkulturen zu sagen. Bei Strichkultur beginnen

zuerst die beiden Seiten des Belags wiederzuergrünen, und dann schreitet die Ergrünung nach dem inneren, sich an der Oberfläche befindlichen Teil fort. Der hintere und zentrale Teil des Belags blieb dabei ganz unverändert.

Bei StICKkultur grünt die Oberfläche zuerst, und dann nach und nach die innere Partie.

Ich habe meine weiteren Versuche mit vergilbten Flüssigkeitskulturen von *Chlorella l.*, *Stichococcus v.* und *Scenedesmus n.* ausgeführt. Dabei wurden aber die zugesetzten Salze nur auf $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beschränkt. Die Resultate zeigten sich mit denen bei Agarkulturen übereinstimmend. Farbenregeneration geht jedoch bei der Flüssigkeitskultur viel langsamer vor sich. Dies wird zum Teil auf die lockere Verbindung der Algenzellen bei Flüssigkeitskulturen zurückzuführen sein.

In Bezug auf die Chlorophyllregeneration von *Chlorosphaera p.* habe ich nur mit Agarkultur, und zwar nur mit einem Zusatz von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Versuche gemacht. Es resultierte ein deutliches Wiederergrünen.

Weitere Versuche bezogen sich auf die Chlorophyllregeneration von Algen, die bei mehr als 2% Konzentration der Glukose vergilbten.

<i>Chlorella l.</i>	Zugesetztes Salz	Zeitdauer	Regeneration
2% Gl-Agar-Kultur	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	18/X-22/X.	Deutlich, dunkelgr.
5% „	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	18/X-22/X.	Deutlich, grün; weiteres Wachstum!
10% „	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	18/X-22/X.	Deutlich, grün; weiteres Wachstum!
<i>Stichococcus v.</i>	Zugesetztes Salz	Zeitdauer	Regeneration
2% Gl-Agar-Kultur	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3/XI-18/XI.	Deutlich, grün.
5% „	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3/XI-18/XI.	Deutlich, grün.
10% „	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	3/XI-18/XI.	Deutlich, grün.

Diese Resultate zeigen deutlich, daß sich die bei 5% und 10% Gl-Agar vergilbten Algen ganz ähnlich wie die bei 2% Gl-Agar vergilbten verhalten.

Bedenken wir, daß die bei 5%-oder 10%-Gl-Agar vergilbten Algen durch neuen Zusatz einer N-Verbindung weiter wachsen können, so zeigt dies, daß die anderen Nährsalze außer der N-Verbindung in genügendem Maße übrig sind. Ähnliche Erscheinungen wurden bei anderen Versuchen mit 2% Gl-Agar beobachtet.

Nun fragt es sich, ob die auf Glukosenährmedien ganz farblos gewordenen Algen durch einen neuen Zusatz von N-Verbindung zum Wiederergrünen gebracht werden können. Um diese Frage zu beantworten, habe ich mit etwa ein Jahr alten Glukoseagar-kulturen von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.*, die ganz weiß geworden waren, Versuche gemacht.

Nach dem Zusatz von Kaliumnitrat zeigten sie keine Ergrünung. Sie waren wahrscheinlich abgestorben, weil das Protoplasma ganz zerstört war. Nur eine Stichkultur von *Chlorella l.*, die noch etwas gelblich aussah, ergrünte. Das Weißwerden der Algen muß daher von der Vergilbung unterschieden werden. Das Verblassen hat keinen direkten Zusammenhang mit dem N-Mangel. Was für eine Ursache dabei vorliegt, darauf werde ich später eingehen.

2. Grenzkonzentrationen der zuzusetzenden N-Verbindungen zum Wiederergrünen.

Bei den oben erwähnten Untersuchungen bemerkte ich, daß die Konzentration der zugesetzten N-Verbindungen keinen merklichen Einfluß auf die Chlorophyllregeneration ausübte. Um darüber etwas sicherere Kenntnis zu erlangen, habe ich die nachfolgenden Versuche, sowohl mit Agar- als auch mit Flüssigkeitskultur ange-

stellt. Die gewonnenen Resultate sind aber, infolge der Schwierigkeit der Versuche noch nicht hinreichend, um die präzisen Grenzkonzentrationen zu bestimmen.

Um einen Konzentrationswechsel bei der Sterilisation der zuzusetzenden N-Verbindungen zu vermeiden, wurde das offene Ende der mit N-Verbindung versehenen Glasröhren fest mit Baumwollwatte und Pergamentpapier geschlossen. Nach der Abkühlung wurden die verschiedenen konzentrierten Lösungen zu je etwa 0.5 cm^3 auf die Glukoseagarkultur gegossen. Bei den Versuchen mit Flüssigkeitskultur wurde der Versuch etwas modifiziert. Es wurde eine bestimmte Quantität N-Lösung zugesetzt, und nach Beendigung des Versuches wurde das ganze Volumen der Nährlösung gemessen, um die Konzentration der zugesetzten N-Verbindung annähernd zu bestimmen. Die Messung des Volumens wurde aber ohne Filtration ausgeführt, so daß die berechnete Konzentration eben nur eine annähernde war.

Die folgenden Versuche bezogen sich nur auf *Chlorella l.*

a). Mit vergilbter Glukoseagarstrichkultur.

Konzentration	Zeitdauer	Regeneration
0.04% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2/VI-6/VI	Sehr schwach (in 4/VI keine Spur).
0.2 „	2/VI-4/VI	Schwach.
1.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
5.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
25.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
0.04% KNO_3	2/VI-6/VI	Sehr schwach (in 4/VI keine Spur).
0.2 „	2/VI-4/VI	Schwach.
1.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.

Konzentration	Zeitdauer	Regeneration
5.0 % KNO_3	2/VI-4/VI	Deutlich.
25.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
0.04% NH_4Cl	2/VI-4/VI	Sehr schwach.
0.20 „	2/VI-4/VI	Schwach.
1.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
5.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
25.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich (unterer Teil des Belags gelbgrün).
0.04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2/VI-4/VI	Schwach bis mäßig!
0.2 „	2/VI-4/VI	Ditto; etwas deutlicher als bei 0.04%.
1.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
5.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich.
25.0 „	2/VI-4/VI	Deutlich (unterer Teil des Belags gelbgrün).

Bei den 25%-Lösungen von NH_4Cl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde der dicht daneben oder in der Lösung befindliche Teil des Belags gelbgrün oder gelbbraun, was auf eine Giftwirkung schließen läßt.

Unter den obigen Resultaten ist noch bemerkenswert, daß das Wiederergrünen bei Ammoniumverbindungen früher als bei Nitrat vor sich geht.

b). Mit vergilbter Glukoselösungskultur.

Konzentration	Zeitdauer	Regeneration
0.04% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	15/X-22/X	Schwach.
0.21 „	15/X-22/X	Deutlich.
1.15 „	15/X-22/X	Deutlich.
4.17 „	15/X-22/X	Sehr deutlich.
8.00 „	15/X-22/X	Deutlich.

Konzentration	Zeitdauer	Regeneration
12.00% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	24/X-5/XI	Schwach, gelbgrün (Grenzkonz.?)
0.04% KNO_3	15/X-22/X	Schwach.
0.21 „	15/X-22/X	Schwach.
1.00 „	15/X-22/X	Deutlich.
5.00 „	15/X-22/X	Sehr deutlich.
8.00 „	15/X-22/X	Sehr deutlich.
12.00 „	24/X-5/XI	Deutlich !
0.04% NH_4NO_3	15/X-22/X	Schwach.
0.22 „	15/X-22/X	Schwach.
1.07 „	15/X-22/X	Deutlich.
2.68 „	24/X-5/XI	Deutlich (Grenzkonzentration).
4.00 „	15/X-22/X	Weiß, giftig.
8.00 „	15/X-22/X	Weiß, giftig.
0.04% NH_4Cl	15/X-22/X	Schwach.
0.22 „	15/X-22/X	Schwach.
1.00 „	15/X-22/X	Deutlich (Grenzkonzentration).
2.68 „	24/X-5/XI	Weißgrün, giftig.
4.00 „	15/X-22/X	Gelbweiß, giftig.
8.00 „	15/X-22/X	Gelbweiß, giftig.
0.04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15/X-23/X	Schwach.
0.21 „	15/X-22/X	Deutlich.
1.07 „	15/X-22/X	Deutlich.
4.05 „	15/X-22/X	Deutlich (Grenzkonzentration).
8.11 „	15/X-22/X	Gelbweiß, giftig.

Es zeigt sich deutlich, daß Ammoniumverbindungen schon bei geringerer Konzentration giftig sind. Das war ganz anderes bei

Agarkultur. Diese Abweichung beruht höchstwahrscheinlich auf der Adsorptionswirkung des Agars.

Nach obigen Versuchen zeigen sich die oberen Grenzkonzentrationen wie folgt:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	wahrscheinlich 12 %
KNO_3	höher als 12 %
NH_4Cl	1.0%
NH_4NO_3	2.7 „
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.0 „

Die Giftwirkung von Nitrat liegt also bei weitem niedriger als die von Ammoniumverbindungen. Unter diesen ist die Giftwirkung von NH_4Cl am größten, die von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ am niedrigsten, und die von NH_4NO_3 liegt in der Mitte zwischen beiden.

3. Einfluß des Lichtes auf das Wiederergrünen.

Schon im Unterabschnitt B. habe ich erwähnt, daß rote Strahlen eine stärkere Zerstörung des Chlorophylls als blaue Strahlen hervorrufen. Es bleibt nun festzustellen, ob rote Strahlen eine hemmende Wirkung auf das Wiederergrünen ausüben können.

Als Lichtfilter für die gelbroten Strahlen diente mir eine 10%-Lösung von Kaliumbichromat, und für die blauen Strahlen eine ammoniakalische Kupfersulfatlösung. Diese Lösungen wurden in Senebiersche doppelwandige Glocken gefüllt.

Die Resultate waren die folgenden:

Material=vergilbte Gl-Agar-Kultur.

Zusatz von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: am 13/VI.

Unter roten Strahlen.

<i>Chlorella l.</i>	15/VI	16/VI	17/VI
Strichkultur	Keine Regeneration.	Undeutlich.	Deutliche Reg.
Stichkultur	Keine Regeneration.	Undeutlich.	Undeutlich.

<i>Stichococcus v.</i>	15/VI	16/VI	17/VI
Strichkultur	Keine Regeneration.	Undeutlich.	Schwache Reg.
Stichkultur	Keine Regeneration.	Undeutlich.	Undeutlich.

Unter blauen Strahlen.

<i>Chlorella l.</i>	15/VI	16/VI	17/VI
Strichkultur	Regeneration deutlich.	Reg. deutlich.	Reg. deutlich.
Stichkultur	Reg. undeutlich.	Reg. schwach.	Reg. deutlich nur an der Oberfläche.

<i>Stichococcus v.</i>	15/VI	16/VI	17/VI
Strichkultur	Reg. deutlich.	Reg. deutlich.	Reg. deutlich.
Stichkultur	Reg. undeutlich.	Reg. schwach.	Reg. deutlich nur an der Oberfläche.

Aus diesen Resultaten ersehen wir, daß die Strichkultur unter roten Strahlen langsamer als unter blauen Strahlen ergrünt. Merkwürdigerweise findet keine Ergrünen bei der Stichkultur unter roten Strahlen statt.

Ferner habe ich als Lichtfilter verschiedenfarbige Glasplatten benutzt, von denen schon die Rede gewesen ist. Die Resultate waren ähnlich wie die obigen:

Zusatz von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: am 3/VI

<i>Chlorella l.</i> bei Strichkultur	4/VI	6/VI
Unter weißer matter Glasplatte	Unverändert	Regeneration schwach.
Unter roter Glasplatte	Unverändert	Regeneration schwach.
Unter blauer Glasplatte	Unverändert	Regeneration deutlich.

<i>Stichococcus v.</i> bei Strichkultur	4/VI	6/VI
Weißte matte Glasplatte	Regeration schwach.	Dunkelgrün.
Rote Glasplatte	Unverändert.	Grün.
Blaue „	Reg. schwach.	Dunkelgrün.

4. Einfluß der Dunkelheit auf das Wiederergrünen.

Nach den Angaben von Schindler (1913, S. 554) und Boresch (1913, S. 155) sind die Cyanophyceen auch im Dunkeln imstande ihr Phycocyan und Chlorophyll zu regenerieren. Nach Boresch (l. c. S. 182) regeneriert *Chlamydomonas* sp. aber dabei nie ihr Chlorophyll.

Nach meinen Untersuchungen verhalten sich *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* abweichend davon. Sie konnten sogar im Dunkeln ihr Chlorophyll regenerieren.

Am 13/VI wurden die vergilbten Glukoseagarkulturen gleich nach dem Zusatz von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ins Dunkle gestellt. Die Versuchsprotokolle sind die folgenden;

<i>Chlorella l.</i>	15/VI	17/VI
Strichkultur	Keine Veränderung.	Regeneration deutlich.
Stichkultur	Keine Veränderung.	Undeutlich.
<i>Stichococcus v.</i>	15/VI	17/VI
Strichkultur	Keine Veränderung.	Regeneration deutlich.
Stichkultur	Keine Veränderung.	Undeutlich.

Ich konnte auch bei der Strichkultur von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* mit Zusatz von Harnstoff ein Wiederergrünen im Dunkeln erlangen.

Weiterhin beabsichtigte ich mir Klarheit darüber zu verschaffen, ob die Nachwirkung des Lichtes auf das Wiederergrünen eine beschleunigende Wirkung ausüben könne. Daher wurde die vergilbte Kultur nach einem Zusatz von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ anderthalb Stunden lang einem diffusen, aber starken Licht ausgesetzt und dann ins Dunkle gebracht. Der Farbenwechsel war aber ungefähr derselbe wie bei den Parallelversuchen.

5. Einfluß der Temperatur auf das Wiederergrünen.

Die Notwendigkeit einer ziemlich hohen Temperatur für das Ergrünen der höheren Pflanzen ist uns bereits bekannt (Pfeffer I, S. 319). Bei der Regeneration der Farbstoffe der Cyanophyceen fand Boresch (l. c. S. 160) eine optimale Temperatur zwischen $20^\circ\text{--}25^\circ\text{C}$.

Nach meinen eigenen Versuchen kann ich ebenfalls bestätigen, daß eine Temperatur um 20°C ein besseres Medium als eine niedrigere Temperatur liefert. Einer vergilbten Strichkultur wurden sowohl $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ als auch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugesetzt. Die Resultate waren die folgenden: (Versuche beziehen sich nur auf *Chlorella l.*)

	Temperatur	Zeitdauer	Regeneration
Laboratorium	Temperaturwechsel $3\text{--}5^\circ\text{C}^{(1)}$	13/III–17/III.	Schwach.
Treibhaus	ca 20°C	13/III–17/III.	Deutlich, besonders bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Temperatur	Zeitdauer	Regeneration
Laboratorium: $8^\circ\text{--}12^\circ$	17/III–24/III.	Erst nach 7 Tagen regeneriert.
Treibhaus: 20°	17/III–21/III.	Erst nach 4 Tagen regeneriert.

(1) Temperaturwechsel wurde mit einem selbstregistrierenden Thermometer gemessen.

Bereits bei den Versuchen B. 1. bemerkte ich vielfach, daß das Ergrünen früher im Sommer als im Winter eintrat. Das läßt sich nach den oben erwähnten Versuchen leicht erklären.

6. Einfluß des sauerstofffreien Mediums und Vakuums auf das Wiederergrünen.

Es ist uns seit langem bekannt, daß Sauerstoff eine unumgängliche Bedingung beim Ergrünen der höheren Pflanzen ist. So konnte Correns (1892 S. 141) in einem möglichst sauerstofffreien Raume kein Ergrünen finden. Nach diesem Autor war bei *Helianthus* 30 mm Luftdruck, bei *Lepidium* sogar 60 mm erforderlich, um wieder zu ergrünen.

Immerhin konnte Grintzesco die Kultur von *Chlorella vulgaris* (1903, S. 77) und *Scenedesmus acutus* (1902, S. 425) im Vakuum, aber am Lichte, ohne besondere Zerstörung des Chromatophors erzielen.

Boresch (l.c. S. 156 ff.) fand auch, daß verfärbte Cyanophyceen im Vakuum, aber nur am Lichte, ihre Farbstoffe regenerieren konnten.

Von den beiden letzteren Autoren ist aber die Größe des partiellen Luftdruckes nicht angegeben worden. Wenn also ein fast absolutes Vakuum vorlag, so mußte der Assimilationssauerstoff, die Rolle des Luftsauerstoffes übernehmen, weil ein Ergrünen ohne O₂ nicht denkbar ist.

Um mir darüber klar zu werden, stellte ich die folgenden Versuche an.

Der erste Versuch.

Weite Glasröhren wurden durch Kalilauge und Pyrogallussäure (a.a.O.) sauerstofffrei gemacht, und die vergilbten Glukose-agarkulturen wurden dann sofort nach dem Zusatz der betreffenden N-Verbindung in die sauerstofffreien Röhren hineingetan. Versuchsbedingungen: Zimmertemperatur und diffuses Licht. Die Versuche verliefen wie folgt:

<i>Chlorella l.</i>	Zeitdauer	Regeneration
Strichkultur	3/VI-23/VI.	Undeutlich.
Stichkultur	3/VI-23/VI.	Undeutlich.
<i>Stichococcus v.</i>	Zeitdauer	Regeneration
Strichkultur	3/VI-23/VI.	Giftig, gelbbraun.
Stichkultur	3/VI-23/VI.	Giftig, gelbbraun.

Der zweite Versuch.

Den nächsten Versuch habe ich im Wasserstoff ausgeführt. Dieses Gas wurde wie üblich aus Zink und Schwefelsäure hergestellt und mit 5% Kalipermanganat- und 10% Bleinitratlösung gewaschen, um den Arsen- und Schwefelwasserstoff zu entfernen.

Zugesetzte N-Verbindung: KNO_3 .

<i>Chlorella l.</i>	Zeitdauer	Regeneration
Strichkultur	4/VI-15/VI.	Unverändert.
Stichkultur	4/VI-15/VI.	Unverändert.
<i>Stichococcus v.</i>	Zeitdauer	Regeneration
Strichkultur	4/VI-15/VI.	Giftig.
Stichkultur	4/VI-15/VI.	Giftig.

Der dritte Versuch.

Dieser Versuch wurde im Vakuum angestellt. Dabei maß ich mittels Manometer den Luftdruck in der Glocke, in welcher das Versuchsmaterial lag.

Zugesetzte N-Verbindung: KNO_3 .

Luftdruck in Glocke = 50 mm = 6.6% der ursprünglichen Sauerstoffmenge.

Die Versuchsprotokolle sind die folgenden.

<i>Chlorella l.</i>	Zeitdauer	Regeneration
Strichkultur	4/VI-8/VI.	Sehr schwach.
Stichkultur	4/VI-8/VI.	Sehr schwach.
<i>Stichococcus v.</i>	Zeitdauer	Regeneration
Strichkultur	4/VI-8/VI.	Schwach, aber kein weiteres Ergrünen.
Stichkultur	4/VI-8/VI.	Schwach, aber kein weiteres Ergrünen.

Kontrollversuche in der Luft verliefen wie folgt:

<i>Chlorella l.</i>	6/VI-8/VI.	Sehr deutlich, dunkelgrün.
<i>Stichococcus v.</i>	6/VI-8/VI.	Sehr deutlich, dunkelgrün.

Luftdruck in Glocke = 15 mm (2% der ursprünglichen Sauerstoffmenge).

Chlorella l., Zugesetzte N-Verb. = $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Strichkultur	29/X-13/XI.	Regeneration keine Spur.
Kontrollversuch in der Luft.	29/X-1/XI.	Reg. deutlich, dunkelgrün.

Die obigen übereinstimmenden Resultate zeigen uns klar, daß die untersuchten Algen nie in einem an Sauerstoff zu stark verminderten Medium ihr Chlorophyll regenerieren können. Erst bei 50 mm Luftdruck sind die vergilbten Algen imstande zu ergrünen doch nur in schwachem Grade. Es ist daher noch fraglich, ob

die Resultate von Boresch auf eine nur speziesreine Kultur oder auf eine besondere Eigenschaft der Cyanophyceen zurückzuführen sind. Es ist daher wünschenswert, die betreffende Frage mit einer bakterienfreien Reinkultur von Cyanophyceen noch einmal nachzuprüfen.

C. ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN N-MENGEN UND DER VERGILBUNGSERSCHENUNG.

Vergegenwärtigen wir uns, daß das Ergrünen durch einen neuen Zusatz von N-Verbindungen bei einer und derselben Kultur eintritt, so ist voräuszusetzen, daß die Vergilbungseerscheinung durch den vorausgehenden überschüssigen Zusatz dieser Verbindungen beseitigt werden kann. Um diese Voraussetzung beweisen zu können, habe ich die folgenden Untersuchungen angestellt.

Als Grundnährlösung diene mir wieder M-L. Aus dieser Lösung wurden wie gewöhnlich Glukoseagar und Glukosenährlösung hergestellt.

In Gl-L ist Kalziumnitrat in der Dosis von 0.05% enthalten. Glukoseagar enthält auch annähernd 0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde noch ein weiterer Zusatz der verschiedenen N-Verbindungen auf Gl-Agar oder Gl-L und zwar in einer Dosis von 0.5% gemacht.

1). Bei Glukosenähragar.

Das Nährsubstrat wurde zu je 5 cm³ in die Röhren beschickt. Für jede Kultur bereitete ich stets zwei Röhren. Während des Versuches wurde die Oberfläche des Agarbodens immer dem Lichte zugekehrt.

Chlorella l. bei Strichkultur.

Anfang 7/VI	23/VIII	5/XI
1% Gl-Agar (Kontroll)	g. M., gelbgrün, vergilbt!	Gelbgrün.
Kontroll + 0.5% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	s. g. M., grün.	Grün.
„ + „ KNO_3	s. g. M., grün.	Grün.
„ + „ NH_4Cl	s. g. M., dunkelgrün, teils braun.	Weiß geworden (giftig).
„ + 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	s. g. M., dunkelgrün, teils braun.	Weiß geworden (giftig).
„ + „ Harnstoff	k. W.	
„ + „ Asparagin	s. g. M., grün.	Grün.
„ + „ Pepton	s. g. M., grün.	Grün.

Stichococcus v. bei Strichkultur.

Anfang 7/VI	23/VIII	5/XI
Kontroll (1% Gl-Agar)	g. M., grün.	Gelbgrün, vergilbt!
„ + 0.5% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	g. M., grün.	Grün, nicht vergilbt.
* „ + „ KNO_3	s. g. M., grün.	Grün.
* „ + „ NH_4Cl	s. g. M., dunkelgrün, teils braun.	Weiß geworden (giftig).
* „ + „ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	s. g. M., dunkelgrün, teils braun.	Weiß geworden (giftig).
* „ + „ Harnstoff	m. M., grün.	Grün.
* „ + „ Asparagin	s. g. M., grün.	Grün.
„ + „ Pepton	s. g. M., grün.	Grün.

Bei den mit Sternen versehenen Kulturen zeigte die Alge Polymorphismus, wovon schon gesprochen worden ist.

Bei den folgenden Versuchen handelte es sich um die Frage, ob die überschüssige Menge des Stickstoffs die Vergilbung beim Glukosenähragar beseitigen kann, in welchem Glukose in einer höheren Konzentration enthalten ist.

Die Kulturbedingungen waren wie früher.

Chlorella l. bei Strichkultur.

Versuchsbeginn 12/XI	10/II	1/VI	10/IX.
0.5% Gl-Agar	Grün.	g. M., dunkelgrün.	Grün.
2% „	Grün.	g. M., gelbgrün.	Weiß geworden.
5% „	Grün.	g. M., gelbgrün.	Weiß geworden.
10% „	Grün.	g. M., gelbgrün.	Weiß geworden.
2% Gl-Agar + Ca (NO ₃) ₂ 0.1%	Grüner.	s. g. M., dunkelgrün.	Dunkelgrün; oberflächlicher und mittlerer Teil wie hinterer Teil des Belags braun.
5% Gl-Agar + Ca (NO ₃) ₂ 0.1%	Grüner.	s. g. M., dunkelgrün.	Dunkelgrün; oberflächlicher und mittlerer Teil wie hinterer Teil des Belags braun.
10% Gl-Agar + Ca (NO ₃) ₂ 0.1%	Grüner.	s. g. M., dunkelgrün.	Dunkelgrün; oberflächlicher und mittlerer Teil wie hinterer Teil des Belags braun.
2% Gl-Agar + Asparagin 0.1%	Grüner.	Größte M., dunkelgrün.	Dunkelgrün; hinterer Teil des Belags braun.
5% Gl-Agar + Asparagin 0.1%	Grüner.	Größte M., dunkelgrün.	Grün; hinterer Teil des Belags braun.
10% Gl-Agar + Asparagin 0.1%	Grüner.	Größte M., dunkelgrün.	Dunkelgrün; hinterer Teil des Belags braun.
2% Gl-Agar + Pepton 0.1%	Gelbgrün.	g. M., gelbgrün.	Grün; hinterer Teil des Belags gelb.
5% Gl-Agar + Pepton 0.1%	Gelbgrün.	g. M., gelbgrün.	Grün; hinterer Teil des Belags gelb.
10% Gl-Agar + Pepton 0.1%	Gelbgrün.	g. M., gelbgrün.	Weiß; hinterer Teil aber gelb.

Stichococcus v. bei Strichkultur.

Versuchsbeginn 22/XI	10/II	1/VI	10/IX
0.5% Gl-Agar	Dunkelgrün.	g. M., dunkelgrün.	Dunkelgrün.

Versuchsbeginn 12/XI	10/II	1/VI	10/IX.
2% Gl-Agar	Dunkel- grün.	g. M., grün.	Weiß geworden.
5% „	Dunkel- grün.	g. M., grün.	Weiß geworden.
10% „	Dunkel- grün.	g. M., dunkel- grün.	Weiß geworden.
2% Gl-Agar + Ca (NO ₃) ₂ 0.1%	Dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün; hinterer Teil gelb.
5% Gl-Agar + Ca (NO ₃) ₂ 0.1%	Dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün; hinterer Teil gelb.
10% Gl-Agar + Ca (NO ₃) ₂ 0.1%	Dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün; hinterer Teil gelb.
2% Gl-Agar + Asparagin 0.1%	Dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün; hinterer Teil gelb.
5% Gl-Agar + Asparagin 0.1%	Dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün; hinterer Teil gelb.
10% Gl-Agar + Asparagin 0.1%	Dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün; hinterer Teil gelb.
2% Gl-Agar + Pepton 0.1%	Gelbgrün.	s. g. M., gelb- grün.	Weiß geworden.
5% Gl-Agar + Pepton 0.1%	Gelbgrün.	s. g. M., gelb- grün.	Weiß geworden.
10% Gl-Agar + Pepton 0.1%	Gelbgrün.	g. M., dunkel- grün.	Dunkelgrün !

Die beiden oben erwähnten Versuche zeigen uns, daß das Vorhandensein einer größeren Menge Stickstoff im Glukosenähragar die Vergilbung der Algen aufhalten oder sogar verhindern kann. Dabei spielte die Menge der Glukose im Nähragar keine nennenswerte Rolle. Das Grünbleiben der Kulturen erfolgte, einerlei ob die Glukose in der Dosis von 2, 5 oder 10% enthalten war. Dies weist darauf hin, daß die Vergilbung nicht nur als eine Folge einer reichen Ernährung mit Kohlenstoff, sondern auch als eine solche des N-Mangels betrachtet werden kann.

Man sieht ein schlechtes Resultat beim Zusatz von Pepton.

Trotz einer größeren Menge Stickstoff geht dabei oft eine Verfärbung vor sich. Dies beruht sehr wahrscheinlich auf den schlechten Nährwert des Peptons. Die dabei eintretende Entfärbung ist vielleicht auf den Einfluß der Glukose zurückzuführen. Man erinnere sich hier an die 10% Gl-Agar + 0.1% Pepton-Kultur, wo keine Vergilbung eintritt. Warum hier keine Vergilbung und kein Weißwerden eintreten, muß dahingestellt bleiben. Dies lehrt uns aber zur Genüge, daß die häufig eintretende Entfärbung nie als eine Folge zu reicher Ernährung mit Stickstoff betrachtet werden kann.

Von der Giftwirkung von NH_4Cl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird später eingehender die Rede sein: Beim Zusatz dieser Salze verblassen die Algen infolge der Bildung freier Säuren.

In Bezug auf die Versuche von *Scenedesmus n.*, so schlugen sie immer fehl. Trotz des überschüssigen Zusatzes von N-Verbindungen auf die Strichkultur oder Stichkultur, verblaßte die Alge oft früher als bei den Kontrollkulturen. Ich habe nicht ausfindig gemacht, was die Ursache davon war.

Hier muß ich noch auf die Farbentöne der verschiedenen Stellen des Algenbelags hinweisen.

Trotz des Vorhandenseins der überschüssigen Menge Stickstoff behielten nur die Oberfläche des Belags, bzw. dessen Ränder, ihre grüne Farbe, und die Hinterseite, und sogar der mittlere Teil der Oberfläche vergilbten. Die Vergilbung des mittleren Teils der Oberfläche des Belags ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß er von der N-Verbindung schwer erreicht wird. Die Vergilbung der Hinterseite scheint aber durch Luftmangel verursacht zu werden.

Die grün bleibenden Teile bei vorliegenden Versuchen waren also ganz ähnlich den durch neuen Zusatz von Stickstoff ergrüntem Teilen des Algenbelags.

2). Bei Glukosenährlösung.

Die folgenden Versuche beziehen sich nur auf *Chlorella l.* Ich sorgte dafür, daß die Alge immer einem diffusen Licht ausgesetzt blieb.

Für jede Kulturreihe benutzte ich drei Kolben von 200 cm³-Inhalt, die je 50 cm³ der Nährlösung enthielten.

Beim ersten Versuch habe ich Ca (NO₃)₂ oder Asparagin in einer Dosis von 0.25% der Gl-L zugesetzt, die die Glukose in einer Dosis von 2, 5 oder 10% enthielt. In diesem Fall übte der Zusatz von N-Verbindungen keine hemmende Wirkung auf die Vergilbung aus. Bei weiteren Versuchen hatte ich daher eine noch größere Menge der verschiedenen N-Verbindungen zuzusetzen.

Der zweite Versuch:

Anfang 28/X/14	12/XII	6/III	29/X	Trocken- gewicht pro 2 Kolben
A. $\frac{1}{2}$ M-L	s. ger. M., grün.	s. ger. M., grün.	m. M., grün.	0.028 g
B. Gl-L (2%)	g. M., grün.	g. M., gelb- grün!	g. M., gelbgrün.	0.296
C. B+Ca (NO ₃) ₂ , 1%	g. M., grün.	g. M., grün.	g. M., grün.	0.240
D. C+(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1%	g. M., dunkel- grün.	g. M., grün, teils braun	g. M., weiß.	0.213
E. B+Ca (NO ₃) ₂ , 5%	g. M., dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	s. g. M., dunkel- grün.	0.501
F. B+Ca CO ₃ , 0.5%	g. M., grün.	g. M., grün- gelbgrün.	g. M., gelbgrün.	0.319
G. F+(NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1%	ger. M., gelb- grün.	g. M., dunkel- grün.	g. M., grün.	0.568
H. B+Ca CO ₃ , 1%	g. M., grün.	g. M., grün- gelbgrün.	g. M., gelbgrün.	0.290
I. B+Asparagin 0.25%	m. M., grün.	g. M., grün.	g. M., gelbgrün, teils braun.	0.232
J. B+Asparagin 0.5%	g. M., grün.	g. M., grün.	g. M., grün.	0.383
K. B+Pepton 0.5%	g. M., grün.	g. M., grün.	g. M., grün.	0.647

Die Tabelle läßt erkennen, daß eine größere Menge von N-Verbindungen auch bei Glukosenährlösung die Vergilbung verhindern

kann. Der Zusatz von CaCO_3 vermochte die Vergilbung nicht zu beseitigen, Er konnte aber die Giftwirkung der Ammoniumsalze, d. i. die Bildung freier Säuren verhindern.

Asparagin bietet ein interessantes Beispiel, wie ein Zusatz von 0.25% eine braune Farbe (giftige Wirkung) und ein solcher von 0.5% keine solche verursacht. Auch bei dieser Vergilbung kann man also nicht von zu reicher Ernährung mit Stickstoff reden, weil selbst eine noch größere Menge davon keine Vergilbung verursacht. Ich vermute bei 0.25%-Asparagin die Bildung einer organischen giftigen freien Säure.

Vergleichen wir das Trockengewicht mit einander, so sehen wir, daß das von E, G, J und K deutlich größer als das der Kontrollkultur (B) ist. Das Trockengewicht bei anderen Kulturen, abgesehen von $\frac{1}{2}$ M-L-Kultur, war fast das gleiche wie das der Kontrollkultur; die Abweichung liegt in der Fehlergrenze. Vermutlich war noch eine Spur von CaCO_3 in F übrig geblieben. Bei H beobachtete ich deutlich, daß eine geringe Menge von CaCO_3 zurückblieb. Daher wurde der Rückstand mit Essigsäure gewaschen, um CaCO_3 zu lösen. Ich befürchtete dabei aber eine Lösung der anderen Stoffe im Algenkörper, was eine Abnahme des Trockengewichts verursacht haben würde. Aus diesem Grunde sind die Trockengewichte bei F und H nur annähernd.

Das Passieren von Aplanosporen und Schwärmern durch das Filtrierpapier verursachte auch einen ziemlich großen Fehler. Daher fällt eine kleine Abweichung des Trockengewichts in die Fehlergrenze.

Schließlich noch ein Wort über das Trockengewicht bei Pepton. Pepton war, wie schon erwähnt, eine schlechte N-Quelle bei Artarischer Nährlösung. Das Resultat vorliegender Versuche ist aber überraschend. Bei Gl-L nach Detmer, namentlich bei längerer Kultur, ist Pepton eine vortreffliche N-Quelle. Ähnliches sieht man auch bei

den vorhergehenden Agarkulturen. Der Nährwert irgend eines Stoffes kann also je nach der Zusammensetzung der Nährlösung und nach der Kulturweise verschieden sein. Man muß also bezüglich der Resultate der verschiedenen Autoren über den Nährwert eines Stoffes diese Tatsache berücksichtigen, sonst kommt man unvermeidlich zu einem Trugschluß.

D. WESEN DER VERGILBUNGSERSCHENUNG.

Um das Wesen der Vergilbungserscheinung näher zu untersuchen, war es nötig, weitere Flüssigkeitskulturen anzustellen. Die Versuche wurden in Jenenser Kaliglaskolben von etwa 300 cm³ Inhalt ausgeführt, um eine etwaige Ausscheidung der Alkalien zu vermeiden. Für jede Versuchsreihe dienten mir, in den meisten Fällen zwei Kolben. Jeder Kolben enthielt je 100 cm³ der Nährlösung. Sie wurde wie üblich sterilisiert und nach der Überimpfung diffusen Licht ausgesetzt. Im Sommer muß man besonders auf die Lichtintensität achten, weil ein grelles Sonnenlicht im Sommer eine Farbstoffzerstörung verursacht.

Erste Kulturen.

Chlorella l.

Anfang 29/X '14	6/III '15.	Trockengewicht pro 2 Kolben	Reaktion nach Abbruch des Versuches
$\frac{1}{2}$ M-L	ger. M., grün.	0.124	Neutral.
2% Gl-L (6 Kolben).	g. M., vergilbt.	1.280 1.262	Neutral oder sauer.
2% Gl-L + Ca CO ₃ 0.5%	g. M., etwas grüner.	0.911	Neutral.
2% Gl-L + Ca(NO ₃) ₂ 1%	s. g. M., dunkelgrün.	1.435	Neutral.
5% Gl-L	g. M., vergilbt.	1.049	Sauer.
10% Gl-L	g. M., ?	0.994	Sauer.
2% Gl-L im Dunkeln	m. M., gelbgrün.	0.508	Sauer. !

Anfang 29/X '14	6/III '15.	Trockengewicht pro 2 Kolben	Reaktion nach Abbruch des Versuches
<i>Stichococcus v.</i>			
$\frac{1}{2}$ M-L	ger. M., grün.	0.144	Neutral.
2% Gl-L	g. M., vergilbt.	0.328	Sauer.
<i>Scenedesmus n.</i>			
$\frac{1}{2}$ M-L	ger. M., grün.	0.354	Neutral.
2% Gl-L	g. M., vergilbt.	0.526	Neutral.
<i>Chlorosphaera p.</i>			
$\frac{1}{2}$ M-L	s. ger. M., grün.	0.237	Neutral.
2% Gl-L	g. M., grün. (am 5/VI vergilbt)	0.390	Neutral.
<i>Chlamydomonas k.</i>			
$\frac{1}{2}$ M-L	ger. M., grün.	0.116	Neutral.
2% Gl-L	g. M., grün.	0.208	Neutral.

Die zweiten und dritten Kulturen beziehen sich nur auf *Chlorella l.*

Zweite Kulturen.

Anfang 20/V	15/VII	10/X	Trockengewicht pro ein Kolben	Reaktion nach Versuch
$\frac{1}{2}$ M-L (2 Kolben)	ger. M., grün.	Grün.	0.027	Neutral.
0.5% Gl-L (2 K.)	g. M., grün.	Grün.	0.145	Neutral.

Dritte Kulturen.

Anfang 20/V	15/IX	10/X	Trockengewicht pro ein Kolben	Reaktion nach Versuch
$\frac{1}{2}$ M-L (3 K.)	ger. M., grün.	Grün.	0.012	Neutral.
0.5% Gl-L (2 K.)	g. M., grün.	Grün.	{ 0.124 0.123	Neutral.
1% Gl-L (3 K.)	g. M., grün.	Gelbgrün.	{ 0.118 0.140	Neutral.
2% Gl-L (6 K.)	g. M., grün.	Gelbgrün.	{ 0.172 0.165	Neutral.
$\frac{1}{2}$ M-L im Dunkeln	k. W.	W. Spur.	—	Neutral.

Zunächst werde ich die Trockengewichte mit einander ver-

gleichen. Bei *Chlorella l.* ist die Ernte bei 2% Gl-L etwa zehnmal größer als die bei $\frac{1}{2}$ M-L. Ähnliches haben wir schon bei den Versuchen von C, 2 beobachtet. Die beschleunigende Wirkung der Glukose auf das Wachstum war bei anderen untersuchten Algen nicht so merklich wie bei *Chlorella l.*, doch ziemlich deutlich.

Die Maximalernte von *Chlorella l.* war bei 1% und 2%-Gl-L wahrzunehmen.

Es sei noch bemerkt, daß die Ernten der ersten Kulturen ziemlich viel größer waren als die der zweiten und dritten Kulturen. Nach meiner Meinung ist diese Abweichung auf die Verschiedenheit der Kulturdauer and der Jahreszeiten zurückzuführen.

Merkwürdigerweise kommt keine Vergilbung bei 0.5% Gl-L vor. Diese Erscheinung tritt aber bei 1%-, 2%-, 5%- und 10%-Gl-L ein. Daher halte ich 0.5% für die Grenzkonzentration der Glukose, die bei *Chlorella l.* keine Vergilbung hervorruft.

1. Vergilbungserscheinung schon bei neutralem Zustande der Nährlösung.

Im folgenden möchte ich das Wesen der Vergilbungserscheinung etwas eingehender erörtern.

Der Verlauf des Farbenwechsels von *Chlorella l.* bei Gl-L sei hier noch einmal erwähnt: *Chlorella l.* vergilbt erst nach 3–5 Monaten nach der Überimpfung. Je älter die Kultur wird, desto gelber wird die Alge, dann wird sie weiß, um schließlich abzusterben.

Nach meinen Untersuchungen hängt das Weißwerden der untersuchten Algen, wenigstens der *Chlorella l.*, mit einer Giftwirkung zusammen. Das Weißwerden wird nämlich durch eine freie organische Säure verursacht, wovon später die Rede sein wird. Somit besteht der Entfärbungsvorgang bei den untersuchten Algen aus zwei auf einander folgenden Vorgängen.

Erstens Vergilbung.

Zweitens Weißwerden.

Zunächst komme ich auf die Vergilbungserscheinung zu sprechen. Die Gl-L ist wegen Vorhandenseins von KH_2PO_4 schwach sauer und beim Verlauf der Kultur wird sie neutral. Die Vergilbung tritt schon im neutralen Zustande der Nährlösung auf, und die hauptsächlichste Ursache der Vergilbung muß daher anderswo zu suchen sein. Der Verblässungsvorgang geht mit der sauren Reaktion der Nährlösung hand in hand. Es fragt sich nun:

Ist der N-Mangel die Hauptursache der Vergilbung? Um diese Frage zu beantworten, sah ich mich veranlaßt den Nachweis von Nitrat und Ammoniak in den vergilbten Kulturen zu erbringen.

2. Nachweis von Nitrat und Ammoniak.

Das Nitrat wurde mit einer Diphenylaminlösung der Schwefelsäure geprüft. Bei der Prüfung des Ammoniaks zeigte sich aber das Nesslerische Reagens unbrauchbar, weil eine andere dieses Reagens reduzierende Substanz in der Nährlösung gebildet wird. Daher wurde die zu prüfende Lösung mit Natronlauge gekocht, und der dabei emporsteigende Dampf wurde mit einem mit HCl benetzten Glasstab geprüft.

In der nachfolgenden Tabelle sind kurz die Resultate der Nitratreaktion dargestellt.

	$\frac{1}{2}$ M-L	0.5% Gl-L	1% Gl-L	2% Gl-L	5% Gl-L	2% Gl-L + CaCO_3
<i>Chlorella l.</i>	Deutlich	Keine Spur	Keine Spur	Keine Spur	Keine Spur	Keine Spur

	<i>Stichococcus v.</i>	<i>Scenedesmus n.</i>	<i>Chlorosphaera p.</i>	<i>Chlomydomonas k.</i>
$\frac{1}{2}$ M-L	Deutlich	Deutlich	Deutlich	Keine Spur
Gl-L (2%)	Keine Spur	Keine Spur	Keine Spur	Keine Spur

Mit Bezug auf Ammoniak, so konnte ich keine Spur in irgend einer Kultur von *Chlorella l.* finden.

Aus obigen Prüfungen geht hervor, daß der Mangel an Stickstoff keine nennenswerte Rolle bei der Vergilbung spielt. So trat bei 0.5% Gl-L die Erschöpfung des Nitrats ebenso wie bei 1%- und 2% Gl-L auf. Trotzdem findet bei der ersteren Lösung keine Vergilbung statt. Die dritte Frage, die sich erhebt ist dann:

Kann eine heterotrophe Lebensweise die Zerstörung des Chlorophylls verursachen?

Infolgedessen sah ich mich veranlaßt, die verarbeitete Menge der Glukose zu bestimmen.

3. Verbrauchbare Mengen Glukose und damit zusammenhängende Algenernte.

Die folgenden Bemerkungen beziehen sich, wenn nichts anderes gesagt wird, nur auf *Chlorella l.*

Die Analyse der Glukose wurde nach der Methode von Bertrand¹⁾ ausgeführt.

Die Resultate sind die folgenden:

Kulturdauer	Ursprungh. Menge	Verbrauchte Menge	Zurückgeblieb. Menge	Trockengewicht	Trockeng. pro 1g Glukosekonsum
29/X-1/VII	5. g (5%)	1.900	3.100	0.525	0.271
29/X-1/VII	10 „ (10%)	2.100	7.900	0.497	0.237
1/VII-10/X	0.5 „ (0.5%)	0.477	0.023	0.124	0.260 !
20/V-10/X	0.5 „ (0.5%)	0.495	0.006	0.145	0.293 !
11/VII-10/X	1.0 „ (1%)	0.832	0.168	0.118	0.142
11/VII-10/X	2.0 „ (2%)	0.975	1.025	0.172	0.176

Die Tabelle läßt erkennen, daß die Glukose bei 0.5% fast

1). Bertrand: Guide pour les manipulations de Chimie biologique, 1913, II. Éd.

ganz resorbiert wird, und daß sie bei höheren Konzentrationen in mehr oder weniger großen Mengen zurückbleibt.

Beachtenswert ist auch, daß die Algenernte im Verhältnis zum gleichen Glukosekonsum bei 0.5% Gl-L am größten ist.

Es ist daher wohl denkbar, daß bei 1%- und 2% Gl-L eine größere Menge Glukose als Gärungsmaterial verwendet wird. Demgemäß ist die Anhäufung einer größeren Menge von Gärprodukten bei 1%- sowie 2%-Gl-L, als bei 0.5% Gl-L zu vermuten.

Streng genommen ist der Spaltungsprozeß der Glukose bei 1%- und 2%-Gl-L nicht als Gärungsprozeß, sondern als eine unvollständige Oxydation oder Oxydationsgärung zu betrachten, weil er in der Luft oder im luftreichen Medium vor sich geht. Jedoch kann ich die Möglichkeit einer echten Gärung nicht ausschließen, weil ich vielfach bei Stichkulturen Gasbildung beobachten konnte.

Bei vollständiger Oxydation von Zucker wird eine größere Energie als bei der Gärung frei, und daher kann der größte Teil des Zuckers als Baumaterial verwendet werden.

Vermutlich geht bei 0.5% Gl-L vor allem vollständige Oxydation der Glukose und damit eine ökonomische Durcharbeitung der Glukose vor sich.

Man kann aber nicht ohne weiteres sagen, daß die Gärung eine wesentliche Ursache der Vergilbungserscheinung ist, obwohl zwischen beiden ein gewisser Parallelismus herrscht.

Es ist aber begreiflich, daß die Algen in zuckerreichen Medien, d. i. in 1%-Gl-L, und in mit noch größeren Mengen von Glukose versehenen Lösungen, saprophytisch oder heterotroph an Kohlenstoff werden können. In diesem Falle kann die Glukose den ganzen C-Bedarf decken. Möglicherweise liegt der Fall anders bei 0.5% Gl-L. Es scheint mir wahrscheinlich, daß dabei sowohl Glukose als auch Kohlensäure den Algen als C-Quelle dient. Offenbar übertrifft aber

der Anteil der Glukose bei der C-Assimilation den von Kohlensäure bei weitem, weil die untersuchten Algen bei autotropher Ernährung immer geringe Ernten liefern.

Auf Grund des bisher Gesagten muß die Hauptursache der Vergilbungserscheinung die zuckerreiche Ernährung und die damit zusammenhängende saprophytische Lebensweise sein. Der Gärungsprozeß ist nichts anderes als eine mit der Vergilbung parallel gehende Erscheinung. Er bildet keine direkte Ursache der Vergilbung. Jedoch könnte man an eine Giftwirkung der Gärprodukte, und daher an einen indirekten Einfluß derselben auf das Weißwerden der Algen denken.

Das Weißwerden bei den untersuchten Algen war eine Absterbeerscheinung. Die vergilbten Algen blieben dagegen einige Monate lang lebensfähig, und konnten durch einen Zusatz von N-Verbindung wieder ergrünen. Die beiden Erscheinungen mußten also bei den untersuchten Algen klar von einander unterschieden werden.

Nach meiner Meinung muß die Vergilbungserscheinung als eine ökologische Erscheinung und das Weißwerden als eine Absterbeerscheinung betrachtet werden.

Gewöhnlich folgen die beiden Erscheinungen: die eine auf die andere. Infolgedessen wurden sie oft als eine einzige Erscheinung betrachtet. Es scheint mir aber, daß die Verblassungserscheinung direkt, ohne Vergilbung, als eine Folge der saprophytischen Lebensweise vorkommen kann. Dies ist wahrscheinlich der Fall bei *Euglena gracilis*. Wie weit meine Unterscheidung richtig ist, lasse ich dahingestellt.

Vor langer Zeit schon wurde die Beziehung zwischen Saprophytismus und Entfärbung betont, und die Abstammung der chlorophylllosen Saprophyten und Parasiten wurde damit erklärt. Diese Ansicht herrscht heute noch; allerdings ist sie noch auf

keinem experimentellen Wege bewiesen.

Über die Ursache der Entfärbung der Algen finden wir Aufschluß in den Arbeiten von Zumstein (1900), Artari (1902, 1913) und E. Pringsheim (1913).

Nach Artari (1902 S. 206) ist das Chlorophyllverschwinden der Chlorophyceen als eine Folge reicher organischer Ernährung zu betrachten. Bei diesem Autor fand sich aber kein Analysieren der Ursachen der Entfärbung.

Zumstein erhielt weiße Euglenen (*Astasia*-Form) neben grünen Formen, sowohl in konzentriertem Erbsenwasser, als auch in Fleischextraktlösung und zwar am Licht. Nach Mitteilungen dieses Autors ergrünte die *Astasia*-Form „mit allmählichem Verbräune der organischen Nahrung oder mit der Gewöhnung an die konzentrierte Lösung“ (S. 185). Es ist aber sehr fraglich, ob seine Behauptung zutrifft. Man erinnere sich zunächst der N-Quelle in seinen Nährlösungen. Wahrscheinlich sind in denselben höhere N-Verbindungen, wie z. B. Eiweiß und Aminosäure, vorhanden. Es ist daher möglich, daß einfache N-Verbindungen, wie Ammoniumsalze &c., daraus entstehen und zunächst zur Chlorophyllbildung dienen. Wenn die Vermutung zutrifft, so ist das Auftreten der *Astasia*-Form am Lichte zum Teil auf eine unbenutzbare N-Verbindung d. i. indirekten N-Mangel zurückzuführen.

Zumstein fand schon das Auftreten des Weißwerdens in N-freier Lösung, und auch das Ergrünen verblaßter Algen bei bloßer Zugabe von N- und zwar NH_4 -Verbindungen, nicht aber bei Zugabe von anderen Salzen (S. 184). Er legte aber das Hauptgewicht des Weißwerdens nicht auf den N-Mangel.

Immerhin betrachten sowohl E. Pringsheim als auch Zumstein die „üppige Ernährung“ als eine Ursache der Verblässung der Euglenen. In ihren Arbeiten ist aber die Frage, wie „reiche or-

ganische Ernährung“ (Zumstein l.c. S. 184) oder „üppige Ernährung“ (E. Pringsheim l.c. S. 45) Farbloswerden verursacht, nicht berührt worden.

Es scheint mir wahrscheinlich, daß die genannten Autoren den Einfluß der C-Quelle auf das Weißwerden nicht berücksichtigt.

In den Arbeiten von Schindler und Boresch finden wir, daß der N-Mangel einen großen Einfluß auf die Entfärbung der Cyanophyceen und *Chlamydomonas*-sp. ausübt. Meine eigenen Untersuchungen bestätigen auch den Einfluß des N-Mangels auf die Vergilbung der Chlorophyceen. Ich kann ihn jedoch nicht als die Hauptursache der Vergilbung betrachten. Darüber habe ich bereits gesprochen, und will daher an dieser Stelle nicht näher darauf eingehen, sondern nur noch ein Beispiel hinzufügen.

Ich kultivierte einmal *Chlorella* l., *Stichococcus* v. und *Scenedesmus* n. auf Beijerinckschem N-freien Gl- und Mannit-Agar. Trotz des N-Mangels zeigten die Algen bei Mannit-Agar einen kleinen schön grünen Belag, bei Gl-Agar aber einen gelbgrünen kleinen (*Stichococcus* und *Scenedesmus*), bisweilen aber auch großen Belag (*Chlorella*). Selbstverständlich war die Vergilbung auf Gl-Agar von der reichen Ernährung an Kohlenstoff und dem N-Mangel abhängig. Mannit ist eine schlechte C-Quelle für die betreffenden Algen, was das Grünbleiben der Algen erklären läßt.

Dies und früher schon mitgeteilte Gründe lassen uns erkennen, daß der N-Mangel einen Einfluß zweiter Ordnung auf die Vergilbung ausübt. Ich will versuchen den Einfluß der Glukose und des N-Mangels auf die Vergilbung bildlich klar zu machen. Man denke hierbei an einen fallenden Körper. Die Ursache des Fallens eines Körpers ist selbstverständlich die Schwerkraft. Man kann aber mit einer Platte leicht den Körper unterstützen und am Fallen verhindern. Mit solcher Platte kann man die hemmende

Wirkung des Stickstoffs betreffs der Vergilbung vergleichen. Die Hauptursache der Vergilbungserscheinung muß reiche Kohlenstoffernährung sein, die man bildlich mit der den Fall des Körpers bedingenden Schwerkraft vergleichen kann.

E. FARBLOSWERDEN UND ABTÖTUNG DURCH BILDUNG FREIER SÄUREN.

Nach und nach verblassen die vergilbten Algen, um zuletzt ganz weiß zu werden. Bei Agarkulturen von *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* dauerte der Vergilbungszustand etwa drei Monate lang. Ähnlich verhielten sich auch die vergilbten Kulturen von *Chlorella l.* in 2%- sowie 5%-Gl-L.

Bei den weißen Flüssigkeitskulturen fand ich immer die Bildung freier Säure. Bemerkenswerterweise fand ich in 10 cm³ von 2%- und 5% Gl-L immer eine 0.3 cm³ $\frac{N}{10}$ NaOH entsprechende Menge freie Säure. Nach chemischer Analyse erwies sich diese Säure als identisch mit Ameisensäure.

Daher wurde die Giftwirkung der Ameisensäure und anderer wichtiger Säuren auf die Algen geprüft. Das Ergebnis lehrte mich, daß die Giftwirkung der Ameisensäure die von anderen Säuren bei weitem übertrifft. Die $\frac{N}{333}$ -Lösung der Ameisensäure wirkte auf *Chlorella l.* immer tödlich. Die $\frac{N}{333}$ Lösung der Ameisensäure ist betreffs Konzentration der Lösung gleich, die 0.3 cm³ der $\frac{N}{10}$ Ameisensäure in je 10 cm³ enthält. Damit stimmt die tödliche Konzentration der Ameisensäure völlig mit der Konzentration der bei weißen Kulturen gefundenen Ameisensäure überein.

Im gelbgrünen oder gelbweißen Zustande der Kultur sind die Algen noch lebensfähig. Man kann durch ihre Überimpfung eine neue Kultur gewinnen. Dies kann man jedoch nicht beim ganz

weißen Zustände der Kultur. Weder Überimpfung, noch N-Zugabe rufen dann einen positiven Erfolg hervor. Die Algen sind völlig abgestorben. Das gesagte trifft wenigstens auf *Chlorella l.* und *Stichococcus v.* zu. *Scenedesmus n.* verhält sich etwas anders. Diese Alge verblaßt leicht bei Glukoseagarstrichkultur. Bei alten Kulturen stirbt der direkt der Luft ausgesetzte Teil des Belags ab; die Rückseite und die Ränder des Belags bleiben aber lebensfähig und ergrünen durch eine N-Zugabe.

1. Indirekte Giftwirkung der anorganischen Säuren.

Zunächst seien hier die Aziditäten der verschiedenen Kulturen bei den Versuchen C, 2 mitgeteilt. Sie wurden nach Beendigung der Versuche mit $\frac{N}{10}$ NaOH bestimmt. Dabei wurde die Nährlösung abfiltriert, und das Filtrat davon wurde zu je 10 cm³ mit der genannten Alkalilösung titriert.

<i>Chlorella l.</i>	Zustand der Alge	Azidität mit $\frac{N}{10}$ NaOH pro 10 cm ³ Filtrat
A $\frac{1}{2}$ M-L	Frisch, grün.	Neutral.
B 2% GI-L	Vergilbt.	0.2 cm ³
C B + Ca(NO ₃) ₂ 1%	Frisch.	Neutral.
D C + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1%	Weiß, tot!	1.0 cm ³ $\left\{ \begin{array}{l} \frac{N}{100} \text{H}_2\text{SO}_4, \text{ wenn freie} \\ \text{Säure identisch mit} \\ \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ ist.} \end{array} \right.$
E B + Ca(NO ₃) ₂ 5%	Frisch.	Neutral.
F B + CaCO ₃ 0.5%	Vergilbt.	Neutral.
G F + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1%	Frisch!	0.3 cm ³
H B + CaCO ₃ 1%	Gelbgrün.	Neutral.
I B + Asparagin 0.25%	Giftig.	0.5 cm ³
J B + Asparagin 0.5 %	Frisch.	0.6 cm ³
K B + Pepton 0.5%	Frisch.	1.2 cm ³

Merkwürdigerweise trat die giftige Erscheinung bei I auf, (Asparagin 0.25%), während bei J (Asparagin 0.5%) keine solche zu finden war. Trotzdem war die Azidität bei beiden Lösungen fast gleich, was die Verschiedenheit der Säuren erkennen läßt. Bei J und k ist auf die Gegenwart schwach giftiger organischer Säuren und bei I auf eine giftige organische Säure wie Ameisensäure hinzuweisen.

Beachtenswert sind die ziemlich große Menge an Säure und die Giftwirkung bei D. Bereits Artari (1906 S. 183) nahm bei *Chlorella communis* die Bildung freier Salpetersäure als eine Folge der Verarbeitung des Ammoniumnitrats an.

Sehr wahrscheinlich ging in unserem Falle die Bildung freier Schwefelsäure vor sich, weil dabei Ammoniumsulfat benutzt wurde. Nehmen wir nun an, daß gebildete Säure nur aus H_2SO_4 besteht, so muß seine Konzentration $\frac{N}{100} H_2SO_4$ gleich sein.

Es ist nunmehr erforderlich festzustellen, in welcher Beziehung die Giftwirkung und die Konzentration der Schwefelsäure zu einander stehen.

Bei meinen Untersuchungen zeigte es sich, daß anorganische Säuren verhältnismäßig Schwache Giftwirkung ausüben, und daß $\frac{N}{10} H_2SO_4$ *Chlorella l.* nicht töten kann. Näheres darüber wird man später finden.

Aus diesem Grunde ist es klar, daß die Giftwirkung der D-Nährlösung nie direkt durch die Bildung der freien Schwefelsäure bedingt ist.

Vermutlich greift Schwefelsäure die Formiate an, und läßt freie Ameisensäure entstehen. Aus diesem Grunde halte ich die Giftwirkung der Schwefelsäure für indirekt.

Der Fall muß auch bei der Giftwirkung von NH_4Cl und

NH_4NO_3 ähnlich sein. Man kann vermuten, daß die freigewordene Salzsäure oder Salpetersäure die Formiate angreift und dadurch die Ameisensäure frei macht.

Um die Bildung freier Säure aus den oben genannten Ammoniumsalzen zu verhindern, habe ich mit Erfolg Kalziumkarbonat, und zwar in einer Dosis von 1% benutzt. Diesbezügliche Untersuchungen mit Detmers Nährlösung ersieht man aus obiger Tabelle. Weiterhin habe ich dieselben Versuche mit Artarischer Nährlösung ausgeführt. In Artarische Nährlösung wurde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einer Dosis von 0.5%, und CaCO_3 in einer Dosis von 1% zugesetzt. Nach 4 Monaten (27/VI-10/X) war die Kultur von *Chlorella l.* gelbgrün oder dunkelgrün, während die Kontrollkultur schon gelbweiß wurde. Bei *Scenedesmus n.* konnte ich keine Erfolge erhalten. Diese Alge wird weiß, einerlei ob sie mit oder ohne CaCO_3 kultiviert wird.

2. Nachweis flüchtiger Säuren, bzw. der Ameisensäure und nicht-flüchtiger Säuren.

Zunächst werde ich eine kurze Darstellung der Nachweismethoden der organischen Säuren geben. Wegen Einzelheiten verweise ich auf die Arbeiten von Bertrand (a. a. O.) und Abderhalden.¹⁾

Qualitative Analyse flüchtiger Säuren.

Die Nährlösung, nach oder ohne Filtration, wurde durch Schwefel- oder Weinsäure schwach sauer gemacht und unter Anwendung eines Kühlers destilliert. Das Destillat wurde neutralisiert und auf dem Wasserbad eingedampft. Dann wurde das konzentrierte Destillat wieder sauer gemacht und mit Äther im Scheidetrichter ausgeschüttelt,

1) Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. II, 1910.

um die Säure zu extrahieren. Nach Befreiung von Äther erhielt ich immer eine kleine Menge Säurelösung.

Ameisensäure kennzeichnet sich durch die folgenden Reaktionen.

- 1). Mit AgNO_3 bildet die neutralisierte Säure einen weißen und dann schwarz werdenden Niederschlag von Silberformiat.
- 2). Salpetersaure Lösung von Kaliumpermanganat (0.5%) färbt sich mit ihr blau.
- 3). Ein charakteristischer Geruch von Ester entsteht durch einen Zusatz von Äthylalkohol und H_2SO_4 .
- 4). Geringere Flüchtigkeit, eine Eigenschaft, die auch zur quantitativen Analyse benutzt wird (nach Bertrand).

Betreffs Erkennung der Butter-, Valerian-, Essig- und Propionsäure verweise ich auf das Werk von Bertrand (a. a. O.).

Man kann die Ameisensäure von der Essigsäure dadurch unterscheiden, daß das Eisensalz der ersteren im Gegensatze zu dem der letzteren in Äthylalkohol unlöslich ist (vergl. Abderhalden l.c.).

Qualitative Analyse nicht-flüchtiger Säuren.

Die nach der Destillation zurückbleibende Nährlösung enthält noch eine große Menge Ameisensäure, weil dieses sich schwer verflüchtigt. Es bedarf daher einer besonderen Vorsicht, um damit Prüfungen nicht-flüchtiger Säuren anzustellen. Uffelmanns Reaktion für die Erkennung der Milchsäure war unbrauchbar, weil eine gleiche Reaktion auch durch Ameisensäure hervorgerufen wird. Daher versuchte ich die Milchsäure durch die Bildung von Zinklaktat zu erkennen.

Oxalsäure läßt sich durch Bildung oxalsauren Kalkes erkennen. Trotz vielfacher Bemühungen konnte ich aber keine Spur dieser Säure nachweisen. Daher kochte ich die Algen sammt der Nährlösung

mit HCl, und behandelte sie dann wie üblich, um die Gegenwart der Oxalsäure in den Algenkörpern nachzuweisen. Aber auch diese Versuche blieben ohne Erfolg.

Bei Agarkulturen von *Chlorella l.*, *Stichococcus v.* und *Scenedesmus n.* konnte ich einmal eine kleine Anzahl Kristalle Kalziumoxalat beobachten. Sie wurden aber auch bei Glukose- und Mineralagar-kultur gefunden. Ich möchte daraus schließen, daß dabei Oxal-säure keinen direkten Zusammenhang mit der Verarbeitung der Glukose hat.

Für die Weinsäure haben wir keine für sie allein charak-teristische Reaktion. Die Reaktion mit Resorzin und H_2SO_4 war bei Gl-L nicht recht anwendbar, weil Glukose eine ähnliche Reak-tion gibt. Die einwandfreie Erkennung der Weinsäure wird nur durch die Isolierung derselben ermöglicht.

Im folgenden sind die Resultate über die Nachweise der organischen Säuren übersichtlich gezeigt. Das Versuchsmaterial wurde den Kulturen im Unterabschnitt D entnommen.

Kulturdauer: 29/X '14–1/VII '15.

<i>Chlorella l.</i>	Zustand der Kultur	Reaktion	Resultate	
			positive	negative
$\frac{1}{2}$ M-L	Frisch, grün.	Neutral.	Ameisensäure.	—
2% Gl-L	Vergilbt.	Sauer.	Ameisensäure.	Oxalsäure.
2% Gl-L + $CaCO_3$ 1%	Vergilbt.	Neutral.	Ameisensäure.	Essig-, Butter-, Propion-, Valerian-, Oxal- und Milchsäure.
2% Gl-L + $Ca(NO_3)_2$ 1%	Frisch, grün.	Neutral.	Ameisensäure.	—
5% Gl-L	Vergilbt, teils verblaßt.	Sauer.	Ameisensäure.	Oxal- u. Milch- säure.
2% Gl-L im Dunkeln	Gelb.	Sauer.	Ameisensäure.	Essigsäure.

<i>Stichococcus v.</i>	Zustand der Kultur	Reaktion	Resultate	
			positive	negative
$\frac{1}{2}$ M-L	Frisch, grün.	Neutral.	Ameisensäure.	—
2% Gl-L	Vergilbt.	Sauer.	Ameisensäure.	—
<i>Scenedesmus n.</i>				
$\frac{1}{2}$ M-L	Frisch.	Neutral.	Spur von Ameisens.	—
2% Gl-L	Vergilbt.	Neutral.	Ameisens. deutlich.	—
<i>Chlorosphaera p.</i>				
$\frac{1}{2}$ M-L	Frisch.	Neutral.	Ameisensäure.	—
2% Gl-L	Vergilbt.	Neutral.	Ameisensäure.	—
<i>Chlamydomonas k.</i>				
$\frac{1}{2}$ M-L	Frisch.	Neutral.	Ameisensäure.	—
2% Gl-L	Frisch.	Neutral.	Ameisensäure.	Milchsäure.

Quantitative Analyse der Ameisensäure.

Diese wurde nach Duclaux (vergl. Bertrand l.c.) ausgeführt. Die Nährlösung aus einem Kolben (ursprüngliche Menge 100 cm³) wurde nach oder ohne Filtration sauer gemacht, und das ganze Volumen wurde durch Zusatz von Wasser auf 120 cm³ gebracht. 10 cm³ davon wurden zur Bestimmung der freien Säure vorbehalten. Die übrigen 110 cm³ wurden in einen Destillierkolben vom etwa 300 cm³ Inhalt hineingetan und abdestilliert.

Die Destillate in Portionen von je 10 cm³ wurden nach einander unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator mit $\frac{N}{50}$ NaOH titriert. Dadurch erhielt ich der Reihe nach die Aziditäten in den Destillaten von 10 (bei 1ster Fraktion), 20 (bei I+II), 30(I+II+III)....bis 60 cm³. Durch den zunehmenden Grad der Azidität in den obigen Destillaten zeichnet sich auch Ameisensäure vor anderen flüchtigen Säuren aus. Weitere Destillation verursacht oft eine Spaltung der organischen Substanz und damit eine Neubildung flüchtiger oder nicht-flüchtiger Säuren. Daher wurde die Destilla-

tion sofort sistiert, nachdem 60 cm³ Destillat erhalten worden waren.

Vermittels der Azidität des 60 cm³ Destillates berechnete ich die gesammte Azidität. Da aber die beobachtete Azidität immer gering ist, so ist der Versuchsfehler im Verhältnis zur gesammten Azidität ziemlich groß, was oft die Brauchbarkeit der Resultate beeinträchtigt. Wahrscheinlich beträgt der Fehler 1 bis 1.5 cm³, während die Gesamt- Azidität in den meisten Fällen nicht über 10 cm³ ist.

Das Versuchsmaterial wurde den im Unterabschnitt D erwähnten Kulturen entnommen.

Die Resultate waren die folgenden:

<i>Chlorella l.</i> Kulturdauer	Kulturlösung	Zustand d. Kultur	Azidität d. freien Säure	Trockenge- wicht pro ein Kolben	Gesammte Azidität mit $\frac{N}{50}$ -NaOH
29/X-1/VII	2% Gl-L.	Gelbgrün.	1.54 c.c.	0.635 g.	8.57 c.c.
29/X-1/VII	5% Gl-L.	Gelbweiß.	7.70	0.525	8.39
29/X-1/VII	2% Gl-L. (Dunkel).	Gelb.	8.10	0.254	5.45
29/X-1/VII	2% Gl-L. (Dunkel).	Gelb.	Sauer.	Destilliert ohne Fil- tration.	9.41
11/VII-15/X	$\frac{1}{2}$ M-L.	Grün.	Neutral.	0.012	3.02
11/VII-15/X	$\frac{1}{2}$ M-L.	Grün.	Neutral.	Ohne Filt.	2.35
11/VII-15/X	0.5% Gl-L.	Grün.	Neutral.	0.123	9.92
11/VII-15/X	1% Gl-L.	Gelbgrün.	Neutral.	0.140	7.76
11/VII-15/X	2% Gl-L.	Gelbgrün.	Neutral.	0.160 ¹⁾	8.62
11/VII-15/X	2% Gl-L.	Gelbgrün.	Neutral.	Ohne Filt.	12.07
20/V-28/X	$\frac{1}{2}$ M-L.	Grün.	Neutral.	0.027	4.96
<i>Stichococcus v.</i>					
29/X-1/VII	$\frac{1}{2}$ M-L.	Grün.	Neutral.	0.072	3.53
29/X-1/VII	$\frac{1}{2}$ M-L.	Grün.	Neutral.	Ohne Filt.	5.88
29/X-1/VII	2% Gl-L.	Gelbgrün.	Neutral.	0.164	5.88
<i>Scenedesmus n.</i>					
29/X-1/VII	$\frac{1}{2}$ M-L.	Grün.	Neutral.	0.177	Spur.
29/X-1/VII	2% Gl-L.	Gelbgrün.	Neutral.	0.263	9.90

1) Die Nährlösung wurde zuerst mit Filtrierpapier und dann mit dem Chamberandschen Trichter filtriert.

Durch diese Untersuchungen ist bewiesen worden, daß Ameisensäure überall in den untersuchten Algenkulturen, und zwar sowohl in M-L, als auch in Gl-L vorkommt.

Vergleichen wir die Ameisensäuremenge, im Verhältnis zur gleichen Algenmenge, bei den verschiedenen Kulturen, so sehen wir, daß die Menge der betreffenden Säure in M-L viel größer ist als in Gl-L. Bei *Chlorella l.* ist auch nachgewiesen, daß die Menge der Ameisensäure in 0.5% Gl-L deutlich größer als in 1%- und 2% Gl-L ist.

Hieraus geht hervor, daß die Bildung der Ameisensäure nicht im Zusammenhange mit der Glukosespaltung steht. Tatsächlich ist die Ameisensäurebildung mehr bei den mit keiner oder weniger Glukose versehenen Kulturen (M-L und 0.5% Gl-L), als bei den mit reichlicher beschickten Glukose Kulturen (1% und 2%- Gl-L) begünstigt.

Schon im Jahre 1882 fand Bergmann Ameisensäure neben Essigsäure nicht nur bei Phanerogamen, sondern auch bei Algen, wie *Phormidium*, *Mougeotia*, *Vaucheria*, *Chara*, *Batrachospermum*, &c. Bergmann nahm die beiden Säuren als „Spaltungsprodukt konstituierender Bestandteile des vegetabilischen Protoplasma“ (S. 784) an. Dieser Schluß basierte aber nur darauf, daß die Säuremenge im Dunkeln zunimmt. Meine eigenen Versuche zeigen ein ähnliches Ergebnis, weil die Ameisensäuremenge, die gleiche Algenmenge vorausgesetzt, bei der Dunkelkultur in 2% Gl-L, größer als bei der Lichtkultur im derselben Nährlösung war.

Der Vermutung von Bergmann widerspricht aber die Tatsache, daß die Ameisensäurebildung bei begünstigten Kulturen (M-L und 0.5% Gl-L) beschleunigt ist. Richtiger scheint mir daher die Ameisensäure als ein normales Stoffwechselprodukt zu betrachten.

Auch glaube ich hier zum Schluß noch bemerken zu müssen,

daß bei der Kultur von *Chlorella l.* in Gl-L die Destillation ohne Filtration immer eine größere Säuremenge zeigte als diejenige mit Filtration. Dies weist deutlich darauf hin, daß Ameisensäure, wahrscheinlich in der Form von Salzen, nicht nur in Nährlösung, sondern auch im Algenkörper enthalten ist. Dies ist auch der Fall bei der Kultur von *Stichococcus v.* in M-L. Wesentlich anders fällt aber die Kultur von *Chlorella l.* in M-L aus. Hier zeigten die beiden Destillationen keinen nennenswerten Unterschied; die Abweichung liegt dabei innerhalb der Versuchsfehler. Das Verhalten scheint mir je nach den Algenarten, der Virulenz der Kultur und den Nährmedien veränderlich zu sein.

3. Bildung der oxydierbaren Substanz.

Die Giftwirkung von Aldehyd, wie z. B. Formaldehyd, Äthylaldehyd &c. ist häufig berichtet worden. Ich verweise auf die Arbeiten von Kuch (1891), Bokorny (1897), und Clark (1899). Nach Bokorny (1911) kann aber die verdünnte Aldehydlösung ohne Giftwirkung assimiliert werden.

Ich habe mich daher bemüht festzustellen, ob Aldehyd in meiner Kulturlösung entstanden war.

Für diese Zwecke wurde die Nährlösung neutral oder schwach alkalisch gemacht, und dann abdestilliert. Das Destillat hatte einen aldehydähnlichen Geruch. Auch wurden die folgenden Reaktionen davon bemerkt.

1. Stark reduzierend auf Nesslerisches Reagens und auch auf ammoniakalische Silbernitratlösung (aldehydähnlich).
2. Keine Rotfärbung mit dem Schiffschenschen Reagens (Abweichung von Aldehyd) und keine Reduktion von Fehling'scher Lösung.
3. Keine Blaufärbung mit salpetersaurer Lösung von Kaliumpermanganat (Abweichung von Aldehyd und Alkohol).

4. Keine Jodformreaktion (Abweichung von Aldehyd, Aceton und Alkohol).

Aus diesen Reaktionen geht schon zur Genüge hervor, daß der in diesem Destillat enthaltene Stoff sich weder mit Alkohol, Aldehyd, noch Aceton identifizieren läßt. Welcher Stoff vorliegt, ist noch nicht festgestellt worden.

Dasselbe Destillat wurde sowohl aus M-L- als auch aus Gl-L-Kultur von *Chlorella l.* erhalten. Daraus darf man wohl den Schluß ziehen, daß die Bildung dieses Stoffes nicht in besonders engem Zusammenhang mit der Glukosespaltung steht. Ich konnte den Stoff auch in der Gl-L-Kultur von *Chlorosphaera p.* finden. Wegen Mangels an Versuchsmaterial konnte ich das Vorkommen dieses Stoffes bei anderen Algen nicht beweisen.

Es fragt sich nun, ob der betreffende Stoff vielleicht einen Anteil am Weißwerden der Algen hat. Ich vermag den Einfluß dieses Stoffes auf die genannte Erscheinung nicht völlig auszuschließen. Die Entstehung dieses Stoffes in M-L widerspricht aber schon der Möglichkeit seiner verblassenden Wirkung, weil in diesem Falle keine Verblassung vorkommt.

Das Farbloswerden in unserer Gl-L läßt sich hinreichend daraus erklären, daß die Ameisensäure befreit wird. Die Ameisensäure in der Form von deren Salzen war ebenso in M-L, 0.5%-1%-, 2%- wie auch in 5% Gl-L entstanden. Sie wird aber nur in den drei letzteren Lösungen befreit und ruft dann das „Weißwerden“ hervor. Gegen meine Erwartung übertrifft die Menge der Formiaten in 0.5% Gl-L diejenige in 1%-, und 2%-Gl-L. In der ersteren Lösung wird die Ameisensäure aber nie befreit, und es tritt weder eine Vergilbung, noch ein Weißwerden ein. Was die Ursache der Befreiung von Ameisensäure ist, habe ich nicht entscheiden können. Vermutlich ist aber die Wirkung des mit

der spaltenden Glukosemenge parallelgehenden Gärprodukts dafür verantwortlich zu machen. Dabei sind freilich organische Säuren mit einer Affinitätsgröße als Ameisensäure (vergl. Ostwald, 1889) voranzusetzen.

VIII. Giftwirkungen verschiedener freier Säuren.

Über die Giftwirkung der freien Säure auf die Pflanzen existieren schon mehrere vortreffliche Arbeiten. So z. B. die Arbeiten von Kahlenberg und True (1896), Heald (1896) und Clark (1899).

Was aber die Giftwirkung der Säuren auf die Algen anbetrifft, so findet man darüber keine ausführliche Arbeiten. Unter diesen sind die Arbeiten von Migula (1890), Bokorny (1897) und Zumstein (1900) hervorzuheben. Die von diesen Autoren hergestellten Säurelösungen waren aber prozentisch, und die Lösungsmittel derselben waren Leitungswasser oder Nährlösung. Die Azidität der von ihnen gebrauchten Säurelösungen war daher nicht ganz genau. Es muß auch noch bemerkt werden, daß die ihnen zur Verfügung stehenden Algen unrein, höchstens speziesrein waren. Die Untersuchungen dieser Autoren wurden auch nie weit auf die organischen Säuren ausgedehnt.

Teils um diese Lücke zu füllen, und teils um die Beziehungen zwischen dem Weißwerden und der Giftwirkung der Säuren festzustellen, unternahm ich die vorliegenden Untersuchungen.

Meine Untersuchungen wurden mit den Normallösungen der verschiedenen Säuren ausgeführt. Als Grundlösung dienten mir dabei $\frac{N}{1}$ -, $\frac{N}{5}$ -, oder $\frac{N}{10}$ -Lösung. Um die genaue Azidität zu erhalten, wurde die Normallösung immer mit destilliertem Wasser hergestellt und verdünnt. Die Kontrollkulturen wurden in destilliertem Wasser ausgeführt. Trotzdem blieben die Algen lange

Zeit hindurch, bisweilen sogar einen Monat lang frisch darin, und häufig konnte ich bei *Chlamydomonas k.* Zellteilung finden.

Jede Säurelösung wurde zu je 10 cm³ in Probierröhren von etwa 30 cm³ Inhalt gefüllt. Eine ziemlich große Menge der Algen, die frischen M-Agar-Kulturen entnommen wurden, wurde in die zu prüfende Säurelösung überimpft. Um eine Veränderung der Konzentration und eine Zerstörung der Säurelösung zu vermeiden, wurde die Säurelösung nie sterilisiert. Diese Behandlung scheint aber keinen Fehler verursacht zu haben, weil bei den Versuchen eine Entwicklung von Bakterien nie beobachtet wurde.

Die Versuche fanden immer an beschatteten Orten statt, um die Spaltung der Säure durch grelles Licht zu vermeiden.

Den Einfluß der Temperatur auf die Giftwirkung der Säuren habe ich nicht besonders berücksichtigt. Die Versuche wurden immer im Treibhaus bei etwa 20°C ausgeführt.

Nunmehr seien hier einige Bemerkungen über die Symptome der Abtötung angeführt. Betreffs der Desorganisationserscheinungen der Zellen verweise ich auf die Arbeit von Klemm (1895).

Nach meinen Untersuchungen zeigen die durch Säuren abgetöteten Algen eine Kontraktion und Granulation des Protoplasmas (vergl. Tafel II, Fig. 61). Das beste Kennzeichen ist aber die Farbenveränderung. Die abgestorbenen Algen werden zuerst gelbbraun und dann weiß. Als das Kriterium des Absterbens wurde daher hauptsächlich die Farbenänderung betrachtet. Nur bei den schwer erkennbaren Reaktionen wurden mikroskopische Untersuchungen des Zellinhaltes ausgeführt.

Stark konzentrierte Säurelösungen verursachen schon nach einigen Stunden, verdünnte aber erst nach 3-5 Tagen Desorganisationserscheinung.

Die folgenden Resultate basierten sich auf fünf tägige Ein-

wirkung der Säurelösung auf die Algen, weil bei den lange dauern- den Versuchen sowohl ein Konzentrationswechsel, als auch eine Spaltung der Säurelösungen möglich ist. Die Versuchsprotokolle bei vorliegenden Untersuchungen sind ziemlich groß. Der Kürze halber lasse ich sie ganz weg und führe nur die Resultate an.

Kritische und tötliche Konzentrationen der verschiedenen
Säurelösungen bei den untersuchten Algen.

Die letzteren Konz. sind eingeklammert.

Versuchsdauer 5 Tage. Im Schatten. T=ca 20°C.

Säure.	<i>Chlorella l.</i>	<i>Stichococcus v.</i>	<i>Scenedesmus n.</i>	<i>Chlorosphaera p.</i>	<i>Chlamydomonas k.</i>
Ameisen- säure	$\frac{N}{500}(\frac{N}{333})$	$\frac{N}{2000}(\frac{N}{1000})$	$\frac{N}{2000}(\frac{N}{1000})$	$\frac{N}{2000}(\frac{N}{1000})$	$\frac{N}{1000}(\frac{N}{500})$
HCOO. K	frisch bei $\frac{N}{100}$	frisch bei $\frac{N}{100}$	frisch bei $\frac{N}{100}$	frisch bei $\frac{N}{100}$	frisch bei $\frac{N}{100}$
Essigsäure	$\frac{N}{50}(\frac{N}{25})$	$\frac{N}{500}(\frac{N}{250})$	$\frac{N}{125}(\frac{N}{100})$	$\frac{N}{500}(\frac{N}{250})$	$\frac{N}{500}(\frac{N}{250})$
Buttersäure	$\frac{N}{100}(\frac{N}{50})$	$\frac{N}{500}(\frac{N}{250})$	$\frac{N}{250}(\frac{N}{100})$	$\frac{N}{2000}(\frac{N}{1000})$	$\frac{N}{2000}(\frac{N}{1000})$
Oxalsäure	$\frac{N}{5}(\frac{N}{2.5})$	$\frac{N}{100}(\frac{N}{50})$	$\frac{N}{13}(\frac{N}{11})$	$\frac{N}{11}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{800}(\frac{N}{400})$
Milchsäure	$\frac{N}{8}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{25}(\frac{N}{10})$	$\frac{N}{200}(\frac{N}{100})$	$\frac{N}{8}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{25}(\frac{N}{10})$
Weinsäure	frisch bei $\frac{N}{1}$	$\frac{N}{125}(\frac{N}{25})$	$\frac{N}{125}(\frac{N}{25})$	frisch bei $\frac{N}{1}$	$\frac{N}{625}(\frac{N}{125})$
HCl	$\frac{N}{10}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$	$\frac{N}{10}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{10}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$
HNO ₃	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$	$\frac{N}{500}(\frac{N}{250})$	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$	$\frac{N}{100}(\frac{N}{80})$
$\frac{1}{2}$ H ₂ SO ₄	$\frac{N}{10}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$	$\frac{N}{80}(\frac{N}{40})$	$\frac{N}{10}(\frac{N}{5})$	$\frac{N}{800}(\frac{N}{400})$
H ₂ O (Kon- troll)	frisch.	frisch.	frisch	frisch.	frisch.

Die obige Tabelle läßt uns deutlich erkennen, daß die Giftwirkung der Ameisensäure von den untersuchten Säuren am größten ist. Bei *Stichococcus v.*, *Scenedesmus n.* und *Chlorosphaera p.* ist schon $\frac{N}{1000}$ -Lösung desselben (0.1 cm^3 der $\frac{N}{10}$ -Ameisensäure wurde mit H_2O auf 10 cm^3 gebracht) deutlich giftig. *Chlorella l.* ist gegen diese Säure am meisten widerstandsfähig. Bei $\frac{N}{333}$ -Lösung (0.3 cm^3 der $\frac{N}{10}$ Ameisensäure wurde mit H_2O auf 10 cm^3 gebracht) stirbt sie im Laufe von zwei Tagen nach der Überimpfung, bei $\frac{N}{500}$ (0.2 cm^3 $\frac{N}{10}$ der Ameisensäure wurde mit H_2O auf 10 cm^3 gebracht) bleibt sie aber ganz frisch.

Die gewonnenen tödlichen Konzentrationen der Ameisensäure sind daher ziemlich ähnlich, oft aber kleiner als die der bei weiß gewordenen Kulturen gefundenen freien Ameisensäure, was uns die Ursache des Weißwerdens verdeutlicht.

Verglichen mit der Giftwirkung der Ameisensäure ist diejenige der Weinsäure sehr unbedeutend. Bei *Chlorella l.* und *Chlorosphaera p.* war die normale Lösung noch nicht giftig. *Chlamydomonas k.* war aber dagegen ziemlich empfindlich, indem $\frac{N}{125}$ Lösung eine deutliche Giftwirkung ausübte.

Gegen meine Erwartung war die Giftwirkung der anorganischen Säuren verhältnismäßig schwach. *Chlorella l.* und *Chlorosphaera p.* blieben noch in $\frac{N}{10}$ HCl und H_2SO_4 ganz frisch.

Vergleichen wir die Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Pflanzenobjekte gegen die freien Säuren mit einander, so sehen wir, daß die Widerstandsfähigkeit der Algen, wenigstens der untersuchten Algen, mehr mit derjenigen der Pilzsporen als mit derjenigen der Phanerogamen-Keimpflanzen übereinstimmt. Nach Clark (1899)

vermögen mehrere anorganische und organische Säuren in den Konzentrationen von $\frac{N}{3.3} - \frac{N}{102}$ die Pilzsporen abzutöten (S. 326), während nach Kahlenberg und True (1896, S. 92), und Heald (1896, S. 132) eine stark verdünnte Säurelösung wie $\frac{N}{3200}$ eine deutlich abtötende Wirkung auf die Keimlinge von Phanerogamen ausübt.

Nach Kahlenberg und True (l.c. S. 91) soll die Giftwirkung der anorganischen Säuren gänzlich auf der Wirkung der H-Ionen beruhen. Wie steht es damit bei unseren Algen?

Um dies zu entscheiden, versuchte ich die Giftwirkung von Ameisensäurem Kalium ($\text{HCOO} \cdot \text{K}$) zu konstatieren. Das Resultat war aber ganz negativ. Hieraus darf man wohl den Schluß ziehen, daß HCOO -Ion keine Giftwirkung ausüben kann.

Es fragt sich nun, ob die Giftwirkung der Ameisensäure ($\text{HCOO} \cdot \text{H}$) auf eine solche von den Molekülen der Säure, auf HCOO - oder auf H- Ionen zurückzuführen ist. Nach obigem muß aber die Wirkung von HCOO -Ion außer Acht gelassen werden. Es ist außerdem noch zu bemerken, daß die tödlichen Konzentrationen der verschiedenen Säuren selbst bei ein und derselben Alge stark von einander abweichen. Dies weist klar darauf hin, daß die Giftwirkung der untersuchten Säuren nicht auf diejenige von H-Ion zurückzuführen ist.

Aus diesem Grunde schreibe ich die Giftwirkung von Ameisensäure derjenigen der undissoziierten Moleküle dieser Säure zu.

Die Giftwirkung der anorganischen Säuren auf die untersuchten Algen ist auch auf diejenige der Moleküle der Säuren zurückzuführen, weil bei denselben die unschädliche Wirkung der Kationen von vornherein klar ist.

Die Giftwirkung von anderen organischen Säuren ist auch sehr wahrscheinlich auf die Wirkung von den Molekülen der

Säuren zurückzuführen. Ob die Kationen dieser Säuren giftig sind, ist noch nicht entschieden worden.

Die tötlichen Konzentrationen sind, wie man aus obiger Tabelle ersieht, oft ziemlich groß. Jedoch darf man keineswegs von einer Abtötung durch osmotischen Druck sprechen. Man erinnere sich hier an die Grenzkonzentrationen der Glukose im V Abschnitt. Vergleichen wir den osmotischen Druck bei den tötlichen Konzentrationen der Säurelösungen mit dem bei den Grenzkonzentrationen der Glukose, so sehen wir sofort, daß derselbe bei den letzteren immer größer ist als bei den ersteren.

Es erübrigt sich noch ein Wort über die Giftwirkung von Ameisensäuren Salzen bei den untersuchten Algen bei langdauernder Kultur hinzufügen. In dieser Beziehung stimmt meine Ansicht mit derjenigen von K. Aso (1906 S. 24) überein. Dieser Autor hat sich bei diesbezüglichen Untersuchungen mit *Spirogyra* und Phanerogamen dahin geäußert, daß die Formiate in Pflanzenkörpern durch hydrolytische Dissoziation freie Säure bilden und die Pflanzen abtöten. Bei kurz dauernden Versuchen soll das aber anders sein.

IX. Erklärung der Entfärbungserscheinung.

Auf Grund der bisher gewonnenen Resultate gebe ich in den folgenden Zeilen meine Ansicht für die Ursachen des Entfärbungsvorganges.

Nach meinen Untersuchungen muß die Entfärbungserscheinung wie schon erwähnt, in zwei Erscheinungen geteilt werden:

1). Vergilbung.

2). Weißwerden.

Nunmehr will ich im einzelnen auf diese Erscheinungen ein-

gehen, und dann die Entfärbungserscheinung der untersuchten Algen mit derjenigen von anderen Algen und Phanerogamen vergleichen.

1). Vergilbungserscheinung.

Zunächst soll die Vergilbungserscheinung im Licht besprochen werden.

Die Hauptursache dieser Erscheinung ist, wie schon erwähnt, die üppige Ernährung durch assimilierbare C-Verbindungen. Es entsteht die Frage, was für eine Rolle die C-Verbindungen dabei spielen.

Nach vieler darauf verwendeter Mühe kam ich zum Schluß, daß die Vergilbung eine besondere durch reiche Ernährung mit Kohlenstoff veranlaßte Lebenserscheinung ist. Das Wesen der Vergilbung muß immer auf einer inneren Ursache beruhen. C-Verbindungen verhalten sich bei der Vergilbung ähnlich wie ein allgemeiner Reiz. Daher steht die Vergilbung mit dem Saprophytismus im Zusammenhange. Um dies zu beweisen, hebe ich besonders die folgenden Tatsachen hervor.

1. Die Vergilbung steht keineswegs mit irgend einer oxydierbaren Substanz im Zusammenhang, weil die vergilbten Algen lange Zeit hindurch, ohne „Weißwerden“, ihre gelbgrüne Farbe behalten. Wenn man es bei der Vergilbung mit einer reduzierenden Wirkung zu tun hat, so müßte man erwarten, daß das Weißwerden rasch nach der Vergilbung erfolgt. Das ist aber nicht der Fall. Die Reduktion des Farbstoffs wird gewöhnlich von einer absterbenden Erscheinung begleitet. Vergilbte Algen sind aber lebensfähig und ergrünen durch den bloßen Zusatz einer N-Verbindung.
2. Daß die vergilbten Algen noch leben, weist uns klar

darauf hin, daß die Vergilbung nie im Zusammenhange mit schädlichen Stoffen, wie z. B. freien Säuren und oxydierbaren Stoffen, steht.

Man kann der Vergilbung eine ökologische Bedeutung beilegen. Bei den Algen wird das entbehrliche Chlorophyll zerstört, und der daraus freigewordene Stickstoff wird verbraucht. Da die Vergilbung ziemlich parallel mit dem N-Mangel geht, so muß eine N-Zugabe, wenn auch geringfügig, für die Algen vorteilhaft sein.

Die Beziehung zwischen N-Mangel und Vergilbung ist sehr innig; doch kann der erstere nie die Hauptursache der Vergilbung sein, weil die Kulturen, bei denen es an Stickstoff mangelt, oft keine Vergilbung zeigen. Erst bei saprophytischer Lebensweise ist der N-Mangel auf die Vergilbung wirkungsfähig; doch kann der N-Mangel allein keine Vergilbung verursachen.

Reiche Ernährung mit Stickstoff hemmt die Vergilbung bei den Algen, die betreffs Kohlenstoffernährung deutlich saprophytisch sind.

Aus obigem geht also deutlich hervor, daß der Stickstoff nur als eine die Vergilbung hemmende Bedingung anzusehen ist (vergl. auch D. 3). Jedenfalls ist es sicher, daß der N-Mangel nie eine Hauptursache der Vergilbung ist.

Als dritte Bedingung der Vergilbung rechne ich den Einfluß der Lichtintensität auf die Algen. Wir haben schon hervorgehoben, daß die Vergilbung früher an der Lichtseite der Glukoseagarkulturen als an der Schattenseite auftritt. Unter starker Bestrahlung tritt ein grüner Farbenton mit einem Stich ins Gelbe sogar in Mineralsalzlösungskultur auf. Indessen findet die Vergilbungserscheinung weder in Mineralsalzlösung noch in 0.5% Gl-L statt. Erst in 1% Gl-L tritt diese Erscheinung ein.

Als vierte Bedingung der Vergilbung ist die Luft hervorzuheben.

Diese Bedingung ist besonders bei der Vergilbung von *Scenedesmus n.* zu nennen. Sie vergilbt früher bei Glukoseagarstrichkultur; bei Glukosestichkultur vergilbt sie aber erst im Laufe einiger Monate nach der Überimpfung.

Auch bei *Chlorella l.*, *Chlorophaera p.* und *Stichococcus v.* erscheint eine Abweichung der Vergilbungszeit zwischen Strich- und Stichkultur. Dabei existiert aber keine allgemein gültige Regel. So tritt die Vergilbung bei der Strichkultur bald früher, bald später als bei der Stichkultur auf. Bemerkenswert ist aber, daß die Vergilbung nicht bei Galaktose- und Maltoseagarstrichkultur auftritt, während dieselbe bei der betreffenden Stichkultur möglich ist.

Jedenfalls ist es sicher, daß die Algen früher oder später je nach der vorhandenen Sauerstoffmenge saprophytisch werden und vergilben.

Schließlich sei bemerkt, daß die optimale Temperatur die Vergilbung zu beschleunigen imstande ist. Die Wirkung dieser Bedingung ist aber sehr wahrscheinlich indirekt, d. i., die optimale Temperatur begünstigt die Algenentwicklung und befördert mittelbar die Vergilbung.

Fassen wir die Ursachen der Vergilbungserscheinung im Lichte zusammen, so gibt es deren fünf:

erstens, Saprophytismus

zweitens, N-Mangel

drittens, Lichtintensität

viertens, Sauerstoffmenge

fünftens, Temperaturverhältnis.

Unter diesen fünf Bedingungen möchte ich die beiden ersten, abgesehen von der Vergilbung bei Glukoseagarstrichkultur von *Scenedesmus n.*, wo die Luft bei Gegenwart reichlicher C-Quellen eine giftige Wirkung ausübt, und eine rasche Vergilbung und darauf folgendes Weißwerden hervorruft, hervorheben.

Bei *Chlamydomonas k.* konnte ich, soweit 1%-C-Verbindung und 2% Glukose in Betracht kommen, keine Vergilbung beobachten. Hierbei liegt also eine Spezifität der Alge vor.

Was nun den Einfluß der Dunkelheit auf die Vergilbung betrifft, so möchte ich hervorheben, daß die mehr oder weniger deutliche Chlorophyllbildung im Dunkeln sowohl bei M-Agar, als auch bei Gl-Agar zu Tage tritt. Bei M-Agar ist der Belag immer grün, bei Gl-Agar aber bisweilen sogar schon im Anfang seiner Entstehung gelbgrün. Im Dunkeln ist das Wachstum immer retardiert. Die Retardierung der Chlorophyllbildung sieht man aber nicht bei M-Agar, sondern nur bei Gl-Agar und Gl-L.

2. Weißwerden.

Diese Erscheinung ist eine Fortsetzung der Vergilbungserscheinung. Der Übergang von der einen Erscheinung in die andere ist nicht sicher festzustellen. Das entscheidende Erkennungsmerkmal ist aber, daß das Weißwerden eine Absterbeerscheinung ist, während die Vergilbung eine besondere Art der Lebenserscheinung ist.

Es fragt sich nun, ob saprophytisches Leben und N-Mangel allein eine Alge zum Weißwerden bringen können. Dies trifft bei *Euglena gracilis* (vergl. Zumstein l.c.) ohne Zweifel zu. Der Fall lag aber anders bei unseren Algen. Das Weißwerden bei unseren untersuchten Algen kam nur dann zustande, wenn in der Nährlösung freie Ameisensäure gebildet wurde. Die Konzentration der durch die Algen ausgeschiedenen Ameisensäure war der tödlichen Konzentration dieser Säure sehr ähnlich. Somit ist das Weißwerden unserer Algen auf die Giftwirkung der Ameisensäure zurückzuführen.

Was für einen Anteil bei der Verblassungserscheinung eine oxydierbare Substanz nimmt, bleibt noch zu untersuchen.

Die Ameisensäuremenge in der Form von Salzen ist größer bei 0.5% Gl-L, als bei 1%- und 2% Gl-L. Es ist noch nicht entschieden, warum die freie Säure nur von den beiden letzten Lösungen gebildet wird. Doch liegt es nahe, die Befreiung der Ameisensäure einer Wirkung einer anderen mit größerer Affinitätsgröße begabten Säure zuzuschreiben.

Das vielfach von früheren Autoren geschilderte Weißwerden der Algen ist daher, teils als eine ökologische Erscheinung (z. B. *Euglena gracilis* u. a.), teils aber als eine Desorganisationserscheinung zu betrachten.

Das Weißwerden tritt in Glukosenährlösung, welcher Stickstoff in Form von anorganischen Ammoniumverbindungen zugegeben ist, rasch auf. Nach Messung der Azidität halte ich es für berechtigt anzunehmen, daß dabei irgend eine anorganische Säure frei wird. Wenn das richtig ist, so sollte man glauben, daß diese freie Säure die Formiate angreift und freie Ameisensäure bildet. Da die anorganischen Säuren in der gefundenen Azidität keine Giftwirkung ausüben können, muß ich die Wirkung der anorganischen Säuren für indirekt und diejenige der Ameisensäure für direkt halten.

3. Vergleichende Betrachtungen über die Entfärbung der Chlorophyceen und anderer Pflanzenklassen.

Nachdem wir festgestellt haben, wie die Entfärbung unserer Chlorophyceen vor sich geht, wenden wir uns jetzt den Erörterungen über die Entfärbung bei den anderen Pflanzengruppen zu.

Nach den Angaben von Berthold, Oltmanns, Nadson, und Schindler wissen wir daß die Entfärbung bei Rhodophyceen und Cyanophyceen zum Teil auf der starken Lichtintensität beruht.

In neuerer Zeit haben Schindler und Boresch hervorge-

hoben, daß die Entfärbung der Cyanophyceen auch stark von dem N-Mangel abhängig ist.

Die Theorie der chromatischen Adaptation von Gaidukov ist heute nicht mehr stichhaltig.

Über die Beziehungen zwischen der Entfärbung der roten Algen und dem N-Gehalt der Nährmedien können wir keine nennenswerte Angabe finden. Meine eigenen Versuche über *Porphyra tenera*¹⁾ konnten aber dieses Verhalten feststellen. Dabei wurde das künstliche Meerwasser nach Herbst (1897) hergestellt. Als N-Quelle dienten mir nur Nitrate und Ammoniumverbindungen und zwar in verschiedenen Konzentrationen. Bei Zusatz von 0.01% NaNO₃ war die Farbstoffbildung der normalen ähnlich. Die ohne Zusatz etwaiger N-Verbindung erzielte Kontrollkultur zeigte aber gelbrote Farben. Zweite Versuche²⁾ wurden dann mit dem Meerwasser nach Noll (1892) ausgeführt. Dabei wurde die Nährlösung durch Zusatz von verschiedenen Stoffen zum natürlichen Meerwasser hergestellt. Ohne Zusatz von Nitrat war die Alge gelbbraun, bei Gegenwart dieses Stoffes war sie aber schwarzpurpur.

Über den Einfluß reicher organischer Ernährung auf die Entfärbung der Rhodophyceen und Cyanophyceen haben wir noch keine sicheren Anhaltspunkte.

Das Farbloswerden der Diatomeen, das zuerst von Miquel (1892) in Zuckermedien beobachtet wurde, wurde durch die späteren Versuche von O. Richter ('06) mit der Reinkultur nicht bestätigt.

Zum Schluß sollen die farblosen saprophytischen und parasitischen Phanerogamen einer Betrachtung unterworfen werden.

1) H. Nakano und M. Higashi. Versuche über die Ernährung von *Porphyra tenera*. Mitteilungen der Kaiserlichen Versuchsanstalt für Fischerei zu Tokyo. Bd. IX. Nr. 4. 1913. (Japanisch).

2) Ditto, Bd. 12, Nr. 5. 1916.

Seit langer Zeit herrschte die Vermutung, daß die Verblässung dieser Pflanzen auf einer heterotrophen Lebensweise beruht, doch fehlte es noch an experimentellen Untersuchungen.

Meine eigenen Untersuchungen weisen deutlich darauf hin, daß eine Chlorophylllosigkeit von einer heterotrophen Lebensweise abgeleitet werden kann.

Unsere Algen sind mit schönem Chlorophyll und damit mit autotropher Ernährung versehen. Sie bedürfen jedoch für ihr Gedeihen immer einer mehr oder weniger reichlichen organischen Ernährung. Daher ist man wohl berechtigt, sie als „Halbsaprophyten“ zu bezeichnen. Nach E. Pringsheim (1913 a, b, l.c.) ist dies auch der Fall bei *Euglena gracilis* und bei Cyanophyceen. Es ist sehr beachtenswert, daß die beiden letztgenannten Algen auch mit autotropher Lebensweise begabt sind.

Obligate Saprophyten, wie Pilze, Bakterien und saprophytische Phanerogamen (*Monotropa* u. a.), besitzen das Chlorophyll nicht mehr. Es wäre aber möglich, daß diese obligaten Saprophyten von Halbsaprophyten abstammen. Die Untersuchungen von Heinricher (1899) über die Halbschmarotzer geben dafür einen schönen Anhaltspunkt. Nach diesem Autor bildet *Tozzia* ein verknüpfendes Bindeglied zur ganz parasitischen *Lathrea*. *Tozzia* lebt als farbloser Organismus mehrere Jahre hindurch unterirdisch; ihre oberirdischen Triebe sind aber grün. *Lathrea* ist dagegen unter keinen Umständen mehr mit einem Chlorophyll versehen. Für die obige Vermutung spricht auch *Cuscuta* deutlich, weil diese nur noch ein geringfügiges Chlorophyll besitzt.

Jedenfalls liegt die Vermutung nahe, daß die farblosen Schmarotzer von grünen Vorfahren abstammen.

X. Zusammenfassung der Hauptresultate.

1. Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Reinkulturen von drei neuen physiologischen Rassen und zwei neuen morphologischen Arten der Chlorophyceen ausgeführt. Nach den morphologischen und physiologischen Merkmalen möchte ich die folgenden Namen vorschlagen:

Chlorella vulgaris Beij. var. *lutescens*, var. nov.

Stichococcus bacillaris Näg. var. *viridis*, var. nov.

Scenedesmus obliquus Kütz. var. *non-liquefaciens*, var. nov.

Chlorosphaera putrida, sp. nov.

Chlamydomonas koishikavensis, sp. nov.

Bei der Benennung der Algen lasse ich als Varietät eine durch Kulturmerkmale unterscheidbare Rasse und als Spezies eine durch morphologische Merkmale charakterisierbare Alge gelten.

2. Die winterliche Wachstumsverlangsamung unserer Algen hing völlig von der niedrigen Temperatur, nicht aber von dem eigentlichen Ruhen ab. Es gelang mir auch eine durch eine Nährbedingung verursachte Ruhe zu finden. Es scheint mir daher, daß die Ruhe der Algen durch verschiedene Bedingungen hervorgerufen zu werden vermag. Dieses Resultat schließt sich an dasjenige von Klebs betreffs der Ruhe der Bäume.

3. Die früheren Angaben über die Zoosporen- und Gametenbildung begründeten sich vorwiegend auf unreine, oder nur spezies-reine Kulturen. Meine eigenen diesbezüglichen Untersuchungen wurden nicht weit ausgedehnt. Die gewonnenen Resultate stimmten im großen und ganzen mit denen von Klebs überein.

4. Je nach der Zusammensetzung der Nährlösung wird bald die eine, bald die andere Reaktion einer Nährlösung von den Algen bevorzugt. Es ist daher schwer, ein konstant bevorzugt bleibende

Reaktion bei irgend einer Alge zu bestimmen. Immerhin konnte ich bei *Chlamydomonas koishikavensis* die Bevorzugung einer sauren Reaktion mit KH_2PO_4 feststellen.

5. Bekannt ist die anaerobe Entwicklung von *Scenedesmus* n. bei Gl-Agar. Nach eigenen Untersuchungen ist unsere Varietät dabei fakultativ anaerob. Da aber die Entwicklung der Alge ebensogut im sauerstofffreien Medium wie in der Luft retardiert, so scheint es mir berechtigt, sie bei Gl-Agar als eine Mikroaerophilie zu bezeichnen.

6. Der Nährwert des Peptons bei *Chlorella vulgaris* var. *lutescens* ist je nach den Nährmedien variabel. So ist dieser Stoff in Artarischer Nährlösung eine schlechte N-Quelle, während er in Detmers Nährlösung, besonders bei längerer Kultur, eine bevorzugte N-Quelle ist.

7. Unsere Algen lassen sich je nach den verschiedenen Grenzkonzentrationen der Glukose in drei Gruppen einteilen.

Polytrophophil, z. B. *Chlorella vulgaris* Beij. var. *lutescens*,
var. nov.

Stichococcus bacillaris Näg. var.
viridis, var. nov.

Mesotrophophil, z. B. *Chlorosphaera putrida*, sp. nov.
Chlamydomonas koishikavensis, sp. nov.

Oligotrophophil, z. B. *Scenedesmus obliquus* Kütz. var. *non-liquefaciens*, var. nov.

8. Es ist a priori wünschenswert, die Leitalgen für die Wasserbeurteilung experimentell zu bestimmen. Auf Grund der bevorzugten N-Verbindungen habe ich unsere Algen als Leitorganismen für die Wasserbeurteilung klassifiziert. Die Resultate waren ähnlich wie die von Kolkwitz, mit einigen geringen Abweichungen. Nach meinen eigenen Untersuchungen sind:

β -mesosaprob, *Chlorella vulgaris* Beij. var. *lutescens*, var. nov.
Stichococcus bacillaris Näg. var. *viridis*, var.
nov.

Scenedesmus obliquus Kütz. var. *non-liquefaciens*, var. nov.

Chlorosphaera putrida, sp. nov.

α -mesosaprob, *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov.

9. Aus dem Erdboden des Botanischen Gartens in Koishikawa wurde eine Art von *Azotobacter* isoliert. Nach stattgefundenen Untersuchungen wurde es aber mit *Azotobacter chroococcum* var. A₁ Jones identifiziert. Im Anschluß zum Resultat von Jones konnte ich auch die Gegenwart von Nitrat in den Bakterienzellen desselben nachweisen.

10. Alle unsere Algen sind imstande sich auf Kosten der durch Autolyse von *Azotobacter* frei werdenden Stickstoffverbindungen zu entwickeln. Das mit Algen gemischt kultivierte *Azotobacter* bindet eine größere Stickstoffmenge als das reine *Azotobacter*.

Es existiert daher ohne Zweifel zwischen den beiden Organismen eine symbiotische Beziehung. Das muß auch im Freien der Fall sein.

Ob aber das von Algen beherbergte *Azotobacter* den ganzen N-Bedarf der Algen decken kann, lasse ich dahingestellt. Nach meiner Meinung muß in dieser Beziehung die Wirkung von *Azotobacter* der Wirkung der im Meerwasser gelöst vorhandenen N-Verbindungen nachstehen.

Immerhin ist es a priori wahrscheinlich, daß *Azotobacter*, wie Reinke betont, einen großen Vorrat von Stickstoff im Haushalt der Natur darstellt.

11. Die Vergilbungserscheinung kommt durch die starke Verminderung des Chlorophylls und durch das Zurückbleiben des

gelben Farbstoffes zustande. Die vergilbten Zellen sind mit reichlichem Fett oder mit Amylodextrinkörnern oder mit beiden versehen.

12. Die Vergilbungserscheinungen im Lichte werden durch die folgenden Faktoren beschleunigt.

- a. Reichliche Ernährung mit assimilierbaren Kohlenstoff-Quellen.
- b. N-Mangel.
- c. Starke Lichtintensität und rote Strahlen.
- d. Optimale Temperatur.
- e. Bald Anwesenheit, bald Abwesenheit der Luft.

13. Als Bedingungen für das Wiederergrünen der vergilbten Algen sind die folgenden Faktoren hervorzuheben.

- a. Neuer Zusatz von N-Verbindungen; Nitrat, anorganische Ammoniumsalze, Harnstoff und Glykokoll sind besonders geeignet, höhere Aminosäuren und Pepton sind ungeeignet.
- b. Mäßige Lichtintensität und blaue Strahlen begünstigen das Ergrünen. Auch im Dunkeln ergrünen die vergilbten Algen.
- c. Optimale Temperatur beschleunigt das Ergrünen.
- d. Fast völlig O_2 -freies Medium ist für das Ergrünen ungeeignet. Erst bei 50 mm Luftdruck konnte ich langsames Ergrünen wahrnehmen.

14. Als die Hauptursache der Vergilbungserscheinung im Licht ist der Saprophytismus hervorzuheben. Es wäre verkehrt, dem N-Mangel die Hauptrolle der Vergilbung zuzuschreiben, obgleich er ohne Zweifel bei der Vergilbung eine große Rolle spielt.

Als Ursachen zweiten Ranges sind die Einflüsse von Licht, Luft und Temperatur anzusehen.

Bei der Vergilbung und bei dem Weißwerden von *Scenedesmus n.* bei der Glukoseagarstrichkultur spielt die Wirkung der Luft eine große Rolle. In anderen Fällen gehört aber der Einfluß der Luft zu den Nebenursachen.

15. Das Weißwerden bei Glukosenährmedien ist eine Folge der Bildung freier Ameisensäure. Das entscheidende Erkennungsmerkmal zwischen „Weißwerden“ und „Vergilbung“ ist, daß die erstere eine Absterbeerscheinung und die letztere noch eine Lebenserscheinung ist.

Ameisensäure in der Form von Formiaten kommt sowohl in 0.5%-Gl-L, als auch in 1%- und 2% Gl-L vor. Jedoch wird sie nur in den beiden letzteren Lösungen befreit. Diese Befreiung ist höchstwahrscheinlich auf eine als Gärprodukt entstehende Säure zurückzuführen, die eine größere Affinitätsgröße als Ameisensäure besitzt.

Wenn die N-Quelle in Form von anorganischen Ammoniumsalzen zugesetzt wird, so geht das Braun- oder Weißwerden früher vor sich. Nach Bestimmung der Azidität wurde festgestellt, daß dabei eine anorganische freie Säure entsteht. Da aber die anorganische Säure in der gefundenen Azidität keine Giftwirkung auf die Algen ausübt, so kann man mit Recht annehmen, daß die Ameisensäure durch die Affinität der anorganischen Säure aus den Formiaten befreit wurde, weil sonst die Giftwirkung der Ameisensäure sehr bedeutend ist.

16. Jede 10 cm³ der Nährlösung, in der die Algen weiß wurden, zeigten eine Azidität von 0.3 cm³ $\frac{N}{10}$ NaOH. Nach den Untersuchungen der Giftwirkung der verschiedenen Säuren wurde festgestellt, daß die Ameisensäure unter den untersuchten Säuren am giftigsten ist. So war $\frac{N}{333}$ Lösung der Ameisensäure (0.3 cm³ $\frac{N}{10}$ Ameisensäure in 10 cm³ Säurelösung) ausreichend eine am meisten

widerstandsfähige Alge abzutöten. Die schwächeren Algen gehen schon bei geringeren Konzentrationen dieser Säure zu Grunde. Danach ist die experimentell bestimmte giftige Konzentration der Ameisensäure ähnlich wie oder kleiner als diejenige der bei der vergilbten Kultur gefundenen freien Ameisensäure, womit die Ursache des Weißwerdens festgestellt wurde.

Daß die ganze in der Nährlösung gebildete freie Säure aus Ameisensäure besteht, wird zunächst auf chemischem Wege erkannt, weil die isolierte Ameisensäuremenge der Menge der freien Säure beinahe gleich ist. Für die Richtigkeit dieser Vermutung spricht auch, daß die experimentell konstatierte schädliche Konzentration der Ameisensäure der Azidität der in der Nährlösung gefundenen freien Säure sehr nahe kommt.

17. Die Giftwirkungen der anorganischen und organischen freien Säuren wurden mit ihren Normallösungen untersucht. Als Resultat ergab sich, daß die Giftwirkung durch die undissoziierten Moleküle der Säuren bewirkt wird.

18. Der Vergilbungserscheinung muß man eine ökologische Bedeutung beimessen. Bei reicher Ernährung mit C-Quellen hört die entbehrliche Chlorophyllbildung der Algen auf, und der infolge der Zerstörung des Chlorophylls frei gewordene Stickstoff kann zu irgend einer anderen Funktion dienen.

Die Erscheinung des „Weißwerdens“ in unseren Algen ist eine chemische Desorganisationerscheinung. Das vielfach von früheren Autoren berichtete Weißwerden der Algen ist ohne Zweifel teils hierauf, teils aber auf eine ökologischen Lebenserscheinung zurückzuführen. Das Farbloswerden von *Euglena gracilis* im Lichte ist zweifellos mit dieser ökologischen Lebenserscheinung zu erklären. Wir sehen also, daß das Weißwerden der Algen oft als eine der Vergilbungserscheinung bei unseren Algen entsprechende Erscheinung

auftreten kann. Bei den heterotrophen Phanerogamen können wir auch diese beiden Entfärbungsvorgänge finden. So ist *Monotropa* völlig weiß, während *Cuscuta* gelb oder gelbgrün und noch mit dem Chlorophyll versehen ist. Daraus kann man schließen, daß sich die Pflanzen je nach den verschiedenen Graden des Farbstoffgehaltes einer heterotrophen Lebensweise anpassen können.

Botanisches Institut d. Kaiserlichen Universität, Tokyo.

März, 1916.

XI. Literaturverzeichnis.

- '09 Andreesen, A. Beiträge zur Kenntnis der Physiologie der Desmidiaceen. Flora, S. 373.
- '01 Artari, A. Zur Ernährungsphysiologie der grünen Algen. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. XIX, S. 7.
- '02 a Artari, A. Zur Frage der physiologischen Rassen einiger grüner Algen. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. XX, S. 172.
- '02 b Artari, A. Über die Bildung des Chlorophylls durch grüne Algen. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. XX, S. 201.
- '04 Artari, A. Der Einfluß der Konzentration der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen I. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 40, S. 593.
- '06 Artari, A. Der Einfluß der Konzentration der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen II. Ebenda, Bd. 43, S. 177.
- '09 Artari, A. Der Einfluß der Konzentration der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen III. Ebenda, Bd. 46, S. 443.
- '13 Artari, A. Zur Physiologie der Chlamydomonaden. (*Chlamydomonas Ehrenbergii*) I. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 52, S. 410.
- '14 Artari, A. Zur Physiologie der Chlamydomonaden. (*Chlamydomonas Ehrenbergii*) II. Ebenda, Bd. 53, S. 527.
- '13 Asaina, Y. Über die Oxydation und Reduktion der Chlorophyllderivate. Journal of the Tokyo Chemical Society, Vol. 34, No. 2. (Japanisch)
- '06 Aso, K. Injurious action of acetates and formates on plants. The Bulletin of the Coll. of Agriculture, Tokyo, Vol. 7, p. 13.
- '90 Beijerinck, M. W. Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenogonidien und anderen niederen Algen. Bot. Zg., Bd. 48, S. 705, 742, 758, 781.
- '93 Beijerinck, M. W. Berichte über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine. Zbl. f. B. u. P., Abt. I, Bd. XIII, S. 368.
- '98 Beijerinck, M. W. Notiz über *Pleurococcus vulgaris*. Zbl. f. B. und P., Abt. II, Bd. IV, S. 785.
- '00 Beijerinck, M. W. Les Organismes anaérobies obligatoires ont-ils besoin d'oxygène libre? Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. VI, S. 341.

- '01 Beijerinck, M. W. Über die oligonitrophile Mikroben. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 7, S. 561.
- '02 Beijerinck und Delden. Über die Assimilation des freien Stickstoffes durch Bakterien. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. IX, S. 3.
- '98 Benecke, W. Über Kulturbedingungen einiger Algen. Bot. Zg., Bd. 56, S. 83.
- '03 Benecke und Keutner. Über stickstoffbindende Bakterien aus dem Ostsee. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. XXI, S. 333.
- '07 Benecke. Über stickstoffbindende Bakterien aus dem Golf von Neapel. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 25, S. 1.
- '82 Bergmann, E. Untersuchungen über das Vorkommen der Ameisensäure und Essigsäure in den Pflanzen und über die physiologische Bedeutung desselben im Stoffwechsel. Bot. Zg., Bd. 40, S. 731.
- '82 Berthold, G. Verteilung der Algen im Golf von Neapel. Mitt. d. zool. Station (zitiert nach Oltmanns (1905)).
- '97 Bokorny, Th. Über die organische Ernährung grüner Pflanzen und ihre Bedeutung in der Natur. Biol. Zbl., Bd. 17, S. 1, 33.
- '11 Bokorny, Th. Ernährung von grünen Pflanzen mit Formaldehyd und formaldehydabspaltenden Substanzen. Biochem. Ztschr., XXXVI, S. 83.
- '13 Boresch, K. Die Färbung von Cyanophyceen und Chlorophyceen in ihrer Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt des Substrates. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 52, S. 145.
- '82 Borodin, J. Über Chlorophyllkristalle. Bot. Zg., Bd. 40, S. 608.
- '97 Bouilhac, R. Sur la fixation de l'azote atmosphérique par l'association des algues et les bacteries. Compt. rend. de l'Ac. des Sc., Paris, t. 123, p. 818.
- '13 Brand, F. Berichtungen bezüglich der Algengruppen *Stichococcus Nägeli* und *Hormidium Kütz.* Ber. d. d. bot. Ges., S. 64.
- '99 Brandt, K. Über den Stoffwechsel im Meere. I. Wiss. Meeresuntersuch. Kiel.
- '02 Brandt, K. Über den Stoffwechsel im Meere. II. Wiss. Meeresuntersuch. Kiel.

- '04 Brandt, K. Über die Bedeutung der Stickstoffverbindungen für die Produktion im Meere. Beih. z. bot. Zbl., Bd. XVI, S. 383.
- '08 Bredemann. Regeneration der Fähigkeit zur Assimilation vom freien Stickstoff des *Bacillus amylobacter* &c. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 26, S. 362.
- '94 Bruns, E. Über die Inhaltskörper der Meeresalgen. Flora, Bd. 79, S. 159.
- '13 Brunthaler, J. Systematische Übersicht über die Chlorophyceen-Gattung *Scenedesmus* Mey. Hedwigia, Bd. 53, S. 164.
- '00 Burton und Livingston. On the nature of the stimulus, which causes the change of form in polymorphic green algae. Bot. Gaz., Vol. 30, p. 289.
- '93 Chodat et Malinresco. Sur le polymorphisme du *Scenedesmus acutus* Meyen. Bull. herb. Boiss., Bd. 1, p. 184.
- '97 Chodat et Goldflus. Note sur la culture des cyanophycées et sur le développement d'oscillatoriées coccogènes. Bull. herb. Boiss. Bd. V. p. 953.
- '98 Chodat, R. Études de biologie lacustre. Ebenda., p. 289.
- '00 Chodat et Grintzesco. Sur les Methodes de culture pure des algues vertes.
- '02 Chodat, R. Algues vertes de la Suisse.
- '09 Chodat, R. Étude critique et expérimentale sur le polymorphisme des algues.
- '13 Chodat, R. Monographie d'algues en culture pure.
- '99 Clark, J. F. On the toxic effect of deleterious agents on the germination and development of certain filamentous fungi. Bot. Gaz., Vol. 28, p. 289, 378.
- '75 Coln, F. Über den Brunnenfaden (*Crenothrix polyspora*) mit Bemerkungen über die mikroskopische Analyse des Brunnenwassers. Cohns Beiträge zur Biol. d. Pflanzen, Bd. 1, S. 109, 110.
- '92 Correns, C. Über die Abhängigkeit der Reizerscheinungen höherer Pflanzen von den Gegenwart freien Sauerstoffs. Flora, Bd. 50, S. 87.
- '89 De Toni. Sylloge algarum, I.
- '96 Dill, O. Die Gattung *Chlamydomonas* und ihre nächsten Verwandten. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 28, S. 323.
- '03 Ernst, A. Siphonienstudien I. *Dichotomosiphon tuberosus* Ernst. Beih. z. bot. Zbl. Bd. XIII, S. 115.
- '04 a. Ernst, A. Siphonienstudien II. Beiträge zur Kenntnis der Codiaceen. Ebenda, Bd. XIV, S. 199.

- '04 b Ernst, A. Zur Kenntnis des Zellinhalts von *Derbesia*. Flora, Bd. 93, S. 514.
- '89 Frank, A. B. Über den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffes durch erdbewohnende Algen. Ber. d. d. bot. Ges. S. 34.
- '04 Frank, Th. Kultur und chemische Reizerscheinungen der *Chlamydomonas tingens*. Bot. Zg. Bd. 62, S. 153.
- '03 Freudenreich, Ed. Über stickstoffbindende Bakterien. Zbl. f. B. u. P. Abt. II, Bd. X, S. 514.
- '03 Gaidukov, N. Weitere Untersuchungen über den Einfluß farbigen Lichtes auf die Färbung der Oscillarien. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 21, S. 484.
- '04 Gaidukov, N. Zur Farbenanalyse der Algen. Ebenda, Bd. 22, S. 23.
- '10 Gebbing, J. Über den Gehalt des Meeres an Stickstoffnährsalzen. Intern. Revue d. gesamt. Hydrob. u. Hydrog., Bd. III, S. 50.
- '02 a Gerlach und Vogel. Stickstoffsammelnde Bakterien. I. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 8, S. 669.
- '02 b Gerlach und Vogel. Stickstoffsammelnde Bakterien. II. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 9, S. 817, 881.
- '03 Gerlach und Vogel. Stickstoffsammelnde Bakterien. III. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 10, S. 633.
- '90, '91 Goroschankin. Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Systematik der Chlamydomonaden.
- '02 Gran, H. Studien über Meeresbakterien II; über die Hydrolyse des Agar-Agars durch eine neue Enzym, die Gelose. Bergens Museums Aarbog.
- '02 Grintzesco, J. Recherches experimentales sur la *Scenedesmus acutus* Meyen. Bull. herb. Boiss. Bd. 2, p. 219.
- '03 Grintzesco, J. Recherches experimentales sur la morphologie et physiologie de *Chlorella vulgaris*. Rev. gén. d. bot., Bd. XV, p. 1.
- '10 Hans und E. Pringsheim. Über die Verwendung von Agar-Agar als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffes. Zbl. f. B. u. P. Abt. II, Bd. 26, S. 227.
- '85 Hansgirg, A. Über den Polymorphismus der Algen. Bot. Zbl. Bd. 22, S. 246, 277, 308, 343, 373, 385.
- '86-88 Hansgirg, A. Prodromus der Algenflora von Böhmen.

- '96 Heald, F. D. On the toxic effect of dilute solutions of acids and salts upon plants. Bot. Gaz., Vol. 22, p. 125.
- '97 Heinricher, E. Die grünen Halbschmarotzer. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 31, 32, 36, 37, 46, 47.
- '99 Heinricher, E. Zur Entwicklungsgeschichte einiger grüner Halbschmarotzer. Ber. d. d. bot. Ges., S. (244).
- '06 Heinze, B. Einige Beiträge zur mikrobiologischen Bodenkunde. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 16, S. 640, 703.
- '97 Herbst, E. Über die zur Entwicklung der Seeigellarven notwendigen anorganischen Stoffe. Archiv. f. Entwicklungsmechanik, Bd. V.
- '13 Iwanowski, D. Über das Verhalten des lebenden Chlorophylls zum Lichte. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 31, S. 600.
- '10 Jacobsen, H. Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen. Zeitsch. f. Bot., Bd. II, S. 145.
- '14 Jollos, V. Variabilität und Vererbung bei Mikroorganismen. Zeitsch. f. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre, Bd. 12, S. 14–35.
- '13 Jones, H. A morphological and cultural study of some *Azotobacter*. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 38, S. 14.
- '96 Kahlenberg and True. On the toxic action of dissolved salts and their electrolytic dissociation. Bot. Gaz., Vol. 22, p. 81.
- '05 Keutner. Über das Vorkommen und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien im Meere. Wiss. Meeresuntersuchung, Kiel, Bd. 8, S. 30. Anhang: Das Vorkommen der stickstoffbindenden Bakterien an Süßwasserpflanzen. Ebenda, S. 46.
- '83 Klebs, G. Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Unters. a. d. bot. Institut. z. Tübingen, S. 333.
- '96 Klebs, G. Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen.
- '15 Klebs, G. Über Wachstum und Ruhe tropischer Baumarten. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 56 (Pfeffer-Festschrift), S. 734–792.
- '95 Klemm, Paul. Desorganisationerscheinungen der Zellen. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 28, S. 627.
- '00 Kolkwitz, R. Beiträge zur Biologie der Florideen. Wiss. Meeresunters. Helgoland (zitiert nach Oltmanns (1905)).

- '02 Kolkwitz und Marsson. Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora u. Fauna. Mitt. d. königl. Prüfungsanstalt f. Wasserversorgung u. Abwässerbeseitigung Heft I, S. 33.
- '08 Kolkwitz u. Marsson. Ökologie der pflanzlichen Saprobien. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. XXVIa, S. 505.
- '11 Kolkwitz. Über das Kammerplankton des Süßwassers und der Meere. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 29, S. 386.
- '94 Kossowitsch, P. Untersuchungen über die Frage, ob die Algen freien Stickstoff fixieren. Bot. Zg. Bd. 52, S. 97.
- '69-70 Kraus, G. Einige Beobachtungen über den Einfluß des Lichtes und der Wärme auf die Stärkerzeugung im Chlorophyll. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. VII, S. 511.
- '94 Krüger, W. Beiträge zur Kenntnis der Organismen des Saftflusses der Laubbäume. Zitiert nach Richter, „Ernährung der Algen.“
- '00 Krüger, W. und Schneidewind. Sind niedere chlorophyllgrüne Algen in der Lage, den freien Stickstoff zu assimilieren? Landwirtschaftliche Jahrb. Bd. 29, S. 771.
- '91 Kuch, K. Über den Einfluß von Aldehydlösungen auf die Lebensthätigkeit der Pflanzen. Inaugural-Dissertation.
- '13 Kufferath, H. Contribution à la physiologie d'une protococcacée nouvelle, *Chlorella luteo-viridis* Chodat, nov. sp. var. *lutescens* Chodat, nov. var. Recueil d'l'institut bot. Léo. Errera. t. IX, p. 113.
- '08 Küster, E. I. Eine kultivierbare Peridinee. Archiv f. Protistenkunde. Bd. 11, S. 351.
- '09 Küster, E. I. Über chemische Beeinflussung der Organismen durch einander.
- '13 a Küster, E. I. Über Zonenbildung in kolloidalen Medien (Beiträge zur entwicklungsmechanischen Anatomie der Pflanzen).
- '13 b Küster, E. I. Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen.
- '33 Kützing, F. J. Species algarum.
- '12 Kylin, H. Über die Farbe der Florideen und Cyanophyceen. Svensk Bot. Tid. Bd. VI, S. 531.
- '13 Liebalddt, E. Über die Wirkung wässriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner. Zeitsch. f. Bot. Bd. 5, S. 65.

- '93 Loew, O. Ein natürliches System der Giftwirkungen.
- '05 Löhnis. Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffbakterien. Zbl. f. B. u. P. Abl. II. Bd. 14, S. 582, 713.
- '12 Magnus und Schindler. Über den Einfluß der Nährsalze auf die Färbung der Oscillarien. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 30, S. 314.
- '02 Matruchot et Molliard. Variations de structure d'une algue verte *Stichococcus bacillaris* Näg. sous l'influence du milieu. Rev. générale de bot. p. 113.
- '11 Meinhold, Th. Beiträge zur Physiologie der Diatomeen. Cohns Beiträge zur Biol. d. Pfl., Bd. X, S. 353.
- '98 Mez. Mikroskopische Wasseranalyse.
- '89 Migula, W. Über den Einfluß stark verdünnter Säurelösungen auf Algenzellen. Abs. in „Bot. Zbl.“, Bd. 41, S. 207, 1890.
- '07 Migula, W. Kryptogamen-Flora II, 1 in Thomés „Flora von Deutschland.“
- '92 Miquel, P. De la culture artificielle des diatomées. Le Diatomiste, Bd. I. Zitiert nach Richter (1911).
- '95 Molisch, H. Die Ernährung der Algen.
I. Sitzber. d. kais. Akad. d. W. in Wien. Mat. naturw. Kl. Bd. 104, Abt. I, S. 783.
- '96 a Molisch, H. Die Ernährung der Algen. II. Ebenda, Bd. 105, S. 633.
- '96 b Molisch, H. Nachweis der gelben Farbstoffe (so-genannte „Kalimethode“). Ber. d. d. bot. Ges., S. 18.
- '12 Munk, M. Bedingungen der Hexenringbildung der Schimmelpilzen. Zbl. f. B. u. P. Abt. II; Bd. XXXII, S. 353.
- '01 Nadson, G. Die perforierenden (kalkbohrende) Algen und ihre Bedeutung in der Natur. Scripta bot. hort. Univ. Imp. Petrop., Bd. 17. Zitiert nach Schindler (1913).
- '08 Nadson, G. Über den Einfluß der Lichtstärke auf die Färbung der Algen. Versuche mit *Phormidium laminosum* und *Oscillaria amphibia*. Bull. du Jard. imp. bot. St. Pétersbourg. Zitiert nach Schindler (1913).
- '49 Nägeli, C. Gattungen einzelliger Algen. Zitiert nach Chodat (1913).
- '78 Nebelung. Spektroskopische Untersuchungen der Farbstoffe einiger Süßwasseralgen. Bot. Zg., Bd. 36, S. 369, 385, 401, 417.

- '92 Noll. Über die Kultur von Meeresalgen in Aquarien. *Flora*, Bd. 50, S. 281.
- '93 Ogata, M. Über die Reinkultur gewisser Protozoen (Infusorien). *Zbl. f. B. u. P.*, Abt I, Bd. 14, S. 165.
- '92 Oltmanns, Fr. Über die Kultur- und Lebensbedingungen der Meeresalgen. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 23, S. 349.
- '95 Oltmanns, Fr. Notizen über die Kultur- und Lebensbedingungen der Meeresalgen. *Flora*, Bd. 80, S. 38.
- '05 Oltmanns, Fr. Morphologie und Biologie der Algen. I-II Bd.
- '13 Omelianski, W. L. und Sieber, N. O. Zur Frage nach der chemischen Zusammensetzung der Bakterienkörper des *Azotobacter chroococcum*. *Hoppe-Seyler's Zeitsch. f. physiolog. Chemie*, Bd. 88, S. 445.
- '00 Ono, N. Über die Wachstumsbedingungen einiger Algen und Pilzen durch chemische Reize. *Journ. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo*, Vol. 13, part, 1, p. 141.
- '10 Orsós, Fr. Die Form der tiefliegenden Bakterien- und Hefekolonien. *Zbl. f. B. u. P.*, Abt I, Bd. 54, S. 289.
- '89 Ostwald, W. Über die Affinitätsgrößen organischer Säuren und ihre Beziehungen zur Zusammensetzung und Konstitution derselben. *Zeitsch. f. physik. Chemie*, Bd. III.
- '04 Palladin, W. Über normale und intramolekulare Atmung der einzelligen Alge *Chlorothecium saccharophilum*. *Zbl. f. B. und P.*, Abt II, Bd. XI, 146.
- '12 Petersen, J. B. On tufts of bristles in *Pediastrum* und *Scenedesmus*. *Bot. Tidsskrift*, Bd. 31, S. 161.
- '04 Petraschewsky. Über Atmungskoeffizienten der einzelligen Alge *Chlorothecium saccharophilum*. *Ber. d. d. bot. Ges.*, Bd. XXII, S. 323.
- '14 Plümecke, O. Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Volvocaceen, *Gonium pectorale* als Wasserblüthe. *Ber. d. d. bot. Ges.*, Bd. 32, S. 131.
- '79 Pringsheim, N. Über Lichtwirkung und Chlorophyllfunktion in der Pflanze. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 12, S. 288.
- '12 Pringsheim, E. Kulturversuche mit Chlorophyllführenden Mikroorganismen, I. Die Kultur von Algen in Agar. *Cohns Beiträge z. Biol. d. Pflanzen*, Bd. 11, S. 249-304.

- '13 a. Pringsheim, E. Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen, II. Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. Ebenda, Bd. 12, S. 1–48.
- '13 b Pringsheim, E. Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen, III. Zur Physiologie der Schizophyceen. Ebenda, S. 99–107.
- '11 Pütter, A. Vergleichende Physiologie.
- '68 Rabenhorst, L. Flora Europaea algarum 1–III.
- '00 Radais. Formation de chlorophyll à l'obscurité. Comp. rend. d'acad. de Sci. de Paris, Bd. 130, Nr. 12, S. 793.
- '85 Reinke, J. Die Zerstörung von Chlorophylllösungen durch das Licht und eine neue Methode zur Erzeugung des Normalspektrums. Bot. Zg., Bd. 43, S. 64.
- '86 Reinke, J. Photometrische Untersuchungen über die Absorption des Lichtes in den Assimilationsorganen. Bot. Zg., Bd. 44, S. 161, 193, 209, 241.
- '03 a Reinke, J. Die zur Ernährung der Meeresorganismen disponiblen Quellen an Stickstoff. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 21. S. 371.
- '03 b Reinke, J. Symbiose von *Volvox* und *Azotobacter*. Ebenda, Bd. 21, S. 481.
- '80 Richter, P. Über den Wechsel der Farbe bei einigen Süßwasseralgen, insb. dem Oscillarien. Bot. Zbl., 2, S. 605.
- '03 Richter, O. Reinkultur von Diatomeen. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 21, S. 493.
- '06 Richter, O. Zur Physiologie der Diatomeen. I. Sitzber. d. kais. Akad. d. W. in Wien, math. naturw. Kl., Bd. 115, Abt. I, S. 27.
- '09 a Richter, O. Zur Physiologie der Diatomeen. II. Denkschrift d. math. naturw. Kl. d. kais. Akad. d. W. in Wien, Bd. 84, S. 666. Zitiert nach „Ernährung der Algen“ desselben Autors.
- '09 b Richter, O. Zur Physiologie der Diatomeen. III. Sitzber. d. kais. Akad. d. W. in Wien, Bd. 118, Abt. I, S. 1337.
- '11 Richter, O. Ernährung der Algen.
- '64 Sachs, J. Wirkungen farbigen Lichtes auf Pflanzen. Bot. Zg., Bd. 22, S. 353.
- '13 Schindler, B. Über den Farbenwechsel der Oscillarien. Zeitschrift f. Bot. S. 497.
- '99 Senn, G. Über einige koloniebildende einzellige Algen. Bot. Zg., Bd. 57, S. 39.
- '97 Strasburger. Botanisches Practicum, S. 405. Das von Alfred Fischer

- etwas modifiziertes Verfahren Löfflers für Ziliennachweis bei Bakterien.
- '00 Tammes, T. Über die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche. Flora, Bd. 87, S. 205.
- '12 Ternetz, Charlotte. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis*. Jahrb. f. wiss. Bot. S. 455.
- '97 Tischutkin, A. Über Agar-Agar-Kulturen einiger Algen und Amöben. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 3, S. 183.
- '05 Treboux, O. Organische Säuren als Kohlenstoffquelle bei Algen. Ber. d. d. bot. Ges., Bd. 23, S. 432.
- '06 Vogel, J. Die Assimilation des freien, elementaren Stickstoffs durch Mikroorganismen. Zbl. f. B. u. P., Abt. II, Bd. 15, S. 33, 174, 215.
- '14 Wager, Harold. The action of light on Chlorophyll. Proceedings on the Roy. Soc. of London, Series B, Vol. 87, p. 386-407.
- '68 Walz, J. Beiträge zur Kenntnis der Zoosporenbildung bei den Algen. Bot. Zg., Bd. 26, S. 497.
- '99 Ward, M. Some methods for use in the culture of algae. Ann. of Bot., Bd. XIII, p. 563.
- '97 Wille, N. Die Chlorophyceen. Die natür. Pflanzenfamilien, I Teil, Abt. II.
- '11 Wille, N. Die Chlorophyceen. Nachträge zu „Die natür. Pflanzenfamil.“
- '06 Willstätter, R. Zur Kenntnis der Zusammensetzung des Chlorophylls. Liebigs Annalen, Bd. 350, S. 1, 48.
- '07 Willstätter und Walter Miegl. Über die gelben Begleiter des Chlorophylls Ebenda, Bd. 355, S. 1.
- '09 Willstätter, Hocheder und Hug. Vergleichende Untersuchungen des Chlorophylls in verschiedenen Pflanzen I. Ebenda, Bd. 371, S. 1.
- '10 Willstätter und Oppé. Vergleichende Untersuchungen des Chlorophylls in verschiedenen Pflanzen II. Ebenda, Bd. 378, S. 1.
- '11 Willstätter und Isler. Vergleichende Untersuchungen des Chlorophylls in verschiedenen Pflanzen III. Ebenda, Bd. 380, S. 154.
- '13 Willstätter und Stoll. Untersuchungen über Chlorophyll.
- '00 Zumstein. Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 34, S. 149.

Inhaltsverzeichnis.

- I. **Einleitung.**
- II. **Bedeutung der Reinkultur.**
- III. **Methodik der Reinkultur.**
- IV. **Formwechsel.**
 - 1. Wachstum und Ruhen der Algen.
 - 2. Zönobien- und Zellfamilienbildung der Algen.
 - 3. Polymorphismus der Algen.
 - 4. Bedingungen der Schwärmer- und Gametenbildung.
- V. **Ernährungsphysiologie.**
 - 1. Reaktion der Nährlösung.
 - 2. Verflüssigung der Gelatine.
 - 3. Anaërobismus von *Scenedesmus obliquus* Kütz. var. *non-liquefaciens* var. nov.
 - 4. Nährwerte der verschiedenen Stickstoffverbindungen.
 - 5. Nährwerte der verschiedenen Kohlenstoffverbindungen.
 - 6. Nährwerte der verschiedenen organischen Säuren.
 - 7. Grenzkonzentrationen des Traubenzuckers.
 - 8. Unsere Algen als Leitorganismen für Wasserbeurteilung.
 - 9. Ernährungsphysiologische Beziehungen zwischen Algen und *Azotobacter*.
 - a) Isolierung von *Azotobacter chroococcum* var. A₁ Jones, und die Merkmale desselben.
 - b) Untersuchungen mit Agarkulturen.
 - c) Untersuchungen mit Flüssigkeitskulturen.
 - d) Kritik über die Hypothesen der Symbiose zwischen Algen und *Azotobacter*.
- VI. **Systematik.**
 - 1. Ernährungsphysiologische Merkmale.
 - 2. Begriff der Spezies, Varietät und physiologischen Rasse.
 - 3. Beschreibung und Identifizierung der gezüchteten Algen.
- VII. **Farbenwechsel der Algen.**
 - A. BEDINGUNGEN DER VERGILBUNG.

1. Beziehungen zwischen der Vergilbung und den C-Verbindungen.
2. Vergilbungsstand bei Glukosenährmedien.
3. Die von der Überimpfung bis zur Vergilbung vergangene Zeitdauer.
4. Einfluß des Lichtes auf die Vergilbung.
5. Einfluß der Dunkelheit auf die Chlorophyllbildung.
6. Einfluß der Temperatur auf die Vergilbung.
7. Mikrochemische Untersuchungen über den Zellinhalt.
8. Untersuchungen über die Zerstörung der Farbstoffe.

B. BEDINGUNGEN DES WIEDERERGRÜNENS.

1. Nährwerte der verschiedenen Stickstoffverbindungen beim Wiederergrünen.
2. Grenzkonzentrationen der zuzusetzenden Stickstoffverbindungen beim Wiederergrünen.
3. Einfluß des Lichtes auf das Wiederergrünen.
4. Einfluß der Dunkelheit auf das Wiederergrünen.
5. Einfluß der Temperatur auf das Wiederergrünen.
6. Einfluß des sauerstofffreien Mediums und des Vakuums auf das Wiederergrünen.

C. ÜBER DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN DEN STICKSTOFFMENGEN UND DER VERGILBUNGSERSCHEINUNG.

1. Bei Glukosenähragar.
2. Bei Glukosenährlösung.

D. WESEN DER VERGILBUNGSERSCHEINUNG.

1. Vergilbungserscheinung schon bei neutralem Zustand der Nährlösung.
2. Nachweis des Nitrats und des Ammoniaks.
3. Verbrauchbare Mengen der Glukose in den verschiedenen Konzentrationen derselben und damit zusammenhängende Algenernten.

E. WEIßWERDEN UND ABTÖTUNG DURCH DIE BILDUNG DER FREIEN SÄUREN.

1. Indirekte Giftwirkung freier anorganischer Säuren.
2. Nachweis flüchtiger Säuren, bzw. der Ameisensäure und nicht flüchtiger Säuren.
3. Bildung der oxydierbaren Substanz.

VIII. Giftwirkungen der verschiedenen freien Säuren.

IX. Erklärungen der Entfärbungsvorgänge.

1. Über die Vergilbung.
2. Über das Weißwerden.
3. Vergleichende Betrachtungen über die Entfärbung der Chlorophyceen und anderer Pflanzenklassen.

X. Zusammenfassung der Hauptresultate.

XI. Literatur.

Tafelerklärung.

Die Figuren wurden soweit nichts anderes bemerkt ist, mit dem Abbéschen Zeichenapparat, bei 700-maliger Vergrößerung entworfen.

Tafel I.

- Fig. 1. *Chlorella vulgaris* Beij. var. *lutescens*, var. nov. M-Agarkultur. p Pyrenoid; s Aplanosporen. Die Größe der Zellen, 4×4 , 4×5 , 4×8 , 7×8 , 9×9 , 8×10 , $10 \times 10 \mu$.
- Fig. 2. *Chlorella l.* M-L-Kultur. p Pyrenoid; s Aplanosporen. Die Größe der Zellen, 10×10 , 8×10 , 8×8 , $5 \times 6 \mu$.
- Fig. 3. *Chlorella l.* Frische Gl-Agarkultur. s Aplanosporen.
- Fig. 4. *Chlorella l.* Alte Gl-Agarkultur. f Fettkugeln.
- Fig. 5. *Stichococcus bacillaris* Näg. var. *viridis*, var. nov. M-Agarkultur. Man sieht hier die Zweiteilung der Zellen. Die Größe der Zellen, 3×7 , 3×4 , 2×8 , $2.6 \times 7 \mu$.
- Fig. 6. *Stichococcus v.* Frische Gl-Agarkultur.
- Fig. 7. *Stichococcus v.* Alte Gl-Agarkultur. f Fett.
- Fig. 8. *Scenedesmus obliquus* Kütz. var. *non-liquefaciens*, var. nov. M-Agarkultur. s Aplanosporen; Da *Dactylococcus*-Stadium. Zellen sind spindelförmig, 7×8 , 4×9 , 5×11 , oder $3 \times 9 \mu$ groß.

- Fig. 9. *Scenedesmus n.* Frische Gl-Agarkultur. Zellen sind dicker als bei M-Agar.
- Fig. 10. *Scenedesmus n.* Alte Gl-Agarkultur. Die Größe der Zellen, 8×8 , 8×10 , $4 \times 10 \mu$.
- Fig. 11. *Chlorella l.* in 23% oder 24% Gl-L-Kultur.
- Fig. 12. *Stichococcus v.* in 22% Gl-L-Kultur.
- Fig. 13. *Scenedesmus n.* in 3 oder 4% Gl-L-Kultur.
- Fig. 14. *Scenedesmus n.* in 5% Gl-L-Kultur.
- Fig. 15. *Chlorosphaera putrida*, sp. nov. in 7%, 9% oder 10% Gl-L-Kultur.
- Fig. 16. *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov. in 3% Gl-L-Kultur.
- Fig. 17. *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov. in 5% Gl-L-Kultur.
- Fig. 18. *Chlamydomonas koishikavensis*, sp. nov. in 7% Gl-L-Kultur.
- Fig. 19. *Chlorella l.* M-L-Kultur. (Frische und alte Kultur).
- Fig. 20. *Stichococcus v.* M-L-Kultur. (Frische und alte Kultur).
- Fig. 21. *Scenedesmus n.* M-L-Kultur (Frische und alte Kultur).
- Fig. 22. *Chlorosphaera p.*, alte M-L-Kultur (Frische M-L-Kultur, Fig. 10, Tafel III).
- Fig. 23. *Chlamydomonas k.*, alte M-L-Kultur (Frische M-L-Kultur, Fig. 13, Tafel III).
- Fig. 24. *Chlorella l.* frische 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 25. *Chlorella l.* alte 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 26. *Stichococcus v.* frische 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 27. *Stichococcus v.* alte 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 28. *Scenedesmus n.* frische 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 29. *Scenedesmus n.* alte 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 30. *Chlorosphaera p.* frische 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 31. *Chlorosphaera p.* alte 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 32. *Chlamydomonas k.* frische 2% Gl-L-Kultur.
- Fig. 33. *Chlamydomonas k.* alte 2% Gl-L-Kultur.

Tafel II.

- Fig. 34. *Chlorosphaera p.* Gl-Agarkultur.
- Fig. 35. Eine vegetative Zelle aus Gl-Agarkultur. 17μ groß, 3 Pyrenoide.

- Fig. 36. *Chlorosphaera p.* Frische M-Agarkultur. Aplanosporenbildung.
- Fig. 37. *Chlorosphaera p.* M-Agarkultur. Zoosporenbildung.
- Fig. 38. *Chlorosphaera p.* Zoosporen, 4×8 , oder $5 \times 8 \mu$ groß.
- Fig. 39. *Chlorosphaera p.* Alte M-Agarkultur.
- Fig. 40. *Chlorosphaera p.* Frische Gl-Agarkultur.
- Fig. 41. *Chlorosphaera p.* Alte Gl-Agarkultur.
- Fig. 42. *Chlamydomonas k.* Eine vegetative Zelle oder Schwärmer aus einer Kultur in H_2O . $a = \times 1100$, $b = \times 700$. p Pyrenoid; k Kern; A Augenpunkt; v Vakuolen.
- Fig. 43. *Chlamydomonas k.* M-Agarkultur. *Gloecystis*-Zustand. $a = \times 500$, $b = \times 900$. p Pyrenoid. Diese befinden sich je 2, 3, oder 4 in einer Zelle. d Amylodextrinherde. Die Größe der Zellen, 8×16 , 6×16 , 4×14 , oder $4 \times 12 \mu$.
- Fig. 44. *Chlamydomonas k.* Frische Gl-Agarkultur. *Gloecystis*- und *Palmella*-Zustand. $\times 500$. Die Größe der Zellen, 10×16 , 10×14 , 6×14 , 12×12 , $5 \times 10 \mu$.
- Fig. 45. *Chlamydomonas k.* aus einer in N-armer Gl-L erzielten Kultur. $a = \times 500$. $b = \times 700$.
- Fig. 46. *Chlamydomonas k.* Alte Gl-Agarkultur, $\times 500$. Gallerte wurde mit Methylenblau deutlich gemacht.
- Fig. 47. *Chlamydomonas k.* aus einer Kultur in H_2O , $\times 500$. Primäre Teilung geht querwise, und sekundäre Teilung, längswise vor sich.
- Fig. 48. Gameten von *Chlamydomonas k.* aus einer Wasserkultur. Größe, 5×6 , 6×8 , 4×10 , oder $5 \times 11 \mu$.
- Fig. 49. Kopulation der Gameten von *Chlamydomonas k.*
- Fig. 50. a. Eine neue Zygosporie, noch grün. Ihre Größe 9μ .
b. ältere Zygosporie, gelbgrün, 17μ groß.
c. alte Zygosporie, gelbbraun, 20μ groß.
- Fig. 51. *Azotobacter Chroococcum* var. A_1 Jones. Mannitagar-kultur, $\times 1100$.
- Fig. 52. Geißelfärbung mit einer bei $25^\circ C$, 20 Stunden alten Mannit-Agar-kultur von *Azotobacter chroococcum* var. $\times 1100$.
- Fig. 53. Ein Monat alte Mannit-Lösungskultur von *Azotobacter ch.* var. In-volutionsformen, $\times 1100$.

- Fig. 54. Mischkultur von *Azotobacter* und *Chlorella l.* in Mannit-Lösung, $\times 1100$. Man sieht viele infolge der Zerstörung von *Azotobacter* entstandene Körner.
- Fig. 55. Mischkultur von *Az.* und *Stichococcus v.* in Mannit-Lösung. $\times 1100$.
- Fig. 56. Mischkultur von *Az.* und *Scenedesmus n.* in Mannit-Lösung. $\times 1100$.
- Fig. 57. Mischkultur von *Az.* und *Chlorosphaera p.* in Mannit-Lösung. $\times 1100$.
- Fig. 58. Mischkultur von *Az.* und *Chlamydomonas k.* in Mannit-Lösung. $\times 1100$.
Kulturdauer von den fünf obigen Kulturen ist 21/V-19/XII.
- Fig. 59. Behandlung der *Chlorella*-Zellen mit 50% Äthylalkohol nach Liebal dt. Die oberen beiden Zellen ($\times 1000$) einer ergrün ten Kultur, die unteren beiden ($\times 1000$) einer vergilbten Kultur entnommen. Das Chlorophyll wurde schwarz, und das Carotin schraffiert gezeigt.
- Fig. 60. Behandlung der *Chlorella*-Zellen mit Molisch's Kalimethode. Die oberen drei Zellen ($\times 1000$) einer ergrün ten Kultur, die unteren fünf ($\times 1000$) einer vergilbten Kultur entnommen. Das Chlorophyll wurde schwarz, und das Carotin schraffiert gezeigt.
- Fig. 61. Durch $\frac{N}{250}$ Ameisensäure abgetötete *Chlorella*-Zellen. $\times 700$.

Tafel III.

- Fig. 1-4 sind etwa 300 mal, und Fig. 5-15 etwa 250 mal vergrößert.
- Fig. 1. *Chlorella l.* M-Agarkultur.
- Fig. 2. *Chlorella l.* Alte Gl-Agarkultur.
- Fig. 3. *Stichococcus v.* M-Agarkultur.
- Fig. 4. *Stichococcus v.* Alte Gl-Agarkultur.
- Fig. 5. *Scenedesmus n.* M-L-Kultur.
- Fig. 6. *Scenedesmus n.* M-Agarstrichkultur.
- Fig. 7. *Scenedesmus n.* Gl-Agarstichkultur.
- Fig. 8. *Scenedesmus n.* M-Gelatinestichkultur.
- Fig. 9. *Scenedesmus n.* Gl-Gelatinestichkultur.
- Fig. 10. *Chlorosphaera p.* M-L-Kultur (Schwärmer- und Aplanosporenbildung).
- Fig. 11. *Chlorosphaera p.* M-Agarkultur (Schwärmer- und Aplanosporenbildung).
- Fig. 12. *Chlorosphaera p.* Gl-Agarkultur (Schwärmerbildung).

Fig. 13. *Chlamydomonas k.* M-L-Kultur. Zygosporonenkeimung. Man sieht hier Vierteilung der Zygosporonen (k).

Fig. 14. *Chlamydomonas k.* M-Agarkultur.

Fig. 15. *Chlamydomonas k.* Gl-Agarkultur.

Fig. 16. Absorptionsspektren der Farbstoffe von *Chlorella l.* und *Coelopleurum Gmelini*. Das Spektrum von Eisenbogen wurde auch beigelegt, um die Lage der Absorptionsbänder zu verdeutlichen. (Alle Spektrogramme wurden von Herrn Prof. Dr. Y. Shibata hergestellt).

a. Absorptionsspektren des Alkoholextrakts von *Coelopleurum Gmelini*. Bei a war die Dicke des Absorptionsmediums 11 cm lang. Bei den darauf folgenden Spektren war dieselbe der Reihe nach 10, 9, 8, 7 und 6 cm lang.

β: Absorptionsspektren des Alkoholextrakts der aus M-L-Kultur entnommen *Chlorella*- Zellen.

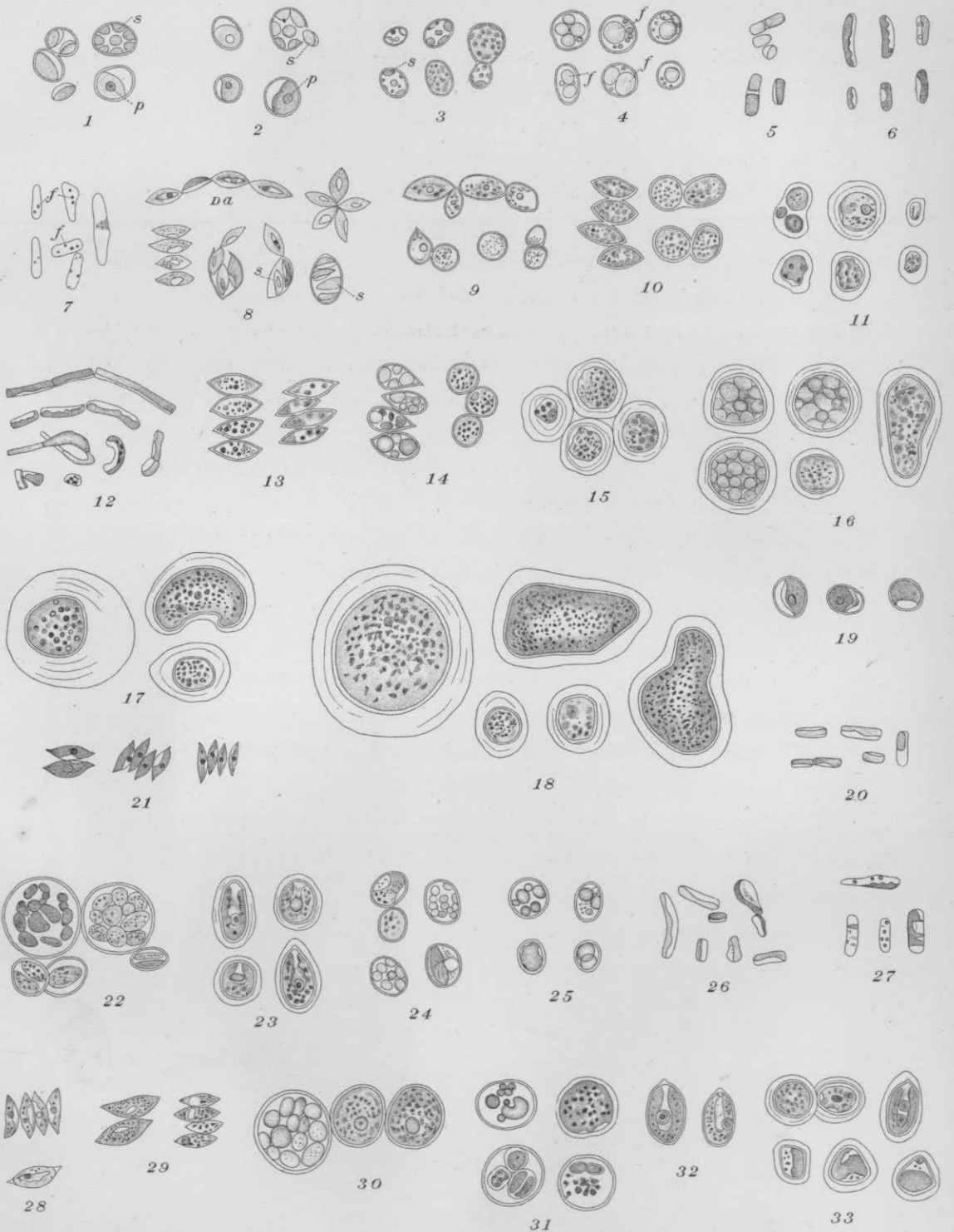
Die Dicke des Absorptionsmediums war entsprechend dem Spectrum a, b, ... und g, der Reihe nach 9, 8, 7, 5, 4 und 3 cm.

γ. Absorptionsspektren des Alkoholextrakts der durch Zusatz von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ergrüneten *Chlorella*-Zellen.

Die Dicke des Absorptionsmediums war in der Reihenfolge 9, 8, 7, 6, 5 und 4 cm lang.

δ. Absorptionsspektren des Alkoholextrakts der aus vergilbter Gl-L-Kultur entnommen *Chlorella*-Zellen.

Die Dicke des Absorptionsmediums war in der Reihenfolge 11, 10, 9, 8, 7 und 6 cm lang.





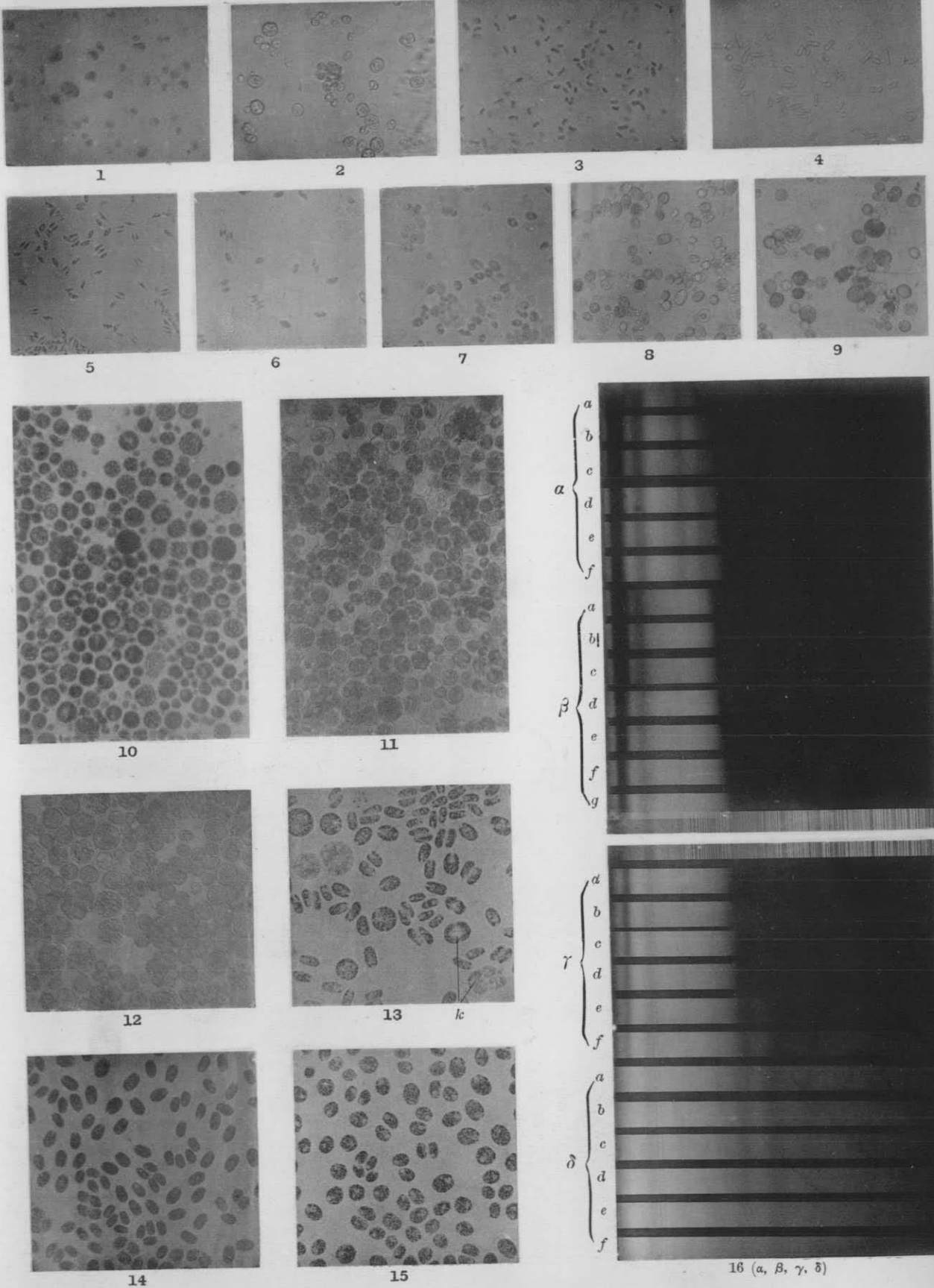


Fig. 1—15, Nakano photo.

Fig. 16, Prof. Y. Shibata photo.

BERICHTIGUNGEN.

Bei mehreren Orten :	statt „ <i>non-liquefaciens</i> “	lies „ <i>non-liquefaciens</i> “.
Seite 18, Zeile 3 von oben :	„ „Zuckerlösungen“	„ „Zuckerlösungen“.
„ 18, „ 4 „ „ :	„ „Varietät“	„ „Varietät“.
„ 20, „ 5 „ „ :	„ „ <i>Chlorospaera</i> “	„ „ <i>Chlorospaera</i> “.
„ 26, „ 2 „ unten :	„ „osmotischem“	„ „osmotischen“.
„ 28, „ 7 „ „ :	„ „retadiert“	„ „retardiert“.
„ 31, „ 13 „ „ :	„ do	„ do.
„ 58, „ 10 „ „ :	„ „Ähnlich“	„ „Ähnlich“.
„ 74, „ 1, untere Tabelle :	„ „ <i>Azotsbacter</i> “	„ „ <i>Azotobacter</i> “.
„ 78, „ 11 von unten :	„ „wennauch“	„ „wenn auch“.
„ 81, „ 12 „ oben :	„ „wirkung.“	„ „Wirkung“.
„ 83, Fig. 3, b :	„ „Strichkultur“	„ „Strichkultur“.
„ „ „ „ d :	„ „Stichkultur“	„ „Strichkultur“.
„ 85, Erklärung von Fig. 4 :	„ „ <i>Chloro phaera</i> “	„ „ <i>Chlorospaera</i> “.
„ 85, Fig. 5, c :	„ „Strichkultur“	„ „Strichkultur“.
„ „ „ „ d :	„ „21/XI“	„ „21/XI-“.
„ „ „ „ e :	„ „Kulturdaue-“	„ „Kulturdauer“.
„ 89, Zeile 8 von oben :	„ „kultiverbaren“	„ „kultivierbaren“.
„ 132, „ 8 „ „ :	„ „Corotin“	„ „Carotin“.