Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 47 (1937)

Artikel: Biologische und toxikologische Versuche mit der Alge Chlorococcum infusionum (Schrank) Meneghini

Autor: Kessler, Johann

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-31811

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 24.10.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Biologische und toxikologische Versuche mit der Alge Chlorococcum infusionum (Schrank) Meneghini.

Von *Johann Kessler*, dipl. Apotheker.

(Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich.)

Eingegangen am 15. Dezember 1936.

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung 172
I. Allgemeine Untersuchungen über *Chlorococcum infusionum* 173
1. Die Kultur von Algen und deren quantitative Bestimmung 173
2. Die Änderung der Azidität in ungepufferter Nährlösung 175
3. Der Einfluss der Azidität auf das Wachstum von *Chlorococcum infusionum* 179
4. Der Einfluss der Temperatur 182
5. Zusammenfassung 185
II. Die Wirkung von Giften auf *Chlorococcum infusionum* 185
1. Die hauptsächlichsten Fehlerquellen bei der Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel 185
2. Mikroskopische Bewertung von *Chlorococcum infusionum* bei Zusatz organischer und anorganischer Giftstoffe 187
3. Giftwirkungen anorganischer Chemikalien auf *Chlorococcum infusionum* 188
A. Versuche mit Quecksilberchlorid (Sublimat) 188
B. Versuche mit Kupfersulfat 192
a) Allgemeines 192
b) Wirkungen auf *Chlorococcum infusionum* 193
c) Untersuchung der aktuellen Azidität in kupferhaltiger Nährlösung 199
d) Nachweis und quantitative Bestimmung des Kupfers im Algenplasma 202
e) Oligodynamische Nachwirkung von Kupfersulfat in Glasgefässen 204
f) Untersuchung von Aqua destillata verschiedener Herkunft und seine Brauchbarkeit für biologische Zwecke 205
4. Giftwirkungen organischer Chemikalien auf *Chlorococcum infusionum* 208
A. Allgemeine Übersicht und Methode 208
B. Versuche mit Phenol 210
C. Versuch mit technischem Kresol 211
D. Versuche mit Roh-Kresol PH.H.V. 212
Ortho-Kresol 212
Para-Kresol 212
Meta-Kresol 212

Seite
E. Versuch mit Thymol D.A.B. 214
F. Versuch mit Carvacrol 215
G. Versuch mit salzsaurem Anilin 216
5. Versuche mit Kupfersulfat und Kresol bei konstanten Temperaturverhältnissen 217
6. Zusammenfassung 220
Zitierte Literatur 222

Einleitung.

Im Kampfe gegen die tierischen und pflanzlichen pathogenen Keime hat die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegen organische und anorganische Stoffe schon frühzeitig durch die Hygieniker eine weitgehende Abklärung erfahren. Die Bedeutung der den Bakterien und Pilzen nahestehenden Algenflora in Flüssen und Seen für die Fischfauna und die Selbstreinigung der Flussläufe wurde erst spät Gegenstand einlässlicher Untersuchungen. Die Tatsache, dass die Algen gerade in der Natur mannigfachen Gifteinwirkungen durch Abwässer jeglicher Art ausgesetzt sind, gab den Anlass, die Wirkung einiger chemischer Stoffe auf Algen quantitativ festzustellen. Wir beschränkten unsere Erhebungen auf die eine Art: *Chlorococcum infusionum* (Schrank) Meneghini, um dafür mehrere Chemikalien in den Untersuchungsbereich einbeziehen zu können.

In erster Linie bezweckten wir die Ausarbeitung einer, für Serienbestimmung von Algen brauchbaren, quantitativen Methode. Allgemeine Fragen über Kultur von Algen, sowie Aziditäts- und Temperaturverhältnisse fanden im ersten Abschnitt ihre Berücksichtigung.

In Abschnitt II versuchten wir den Einfluss einiger als Antiseptica bekannter, anorganischer und organischer Giftstoffe auf *Chlorococcum infusionum* ebenfalls auf gravimetrische Weise festzustellen. Die einlässlichen Untersuchungen über das Kupfersulfat sind als Beitrag zur Frage der Oligodynamie gedacht.

Mein verehrter Lehrer, Herr Prof. Dr. E. Gäumann, Direktor des Institutes für spezielle Botanik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, ermöglichte mir die Durchführung dieser Arbeit in seinen Laboratorien vom Januar 1935 bis Sommer 1936. Für das Interesse und seine wertvollen Anregungen spreche ich ihm meinen besten Dank aus.

Herr Priv.-Doz. Dr. O. Jaag überliess mir in zuvorkommender Weise seine Algenreinkulturen und bestimmte mir die Art *Chlorococcum infusionum* (Schrank) Meneghini.

Im Verlaufe unserer Arbeit durften wir auch die Freundlichkeit und Ratschläge nachstehender Herren beanspruchen: Prof. Dr. H. Pallmann, Dr. A. Ammann, Dr. L. Zobrist, E. Thomas. A. Schibli und R. Schwegler.

Die Reinschrift dieser Arbeit besorgte Frl. E. Kessler.

I. Allgemeine Untersuchungen über Chlorococcum infusionum.

1. Die Kultur von Algen und deren quantitative Bestimmung.

Zur Anzucht der Algenkulturen bedienten wir uns fester und flüssiger Nährmedien. Auf 1000,0 g destilliertes Wasser enthielten letztere :

0,25 g Kaliumchlorid (K Cl)
0,25 g Monokaliumphosphat (KH_2PO_4)
0,25 g Magnesiumsulfat ($MgSO_4.7\,H_2O$)
0,002 g Eisenchlorid ($FeCl_3.6\,H_2O$)

Mit dieser sogenannten Knopschen Lösung (in der Arbeit gekürzt durch K$\frac{1}{3}$) war für die zur Vegetation von Algen notwendigen Elemente gesorgt. Durch Auflösen von 15 g gewaschenem und wieder getrocknetem Agar in einem Liter K$\frac{1}{3}$ stellten wir feste Kulturböden her. Hauptzweck der Vorversuche war eine möglichst rasch wachsende Alge mit einem ihr besonders zusagenden Nährsubstrat zu finden, bei dem aber anderseits im Hinblick auf die in Aussicht genommenen Desinfektionsversuche keine allzu grossen chemischen Unverträglichkeiten zu befürchten waren. Je 50 cm³ für die festen, und 100 cm³ zur Bereitung der flüssigen Nährmedien wurden in Erlenmeyerkolben (Kali-Glas) mit einem Fassungsvermögen von 100 cm³ bzw. 400 cm³ abgefüllt, diese Kolben wie üblich mit nicht entfetteter Watte verschlossen und einmal im Autoklav bei 120° und 2 Atm. 20 Minuten lang sterilisiert. Mit der Platinnadel wurden zirka 80, der Reihe der Grünalgen angehörende Arten überimpft, und das Wachstum in den verschiedenen Nährmedien verglichen. Nach der Beimpfung wurden die Kulturen in einem Glashaus unseres Institutes aufbewahrt, wo sie gleichen Bedingungen an Temperatur, Luft und Belichtung ausgesetzt waren.

Es war vorauszusehen, dass in Substraten ohne künstliche Kohlenstoffquelle wie K$\frac{1}{3}$ oder Erdlösungen (bereitet aus einem Absud von Humuserde) die Algenwerte unter dem Durchschnitt derjenigen von K$\frac{1}{3}$ + 1% Glukose liegen mussten. Für die weiteren Untersuchungen kamen sie nicht mehr in Betracht. Damit schied auch der Teil der Algen aus, welcher in K$\frac{1}{3}$ + 1% Glukose nur ein kümmerliches Wachstum zeitigte.

Zugleich mit diesen Erhebungen sahen wir uns nach einer quantitativen, zuverlässigen Bestimmungsmethode der Algenkulturen um. In den Literaturangaben konnten wir nur bei Bokorny (1905) eine Angabe finden, Algenzellen quantitativ zu bestimmen : « 5 mg Sublimat reichen aus, um 10 g Algen zu töten, wobei aber zu bemerken ist, dass die Alge feucht gewogen wurde. »

Ein Versuch, das Algenmaterial zu zentrifugieren, erwies sich für Serienuntersuchungen zu umständlich, und ein Vergleich der Rauminhalte der zentrifugierten Massen als unbefriedigend. Dagegen liessen sich die Kulturen auf Filtern gewichtsanalytisch bestimmen, wobei für

Chlorococcum infusionum Werte zwischen 10 mg und 90 mg festgestellt wurden. Nur einige *Coccomyxenarten* mit Zellen in der Grössenordnung von 6 μ—10 μ ergaben kein klares Filtrat. (Durch Zuhilfenahme ganz engporiger Filter könnten wohl auch Algenzellen unter 10 μ gravimetrisch bestimmt werden.) Damit war uns der Weg der Bestimmungsmethode von *Chlorococcum infusionum* in einem Nährmedium von K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose gewiesen.

Da der Endwert einer Kultur von der Menge des Ausgangsmaterials wesentlich abhängt, ist es unerlässlich, immer dieselbe Algenmenge überzuimpfen. Zu diesem Zwecke gaben wir zu einer gutgewachsenen *Chlorococcum*-Kultur auf festem Agarboden 100 cm³ steriles, destilliertes Wasser und stellten durch längeres Schütteln eine möglichst homogene Aufschwemmung her. Mit Hilfe des in Abb. 1 wiedergegebenen

Abb. 1.

Normaltropf-Fläschchen im Sinne der PH. H. V., System T. K. zum Überimpfen von Algensuspensionen.

Normaltropf-Fläschchen, System T. K. Thomann (1936), beimpften wir eine sterile Nährlösung mit 15 Tropfen Algensuspension.

Diese Fläschchen, mit einer Ausgussöffnung von zirka 3 mm, wurden bei 120° zwei Stunden sterilisiert und gewähren nebst dem guten Mischungsvermögen der Aufschwemmung den Vorteil einer genauen Kontrolle der abgegebenen Tropfenzahl. Glasstöpsel und Ausgussöffnung können durch Abflammen erneut sterilisiert werden, und die Abschlußstellung des eingeschliffenen Stöpsels schützt das Material längere Zeit vor Infektion. Eine ebenfalls im Handel zirkulierende Art, deren Tropfvorrichtung dem Glasstopfen (Glasdorn) und nicht dem Flaschenrand angebracht ist, erwies sich für unser Verfahren als nicht zweckmässig.

Zur Bestimmung selbst werden die einzelnen Kulturen quantitativ auf ein gewogenes Filter gebracht, ausgewaschen, lufttrocken gemacht und bei 103° während drei Stunden zu konstantem Gewicht getrocknet. Die Tabellen zeigen das arithmetische Mittel des Trockengewichtes von

8—10 Kulturen. Die Brauchbarkeit der Methode ergibt sich aus Tab. 1, die zeigt, dass der mittlere Fehler unter 1 % des mittleren Gewichtes liegt. Die Überimpfung für die eigentlichen Versuche erfolgte dementsprechend nicht mehr durch das Material von Agarböden, sondern direkt durch Kulturen aus K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose, wodurch eine viel grössere Homogenität der Suspension erzielt werden konnte.

Tabelle 1.
Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in gepufferter Nährlösung, übergeimpft mit dem T. K. Patenttropfglas. pH : 5,1. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 18°—24° C.

Kultur Nr.	Trockengewicht mg	Mittleres Gewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
1	89,9	87,1	0,7
2	88,1		
3	87,5		
4	90,5		
5	84,0		
6	89,6		
7	84,3		
8	83,9		
9	86,8		
10	86,1		

2. *Die Änderung der Azidität in ungepufferter Nährlösung.*

Die Fähigkeit der parasitischen Pilze, die Wasserstoffionenkonzentraton ihrer Nährsubstrate nach bestimmten Gesetzen verändern zu können, findet bei Fischer und Gäumann (1929) Erwähnung, und im Selektionsvermögen der betreffenden Pilzart ihre Erklärung. Auch Luz (1934) fand bei seinen Versuchen mit *Fusarium lycopersici* in modifizierter Richardscher Lösung eine vierphasige Aziditätsänderung. Bei einem Ausgangs-pH von 3,9 erfolgt in den ersten Tagen eine Ansäuerung auf pH 3,41, worauf eine Verschiebung der Reaktion im Sinne eines Anstieges auf pH 7,5 eintritt. Nach Erreichung dieses Umschlagpunktes sinkt der Wert wieder auf pH 7,21, um dann schliesslich auf der Höhe von 8,5 konstant zu bleiben.

Eine derartige Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration von der sauren nach der neutralen Seite wird bei Mikroorganismen allgemein vermutet; sie ist aber nur bei den Pilzen untersucht. Wir suchten daher das Verhalten von *Clorococcum infusionum* in Knopscher Lösung kennenzulernen.

Da in Anlehnung an Luz (l. c.) mit einer Änderung der Wasserstoffionen in den ersten 8 Tagen zu rechnen war, erfolgte die pH-Messung zu Versuchsbeginn täglich, später gewöhnlich jeden 5. Tag.

Nach dem in Kap. 1 beschriebenen Verfahren wurden die Algen zu gleichzeitiger Bestimmung des Trockengewichtes auf ein Filter gebracht, und in je 2 bis 3 Proben eines einzelnen Filtrates wurde elektro-

Tabelle 2.
Aziditätsänderung und Wachstum in der ungepufferten Kulturlösung (Nr. 1) von *Chlorococcum infusionum*. Temperatur: 18°—23° C.

Kulturdauer Tage	pH	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
Ausgangslösung	4,99	—	—
2	4,86	—	—
3	4,73	—	—
4	4,56	—	—
5	4,40	—	—
6	4,61	—	—
7	4,91	—	—
10	5,25	12,9	1,2
15	5,65	18,7	1,3
20	6,07	16,0	2,1
25	6,21	17,4	1,4
30	6,54	17,1	2,5
35	6,42	21,7	0,6
40	6,37	23,8	1,4
45	6,30	28,1	1,3
50	6,23	32,5	1,0
100	7,01	—*	—*

* nicht bestimmt.

Tabelle 3.
Aziditätsänderung und Wachstum in der ungepufferten Kulturlösung (Nr. 2) von *Chlorococcum infusionum*. Temperatur: 15°—20° C.

Kulturdauer Tage	pH	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
Ausgangslösung	4,58	—	—
2	4,57	—	—
3	4,47	—	—
5	4,37	—	—
7	4,22	19,7	3,5
12	3,61	21,1	2,1
15	3,69	26,4	2,2
18	3,71	22,3	1,8
23	4,04	30,3	0,5
28	4,20	42,8	1,6
32	4,64	42,0	0,7
35	4,99	40,9	2,4
40	5,29	45,8	2,1
45	5,81	46,2	2,2

metrisch mit der Platin-Chinhydron-Elektrode die aktuelle Azidität gemessen. Das Ausgangs-pH einiger nicht beimpfter Kontrollösungen blieb während der ganzen Zeit unverändert.

Wie Tab. 2 und 3 und Abb. 2 zeigen, ist eine auffallende Ähnlichkeit mit den Angaben von Fischer und Gäumann (l. c.) bei verschiedenen Pilzmyzelien unverkennbar. Auch der steile Abfall der Azidi-

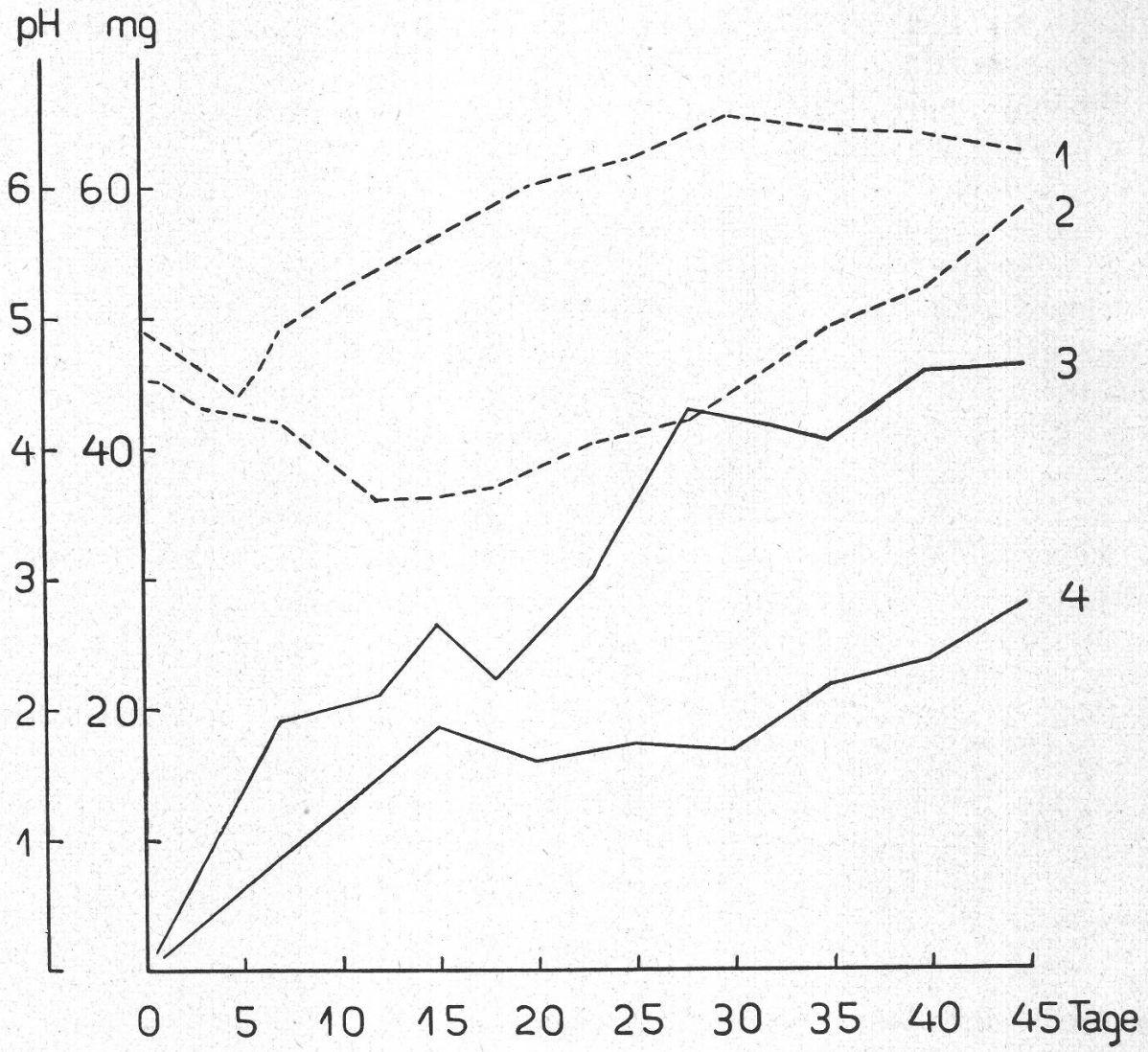


Abb. 2.
Aziditätsänderung und Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in ungepufferter Nährlösung.
Kurve 1 und 2: Veränderung der aktuellen Azidität durch *Chlorococcum infusionum.*

Kurve 3 und 4: Wachstum der Alge in den ungepufferten Nährlösungen.

tät bei Kulturlösung 2 zu Beginn des Versuches deckt sich mit den Ausführungen von Luz (l. c.) und Anliker (1935) bei den Pilzen *Fusarium lycopersici* und *Fusarium nivale.*

Physiologisch sind diese Erscheinungen noch nicht restlos abgeklärt. Nach Fischer und Gäumann (l. c.) vermag der Pilz die Reaktion der Kulturlösung nach einem ihm zusagenden Optimum zu verändern, um erst auf seinem isometabolischen Punkt, der zugleich sein charakteristisches Gleichgewicht bedeutet, konstant zu bleiben.

Luz und Anliker (l. c.) schliessen aus der starken Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration auf eine Bevorzugung der Kationen durch den Pilz, so dass ein Überschuss von Anionen als Ursache der Aziditätszunahme zu bezeichnen sei. Bei *Citromyces*-Arten bewirkt eine Diffusion organischer Säuren, wie z. B. Zitronensäure, Oxalsäure, in die Nährlösung eine Ansäuerung.

Die allgemein auch bei Algen vermutete, und bei *Chlorococcum infusionum* nun gefundene, anfängliche Zunahme der sauren Reaktion muss vorläufig als Tatsache hingenommen, und die Erklärung spätern Untersuchungen vorbehalten werden. Sicherlich aber hängt die allmähliche Verschiebung nach der alkalischen Seite mit den Abbauprodukten der Kulturen zusammen, in denen sich auch unter optimalen Verhältnissen und gutem Wachstum immer eine grosse Zahl toter farbloser Zellen feststellen lässt.

Nachdem die bisherigen Versuche in Übereinstimmung mit den erwähnten Literaturangaben eine enge Beziehung zwischen optimaler Reaktion und Wachstum erbrachten, war eine Pufferung sämtlicher weitern Kulturlösungen selbverständlich. Dadurch erfolgte nicht bloss die Ausschaltung der störenden pH-Schwankungen, sondern die Alge erhielt gleich von Anfang an ein Nährsubstrat mit einer ihr zusagenden Azidität.

Als Puffergemisch wählten wir eine von Mc Ilvaine aus Kolthoff (1926) angegebene Zusammensetzung entsprechender Mengen Zitronensäure und sekundärem Natriumphosphat, sowie die eben-

Tabelle 4.

Beziehungen zwischen Puffergemischen verschiedener Zusammensetzung (pH 5,1) und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in kohlenstoffhaltigem und kohlenstoffreiem Nährmedium. Kulturdauer: 14 Tage. Temperatur: 18°—26° C.

Zusammensetzung der Nährlösung 100 cm³	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
K $\frac{1}{3}$	Spuren	—
K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	19,4	1,4
K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + Phosphat-Puffer	53,3	2,3
K $\frac{1}{3}$ + Phosphat-Puffer	17,1	1,1
K $\frac{1}{3}$ + Zitrat-Puffer	42,8	3,4
K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + Zitrat-Puffer .	59,4	1,6

falls von Kolthoff (l. c.) vorgeschriebene Mischung von primärem und sekundärem Natriumphosphat.

Das Wachstum der Alge mit und ohne Kohlehydrat in beiden Puffergemischen ist aus Tab. 4 ersichtlich. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Alge den Puffer nur dann angreift, wenn ihr der Kohlenstoff in einer andern Form fehlt oder nur ungenügend zur Verfügung steht. Für unsere weiteren Arbeiten konnten daher ohne Bedenken beide Gemische verwendet werden. Mit Ausnahme der Kupfersulfatversuche stabilisierten wir das pH sämtlicher Kulturen mit genanntem Phosphatpuffer.

Für die nachfolgenden Untersuchungen gestalteten wir die Nährlösung wie folgt:

50 cm³ einer sterilen K $\frac{2}{3}$ Lösung verdünnten wir mit 50 cm³ einer ebenfalls getrennt sterilisierten Pufferlösung, welcher 2 % Glukose beigemischt war, so dass die fertige Kulturlösung wiederum dem üblichen Gehalt von K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose entsprach.

3. *Der Einfluss der Azidität auf das Wachstum von Chlorococcum infusionum.*

Für die Vegetation von Algen ist die Azidität des Nährsubstrates lebenswichtig. Die für das Wachstum optimalen Grenzen ermittelten wir in verschieden sauren Nährmedien, deren pH mit dem Zitrat-Phosphat-Gemisch nach Sörensen zit. bei Kolthoff (l. c.) konstant gehalten wurde.

Obwohl die Algen in der Natur ein leicht alkalisches Nährmedium bevorzugen, mussten wir aus versuchstechnischen Gründen unsere Erhebungen auf die Grenzen von pH 1,0 bis pH 6,5 beschränken; denn bei weiterer Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration fallen die

Tabelle 5.

Beziehungen zwischen der Reaktion der Kulturlösung und dem Wachstum einer *Flechtengonidie* (Nr. 124). Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 15°—20° C.

pH	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
1,21	tot	—
1,52	tot	—
2,01	tot	—
2,50	tot	—
3,13	12,5	1,2
3,61	37,6	3,5
4,32	87,9	4,2
4,99	83,9	4,9
5,44	65,1	2,0
6,07	68,4	3,2
6,78	59,4	2,2

Tabelle 6.
Beziehungen zwischen der Reaktion der Kulturlösung und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 15°—25° C.

pH	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
1,25	tot	—
1,50	tot	—
2,04	tot	—
2,58	tot	—
3,08	32,3	2,6
3,93	66,5	1,9
4,41	78,3	3,1
4,51	79,2	2,7
5,10	82,7	2,6
5,47	66,9	4,8
5,90	78,2	2,0
6,42	73,0	3.7

Tabelle 7.
Beziehungen zwischen der Reaktion der Kulturlösung und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum* unter besonderer Berücksichtigung der Grenzen zwischen pH 5,0 bis 6,5. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 20°—28° C.

pH	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
2,10	tot	—
3,25	21,4	2,2
4,78	82,7	2,4
5,20	81,1	4,8
5,27	84,0	3,3
5,54	63,1	2,5
5,61	67,2	2,9
5,65	60,8	3,2
5,95	76,1	2,3
6,57	80,4	3,1

Phosphate des Nährsubstrates unter Bildung von unlöslichem Magnesiumammoniumphosphat (NH_4MgPO_4) aus, so dass ein damit im Zusammenhang stehendes gehemmtes Wachstum in erster Linie auf die daraus resultierende mangelhafte Nährquelle zurückzuführen wäre. Anderseits verzichteten wir auf die Anwendung modifizierter Nährlösungen, bei denen beispielsweise Magnesium und Eisen fehlen, oder das Monokaliumphosphat durch das tertiäre Salz ersetzt ist, da wir im Hinblick auf unsere späteren Untersuchungen auf eine Zusammensetzung der Kulturlösung bedacht sein mussten, die sich für Versuchsobjekt und Methodik gleich günstig erwies.

Wie aus Tab. 5, 6, 7 und Abb. 3 hervorgeht, liegt die eine Lebensgrenze unserer Alge bei einem pH von 3,0. Bei einer Azidität von 2,5 und 2,6 waren sämtliche Zellen entfärbt, demnach tot. In einem Substrat von pH 2,7—3,0 war keine Entwicklung zu beobachten, obschon das mikroskopische Bild auf lebende Zellen schliessen liess. Während das Wachstum zwischen pH 3,0 und 3,3 noch deutlich gehemmt erscheint,

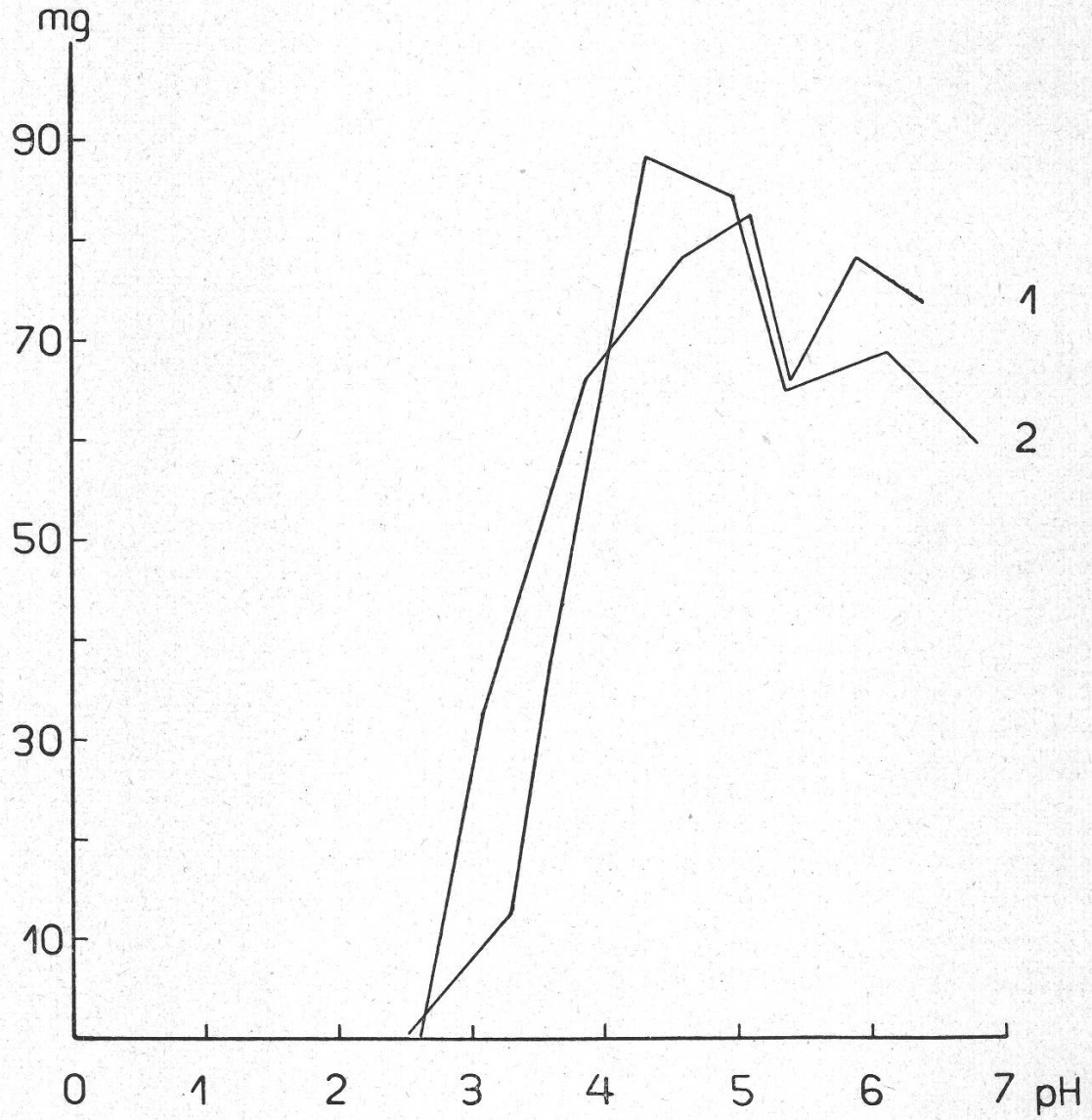


Abb. 3.
Beziehungen zwischen Azidität und Wachstum von *Chlorococcum infusionum.*
Kurve 1: *Flechtengonidie* Nr. 124.
Kurve 2: *Chlorococcum infusionum.*

bildet sich auch unter Berücksichtigung des mittleren Fehlers bei pH 4,8—5,2 ein Maximum, fällt hierauf gegen pH 5,4 und 6,0 etwas ab, um dann gegen die neutrale Seite hin wieder leicht anzusteigen.

Kurve 1, welche die Wachstumswerte einer *Flechtengonidie* bei verschiedenem pH verbildlicht, deckt sich beinahe mit dem Kurven-

verlauf von *Chlorococcum infusionum*. (Bei Nr. 124 handelt es sich um eine Flechtengonidie, die Herr P.-D. Dr. O. Jaag aus einer, unter Wasser wachsenden Flechte des Rheinfalls rein gezüchtet hatte. Leider ging im Laufe der Versuche die Kultur ein, bevor sie systematisch durchgearbeitet war, so dass es uns nicht möglich ist, heute ihre systematische Stellung zu nennen.) Auch Jaag (1929) ermittelte für 2 *Flechtengonidien* eine äusserste Lebensgrenze bei einer Azidität von pH 3,0.

Die Ergebnisse mit *Chlorococcum infusionum* lassen sich mit den Angaben von Fischer und Gäumann (l. c.) ebenfalls instruktiv vergleichen. *Fusarium lycopersici Sacc.* Rasse 119, 126, 134 und besonders 128 ergaben bei pH 2,7 noch keine quantitative Ausbeute, sondern zeigten erst bei pH 3,1 geringe Entwicklung und bei pH 4,7 eine erste Wachstumskulmination. Mit pH 5,4 erfolgt ein Absinken, hernach ein allmählicher Anstieg zu einem zweiten Optimum, das zwischen pH 6,5 und 6,7 zu liegen kommt. Bei pH 7,7 und 8,3 waren die Werte geringer, um gegen pH 8,8 noch stärker abzufallen.

4. Der Einfluss der Temperatur.

Während der Sommermonate Juli und August 1935 waren im Versuchshaus, an dem sonst idealen Standplatz unserer Kulturen, andauernde Temperaturen von 35° und 40° C keine Seltenheiten. Die Algen verloren dabei ihre Keimkraft und gingen zugrunde. Die nachfolgenden Untersuchungen prüfen den Einfluss der Temperaturverhältnisse auf das Wachstum von *Chlorococcum infusionum* unter besonderer Berücksichtigung der obern Grenze.

Zur Durchführung dieser Versuche standen uns Thermostaten mit Temperaturintervallen von je 3° in einem Bereiche von 0°—36° zur Verfügung. Die Algen mussten darin in völliger Dunkelheit gedeihen. Durch Tastversuche wurde festgestellt, dass *Chlorococcum infusionum* auch ohne Licht, wohl aber bei genügender Kohlenstoffzufuhr eine normale Entwicklung aufzuweisen vermag.

Da die einzelnen Thermostaten noch andern Untersuchungen dienen mussten, und auch mit Pilzkulturen beschickt waren, setzte in einem ersten Versuch, besonders bei 21°, eine Masseninfektion durch Pilzsporen ein. Als versuchstechnische Ergänzung mag deshalb beigefügt werden, dass sämtliche Wattepfropfen nach der Sterilisation mit einem Sublimat-Wasser-Glyzerin-Gemisch getränkt wurden, wodurch der Verlust an Kulturen auf ein Prozent herabgedrückt werden konnte.

Aus den Literaturangaben Oltmanns (1923) war vorauszusehen, dass sich das Temperaturoptimum für *Chlorococcum infusionum* ebenfalls innerhalb weiter Grenzen bewegt.

Während bei 0° und 3° das Impfmaterial ohne Entwicklung blieb und seine Bestimmung nicht möglich war, erfolgte bei 6° eine merkliche

Gewichtszunahme, die sich bei 12° noch vergrösserte, und mit 15° die optimale Wachstumszone erreichte, die sich bis 24° erstreckte. Mit weitern 3° Steigerung trat eine Gewichtsverminderung von 30 mg, bezogen auf das Mittelgewicht, ein, und bei 30° waren nach Ablauf der Kulturdauer (100 Tage) sämtliche Zellen tot. Die im Wachstum gehemmten Algen von 0° und 3° blieben aber lebend. Normalen Licht- und Tem-

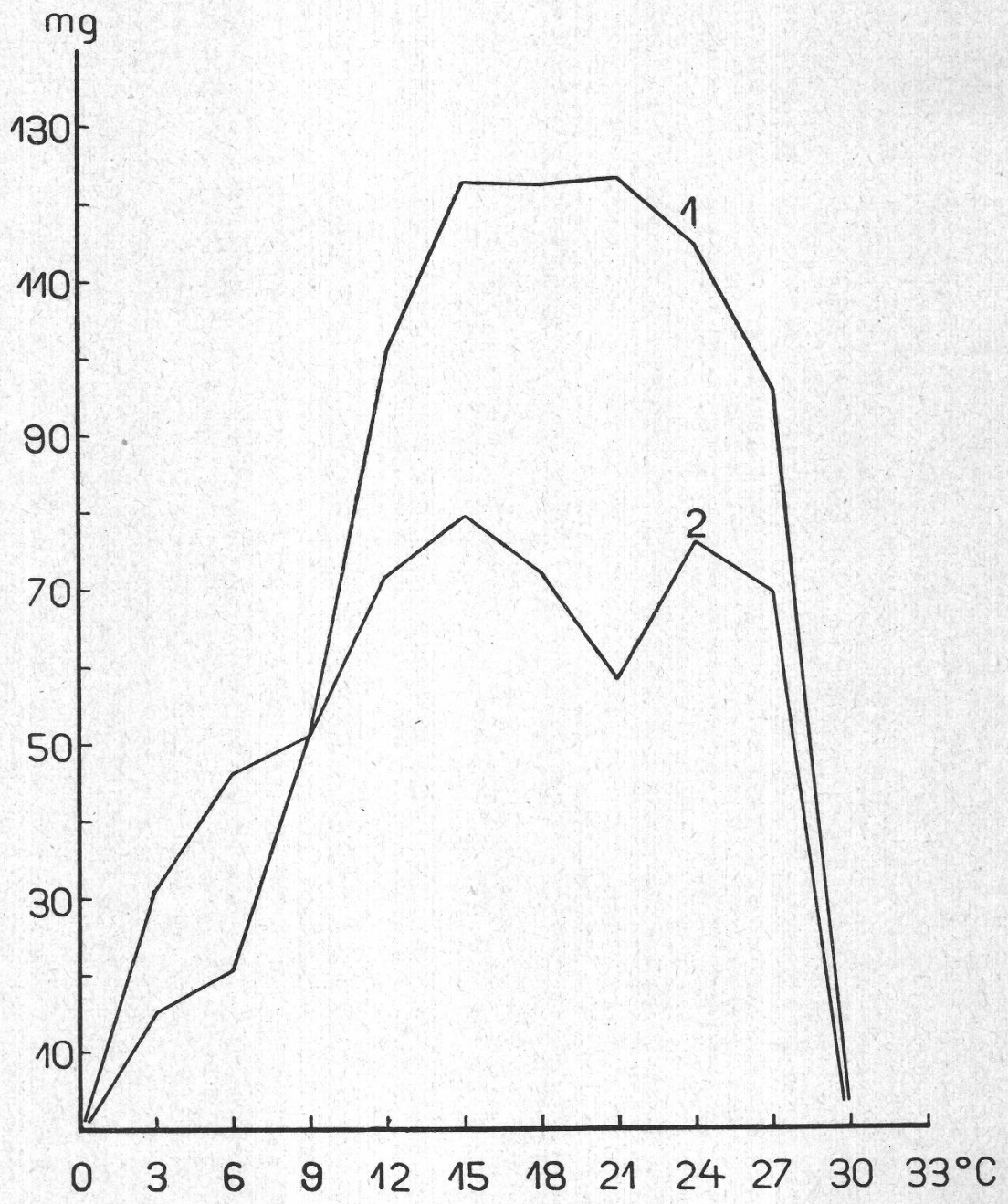


Abb. 4.

Der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *Chlorococcum infusionum.*

Kurve 1: Kulturdauer 100 Tage.
Kurve 2: Kulturdauer 60 Tage.

Tabelle 8 a.
Beziehungen zwischen konstanten Temperaturverhältnissen und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH : 5,0. Kulturdauer : 100 Tage.

Temperatur °C	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
0	+	—
3	15,2	1,6
6	20,7	2,5
9	52,1	7,8
12	100,7	4,5
15	123,0	3,1
18	122,7	2,6
21	123,1	4,3
24	114,4	5,9
27	95,3	7,9
30	tot	—
33	tot	—
36	tot	—

Tabelle 8 b.
Beziehungen zwischen konstanten Temperaturverhältnissen und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH : 5,1. Kulturdauer : 60 Tage.

Temperatur °C	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
0	+	—
3	31,5	0,9
6	46,5	1,9
9	51,9	1,9
12	72,1	3,8
15	79,9	2,2
18	72,1	2,6
21	58,2	1,5
24	76,0	2,4
27	69,5	2,0
30	±	—
33	tot	—
36	tot	—

peraturverhältnissen ausgesetzt, kam es zu einer sofortigen Regeneration mit einem Wachstumsertrag von zirka 80 mg im Mittel.

Interessant erscheint das Verhalten von *Chlorococcum infusionum* bei einer Temperatur von 30° : In den ersten Wochen der Versuchszeit vermochte das äusserst intensive Wachstum alle übrigen Kulturen zu überflügeln. Plötzlich aber erschöpfte sich ihre Vitalität, die Zellen entfärbten sich, und wir sahen deshalb von einer Bestimmung ab.

Platzmangel in den Thermostaten zwang uns, den Versuch 2 schon nach 60 Tagen abzubrechen. Der Kurvenverlauf bestätigt jedoch den im vorhergehenden Versuch besprochenen Temperatureinfluss. Auch die von Anliker (l. c.) untersuchten Pilzrassen von *Fusarium nivale* und *Fusarium herbarum* ergaben überraschend ähnliche Kurvenbilder. Für diese liegt das Wachstumsoptimum zwischen 21° und 27°. Wie für die Pilze, so beginnen auch für unsere Alge bei 30° die ungünstigen Lebensbedingungen.

5. Zusammenfassung.

1. Die Algenkulturen erfahren *gravimetrisch* eine *quantitative Bewertung.*
2. Die *Azidität* einer mit *Chlorococcum infusionum* beimpften Nährlösung verändert sich im Laufe der Kulturdauer. Nach einer anfänglichen Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration von pH 4,99 auf 4,00 im ersten, und von pH 4,58 auf 3.61 im zweiten Untersuchungsfalle, erfolgte eine Verschiebung gegen die neutrale Seite.
3. Ein *Puffergemisch* von Zitronensäure und sekundärem Natriumphosphat wird von der Alge nur bei Kohlenstoffmangel angegriffen.
4. Eine Azidität von pH 3,0 bildet für *Chlorococcum infusionum* die äusserste Lebensgrenze. Das Reaktionsoptimum im untersuchten sauren Gebiet liegt zwischen pH 4,5 und 5,1.
5. Das *optimale Wachstum* für *Chlorococcum infusionum* reicht bei konstanten Temperaturverhältnissen von 15°—27° C.
6. Die obere *Wachstumsgrenze* liegt bei 30° C.

II. Die Wirkung von Giften auf Chlorococcum infusionum.

1. Die hauptsächlichsten Fehlerquellen bei der Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel.

Wenn unter Desinfektion in erster Linie die Vernichtung pathogener tierischer und pflanzlicher Mikroorganismen verstanden wird, so darf wohl jede erfolgreiche Giftwirkung auf irgendeinen derartigen Organismus unter diesen Begriff eingereiht werden. Die in der Bakteriologie durch bewährte Untersuchungsmethoden gesammelten Erfahrungen lassen sich ohne weiteres auch auf Pilze und Algen ausdehnen. Für die Beurteilung und praktische Verwendung des zu prüfenden Desinfiziens sind die Konzentration, die Dissoziationsverhältnisse, die Temperatureinwirkungen usw. zu berücksichtigen.

Den absoluten desinfektorischen Grad einer Substanz anzugeben ist daher unmöglich. Es kann sich dabei immer nur um vergleichende

Werte handeln. In diesem Sinne hat Gruber (1892) am 7. internationalen Kongress für Hygiene in Brüssel die Hauptfehlerquellen bei solchen Untersuchungsmethoden zusammengestellt. Durch Schneider und Seligmann (1908) wurde ihre Zahl noch ergänzt.

Wir beschränken uns auf die Besprechung der folgenden Punkte:

a) Das Desinfektionsmittel.
b) Die Zusammensetzung des Nährmediums.
c) Das Desinfektionsobjekt.
d) Die Temperatur.

a) Das Desinfektionsmittel.

Beschaffenheit und Herkunft der zu verwendenden Präparate dürfen nicht wahllos hingenommen werden, sind doch bei den technischen Produkten Schwankungen in ihrer Zusammensetzung recht häufig. So kann im Trikresol der Gehalt der einzelnen wirksamen Isomeren verschieden sein. Eine Orientierung nach den Vorschriften der zuständigen Landespharmacopöe kann diese Fehler ausscheiden. Das Schweizerische Arzneibuch, um nur ein Beispiel anzuführen, setzt den Gehalt für Sublimat auf 99,5 % $HgCl_2$ fest und fügt zugleich eine quantitative Prüfungsmethode bei: 0,2000 g müssen mindestens 14,66 cm^3 und höchstens 14,73 cm^3 0,1 n Jod verbrauchen. Das Deutsche Arzneibuch macht unter diesem Artikel diesbezüglich keine Vorschriften.

Solche Mängel werden aber durch fehlerhaftes Arbeiten bei der Herstellung der zu prüfenden Giftlösungen noch vergrössert, besonders wenn es sich um flüssige Chemikalien handelt, wobei eine Identifizierung von Gewicht und Volumen in der Literatur keine Seltenheit ist.

Den physikalischen Eigenschaften der Gifte und ihrer Lösungsmittel muss auch die Sterilisationsmethode angepasst sein. Eine grosse Zahl chemischer Körper reagiert augenblicklich mit dem Nährsubstrat, oder wirkt durch Licht- und Wärmeeinflüsse nachträglich inkompatibel. Die in solchen Fällen erhaltenen Ergebnisse können nicht als Ausdruck des Hemmungswertes gelten, da sie eben zum grossen Teil durch Ausfällung einzelner Bestandteile der Nährlösung und der dadurch veranlassten Herabsetzung ihres Nährwertes beeinflusst sind.

b) Die Zusammensetzung des Nährmediums.

Von grösstem Einfluss auf jeden erfolgreichen Desinfektionsversuch ist die Kulturlösung. In einem unpassenden, dem Individuum wenig zusagenden Nährmedium wird das Wachstum ohnehin kümmerlich und die Widerstandskraft der Alge gegen äussere Einflüsse herabgesetzt sein. Schon dadurch geschwächte Organismen würden in Kultur ein falsches Bild über den Wirkungsgrad des angewandten Mittels ergeben.

Entscheidend ist ebenfalls die Wahl zwischen festen und flüssigen Nährmedien. Nur letztere bürgen für eine restlose und sichere Verteilung der Chemikalien, während bei festen Agar- oder Gelatinemassen immer mit Schwierigkeiten, besonders versuchstechnischer Natur, zu rechnen ist.

Wie aus unsern frühern Versuchen hervorgeht, muss die Nährlösung in einem optimalen Aziditätsbereich gehalten werden, da sonst die Giftwirkung durch den Aziditätseinfluss gestört werden könnte.

c) Das Desinfektionsobjekt.

Wiederum war es Gruber (l. c.), der auf die verschiedenen Empfindlichkeitsunterschiede pathogener Mikroorganismen, selbst bei Individuen des gleichen Stammes, aufmerksam machte. Auch während unserer Untersuchungen mit *Chlorococcum infusionum* tauchten plötzlich Kulturen auf, deren Resistenz gegenüber Giftstoffen weit unter dem normalen Niveau lag. Die in diesem Zusammenhang gemachten Erhebungen zeigten, dass es sich bei solchen Algen nur um schlechte Vitalitätsverhältnisse und nicht um Veränderungen innerhalb der Rasse, wie bei Bakterien, handeln konnte (vide Abschn. II., S. 205). Auf frischen, einwandfreien Nährmedien hatten wir in der Folge mit *Chlorococcum infusionum* in dieser Hinsicht keine Schwierigkeiten mehr.

d) Die Temperatur.

Der Einfluss der Temperatur auf die Wirkung eines Desinfiziens wird von der einschlägigen Literatur Koch (1881), Heider (1892) und Paul (1901) übereinstimmend bejaht. Wie aus unseren Untersuchungen über die Temperaturkurven hervorgeht, sind die Lebensbedingungen der Algen gegenüber einer ganzen Anzahl pathogener Organismen in relativ so kleine Temperaturbezirke eingeengt, dass nach unseren Feststellungen der Hinweis obgenannter Autoren nur auf Bakterienkulturen zutrifft.

Trotz Berücksichtigung und Ausschaltung dieser grössten Fehlerquellen kann der Endwert immer noch beeinträchtigt werden durch den Einfluss des Lichtes, der Jahreszeit, sowie der Unzulänglichkeiten in der Sterilisationsmethode und der Impftechnik.

2. *Mikroskopische Bewertung von Chlorococcum infusionum bei Zusatz anorganischer und organischer Giftstoffe.*

Nägeli (1893) und Rumm (1895) unterscheiden bei Anwendung verschiedener Konzentrationsstufen von Kupfersulfat auf *Spyrogyra longata* drei wesentliche Todesarten :

1. Die plasmolytische Vergiftung, charakterisiert durch Rückzug des Plasmaschlauches von der Membran mit deutlicher Trübung des Zellinhaltes.

2. Die chemische Vergiftung. Der Plasmaschlauch zieht sich nur wenig von der Membran zurück und der Zellinhalt scheidet in braunen Tropfen aus.
3. Die oligodynamische Vergiftung, bei der sich das Chlorophyllband vom Plasmaschlauche löst und klumpenförmig zusammenballt.

Auch wir haben unser Algenmaterial, das verschiedenen Konzentrationen von Sublimat, Kupfersulfat, Kresol und Thymol ausgesetzt war, einer mikroskopischen Prüfung unterzogen. Gleichzeitig mit den durch chemische Mittel getöteten oder geschädigten Algenzellen untersuchten wir auch solche, die durch rein thermischen Einfluss in ihrer Entwicklung gehemmt oder abgetötet waren.

a) Eine Aufschwemmung von *Chlorococcum infusionum* kurz aufgekocht, zeigte noch nach 10 Stunden das Bild einer in optimalen Verhältnissen lebenden Kultur von sattgrünen Zellen. Nach 24 Stunden verfärbten sich einige blassgrün, wie sie aber auch unter normalen Bedingungen nicht selten vorhanden sind. Erst nach 36 Stunden war der Beginn einer deutlichen Farbstoffabnahme zu konstatieren, und nach 3 Tagen waren sämtliche Algenzellen entfärbt.

b) Eine 10^{-2} mol Sublimatlösung zeigte sich zeitlich viel schneller in ihrer Wirkung. Schon nach 6 Stunden war das mikroskopische Bild massenhaft mit farblosen Zellbeständen durchsetzt. In einer Konzentration von 10^{-4} mol blieb der Farbstoff nach 2 Tagen in Form brauner Flecken an der Membran sichtbar und war nach weitern 24 Stunden ebenfalls verschwunden.

c) Ähnliche Erscheinungen zeigten sich bei Kupfersulfat, Kresol und Thymol, sowie bei Algenkulturen, die im Thermostaten über 30° C aufbewahrt wurden. Nur dauerten hier die Üebergänge zwischen lebendgrün und farblostot viel länger an, das Endstadium war immer mit einer Farbstoffzerstörung gezeichnet.

Das mikroskopische Bild von geschädigten oder abgetöteten Zellen der Art *Chlorococcum infusionum* bleibt bei Einwirkung verschiedener chemischer oder physikalischer Einflüsse immer dasselbe. Eine Beziehung zur Natur oder sogar zum Konzentrationsverhältnis des Desinfektionsobjektes lässt sich nicht folgern.

3. *Giftwirkungen anorganischer Chemikalien auf Chlorococcum infusionum.*

A. Versuche mit Quecksilberchlorid (Sublimat).

Zur Verwendung kam ein den Anforderungen der *PH. H. V.* (1935) genügendes Präparat. Löslichkeit 1 : 16 in kaltem, und 1 : 3 in siedendem Wasser.

In Verbindung mit Alkalien oder alkalisch reagierenden Stoffen entstehen Fällungen, und auf Zusatz von Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Ammoniumchlorid leicht lösliche Doppelsalze, deren Ionen noch

weniger dissoziert sind als bei reinen Sublimatlösungen. Kohlehydrate vermögen das Bichlorid, besonders bei Einwirkung von Licht und Wärme, zu zersetzen.

Einen empfindlichen Nachweis von Hg-Ionen liefert das Diphenylcarbazid, das bis zu einer Konzentration von 10^{-5} mol noch schwach reagiert.

Durch weitmaschige Veränderung der Konzentrationsverhältnisse wurden die letalen, und durch weitere Eingabelungen die toxischen Dosen ermittelt.

Unsere Untersuchungen beziehen sich zur Hauptsache auf die letzteren, bei denen die Einwirkungszeit nicht zu berücksichtigen ist.

Das Sublimat wurde quantitativ abgewogen. Mit Hilfe der Stammlösungen bereiteten wir daraus die entsprechenden Verdünnungen in fallenden Konzentrationen. Je 50 cm^3 sterile Knopsche Nährlösung von der Stärke K $\frac{2}{3}$ + 2% Glukose, sowie der doppelten Menge des Quecksilbersalzes wurde durch Zusatz von 50 cm^3 steriler Pufferlösung auf den normalen Gehalt von K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose und der gewünschten Molarität eingestellt, und nach dem allgemeinen, bereits erwähnten Verfahren beimpft.

Jeden zweiten bis dritten Tag wurden die Kulturen sorgfältig geschüttelt, ihr Zustand kontrolliert und in einem Protokoll festgelegt.

Das in den Tabellen angeführte mittlere Trockengewicht jeder Serie nebst der zugehörigen Kontrolle von K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose ist das Ergebnis von 7 bis 10 Kulturen.

Wie aus Tab. 9 hervorgeht, liegt die letale Zone von Sublimat bei *Chlorococcum infusionum* innert einer Molarität von 10^{-1} bis 10^{-6}.

Die toxische Phase muss im Bereich von $2 \cdot 10^{-6}$ bis 10^{-6} mol liegen. Bei $1{,}25 \cdot 10^{-6}$ mol konstatierten wir in 10 Lösungen noch zwei, in $1{,}1 \cdot 10^{-6}$ mol nur noch eine einzige Kultur mit gutem Wachstum, während in der Verdünnung von 10^{-6} mol jeglicher Einfluss des Sublimates verschwunden war.

Eine sogenannte oligodynamische Reizförderung war durch das Quecksilberchlorid nicht zu konstatieren. Alle weitern Konzentrationen bis zu 10^{-8} mol ergaben eine Wachstumsübereinstimmung mit der Kontrolle von K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose.

Das Quecksilberchlorid war der einzige von den zur Untersuchung gelangenden chemischen Körpern, bei denen sich in Verbindung mit der Alge keine Schädigungszone mit nur vermindertem Wachstum feststellen liess. In Anwesenheit nachweisbarer Mengen Hg-Ionen vollzieht sich ein so weitgehender Eingriff in die Konstitution des Individuums, dass auch nach Entzug des schädigenden Einflusses eine Regeneration nur ausnahmsweise glückt.

Aus diesem Grunde befassten wir uns, wenn auch nicht eingehend, mit der Einwirkungsdauer der Sublimatlösungen auf unsere Alge. In

Tabelle 9.

Beziehungen zwischen der Molarität einer Sublimatlösung und dem Einfluss auf das Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH : 5,0. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 15°—26° C.

Konzentration K $^1/_3$ + 1 % Glukose + $HgCl_2$ mol	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-1}	tot	—
10^{-2}	tot	—
10^{-3}	tot	—
10^{-4}	tot	—
$5 \cdot 10^{-5}$	tot	—
$2 \cdot 10^{-5}$	tot	—
10^{-5}	tot	—
$2 \cdot 10^{-6}$	tot	—
$1{,}7 \cdot 10^{-6}$	tot	—
$1{,}3 \cdot 10^{-6}$	tot	—
$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	2 Kulturen mit Wachstum	—
$1{,}1 \cdot 10^{-6}$	1 Kultur mit Wachstum	—
10^{-6}	85,4	5,2
10^{-7}	86,6	4,0
10^{-8}	90,7	5,1
10^{-9}	97,6	4,1
Kontrolle K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose	89,1	4,8

den Konzentrationen von 10^{-1} bis $5 \cdot 10^{-4}$ mol war die Schädigung auf das Impfmaterial so stark, dass bereits am folgenden Tag sämtliche Zellen entfärbt waren. Bei weiteren Verdünnungen von $5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-6}$ mol war der Zelltod nach 8 Tagen eingetreten. *Chlorococcum infusionum* in einer Nährlösung mit Zusatz von 10^{-5} mol $HgCl_2$, nach 3 Tagen mit sterilem Wasser ausgewaschen und in ein giftfreies Nährmedium von gleichem pH versetzt, konnte sich nicht mehr erholen, und nach 8 Tagen war die Alge vollständig entfärbt. (Die Chlorose der Alge bedeutet zwar nur ein sekundäres, aber sicheres Merkmal des eingetretenen Zelltodes. Eine verhältnismässig schnelle Beurteilung des Desinfektionswertes wie bei rasch wachsenden Bakterienkulturen ist hier nicht möglich.) Die Einwirkung in der ersten Zeit der Kulturdauer durch eine relativ geringe Zahl von Quecksilberionen war somit intensiv genug, um einen Regenerationsversuch illusorisch zu machen.

Die Literatur enthält nur spärliche Angaben über die Wirkung von Sublimat auf Algenzellen. Bokorny (l. c.) hält eine Konzentration 1 : 50,000 bis 1 : 200,000 noch für tödlich, und Schädigungen bis zu einer Verdünnung 1 : 100 Mill. und 1 : 1000 Mill. noch für möglich, vor-

ausgesetzt, dass die Lösung in hinreichender Menge vorhanden und die Zeitdauer der Einwirkung genügend lang ist.

In der Bakteriologie dagegen fehlt es nicht an vergleichenden Ergebnissen von systematisch durchgeführten Sublimatversuchen. Während nach Weyrauch (1927) eine Phenollösung auf Typhusbazillen in einer Stärke 1 : 100 bakterizid wirkt, ergibt eine Quecksilberlösung schon bei einer Konzentration von 1 : 200,000 denselben Effekt.

Auch in der Technik der Holzkonservierung Mahlke (1928) hat von sämtlichen Quecksilbersalzen nur das Sublimat eine praktische Bedeutung erlangt. Nach dem Kyanisierverfahren (Eintauchmethode) bildet eine vom Holze aufgenommene Quecksilbermenge in der Stärke von 0,6% einen wirksamen Schutz gegen die holzzerstörenden Pilze, welche derart behandeltes Holz nicht mehr angreifen.

Es war uns auch bekannt, dass bei Anwendung hoher Verdünnungsreihen wie z. B. 10^{-6} mol $HgCl_2$ die sogenannte Wandadsorption des Glases auf das Wachstum der Kulturen mitbestimmend sein kann. Durch die Adhäsionskraft der Glasflächen werden die Ionen angezogen, und die Lösungen derart gleichsam entgiftet.

Tabelle 10.

Beziehungen zwischen Wandadsorption und Giftigkeit einer stark verdünnten Sublimatlösung auf das Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH : 5,1. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 12°—21° C.

Kultur Nr.	Nährmedium $K^1/_3$ + 1% Glukose + $HgCl_2 10^{-6}$ mol 100 cm³	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
1	Glaskolben vorbehandelt mit 10^{-6} mol Sublimatlösung	80,2	0,9
	Kontrolle:		
2	Glaskolben nicht vorbehandelt	87,0	0,8
3	Vergleichskultur in K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose . . .	79,2	0,6

Tab. 10 dient zur Erklärung dieser Erscheinung. Nachdem die Lebensgrenze für *Chlorococcum infusionum* unter Sublimateinwirkung bei 10^{-6} mol festgestellt war, konnte die Möglichkeit einer Beeinflussung der Algenwerte durch allfällig adsorbierte Hg-Ionen nicht ausgeschlossen sein.

Um diese Tatsache (nach mündlicher Mitteilung von Prof. Dr. Treadwell, E. T. H., Zürich) zu überprüfen, füllten wir einen Teil der Glaskolben 48 Stunden vor Gebrauch mit der in Betracht kommenden Molarität von 10^{-6} $HgCl_2$, während die übrigen Gefässe ohne jeg-

liche Vorbehandlung teils mit der gleichen Konzentration und teils nur mit reiner Nährlösung zum Vergleich beschickt wurden. Im Verlaufe der Kulturdauer war jedoch kein qualitativer Unterschied in der Wachstumsintensität zu verzeichnen. Die gravimetrische Bestimmung bestätigte diese Beobachtungen und ergab dann wohl zufällig bei den vorbehandelten Kolben ein etwas grösseres Trockengewicht.

In diesem Zusammenhang mag auch noch auf die schon von Nägeli (l. c.) beobachteten, oligodynamischen Erscheinungen hingewiesen werden. Glasgefässe, die längere Zeit der Einwirkung von Metallsalzlösungen unterliegen, erhalten mit der Zeit einen Überzug von Metallteilchen, von denen je nach Qualität des Glases ein Teil festgehalten wird. Auf diese Weise vermag ein solches Glas unter Umständen seinen Inhalt längere Zeit oligodynamisch zu beeinflussen.

Zur Abklärung dieser Frage wurde ein Teil der zu Sublimatversuchen gebrauchten Kolben vor der üblichen mechanischen Reinigung durch Sodalösung, heisses Brunnenwasser und Aqua destillata mit konzentrierter Salpetersäure behandelt. Sämtliche Gefässe erhielten hernach wiederum eine Nährlösung mit einer Reinkultur. Eine oligodynamische Nachwirkung durch Quecksilberchlorid war bei unserem Murano-Glas nich zu konstatieren.

Auf die Bedeutung der zu verwendenden Glassorten bei Algen- und Pilzkulturen hat Ondratscheck (1935) aufmerksam gemacht. Ihre ungleichartige Zusammensetzung bedingt einen unregelmässigen Löslichkeitsgrad von Stoffen, durch welche die Kulturen gefördert werden, oder eine Hemmung erfahren können. Diese Löslichkeit wirkt sich während der ganzen Kulturdauer, besonders aber bei der Sterilisation am meisten aus, so dass durch ihn der Kalium- und Magnesiumbedarf gewisser Algenzellen gedeckt wird.

B. Versuche mit Kupfersulfat.

a) Allgemeines.

Wohl kein Metall hat hinsichtlich Wirkung auf pflanzliche Organismen in der Literatur eine so weitgehende Bearbeitung erfahren wie das Kupfer. Anstoss dazu gaben zum grossen Teil die Untersuchungen von Nägeli (1893). Die in diesem Zusammenhang aufgeworfene Frage der oligodynamischen Reizwirkung war das Problem, das sich wie ein roter Faden durch alle Arbeiten mit Kupfersulfat zieht.

Wir verzichten auf einen eingehenden geschichtlichen Rückblick und beschränken uns auf unsere Beobachtungen. Schon bei der Herstellung der Stammlösungen fiel uns die Unbeständigkeit der stark konzentrierten Molarlösungen auf. Innerhalb weniger Tage bildet sich ein bläulich-grüner, flockiger Niederschlag von Kupferkarbonat und Kupferphosphat, der den Gehalt an ionisiertem Kupfer vermindert. Übrigens erfahren Kupfersalze in destilliertem Wasser ebenfalls eine

Veränderung, in dem sich basisches Kupfersulfat ($Cu[OH]HSO_4$) in Form gelblich-weisser Kristalle ausscheidet. Die Ausgangslösungen wurden daher nie länger aufbewahrt, sondern sogleich zu weiteren Verdünnungen verarbeitet.

Während bei den bisherigen Untersuchungen sämtliche Kulturen mit einem Gemisch aus primärem und sekundärem Natriumphosphat gepuffert wurden, war seine Verwendung für Kupfersulfat nicht ohne weiteres gegeben. Bei höheren Konzentrationen wird das Metall als Phosphat gefällt und dadurch seine Wirksamkeit herabgesetzt. Aus diesem Grunde lässt sich auch das Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in einer sonst letalen, aber mit Phosphat gepufferten Kupfersulfatlösung von 10^{-4} mol erklären : Die Alge vermag sich der nur langsam steigernden Konzentration des Nährsubstrates, bedingt durch die allmählich erfolgende Löslichkeit des Kupferphosphates, anzupassen, so dass sie sich in einem, unter andern Verhältnissen für sie tödlichem Medium zu behaupten vermag. In hochkonzentrierten Lösungen erfolgt auch ohne Pufferzusatz in Knopscher Lösung eine Ausfällung von Phosphorsalzen. In einem solchen Falle kann nicht nur das Kupfer die wachstumshemmende Ursache sein, sondern ebensogut das Fehlen der Phosphorsäure, die durch das Metall in unlöslicher Form gebunden wird.

Den einzigen Ausweg bildet für solche Pufferungen die Verwendung von Zitraten, die das Metallsalz in Form einer Komplexverbindung in Lösung zu halten vermögen. Für unsere Verhältnisse war daher die Verwendung des bereits in den allgemeinen Erörterungen besprochenen Zitratpuffers nach McIlvaine (l. c.) gegeben.

Um eine Reduktion des Kupfers zu Kupferoxydul zu verhindern, durften die getrennt sterilisierten Lösungen von Zitrat + 1 % Glukose sowie K $\frac{1}{3}$ + Kupferzusatz erst nach dem Erkalten zusammengegossen werden.

b) Wirkungen auf *Chlorococcum infusionum.*

Mit einer Verdünnungsreihe von Konzentrationen zwischen 10^{-3} und 10^{-6} mol suchten wir vorerst die letale Zone des Kupfersulfates auf *Chlorococcum infusionum* zu ermitteln. Sowohl in reinen als auch gepufferten Nährlösungen führte eine Molarität von $50 \cdot 10^{-6}$ in allen Fällen zum Algentod, während diejenige von $20 \cdot 10^{-6}$ mol nicht immer tödlich, aber stark toxisch wirkte und nur spärliches Wachstum aufkommen liess. Bei einem Kupferzusatz von $2 \cdot 10^{-6}$ mol scheint der schädigende Einfluss des Metallsalzes aufzuhören, die Alge entwickelt sich analog der Kontrolle. Die in noch schwächeren Lösungen erhoffte Wachstumssteigerung trat nicht besonders hervor. Sämtliche Werte liegen entweder im Bereich des mittleren Fehlers, oder zeigen eine nur so geringe Zunahme, dass nach unseren bisherigen Kulturerfahrungen von einer oligodynamischen Reizwirkung nicht gesprochen werden kann (Tab. 11).

Dagegen fiel uns bei der täglichen Kontrolle der Kulturen das schon augenfällig viel intensivere Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in Verdünnungen wie $2 \cdot 10^{-6}$ mol und besonders 10^{-6} mol auf, das sich vor allem in den ersten 14 Tagen der Versuchszeit äusserte. In dieser Zeit wurden die Erträge der Kontrolle weit überholt, glichen sich jedoch nach 30 bis 40 Tagen wieder aus. Der Endwert der verschiedenen Kulturen ist daher zur Beurteilung dieser Frage allein nicht massgebend. Durch eine quantitative mehrmalige Bestimmung des Algengewichtes innerhalb der Versuchsdauer bestätigten wir diese Beobachtungen, wie aus Tab. 12 und Abb. 5 hervorgeht.

Tabelle 11.

Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in stark verdünnten Kupfersulfat-Nährlösungen. pH : 4,9. Kulturdauer : 40 Tage. Temperatur : 18°—27° C.

Konzentration $K^1/_3$ + 1 % Glukose + $CuSO_4$ mol	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-6}	98,1	2,6
10^{-7}	97,3	2,4
10^{-8}	99,8	2,6
10^{-9}	97,6	1,9
10^{-10}	101,1	1,7
Kontrolle $K\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	95,9	1,8

Tabelle 12.

Beziehungen zwischen Konzentration einer kupferhaltigen Nährlösung und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH : 5,13 mit Zitratpuffer. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 13°—18° C.

Tage	Konzentration : $K^1/_3$ + 1 % Glukose + $CuSO_4$ mol						$K^1/_3$ + 1 % Glukose	
	$10 \cdot 10^{-6}$		$2 \cdot 10^{-6}$		10^{-6}		Kontrolle	
	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
5	6,8	1,7	9,0	0,4	12,6	1,3	12,0	1,4
10	17,2	1,6	29,5	3,7	30,5	3,6	14,6	3,8
15	19,9	1,4	38,1	4,5	41,8	5,0	36,2	3,3
20	21,5	2,3	46,3	4,1	49,4	4,1	54,5	1,5
25	24,6	2,4	49,7	3,9	53,6	5,4	63,6	2,6
30	30,8	3,7	59,7	4,6	62,7	3,5	77,9	4,1
35	31,9	2,8	69,3	2,5	87,5	3,4	74,2	4,0
40	32,8	4,1	90,8	3,8	93,0	3,3	91,4	4,8
45	59,0	4,7	98,7	1,9	100,0	3,3	100,4	1,3

Die Kontrolle ergibt das Bild eines regelmässigen Wachstums. Sämtliche Kulturen in Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ mol und 10^{-6} mol waren ihr in den ersten 14 Tagen an Wachstumsenergie überlegen. Nach 20 Tagen scheint ein Ausgleich stattgefunden zu haben : Beide Kupferkurven verlaufen bis zum 30. Tage ungefähr parallel, an welchem Kurve 3 plötzlich von 62 mg auf 87 mg ansteigt. Bei Kurve 1 und der Kontrolle ist dieser Sprung um 5 Tage verzögert, aber nach Versuchs-

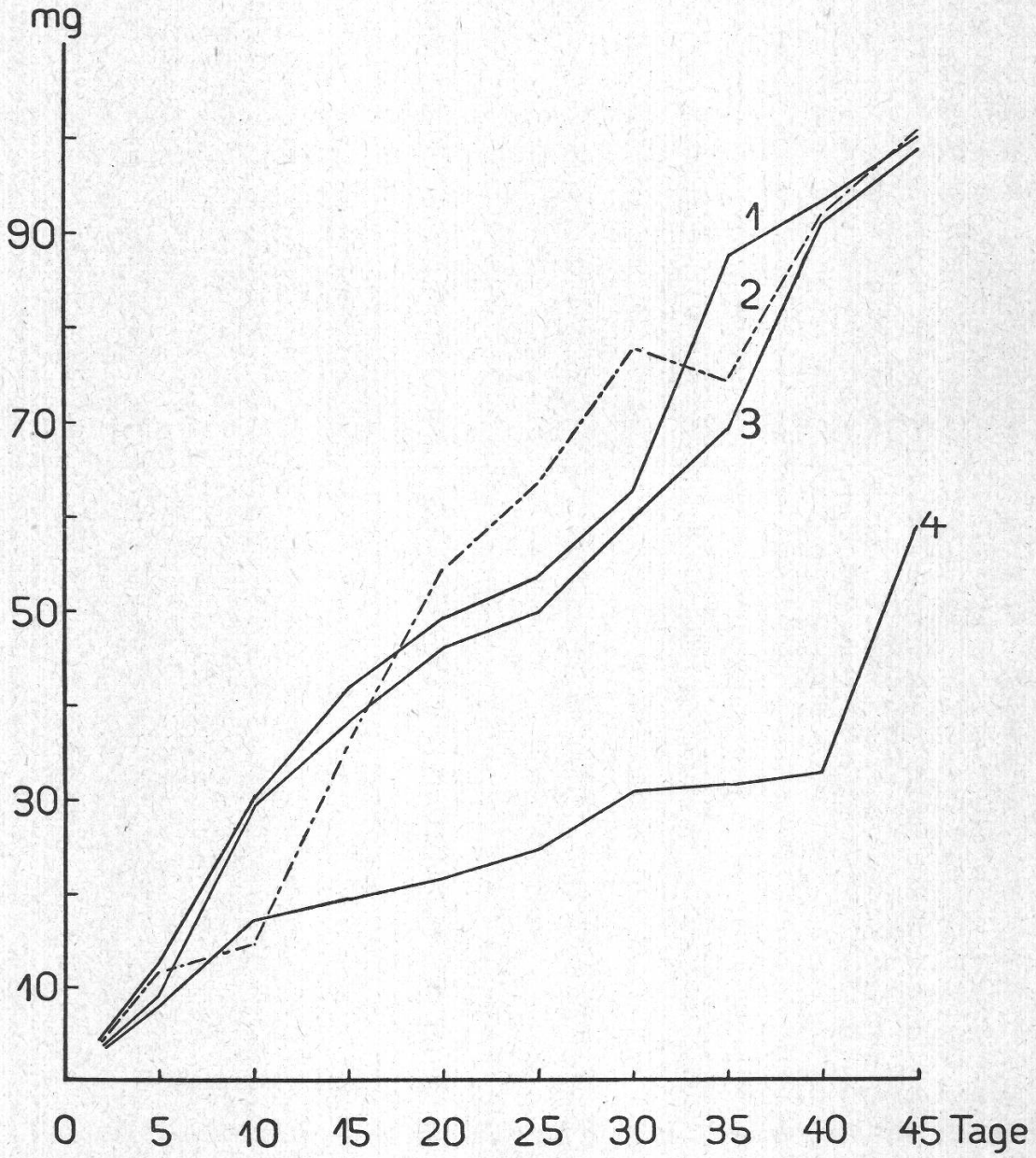


Abb. 5.

Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in Nährlösung von K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose mit Kupfersulfatzusatz und Zitratpuffer.

Kurve 1 : Kupfersulfatzusatz von 10^{-6} mol.
Kurve 2 : Kontrolle : K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose.
Kurve 3 : Kupfersulfatzusatz von $2 \cdot 10^{-6}$ mol.
Kurve 4 : Kupfersulfatzusatz von $10 \cdot 10^{-6}$ mol.

abbruch (45 Tage) treffen sich die Kurvenenden beinahe in einem Punkt, ein quantitativer Unterschied ist nicht mehr festzustellen.

Wie zu erwarten war, zeigte die Alge in der Verdünnung von $10 \cdot 10^{-6}$ mol eine stark gehemmte Entwicklung. Nach 40 Tagen scheint sie sich jedoch an das schädigende Kupfermilieu gewöhnt zu haben, denn bei Versuchsabbruch zeigte das Trockengewicht doch 59 mg. Einige Restkulturen, die wir aber nicht mehr tabellarisch auswerten wollten, ergaben am 60. Tag ein Gewicht von 78 mg. Die Vermutung, dass nach genügend langer Kulturdauer und der damit verbundenen Verringerung der Kupferionen in der Nährlösung infolge Aufnahme derselben durch das Plasma das Wachstum wieder normal einsetzen könne, ist höchst wahrscheinlich, da zugleich die Anpassungsfähigkeit der Alge an das gebotene Milieu beeinflussend wirkt.

Anschliessend möchten wir noch die eigenartigen Verhältnisse erörtern, wie sie Tab. 13 und Abb. 6 zum Ausdruck bringen.

Tabelle 13.

Beziehungen zwischen Konzentration einer kupferhaltigen Nährlösung und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH : 5,1, mit Phosphatpuffer. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 20°—28° C.

Tage	Konzentration: K 1/3 + 1 % Glukose + $CuSO_4$ mol						K 1/3 + 1 % Glukose	
	$20 \cdot 10^{-6}$		$2 \cdot 10^{-6}$		10^{-6}		Kontrolle	
	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
5	+	—	25,4	3,2	12,6	2,1	20,6	2,0
10	4,7	0,9	40,4	1,2	50,9	5,2	33,3	2,1
15	12,0	1,9	42,1	1,2	82,4	5,2	38,3	3,3
20	4,0	1,0	49,2	2,3	97,7	4,0	51,4	1,1
25	tot	—	54,9	1,8	69,7	5,1	51,7	2,2
30	tot	—	59,6	1,3	72,8	4,3	58,8	2,3
35	tot	—	58,1	2,3	73,7	2,3	69,4	3,1
40	tot	—	59,1	1,0	74,1	1,9	70,4	1,9
45	tot	—	—*	—	—*	—	74,7	1,2

* nicht bestimmt.

Im Gegensatz zur Zusammenstellung in Tab. 12 wurde bei diesem entsprechenden Versuch mit primärem und sekundärem Natriumphosphat auf gleiches pH gepuffert.

Ein Einfluss der Phosphate auf das Kupfer war in so geringen Verdünnungen nicht zu befürchten.

In einer Molarität von $20 \cdot 10^{-6}$ konnte sich *Chlorococcum infusionum* etwa 21 Tage erhalten. Nach 25 Tagen waren die meisten Kulturen massenhaft mit totem Zellmaterial durchsetzt, und nach einer Versuchsdauer von 30 Tagen lebten von 60 Kulturen nur noch deren 4.

Das Wachstum in $2 \cdot 10^{-6}$ molarer, also in einer 10fach verdünnteren Lösung, deckte sich beinahe mit dem Kontrollversuch (Kurve 3) in der Mitte der Versuchszeit (vgl. Tab. 12), hatte aber nach Abbruch des Versuches dessen Wert noch nicht erreicht. Überraschend wirkte das sehr gesteigerte Wachstum in einer Konzentration von 10^{-6} mol. Mit einem Gewicht von 97 mg nach 20 Tagen überholt diese Kurve sämtliche Werte. Es erfolgt alsdann ein Abfall auf 69 mg, um sich nachher auf

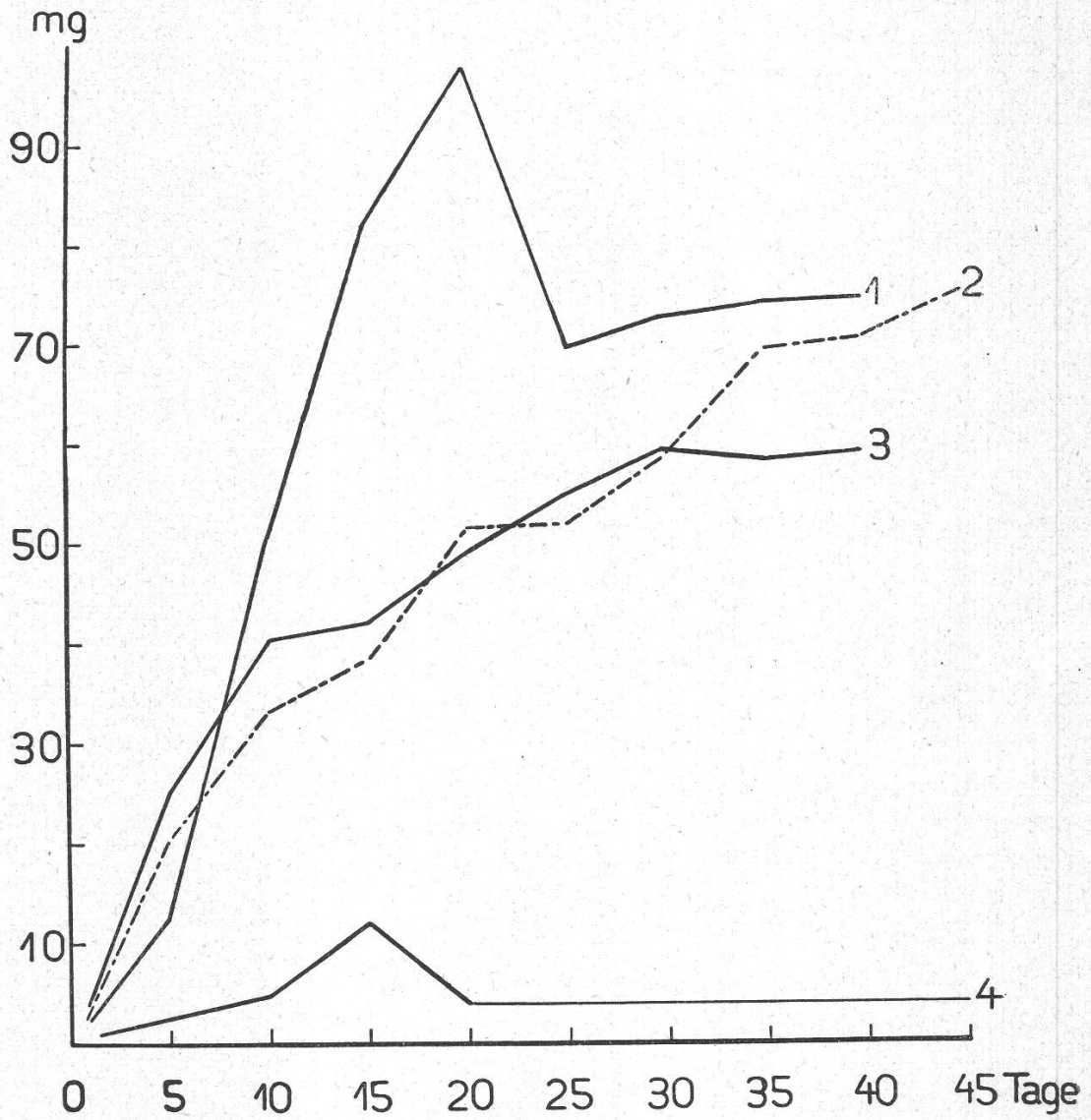


Abb. 6.

Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose mit Kupfersulfatzusatz und Phosphatpuffer. pH : 5.13.

Kurve 1 : Kupfersulfatzusatz von 10^{-6} mol.
Kurve 2 : Kontrolle : K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose.
Kurve 3 : Kupfersulfatzusatz von $2 \cdot 10^{-6}$ mol.
Kurve 4 : Kupfersulfatzusatz von $20 \cdot 10^{-6}$ mol.

dem konstanten Wert von 72 mg und 74 mg zu halten. Das Kurvenbild der Kontrolle verläuft normal.

Als Grund zu diesem raschen Aufstieg vermuten wir nebst andern optimalen Verhältnissen einen direkten stimulierenden Einfluss durch das Kupfersulfat. Schon in früheren Versuchen blieb es uns unerklärlich, wie vereinzelte Kulturen in schwachen Kupfersulfatlösungen schon nach wenigen Tagen ein üppiges Wachstum aufwiesen, während das Impfmaterial der übrigen Exemplare sichtlich noch keine Vermehrung erfahren hatte, ohne dass es aber gelang, für diese Tatsachen eine Begründung zu finden.

Nachdem aber ein gewisser Einfluss des Kupfers auf die Alge festgestellt war, versuchten wir diese Erscheinung durch folgenden Versuch noch eindrücklicher zu gestalten :

Zwei Reihen Kupfersulfatlösungen von $20 \cdot 10^{-6}$ und $10 \cdot 10^{-6}$ mol wurden mit *Chlorococcum infusionum* beimpft. In Übereinstimmung mit früheren Versuchen konstatierten wir in der Verdünnung von $10 \cdot 10^{-6}$ mol ein Wachstum, das sich deutlich von demjenigen in einem Nährmedium mit ein Cu-Gehalt von $20 \cdot 10^{-6}$ mol unterscheiden liess und sich auf die nicht messbare Menge des Impfmaterials beschränkte.

Fünf bis zehn Kulturen beider Verdünnungsserien wurden auf sterile Filter gebracht und so der Einwirkung der Kupferlösung entzogen. Mit je 100 cm^3 frischer, steriler Nährlösung mit einem pH von 5,0 spülten wir die Alge in neue, trocken sterilisierte Kolben. Eine Anzahl Kulturen behandelten wir so, dass sie erst nach zwei bis dreimaligem Auswaschen mit Wasser oder gepufferter Nährlösung in das kupferfreie Nährmedium versetzt wurden. Den Rest der Versuchsexemplare liessen wir ohne Behandlung weiter wachsen, d. h. sie wurden in der ursprünglichen Kupferlösung belassen und dienten als Kontrolle. Zu gleicher Zeit beimpften wir noch 10 Nährsubstrate von K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose mit *Chlororcoccum infusionum*. Nach 35 Tagen wurden die Ergebnisse verglichen.

Fünf unbehandelte Kulturen, einer Konzentration von $20 \cdot 10^{-6}$ mol ausgesetzt, gingen ein, während drei gegen das Ende der Versuchsdauer doch noch ein Trockengewicht von 50 mg aufwiesen.

Das Ergebnis der dem Kupfereinfluss frühzeitig entzogenen Algenzellen war in ihren neuen Nährmedien nach 35 Tagen folgendes :

Aus Konzentration :

$20 \cdot 10^{-6}$ mol	Trockengewicht mg
a) in frische Nährlösung gebracht	94,4 ± 2,2
b) mit Aqua destillata ausgewaschen und dann wie *a)*	91,1 ± 2,9
c) mit gepufferter Nährlösung ausgewaschen und dann wie *a)*	93,3 ± 5,0
d) Kontrolle. Nicht behandelt. (Nur 5 Kulturen lebend)	50,0 —

$10 \cdot 10^{-6}$ mol	Trockengewicht mg
a) in frische Nährlösung gebracht	$99{,}4 \pm 1{,}3$
b) mit Aqua destillata ausgewaschen und dann wie *a)*	$94{,}9 \pm 3{,}6$
c) mit gepufferter Nährlösung ausgewaschen und dann wie *a)*	$93{,}3 \pm 2{,}6$
Vergleichskultur : K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose frisch beimpft . . .	$72{,}6 \pm 3{,}1$

Sämtliche, einmal mit Kupfersulfat in Kontakt gekommenen Algenzellen von *Chlorococcum infusionum* erfuhren eine Wachstumsförderung, wobei die Art des Auswaschmittels ohne Bedeutung ist.

Von den mannigfachen Literaturversionen über die Art der Beeinflussung durch Kupfersulfat zitieren wir Rumm (1894), der den direkten Einfluss der Bordeauxbrühe auf Weinreben nicht nur in der Zerstörung parasitischer Pilze erblickt, sondern in einem chemotaktischen Reiz auf die Pflanze selbst. Auch Martin (1928) äussert sich im gleichen Sinne. Dass es sich dabei nicht um eine ausgesprochene Oberflächenwirkung oder chemische Reizerscheinung handeln kann, hat schon Zsigmondy (1898), zitiert bei Steinhart (1931), und v. Plotho (1920) durch den Aufnahmenachweis kolloidalen Goldes durch Pilzmyzelien widerlegt. Steinhart und Schwartz (1931) beschreiben eine Methode, nach der es gelingt, den Verlauf der Kupferaufnahme bei einer sich entwickelnden Kultur von *Aspergillus niger* zu verfolgen, und die uns in dieser Beziehung einige Anregungen gab.

c) Untersuchung der aktuellen Azidität in kupferhaltiger Nährlösung.

In Tab. 14 und Abb. 7 stellen die Kurven 3 und 4 die Aziditätsänderungen einer ungepufferten Kupfersulfatlösung mit der zugehörigen Kontrolle (Kurve 3) dar.

Die schon früher während den ersten Kulturzeiten gefundene Ansäuerung des Substrates tritt auch bei Zusatz von Kupfersulfat wieder auf. Die Ähnlichkeit der beiden Kurvenbilder ist besonders in den ersten und letzten Tagen der Versuchsdauer auffallend. Der Parallelismus der beiden Kurven wird eigentlich nur am 32. Tage gestört, indem die kupferhaltige Nährlösung von pH 4,4 auf 5,4 ansteigt. Diese Abweichung findet jedoch in den beiden zugehörigen Wachstumskurven 6 und 7 keine Analogie.

In einer gepufferten Nährlösung wird das Ausgangs-pH durch die Alge nicht verändert, und das Kurvenbild wird durch eine Gerade dargestellt (5). Die Pufferungsgerade der Kontrollösung deckt sich in ihrem Verlauf beinahe mit derjenigen von K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + $2 \cdot 10^{-6}$ mol $CuSO_4$ (1), und deshalb musste auf ihre Eintragung in Abb. 7 ver-

Tabelle 14.

Beziehungen zwischen Azidität und Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in einer ungepufferten sowie gepufferten, kupferfreien und kupferhaltigen Nährlösung von 2.10^{-6} mol mit der zugehörigen Kontrolle von K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose. pH : 5,13. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 13°—23° C.

1* : K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose (nicht gepuffert).
2* : K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + $CuSO_4$ von $2 \cdot 10^{-6}$ mol (nicht gepuffert).
3* : K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose (gepuffert).
4* : K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + $CuSO_4$ von $2 \cdot 10^{-6}$ mol (gepuffert).

Kulturdauer Tage	1* pH	2* pH	3* pH	4* pH	1*		2*		3*		4*	
					Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
Ausgangslösung	4,58	4,59	5,13	5,16								
2	4,57	4,53										
3	4,47	4,37										
5	4,37	4,54	5,09	5,20					6,8	1,7	12,0	1,4
7	4,22	4,40			19,7	3,5	15,7	2,2				
10			4,99	5,07					29,5	3,7	29,5	3,8
12	3,61	3,72			21,1	2,1	17,0	1,9				
15	3,69	3,92	4,99	5,01	26,4	2,2	24,4	0,8	38,1	4,5	36,2	3,3
18	3,71	4,01			22,3	1,8	25,7	1,5				
20			4,92	5,01					46,3	4,1	54,6	1,5
23	4,04	4,43			30,3	0,5	34,5	1,7				
25			5,12	4,98					53,6	5,4	63,6	2,6
28	4,20	4,45			42,8	1,6	41,8	1,2				
30			4,97	4,99					59,7	4,6	77,9	4,1
32	4,64	5,40			42,0	0,7	36,6	1,0				
35	4,99	5,10	4,92	4,92	40,9	2,4	35,2	1,0	69,3	2,5	74,2	4,0
40	5,29	5,63	4,95	4,97	45,8	2,1	42,5	1,1	90,8	3,8	91,4	4,8
45	5,81	5,83	4,91	5,14	46,2	2,2	43,4	1,3	98,7	1.9	100,4	1,3

zichtet werden. Das Wachstum der beiden Serien (Kurve 1 und 2) verläuft mit grösster Regelmässigkeit, und eine direkte Steigerung ist nur nach dem 15. Tag zu konstatieren.

Zusammenfassend ergibt das Tabellenbild, dass ein Kupfersulfatzusatz von geringer Konzentration die Lebensbedingungen der Alge nicht zu stören vermag. Auch die Aziditätsverhältnisse in den Versuchslösungen mit und ohne Kupfersulfat bleiben sich gleich und können voneinander nicht unterschieden werden.

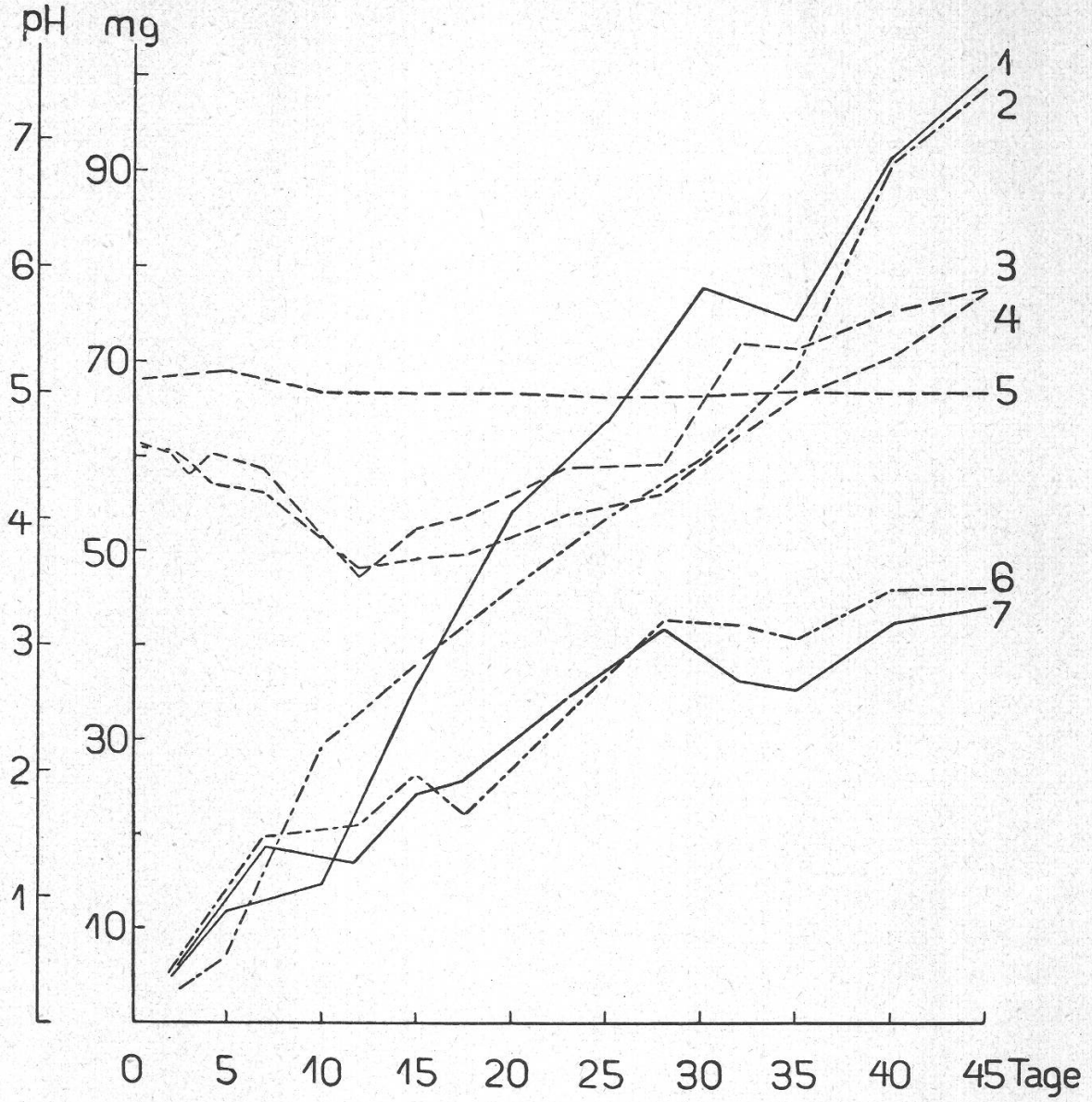


Abb. 7.

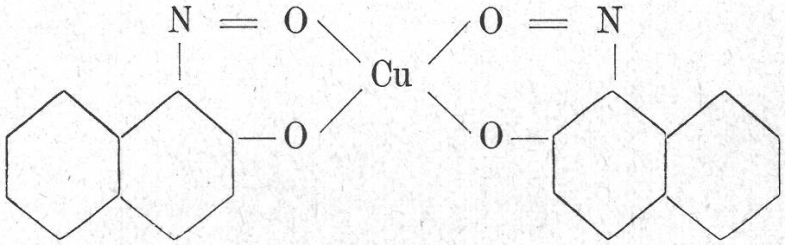
Azidität und Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in gepufferter und ungepufferter, kupferhaltiger und kupferfreier Nährlösung.

Kurve 1: Wachstum in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose, Kupfersulfatzusatz von $2 \cdot 10^{-6}$ mol. gepuffert, pH: 5,13.
Kurve 2: Wachstum in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose, gepuffert, pH: 5,13.
Kurve 3: pH-Verlauf in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose.
Kurve 4: pH-Verlauf in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose, Kupfersulfatzusatz von $2 \cdot 10^{-6}$ mol.
Kurve 5: pH-Verlauf in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose, gepuffert, pH: 5,13.
Kurve 6: Wachstum in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose.
Kurve 7: Wachstum in K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose, Kupfersulfatzusatz von $2 \cdot 10^{-6}$ mol.

d) Nachweis und quantitative Bestimmung des Kupfers im Algenplasma.

Hauptzweck unserer nachfolgenden Untersuchungen war, eine brauchbare Methode zu finden, um das von der Alge eventuell aufgenommene Kupfer nachweisen und wenn möglich quantitativ bestimmen zu können.

Steinhart und Schwartz (l. c.) führten ihre Kupferbestimmung in Pilzmyzelien mit α Nitroso - β Naphthol durch. Diese organische Verbindung ist in Anwesenheit von Ammoniak in Chloroform unlöslich, bildet aber mit Schwermetallen eine Komplexverbindung von nachstehender Formel :



die sich nun in Chloroform auflöst.

Die beiden genannten Autoren zitieren folgendes Verfahren :

> « Nach der Ausschüttelung mit Chloroform wird die Chloroformschicht in das eine Kolorimetergefäss, und die auf gleiche Weise aus einer bekannten Kupferkonzentration hergestellte Standardlösung in das andere zum Vergleich hineingebracht. »

Wir verzichteten jedoch auf die Anwendung dieser Methode, da auch ohne Kupferzusatz aus rein physikalischen Gründen immer wechselnde Mengen von Farbstoff in die Chloroformschicht mitgerissen wurden. Das Verfahren gestaltet sich für Serienuntersuchungen ziemlich umständlich und die erhaltenen Werte waren unbefriedigend.

Eine weitere diesbezügliche Anregung verdanken wir Herrn Dr. A. Ammann, Assistent an der chemisch-analytischen Abteilung der E. T. H., der uns auf eine viel einfachere, ebenfalls kolorimetrische Kupferbestimmung nach Laget (1935) mit Hilfe von Natriumdiaethyldithiocarbamat aufmerksam machte.

Laget beschreibt seine Methode wie folgt :

> « In Abwesenheit anderer Elemente werden 5 cm³ der Cu-Lösung mit 5 cm³ 95 % Alkohol und 1 cm³ der 1 % alkoholischen Reagenslösung versetzt und die Lösung kolorimetriert. Damit lässt sich Cu in Mengen von 0,1 γ bis 100 γ bestimmen. Fremde Metalle haben folgenden Einfluss : In ammoniakalischer Lösung stören Zink und Cadmium nicht, auch in Gegenwart von 200 mg Zn oder 100 mg Cd auf 20 γ Cu. Mangan liefert mit dem Reagens einen in Alkohol braunvioletten, Eisen einen rosaroten Niederschlag. Die Cu-Bestimmung ist in diesem Falle möglich, wenn

Fe nur in Spuren vorliegt. In Gegenwart von Magnesium gibt man etwas Ammonzitrat dazu. »

Die Aufgabe, kleine Kupfermengen im Algenplasma zu bestimmen, wurde von uns nach folgendem Verfahren gelöst:

Das Trockengewicht der Alge wird auf vorgewogenen, aschenfreien Filtern bestimmt. Diese werden solange mit redestilliertem Wasser ausgewaschen bis die Waschflüssigkeit auf $^1/_{10}$ des Volumens eingedampft, bei Zugabe dieses Cu-Reagens keinen Farbunterschied, verglichen mit Aqua redestillata als Blindprobe, mehr ergibt. In Porzellantiegeln, denen eine Behandlung mit reinster Schwefelsäure voranging, wurden Filter und Alge verbrannt, hernach geglüht, wobei das vorhandene Kupfersulfat in Kupferoxyd übergeht, das sich nach dem Erkalten auf Zusatz von 2 cm^3 analysenreiner Schwefelsäure (Merck) wiederum als Kupfersulfat löst. Auf dem Sandbade wird das Lösungsmittel unter Zugabe einiger Tropfen reinster Salpetersäure abgedampft, und der Rückstand in 5 cm^3 Aqua redestillata gelöst. Letzterer wird quantitativ in das Kolorimeter gebracht, mit Alkohol und dem Reagens auf die vorgeschriebenen 11 cm^3 ergänzt und mit einer, der zu bestimmenden Menge Kupfer ungefähr aequivalenten Standardlösung verglichen.

Die fraglichen Konzentrationen lassen sich mit Hilfe einer Eichkurve leicht feststellen, wobei sie als Mittelwerte der theoretischen und der durch Kolorimetrierung ermittelten Geraden zu betrachten sind.

Tab. 15 enthält eine kurze Zusammenstellung von Algengewicht und aufgenommenem Kupfer.

Tabelle 15.

Beziehungen zwischen Algengewicht und Kupferaufnahme durch *Chlorococcum infusionum*. Lösung ungepuffert. Ausgangs-pH: 4,51. Temperatur: 14°—20° C.

Einzel-Trockengewicht mg	Konzentration $K^1/_3 + 1\,\%$ Glukose + $CuSO_4$ mol	Cu-Aufnahme durch die Alge mol
25,6	$2 \cdot 10^{-5}$	$7{,}3 \cdot 10^{-6}$
28,2		$7{,}9 \cdot 10^{-6}$
29,8		$6{,}7 \cdot 10^{-6}$
33,1		$7{,}2 \cdot 10^{-6}$
37,0		$7{,}7 \cdot 10^{-6}$
42,0		$8{,}8 \cdot 10^{-6}$
45,4		$9{,}2 \cdot 10^{-6}$
50,0		$11{,}0 \cdot 10^{-6}$
42,9	10^{-5}	$6{,}6 \cdot 10^{-6}$
45,4		$2{,}0 \cdot 10^{-6}$
47,0		$6{,}7 \cdot 10^{-6}$
49,7		$6{,}4 \cdot 10^{-6}$
50,0		$8{,}2 \cdot 10^{-6}$
50,2		$3{,}0 \cdot 10^{-6}$
53,4		$7{,}6 \cdot 10^{-6}$
59,4		$4{,}3 \cdot 10^{-6}$

In einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol Kupfer nimmt mit der Quantität der Alge auch der Kupfergehalt deutlich zu.

Ein Trockengewicht von 33,1 mg enthält bereits $7{,}2 \cdot 10^{-6}$ mol gebundenes Kupfer, dessen Gehalt sich proportional der Algenmenge steigert, und mit 50,0 mg bereits $11{,}0 \cdot 10^{-6}$ mol des Metalles aufzunehmen imstande ist. Der hier beobachtete periodische Verlauf von Gewicht und Kupferaufnahme kam in der nächst höheren Verdünnung von 10^{-5} mol Kupfersulfat nicht mehr so deutlich zum Ausdruck. Bei gleichen Gewichtsmengen von *Chlorococcum infusionum* schwankt der Kupfergehalt in einer Grössenordnung von $8{,}2 \cdot 10^{-6}$ mol und $3{,}0 \cdot 10^{-6}$ mol (vgl. Tab. 15).

Bei der Aufnahme von Metallsalzen, insbesondere von Kupfer, wirken sicherlich Faktoren mit, die als Problem für sich noch der Abklärung warten. Unzweifelhaft ist eine feste, vermutlich chemische Bindung des Kupfers durch *Chlorococcum infusionum* festgestellt worden, ohne aber diese Tatsache einer Gesetzmässigkeit unterstellen zu können. Immerhin muss das Auswaschverfahren lange Zeit genug fortgesetzt werden, bis mit Sicherheit von einem biologisch gebundenen Kupferanteil gesprochen werden darf.

Zur Abklärung dieser Frage liessen wir auf ein totes Pilzmyzel (Fusarium spec.) mit einem nachträglich ermittelten Trockengewicht von 2,7 g eine Kupfersulfatlösung von 10^{-3} mol mehrere Tage hindurch einwirken. Die auf einer Nutsche ausgewaschene Menge des Pilzmaterials brauchte innerhalb von 2 Stunden 1500 cm^3 Aqua redestillata, bis die Waschflüssigkeit kupferfrei war. Etwa die Hälfte des getrockneten Myzels wurde verbrannt, im Porezellantiegel geglüht, und der Rückstand mit Schwefelsäure aufgenommen. Die kolorimetrische Bestimmung mit Natriumdiaethyl-dithiocarbamat vermochte nicht einmal Spuren von Kupfer festzustellen. Eine an totem Pilzmyzel nur adsorptiv zurückgehaltene Kupfermenge lässt sich daher ohne weiteres wieder auswaschen.

e) Oligodynamische Nachwirkung von Kupfersulfat in Glasgefässen.

Nägeli (l. c.) erwähnt in seinen grundlegenden Untersuchungen mit Kupfersulfat an *Spirogyrazellen* die sogenannte oligodynamische Nachwirkung einiger Metallsalze bei gewissen Glassorten, die auch nach Entzug der eigentlichen Kupferlösung ihnen längere Zeit innewohnt.

Mit diesem Versuch war nicht nur eine Prüfung vorgenannter Erscheinung auf *Chlorococcum infusionum* beabsichtigt, sondern im Zusammenhang damit war festzustellen, ob die gewöhnliche mechanische Reinigung mit heissem Soda- und Brunnenwasser der mit Kupfer in Berührung gekommenen Glaswaren genüge, oder ob dazu noch eine Behandlung mit Schwefelsäure notwendig sei.

Die Erlenmeyerkolben, in denen 35 Tage lang Kupfersulfat in Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-6} mol gelegen hatte, wurden dem üblichen Reinigungsverfahren unterworfen und hernach mit 100 cm³ K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose und der Algensuspension beschickt. Sämtliche Gefässe, welche einst die 0,1 molaren Kupferlösungen enthielten, zeigten deutlich gehemmte Kulturen, deren Unterschied gegenüber der Kontrolle auch quantitativ festgehalten werden konnte.

Tabelle 16.

Beziehungen zwischen oligodynamischer Nachwirkung durch Kupfersulfat an Glasgefässen und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 5,2. Kulturdauer: 35 Tage. Temperatur: 15°—21° C.

Frühere $CuSO_4$ Konzentration mol	Trockengewicht nach 35 Tagen mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-1}	47,1	2,1
10^{-2}	71,4	2,4
10^{-3}	67,3	2,3
10^{-4}	73,5	2,1
10^{-5}	69,4	1,9
10^{-6}	66,2	3,2
Kontrolle K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose . .	68,7	1,1

Die höheren Verdünnungsreihen vermochten unser Glas oligodynamisch nicht zu beeinflussen, weshalb eine spezielle Behandlung bei der Reinigung nur für genannte Konzentrationsverhältnisse nötig ist, die jedoch praktisch ausser Betracht fallen.

f) Untersuchung von Aqua destillata verschiedener Herkunft und seine Brauchbarkeit für biologische Zwecke.

Bei Reinigung der Destillationsanlage unseres Institutes bezogen wir das für unsere Nährsubstrate notwendige Aqua destillata jeweils aus dem Chemiegebäude der E. T. H. Es war oft unerklärlich, wie derselbe Versuch unter gleichen Voraussetzungen sich ganz anders äusserte oder sogar versagte. Nach Ausarbeitung der Cu-Bestimmungsmethode untersuchten wir daher systematisch das Aqua destillata einiger Institute rein qualitativ auf den Cu-Gehalt und seine Brauchbarkeit für biologische Zwecke.

1. Aqua destillata aus dem Pharmazeutischen Institut der E. T. H.

Die Destillationsapparatur besteht aus verzinntem Kupfer. Der Auslauf ist Messing. Die Prüfung auf Cu mit unserem Reagens (Schering, Kahlbaum) fiel erst nach Eindampfen des Wassers auf den zehnten Teil seines Volumens leicht positiv aus.

2. Aqua destillata des Institutes f. spez. Botanik der E. T. H.

Das Steigrohr vom Kondensor in die Kühlanlage ist unverzinntes Kupfer. Das Leitungsrohr, welches den Kondensor mit dem Ausgleichsgefäss verbindet, besteht ebenfalls aus reinem Kupfer.

Die Prüfung auf Cu ergab wiederum erst nach dem Eindampfen auf den zehnten Teil des Volumens einen positiven Ausschlag.

3. Aqua destillata aus dem Chemiegebäude der E. T. H. (Techn. Abteilung).

Die Apparatur ist nur zum Teil verzinnt. 5 cm^3 Wasser kolorimetriert ergab einen Cu-Gehalt von 10^{-4} mol.

4. Aqua destillata aus der Kantonsapotheke Zürich.

Die Kupferapparatur ist verzinnt. Nur die Kühlschlange ist zum Teil verzinkt.

50 cm^3 Wasser auf Cu geprüft und wie sub 3 eingedampft, liess nur Spuren des Metalles nachweisen.

5. Aqua redestillata.

Das Wasser unseres Institutes erfuhr durch eine nochmalige Destillation in Glasgefässen eine derartige Verbesserung, dass jede Reaktion auf Cu negativ ausfiel.

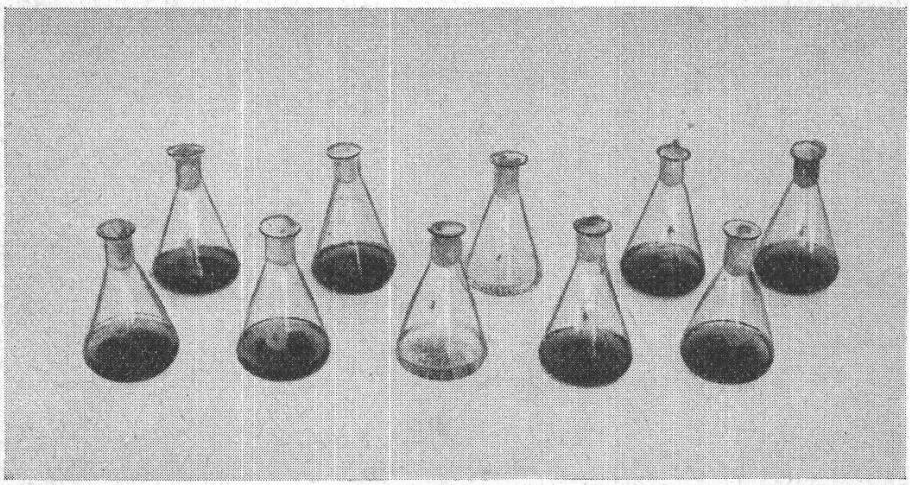
Tabelle 17.

Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in Aqua destillata verschiedener Herkunft und gleichbleibenden Versuchsbedingungen. pH : 5,1. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 14°—19° C.

	Herkunft des Aqua destillata	Tage	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
1	Pharmaz. Inst. E. T. H.	14	95,8	2,0
		45	186,5	2,7
2	Inst. f. Spez. Botanik E. T. H.	14	95,4	2,3
		45	174,4	2,8
3	Chemiegebäude E. T. H. (Techn. Abteilung)	14	17,9	2,4
		45	27,4	1,0
4	Kantonsapotheke Zürich	14	67,4	1,9
		45	162,0	2,4
5	Aqua redestillata.	14	100,2	3,5
		45	176,9	3,9

Bevor die verschiedenen Wasser mit den Nährsalzen zu Knopscher Lösung verarbeitet und gepuffert wurden, unterzogen wir auch sämtliche dazu notwendigen Chemikalien einer Prüfung auf Kupfer. Einzig das Kaliumchlorid musste durch das entsprechend analysenreine Präparat ersetzt werden.

Die biologischen Ergebnisse sind in Tab. 17 und Abb. 8 wiedergegeben. Der reichliche Cu-Gehalt im Aqua destillata des Chemie-



1 2 3 4 5

Abb. 8.
Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in Aqua destillata verschiedener Herkunft nach 14tägiger Kulturdauer. Jede Nummer umfasst 2 Kolben. Die Nummern entsprechen der ersten Kolonne von Tab. 17.

gebäudes von 10^{-4} mol wirkte nicht tödlich, aber so stark auf das Algenmaterial, dass letzteres mit 17,4 mg nach 14, und 27,4 mg nach 45 Tagen weit im Rückstand blieb.

In der Abb. 8 kommt die Differenz gegenüber den andern 4 Kulturen deutlich zum Ausdruck.

Überrascht haben ebenfalls die stark gehemmten Kulturen im Aqua destillata der Kantonsapotheke: Das Algenwachstum bleibt in der ersten Hälfte der Versuchszeit mit 30 mg bedeutend zurück gegenüber normaler Entwicklung in Wasser Nr. 1, 2 und 5. Nach 35 Tagen hat wohl infolge Anpassung der Alge an die gegebenen Verhältnisse ein Ausgleich stattgefunden, so dass nach Ablauf der Versuchsdauer mit 162 mg ein noch befriedigendes Gewichtsmittel erreicht wird. Aus diesem Grunde unterzogen wir das Wasser noch einer Prüfung auf Zink und andere Schwermetalle, die mit Dithiokarbazon positiv ausfiel. Diese Differenzierung kommt durch das photographische Bild (Abb. 8) nicht zum Ausdruck.

Zusammenfassend bestätigen diese Untersuchungen die schon in Abschnitt II Kapitel 1 erwähnte Notwendigkeit, sämtliche für bio-

logische Arbeiten nötigen Ingredienzen auf ihren Reinheitszustand zu prüfen.

Eine Redestillation des Wassers ist nur für Spezialzwecke erforderlich.

4. *Giftwirkungen organischer Chemikalien auf Chlorococcum infusionum.*

A. Allgemeine Übersicht und Methode.

Zur Bearbeitung dieses Problems wählten wir solche Stoffe, die in der Medizin bereits als wirksame Antiseptica bekannt sind, um damit zugleich die von Bechhold (1906) erwähnten Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung auch bei Algen nachzuweisen.

Tab. 18 gibt eine Übersicht der in unsern Versuchen verwendeten organischen Chemikalien und ihrer wichtigsten chemischen und physikalischen Eigenschaften.

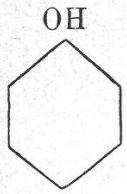
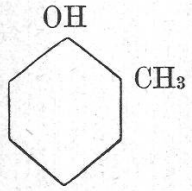
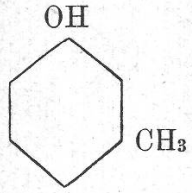
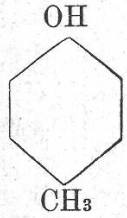
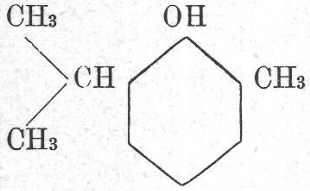
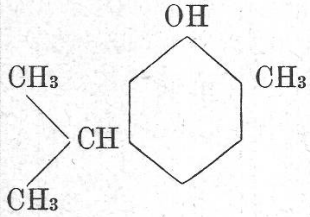
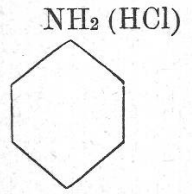
Die Sterilisation dieser organischen Lösungen führten wir anfänglich nach der üblichen Methode durch, bis uns die grossen Trockengewichtsdifferenzen bei den Molarlösungen der Karbolsäure auffielen. Eine Konzentration von 10^{-3} mol ergab bereits ein unwahrscheinlich gutes Wachstum von 82,3 mg Trockengewicht. Es muss eben berücksichtigt werden, dass sämtliche Körper der Phenolgruppe trotz ihres hohen Siedepunktes mehr oder weniger leicht wasserdampfflüchtig sind. In der toxikologischen Analyse findet diese Eigenschaft in der Auffindung und Trennung der phenolischen Körper durch die Wasserdampfdestillation ihre Anwendung.

Mit Ausnahme von Anilinum hydrochloricum stellten wir für sämtliche, in Tab. 18 angeführten Desinfektionsmittel sogenannte Stammkonzentrationen her. Für die Sterilisation, die in Glasstopfengläsern und bei strömendem Wasserdampf erfolgte, genügten 20 Minuten. Mit einer sterilen Heber-Pipette wurden die zur erwünschten Molarität notwendigen cm^3 der Konzentratlösung in die bereits gepufferte, sterile Nährflüssigkeit gebracht. Die nach der erst beschriebenen Methode aufgetretenen Schwankungen blieben aus.

Tab. 19 zeigt das Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in phenolischer Nährlösung nach Methode I und II sterilisiert.

Im ersten Verfahren entweicht durch die Sterilisation soviel Phenol, dass schon bei 10^{-3} mol ein beinahe optimales Wachstum auftritt, wogegen Methode II zeigt, dass die toxische Wirkung ihren Einfluss noch in der Verdünnung von 10^{-4} mol geltend macht. Dieselben Erscheinungen bewirkten auch sämtliche Kresole, während bei Thymol und Carvacrol die vitale und letale Zone durch die Art des Sterilisationsverfahrens nicht verschoben wurde.

Tabelle 18.
Zusammenstellung der verwendeten organischen Chemikalien und ihrer wichtigsten physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Substanz	Chemische Formel	F. P. °C	S. P. °C	Löslichkeit in H_2O	Molekulargewicht
Phenol Ph. H. V.		43°	183°	1 : 15	94,05
Roh-Kresol Ph. H. V.	$C_6H_4(OH)(CH_3)$		185°—210°*	1 : 100	108,06
Ortho-Kresol		30°	190°	1 : 40	108,06
Meta-Kresol		4°	201°	1 : 190	108,06
Para-Kresol		37°	200°	1 : 55	108,06
Thymol D A. B.		44°	230°	1 : 1100	150,11
Carvacrol		flüssig	236°	schwer löslich	150,11
Anilin (HCl.)		6°	184°	sehr leicht löslich	129,53

* Hauptfraktion

Tabelle 19.

Beziehungen zwischen Sterilisationsverfahren, Phenol-Gehalt und Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 5,0. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 18°—25° C.

Konzentration $K^1/_3$ + 1 % Glukose + Phenol mol	Methode I (unzweckmässig) Trockengewicht mg	Methode I (unzweckmässig) Mittlerer Fehler ± mg	Methode II (richtig) Trockengewicht mg	Methode II (richtig) Mittlerer Fehler ± mg
$2 \cdot 10^{-3}$	tot	—	tot	—
10^{-3}	82,4	5,1	tot	—
$5 \cdot 10^{-4}$	77,8	5,9	16,9	2,1
$3 \cdot 10^{-4}$	85,7	4,4	17,4	2,4
$4 \cdot 10^{-4}$	92,8	3,1	—	—
$2 \cdot 10^{-4}$	95,1	2,3	38,3	4,2
10^{-4}	108,6	6,8	49,5	1,1
$5 \cdot 10^{-5}$	—	—	65,0	1,0
$2 \cdot 10^{-5}$	99,2	5,2	61,8	2,1
10^{-5}	91,5	6,0	67,2	2,3
$2 \cdot 10^{-6}$	94,8	5,4	63,8	1,9
10^{-6}	98,8	7,4	68,1	3,4
Kontrolle $K\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	95,4	6,5	65,4	2,2

In der nachfolgenden Besprechung der einzelnen chemischen Körper verzichten wir auf die Wiedergabe der nach dem Verfahren I erhaltenen Werte.

B. Versuche mit Phenol.

Zur Verwendung gelangte ein den Ansprüchen der PH. H. V. entsprechendes Präparat.

Konzentrationen bis zu $5 \cdot 10^{-4}$ mol wirkten auf die Alge innert 5 Tagen tödlich. Dagegen vermochte sich *Chlorococcum infusionum* in einer Molarität von $5 \cdot 10^{-4}$ in sämtlichen Versuchen zu behaupten, wobei aber die Kultur auf die Menge des Impfmaterials sistiert blieb. In einer Verdünnung von $2 \cdot 10^{-4}$ mol ist das Wachstum schon intensiver, das Gebiet der hemmenden Zone ist damit überschritten. Wenn sich der Einfluss des Phenols in 10^{-4} mol noch geltend macht, so deckt sich der Wert der nächst höheren Verdünnung von $5 \cdot 10^{-5}$ mol bereits mit demjenigen der Kontrollkurve.

Zugleich wurde das Verhalten unserer Alge in $K\frac{1}{3}$ ohne Glukose, aber mit leichtem Phenolzusatz, einer Untersuchung unterworfen. Lohmann (1933) glaubt, dass unter Umständen bei Entzug jeglicher anderer Kohlenstoffquelle auch ein phenolischer Körper durch den Mikroorganismus angegriffen werden könnte, vorausgesetzt, dass derselbe nicht in einer, die Lebensfunktionen störenden Menge vorhanden ist.

Gegenüber der Kontrollösung von K $\frac{1}{3}$ blieb das Wachstum der Alge in einem leicht phenolhaltigen Nährmedium um ein weniges zurück (Tab. 20).

Tabelle 20.
Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in kohlenstoffreier Nährlösung mit Zusatz von Phenol. pH : 5,0. Kulturdauer : 45 Tage. Temperatur : 24°—27° C.

Konzentration K $^1/_3$ + Phenol mol	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
$2 \cdot 10^{-4}$	17,4	2,4
$1{,}6 \cdot 10^{-4}$	14,1	1,3
$1{,}4 \cdot 10^{-4}$	15,4	1,8
$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	16,2	1,1
10^{-4}	14,8	1,0
$5 \cdot 10^{-5}$	17,3	1,0
$2 \cdot 10^{-5}$	19,1	1,2
Kontrolle K $\frac{1}{3}$ . .	23,8	1,9

Während unter optimalen Verhältnissen eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol Phenol die Alge nicht mehr zu beeinflussen vermag, ist bei Entzug der Kohlenstoffquelle infolge der geringern Vitalität die Einwirkung noch wahrzunehmen. Auf jeden Fall wurden die von uns verwendeten Karbolsäuremedien von der Alge nicht zur Verbesserung der Assimilationsverhältnisse benützt.

C. Versuch mit technischem Kresol.

Ebenso prüften wir ein technisches Kresol ohne nähere Angabe der Zusammensetzung in seiner Wirkung gegenüber *Chlorococcum infusionum.*

Während sich unmittelbar die Desinfektionswerte unserer untersuchten Chemikalien nur mit der zugehörigen Kontrolle vergleichen lassen, kann dieser Kresolversuch demjenigen des Phenols ohne Bedenken gegenübergestellt werden, da er unter denselben Bedingungen durchgeführt wurde. Die Gewichte beider Kontrollkulturen betrugen 65 mg im Mittel.

Tab. 21 und Abb. 9 geben die Werte und den Wachstumsverlauf der Alge in Cresolum technicum wieder. Die Trockengewichte des Phenols aus Tab. 19 sind zum Vergleich ebenfalls im Kurvenbild enthalten. Übereinstimmend mit Schneider (1906) übertrifft das vorliegende technische Kresolprodukt schon merklich die Desinfektionskraft des Phenols, besonders im Gebiet der letalen Zone. In einer Konzentration

Tabelle 21.

Beziehungen zwischen Kresolgehalt (techn.) einer Nährlösung und Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 4,98. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 18°—24° C.

Konzentration K 1/3 + 1 % Glukose + Kresol mol	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-3}	tot	—
$6 \cdot 10^{-4}$	tot	—
$5 \cdot 10^{-4}$	11,5	1,4
$4 \cdot 10^{-4}$	9,0	4,1
$3 \cdot 10^{-4}$	14,8	1,3
$2,5 \cdot 10^{-4}$	26,0	2,3
$2 \cdot 10^{-4}$	35,1	4,3
10^{-4}	44,9	1,6
$5 \cdot 10^{-5}$	58,4	1,8
$2 \cdot 10^{-5}$	71,3	2,4
10^{-5}	63,1	2,5
Kontrolle K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	65,2	1,7

von $5 \cdot 10^{-4}$ mol erlag von 10 Kulturen die Hälfte bei Einwirkung von Kresol, während bei gleicher Phenolkonzentration die ganze Serie sich zu behaupten vermochte. Bechhold (l. c.) bringt diese Tatsache in Zusammenhang mit der Substitution eines Alkyls im Benzolrest, und sieht mit Bokorny (1896) in der Stellung der Methylgruppe am Benzolring den Wert des Desinfektionsmittels. Die Giftintensität einzelner isomerer Körper der Phenolreihe auf *Spirogyrazellen* konnte er wohl deutlich unterscheiden, aber nicht in eine allgemeine Regel fassen, indem z. B. bald das Paranitrophenol, bald dessen Ortho-Verbindung auf die Organismen giftiger wirkten.

D. Versuche mit Roh-Kresol PH. H. V., Ortho-Kresol, Para-Kresol, Meta-Kresol.

Mit dem Cresolum crudum PH. H. V. und seinen drei, in Tab. 22 angeführten Homologen, prüften wir durch Messung des Einwirkungsgrades auf *Chlorococcum infusionum* ebenfalls die Möglichkeit einer quantitativen Differenzierung.

Das Roh-Kresol, im Sinne des Schweizerischen Arzneibuches, stellt ein Gemisch der drei isomeren Kresole dar mit einem Mindestgehalt von 50% Meta-Kresol. Die 3 isomeren Kresole sind im Handel einzeln käuflich und stammen aus der chemischen Fabrik vorm. B. Siegfried, Zofingen.

Sämtliche Kulturen waren in bezug auf Zeit, pH und Temperatureinwirkung denselben Bedingungen unterstellt.

Der Einfluss der 4 Kresole und ihre Beziehungen zueinander geht aus Tab. 22 hervor. Auch unter Berücksichtigung des mittleren Fehlers wirkte von den drei isomeren Kresolverbindungen diejenige der Ortho-Stellung am stärksten auf unser Untersuchungsmaterial ein. Das intensiv gehemmte Wachstum liess eine Wägung erst in einer Verdünnung

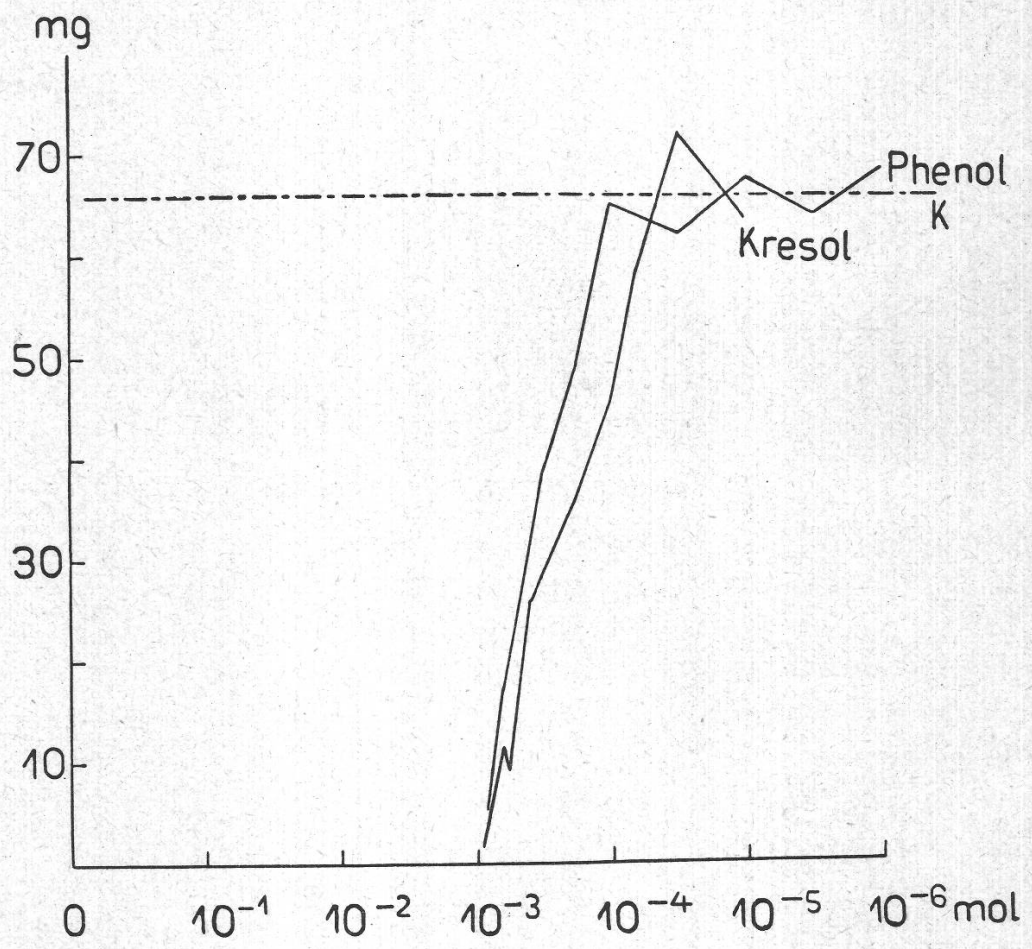


Abb. 9.
Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in phenol- und kresolhaltiger Lösung nebst der zugehörigen Kontrolle (K).

von $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol zu, und mit 45,6 mg Trockengewicht in $5 \cdot 10^{-5}$ mol steht es der Desinfektionskraft des Roh-Kresols (43,5 mg) nicht nach.

Die Giftstärke von Meta-Kresol und Para-Kresol war in unserm Falle gleich, während das Pharmakopöe-Produkt von Cresolum crudum unstreitig die grösste Desinfektionswirkung zeigte.

Wenn auch die letale Zone gegenüber den drei isomeren Verbindungen keine Erweiterung erfährt, so reicht doch dessen toxischer Einfluss über eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ mol hinaus, die für Para- und Meta-Kresol bereits Grenze und Übergang zu normalem Wachstum bedeutet.

Tabelle 22.

Beziehungen zwischen chemischer Konstitution der 4 Kresollösungen und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 5,0. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 13°—21° C. + = lebend, aber quantitativ nicht messbar.

Konzentration K 1/8 + 1% Glukose + Kresol mol	Ortho-Kresol		Meta-Kresol		Para-Kresol		Roh-Kresol PH. H.V.	
	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-3}	tot	—	tot	—	tot	—	tot	—
$7 \cdot 10^{-4}$	tot	—	tot	—	tot	—	tot	—
$5 \cdot 10^{-4}$	+	—	7,2	1,4	10,6	1,5	+	—
$3 \cdot 10^{-4}$	+	—	27,5	1,7	14,9	2,9	+	—
$2,5 \cdot 10^{-4}$	18,4	1,3	37,1	3,3	20,3	5,4	10,2	2,2
$2 \cdot 10^{-4}$	19,8	3,5	47,1	1,6	43,9	0,7	11,7	1,1
10^{-4}	42,1	2,0	52,9	2,1	53,4	2,8	33,0	1,0
$5 \cdot 10^{-5}$	45,6	1,8	60,0	1,6	63,4	2,2	43,5	1 7
Kontrolle: K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose .			69,1	1,6				

E. Versuch mit Thymol (D. A. B.).

Seiner chemischen Konstitution nach ist das Thymol ein Isopropyl-Phenol, bei dem ein Wasserstoffatom des Benzolkerns durch eine CH_3Gruppe ersetzt ist. Durch die äusserst geringe Wasserlöslichkeit, sowie den nicht unbedeutenden Handelspreis bleiben jene wichtigen Vorbedingungen unerfüllt, die an ein Antisepticum gestellt werden müssen.

Die einschlägige Literatur Koch (l. c.), Bechhold (l. c.), Laubenheimer (1909) hebt übereinstimmend die gesteigerten Desinfektionsfähigkeiten des Thymols gegenüber Kresol oder sogar Phenol hervor. Die erhöhte Wirksamkeit wird den eingeführten Alkylgruppen zugeschrieben.

Auch *Chlorococcum infusionum* erfuhr durch Thymol eine starke Behinderung in der Entwicklung.

Nach Tab. 23 lässt sich bei einer Molarität von $2 \cdot 10^{-4}$ ein ganz geringes Wachstum feststellen, das nur allmählich eine Steigerung erfährt und in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol immer noch gehemmt ist. Die günstigen Effekte des äusserst wirksamen Cresolum crudum PH. H. V. wurden wenigstens bis zu einer Verdünnung von $5 \cdot 10^{-5}$ mol nicht verbessert. Die durch Kolbenmangel beschränkte Zahl der untersuchten Kresolverdünnungen liess leider keinen eingehenden Vergleich zwischen diesen beiden Stoffen zu. (Da immer einige Versuche miteinander zur Durchführung gelangten, benötigten wir stets 500—600 Erlenmeyerkolben zu 400 cm³.)

Tabelle 23.
Beziehungen zwischen dem Thymolgehalt einer Nährlösung und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 4,9. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 20°—27° C.

Konzentration $K^1/_3$ + 1 % Glukose + Thymol mol	Trocken-gewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-3}	tot	—
$5 \cdot 10^{-4}$	tot	—
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	tot	—
$2 \cdot 10^{-4}$	10,5	1,6
$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	13,6	1,1
10^{-4}	22,1	1,5
$0{,}8 \cdot 10^{-5}$	34,8	2,2
$0{,}6 \cdot 10^{5}$	36,6	1,4
$5 \cdot 10^{5}$	41,0	2,3
$2 \cdot 10^{-5}$	52,3	1,2
10^{-5}	56,8	2,5
Kontrolle $K\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	56,2	1,3

Weit grösser dagegen sind die Intensitätsunterschiede gegenüber dem Phenol. In einem Nährmedium von $2 \cdot 10^{-4}$ mol Thymol-Gehalt konnte sich das Impfmaterial innert 45 Kulturtagen wohl behaupten, aber nicht vermehren, während eine gleiche Phenolkonzentration ein ziemlich erfolgreiches Wachstum (38 mg) nicht aufzuhalten vermochte. Mit $5 \cdot 10^{-5}$ mol wird der toxische Einfluss des Phenols auf das Algenmaterial unbedeutend, bleibt aber für Thymol noch bestehen.

F. Versuch mit Carvacrol.

Die bei den Kresolen deutlich erkennbaren Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionskraft untersuchten wir auch beim Carvacrol, der isomeren Verbindung des Thymols mit der Isopropylgruppe in Meta-Stellung zur Hydroxylgruppe (Tab. 24).

Die Löslichkeit des Carvacrols in Wasser ist erheblich schlechter als diejenige des Thymols. Das auf eine Konzentration von 10^{-3} mol berechnete Carvacrol löste sich nicht ganz in Wasser von 60° C. Dagegen war die nächst höhere, relativ nur wenig verstärkte Molar-Lösung von $5 \cdot 10^{-4}$ bereits klar. Der bei der Herstellung der Stammlösung entstehende Fehler überträgt sich auch auf die Verdünnungen, ist aber sicher nicht grösser, als wenn die Einstellung der Ausgangslösung mit zu kleinen Gewichtseinheiten hätte vorgenommen werden müssen.

Die letale Grenze bei $2 \cdot 10^{-4}$ mol ist mit derjenigen des Thymols identisch. Die Einwirkung auf das Zellmaterial dagegen erweist sich

Tabelle 24.
Beziehungen zwischen dem Carvacrolgehalt einer Nährlösung und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 5,0. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 15°—23° C.

Konzentration K 1/3 + 1 % Glukose + Carvacrol mol	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-3}	tot	—
$5 \cdot 10^{-4}$	tot	—
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	tot	—
$2 \cdot 10^{-4}$	11,8	0,9
$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	21,7	2,3
10^{-4}	22,0	0,5
$0{,}8 \cdot 10^{-5}$	30,1	0,9
$0{,}6 \cdot 10^{-5}$	31,5	0,8
$5 \cdot 10^{-5}$	37,9	1,0
$2 \cdot 10^{-5}$	51,3	1,0
10^{-5}	55,3	2,3
$2 \cdot 10^{-6}$	68,5	1,1
Kontrolle K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	70,3	1,3

viel nachhaltender. Durch Carvacrolzusatz von 10^{-5} mol bleibt das Wachstum immer noch stark behindert, während die im isomeren Thymol gehaltenen Kulturen damit bereits den Kontrollwert von K $\frac{1}{3}$ + 1% Glukose erreichen und dem Einfluss der toxischen Zone entgangen sind. Wird der bereits erwähnte, durch die schwerere Löslichkeit bedingte Fehler mitberücksichtigt, so erfährt die hemmende Wirkung eine Verschiebung in grössere Verdünnungen.

G. Versuch mit salzsaurem Anilin.

An Stelle des reinen Anilins verwendeten wir das HCl-Salz, welches in Wasser in beliebigem Verhältnis löslich ist. Durch Wärme (Sterilisation) begünstigt, bildet es mit dem Eisenchlorid des Nährsubstrates eine lösliche Eisenkomplexsalz-Verbindung, kenntlich an der für sie charakteristischen rosaroten Farbe. Eine Lösung mit $2 \cdot 10^{-3}$ mol Anilinzusatz war noch leicht gerötet, und in dieser Konzentration liess sich ein Gedeihen der Alge gerade noch feststellen. Es unterliegt daher keinem Zweifel, dass Eisen auch in Form dieser Verbindung seinen Wert als biogenes Element gar nicht oder nur in beschränktem Masse einbüsst.

Vorversuche hatten bereits ergeben, dass der Schädigungsbereich von Anilinum hydrochloricum im Vergleich zu den bisher untersuchten anorganischen und organischen Substanzen einen viel geringeren Umfang einnehmen werde. Schon Bokorny (l. c.) wies rein qualitativ

Tabelle 25.

Beziehungen zwischen dem Gehalt einer Nährlösung an salzsaurem Anilin und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum*. pH: 5,0. Kulturdauer: 45 Tage. Temperatur: 18°—29° C.

Konzentration K 1/3 + 1 % Glukose + Anilin (HCl) mol	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
10^{-2}	tot	—
$5 \cdot 10^{-3}$	19,7	1,4
$2 \cdot 10^{-3}$	20,0	0,7
10^{-3}	22,7	1,2
$6,6 \cdot 10^{-4}$	46,0	8,7
$5 \cdot 10^{-4}$	83,5	1,1
$4 \cdot 10^{-4}$	87,1	2,6
$2,5 \cdot 10^{-4}$	85,1	2,7
$2 \cdot 10^{-4}$	81,2	2,5
Kontrolle K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose	82,3	1,3

auf die verminderte Toxizität des Anilins auf niedere Pflanzen- und Tierzellen hin.

Aus Tab. 25 geht hervor, dass die Giftigkeit auch auf *Chlorococcum infusionum* gegenüber den andern Giftsoffen stark herabgesetzt ist.

In der verhältnismässig erheblichen Konzentration von 10^{-2} mol blieben die Zellen bis zum zehnten Tage grün. Bereits in einer unwesentlich höhern Verdünnung von $5 \cdot 10^{-3}$ mol war ein leichtes Wachstum quantitativ messbar, und bei einer Molarität von $5 \cdot 10^{-4}$ vermag sich die Alge optimal zu entwickeln.

5. *Versuche mit Kupfersulfat und Kresol bei konstanten Temperaturverhältnissen.*

Das Kupfersulfat wählten wir in einer, von frühern Versuchen her als unschädlich bekannten Konzentration von 10^{-6} mol. Auf jedes Temperaturintervall entfielen 10 Kulturen mit ebenso vielen Kontrollversuchen. Eine Schädigung durch das Kupfer war in einer solchen Verdünnung wie festgestellt, ausgeschlossen, nicht aber die Möglichkeit einer gesteigerten Vitalität unter konstanten Temperaturverhältnissen (Tab. 26, Abb. 10).

Vergleicht man den Kurvenverlauf der Trockengewichte aus kupferfreier (1) und kupferhaltiger (2) Nährlösung, so zeigt sich nur bei 15° und 18° eine nennenswerte Abweichung von der Kontrolle.

Tabelle 26 a.

Beziehungen zwischen konstanten Temperaturverhältnissen und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in $K\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose mit und ohne Kupferzusatz. pH: 5,0. Kulturdauer: 100 Tage. + = lebend, quantitativ nicht messbar.

Temperatur °C	$K\,^1/_3$ + 1 % Glukose + $CuSO_4$ 10^{-6} mol		Kontrolle $K\,^1/_3$ + 1 % Glukose	
	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
0	+	—	+	—
3	15,2	1,6	21,9	1,1
6	20,7	2,5	24,4	4,4
9	52,1	7,8	75,1	3,9
12	100,7	4,5	102,1	4,1
15	123,0	3,1	95,1	3,6
18	122,7	2,6	112,9	3,5
21	123,1	4,3	120,8	1,9
24	114,4	5,9	119,4	2,6
27	95,3	7,9	102,2	3,1
30	tot	—	tot	—
33	tot	—	tot	—
36	tot	—	tot	—

Tabelle 26 b.

Beziehungen zwischen konstanten Temperaturverhältnissen und dem Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in $K\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose mit und ohne Kresolzusatz. pH: 5,1. Kulturdauer: 60 Tage.
+ = lebend, quantitativ nicht messbar. ± = zum Teil lebend.

Temperatur °C	$K\,^1/_3$ + 1 % Glukose + Kresol $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol		Kontrolle $K\,^1/_3$ + 1 % Glukose	
	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg	Trockengewicht mg	Mittlerer Fehler ± mg
0	±	—	+	—
3	±	—	31,5	0,9
6	±	—	46,5	1,9
9	±	—	51,9	1,9
12	13,7	1,9	72,1	3,8
15	25,7	1,4	79,9	2,2
18	22,5	4,0	72,1	2,6
21	32,1	1,8	58,2	1,5
24	35,0	1,5	76,0	2,4
27	40,0	0,6	69,5	2,0
30	±	—	±	—
33	tot	—	tot	—
36	tot	—	tot	—

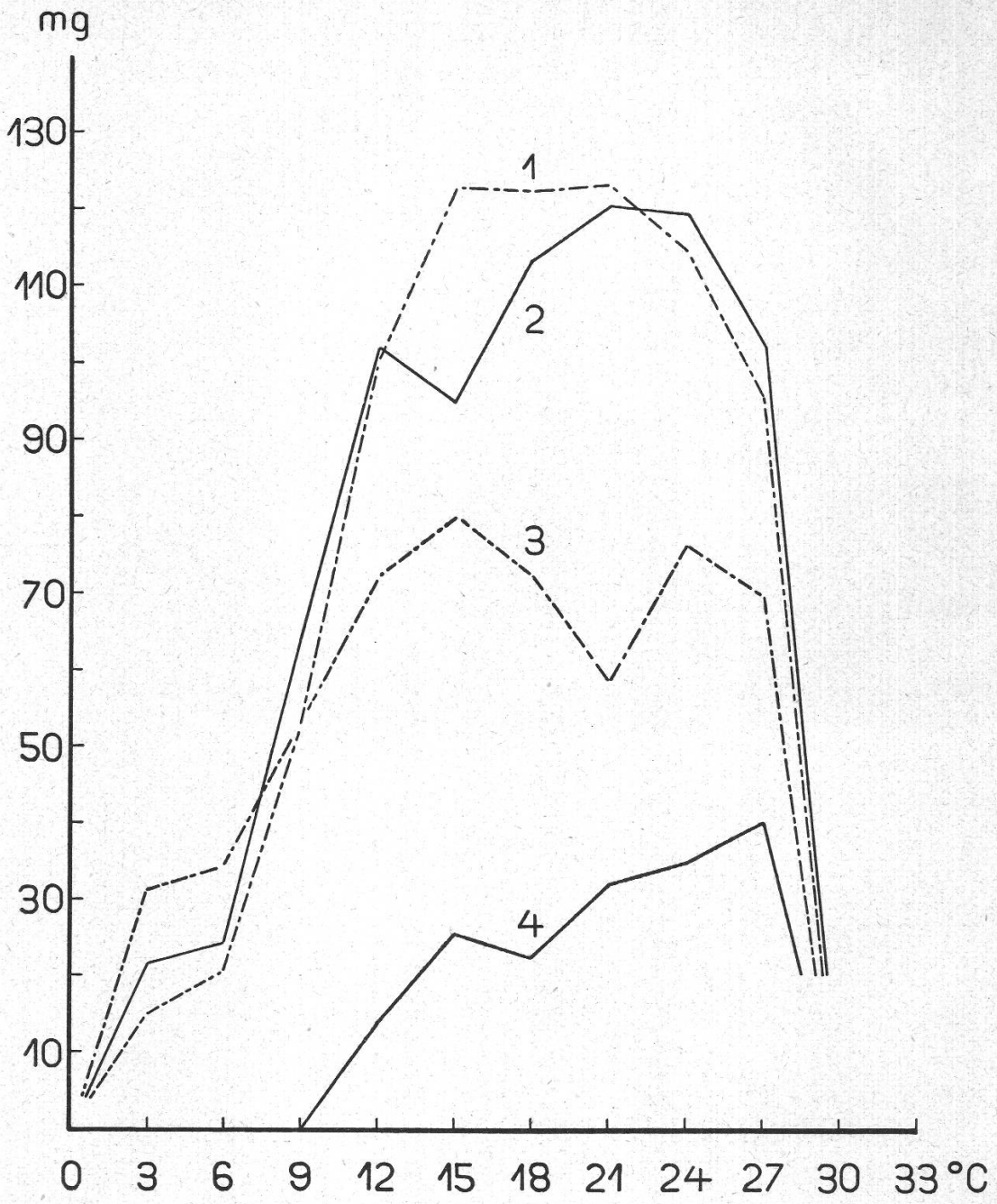


Abb. 10.

Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von *Chlorococcum infusionum* in kupfer- und kresolhaltiger Nährlösung.

Kurve 1: K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose.
Kurve 2: K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + Kupfersulfatzusatz von 10^{-6} mol.

Kurve 3: K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose.
Kurve 4: K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose + Kresolzusatz von $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol.

In einem Vorversuch überzeugten wir uns noch einmal, dass die in Betracht kommende Molarität von $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ Kresol in der Nähe der letalen Grenze liegen müsse. Der verhältnismässig starke Kresolzusatz (Cresolum crudum PH. H. V.) liess allein schon gegenüber der Kontrolle ein viel schlechteres Wachstumsergebnis erwarten. Die bei 0° bis 9° angesetzten Algenkulturen gingen zum Teil ein oder blieben in der Entwicklung auf das Impfmaterial beschränkt. Normalen Verhältnissen ausgesetzt, vermochten sie sich nicht zu regenerieren. Möglicherweise kann auch der damit verbundene plötzliche Temperaturunterschied von 0° auf 25° den Zelltod herbeigeführt haben. Erst bei 12° zeigte sich ein quantitativ messbares Wachstum, das zwischen 21° und 27° sein Maximum erreichte. Das Mittelgewicht von 5 Parallelversuchen mit demselben Kresolzusatz, aber im Versuchshaus unter normale Licht- und Temperaturverhältnisse gebracht, betrug am gleichen Zeitpunkt 52,3 mg. Auch die kritische Temperatur von 30° vermochte die Alge nur im Verhältnis des Kontrollversuches zu schädigen, das sich in der anfänglich gesteigerten und dann plötzlich erschöpften Vitalität äusserte.

Wenn auch der durch die Kälte herabgesetzte Stoffwechsel normalerweise die Aufnahme von Giftstoffen durch die Pflanzenzelle verhindert oder erschwert, so ist doch die chemische Aktivität des Kresols in den untern Temperaturzonen noch gross genug, die Algenzellen empfindlich zu schädigen, während im optimalen Temperaturbereich dessen Einfluss besser überwunden werden kann.

6. Zusammenfassung.

1. *Sublimat* wirkt in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ bis 10^{-6} mol noch tödlich auf *Chlorococcum infusionum.* Ein nur toxisches Gebiet, in welchem die Kulturen noch lebten, aber in ihrem Wachstum gehemmt waren, liess sich nicht finden. Bei einer Molarität von 10^{-6} ist der Quecksilbereinfluss verschwunden, und die Entwicklung der Alge von derjenigen des Kontrollversuches (K $\frac{1}{3}$ + 1 % Glukose) nicht zu unterscheiden.
2. Eine *oligodynamische Nachwirkung* durch Sublimateinfluss war bei Murano-Glas nicht zu konstatieren.
3. Die *Wandadsorption* der Kulturgläser vermochte in Verdünnungen von 10^{-6} mol $HgCl_2$ die Lösungen nicht zu entgiften. In Glasgefässen, mit der betreffenden Molarität vorbehandelt, unterschied sich das Wachstum der Alge nicht von den Kontrollwerten.
4. Die Grenze der Lebensbedingungen für *Chlorococcum infusionum* liegt bei einer $5 \cdot 10^{-5}$ molaren *Kupfersulfatlösung.* Mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ mol tritt die letale Wirkung nicht mehr sicher ein. Eine Verdünnung bis zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ mol kann in den toxischen Bereich einbezogen werden

5. Die *oligodynamische Reizwirkung* des Kupfersulfates wurde mehrmals in Konzentrationen von 10^{-6} mol festgestellt. Sie äusserte sich in einem stark gesteigerten Wachstum zu Beginn des Versuches. Nach 20 Tagen hört der fördernde Einfluss des Kupfers gewöhnlich auf, obwohl der Cu-Gehalt der Nährsubstrate noch nicht erschöpft ist. Ein quantitativer Unterschied von Algenkulturen aus kupferfreien und optimal kupferhaltigen Nährlösungen ist dann nicht mehr festzustellen.
6. Der *Aziditätsverlauf* eines Nährsubstrates mit *Chlorococcum infusionum* erfährt auch bei Kupferzusatz keine Störung, sondern strebt ebenfalls nach einer anfänglichen Ansäuerung dem neutralen Gebiet zu.
7. Es wurde eine Methode ausgearbeitet, mittels welcher das von der lebenden Alge aufgenommene, nicht mehr auswaschbar, biologisch gebundene *Kupfer* mit *Natriumdiaethyl-dithiocarbamat* nachgewiesen werden kann.
8. Die *oligodynamische Nachwirkung* von Kupfervitriol an Glasgefässen äusserte sich dadurch, dass Cu-Ionen adsorptiv an der Glaswand festgehalten wurden, so dass auch nach mehrmaligem Auswaschen der Kolben spätere Kulturen noch Schädigungen erlitten.
9. Eine Untersuchung von *Aqua destillata verschiedener Herkunft* zeigte die Notwendigkeit einer vorhergehenden Prüfung desselben auf seine Brauchbarkeit für biologische Zwecke. Ein von uns untersuchtes Wasser wies einen Cu-Gehalt von 10^{-4} mol auf.
10. Es wurden sterile Nährlösungen mit sterilen, wasserdampfflüchtigen *organischen Substanzen* auf eine bestimmte Molarität eingestellt.
11. Die Intensität der Giftwirkung von *8 phenolischen Körpern* und *Anilinum hydrochloricum* auf *Chlorococcum infusionum* ist in Tab. 27 qualitativ zusammengefasst.
12. Eine Beziehung zwischen *chemischer Konstitution* und *Giftwirkung* bei den isomeren Verbindungen des Kresols und Thymols konnte nachgewiesen werden.
13. Durch Zusatz von Kupfersulfat in einer Stärke von 10^{-6} mol erfährt *Chlorococcum infusionum* auch unter *konstanten Temperaturverhältnissen* keine Wachstumssteigerung.
14. Eine *kresolhaltige Nährlösung* von $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol vermochte *Chlorococcum infusionum* bei konstanten Temperaturverhältnissen unterhalb 12° zu schädigen.

    Temperaturen bis zu 27° können die Desinfektionskraft des Kresols nicht steigern. Durch vermehrte Wärmezufuhr erleiden die Lebensbedingungen der Alge ohnehin eine Störung.

Tabelle 27.

Zusammenstellung der untersuchten organischen Chemikalien in ihrer Wirkung auf *Chlorococcum infusionum*.

± = lebende Kultur, aber kein Wachstum.
+ = gehemmtes Wachstum.
++ = normales Wachstum.
* = nicht bestimmt.

Chemische Verbindung	Konzentration in mol												
	10^{-1}	10^{-2}	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	$6 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Anilin (HCl.)	tot	tot	±	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Phenol . .	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	±	±	+	+	++	++
Kresol (techn.)	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	±	+	+	+	+	++
Roh-Kresol .	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	±	±	+	+	+	*
Ortho-Kresol	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	±	±	+	+	+	*
Meta-Kresol	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	±	+	+	+	+	*
Para-Kresol	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	+	+	+	+	++	*
Thymol . .	tot	tot	tot	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	+	+	++
Carvacrol .	tot	tot	tot	tot	tot	tot	tot	tot	tot	±	+	+	+

Zitierte Literatur.

Ammann, A., 1934. Löslichkeit und analytische Bestimmung einiger organischer Schwermetallsalze. Diss., E. T. H., Zürich, 80 S.

Anliker, J., 1935. Beiträge zur Kenntnis der Fusariose des Roggens. (Beiträge z. Kryptogamenflora d. Schweiz, **8**, Heft 4, S. 22—35.)

Bachmann, H., 1934. Über die Giftwirkungen von chemischen Substanzen auf niedere Wasserorganismen. (Zeitschr. für Hydrologie **VI**, Heft 1 und 2, S. 105—126.)

Bechhold, H., 1906. Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. (Zeitschr. f. physiolog. Chemie, **47**, S. 173—199.)

Benecke, W., 1907. Über die Giftwirkung verschiedener Salze auf *Spirogyra*. (Ber. der Deutsch. Botan. Ges., **25**, Heft 6, S. 322—336.)

Beuttner, E., 1909. Kommentar zur PH.H. IV, Zürich.

Bokorny, Th., 1896. Toxikologische Notizen über Ortho- u. Para-Verbindungen. (Archiv f. d. ges. Physiologie, **64**, S. 306—312.)

— 1905. Nochmals über die Wirkung stark verdünnter Lösungen auf lebende Zellen. (Archiv f. d. ges. Physiologie, **110**, S. 174—226.)

Brezina, E., 1906. Die Selbstreinigung der Donau. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh., **53**, S. 373—375.)

Brütsch, A., 1934. Untersuchungen über neue praktische Verwendungsmöglichkeiten von oligodynamisch wirksamen Materialien zur Wasserentkeimung. Diss., E. T. H., Zürich, 91 S.

Deutsches Arzneibuch (D. A. B.), 1926. Berlin.

Fischer, E., u. Gäumann, E., 1929. Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena, S. 230—238, 247—252.

Gäumann, E., 1935. Tagesfragen der Mastenimprägnierung. Schweiz. Zschr. f. Forstwesen, Nrn. 1 u. 2, 26 S.

Gruber, M., 1892. Über die Methoden der Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. (Centralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., **11**, S. 115—117.)

Heider, A., 1892. Über die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel bei erhöhter Temperatur. (Archiv f. Hygiene, **15**, S. 341—386.)

Jaag, O., 1929. Recherches expérimentales sur les gonidies des lichens appartenant aux genres *Parmelia* et *Cladonia*. Diss., Genf, S. 67—68.

Koch, R., 1881. Über Desinfektion. (Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. **1**, S. 234—282.)

Kolthoff, J. M., 1926. Der Gebrauch der Farbindikatoren. Aufl., **3**, Berlin, S. 149—150.

Laget, E., 1935. Kolorimetrische Bestimmung von Spuren Kupfer mittelst Natr.-diaethyl-dithiocarbamat. (Chem. Zentralbl., **17**, Bd. II, S. 2708.)

Laubenheimer, K., 1909. Das Phenol u. seine Derivate als Desinfektionsmittel. Habilitatschr., Berlin, 156 S.

Loewe, F. H. W., 1933. Keimfreies Wasser durch Katadyn. (Schweiz. Apoth. Ztg., Nr. **31**, S. 375—378.)

Lohmann, G., 1934. Nährstoffwirkung u. Giftwirkung bei *Aspergillus niger*. (Archiv f. Mikrobiologie, **5**, S. 31—56.)

Luz, G., 1934. Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* u. *Fusarium lini*. (Phytopath. Zeitschr., **7**, S. 585—597.)

Mahlke, F., 1928. Handbuch der Holzkonservierung. Berlin, S. 178—250.

Malenković, B., 1907. Die Holzkonservierung im Hochbaue. Wien, S. 226—286.

Martin, H., 1928. The scientific principles of plant protection. London, S. 73 bis 91.

Müller, H., 1935. Die Bedeutung und praktische Verwendung des Kupfers in der Innern Medizin mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehungen zum Blut. (Zeitschr.: Die Medizinische Welt, Nr. **22**, Berlin.)

Nägeli, K., 1893. Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen. Neue Denkschr. der allg. schweiz. Gesellschaft f. Naturwissenschaften. Zürich.

Oltmanns, F., 1923. Morphologie u. Biologie der Algen. Jena, 2. Aufl., **3**, S. 353—364.

Ondratscheck, K., 1935. Über die Brauchbarkeit einiger Glassorten für Algenreinkulturen. (Archiv f. Mikrobiologie, **6**, S. 532—538.)

Pascher, A., 1915. Die Süsswasserflora Deutschlands, Österreichs u. der Schweiz. Heft **5**, Jena, 61.

Paul, Th., 1901. Entwurf zur einheitlichen Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel. Diss., Berlin, 54 S.

Pharmacopoea Helvetica, 1933. (PH. H. V.) Bern.

Plotho v., O., 1920. Einfluss kolloidaler Metallösungen auf *Aspergillus niger*. (Biochem. Zeitschr., **110**, S. 33—59.)

Rabanus, A., 1934. Chemische Holzschutzmittel. (Bauforschungen, Berlin, **3**, S. 29—30.)

Rumm, Ch., 1894. Zur Kenntnis der Giftwirkung der Bordeauxbrühe und ihre Bestandteile auf *Spirogyra longata* u. die Uredosporen von *Puccinia coronata*. Diss., Stuttgart.

Schneider, H., 1906. Ein Beitrag zur Kenntnis der Phenole in Verbindung mit Säuren u. Gemischen mit Seifen vom chemischen u. bakteriologischen Standpunkt aus. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., **53**, S. 116—122.)

Schneider, H., u. Seligmann, E., 1908. Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., **58**, S. 413—427.)

Schwartz, W., u. Steinhart, H., 1931. Untersuchungen über die oligodynamische Wirkung des Kupfers, I. Teil. (Archiv f. Mikrobiologie, **2**, S. 261 bis 271.)

Steinhart, H., 1933. Untersuchungen über die oligodynamische Wirkung des Kupfers, II. Teil. (Archiv f. Mikrobiologie, **4**, S. 301—325.)

Thomann, J., 1936. Normaltropfenzähler u. gewöhnliche Tropfgläser. (Pharm. Acta Helv., Nrn. **4**, **5**, S. 114—120.)

Weyrauch, F., 1927. Zur vergleichenden Prüfung von Desinfektionsmitteln. (Centralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. und Infektionskrankh., Abtl. I, **103**, S. 123—129.)

Zöller, W., 1925. Formeln u. Tabellen zur Errechnung des mittleren Fehlers, Berlin.