

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES DE CRACOVIE.

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES.

N° 9.

Novembre.

1908.

- Sommaire:** 62. G. G. WILENKO und Z. MOTYLEWSKI. Über die Wirkung von Natrium auf Cholesterin in der Lösung in Amylalkohol.
63. ST. BONDZYŃSKI und V. HUMNICKI. Quantitative Untersuchungen über das Verhalten von Salol sowie von Distearylsalizylglyzerid im Organismus.
64. W. GAWIŃSKI. Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung von Proteinsäuren im Harn von gesunden Menschen sowie in einigen Krankheitsfällen.
65. A. W. JAKUBSKI. Untersuchungen über das Stützgewebe des Nervensystems im vorderen und im hinteren Körperende der Hirudineen; nebst Bemerkungen über deren Neuromerie.
66. ST. KOPEĆ. Experimentaluntersuchungen über die Entwicklung der Geschlechtscharaktere bei Schmetterlingen.
67. R. MINKIEWICZ. Étude expérimentale du synchromatisme de Hippolyte varians Leach.
68. S. KRZEMIENIEWSKI. Untersuchungen über Azotobacter chroococcum Beij.

Séance du lundi 2 Novembre 1908.

PRÉSIDENCE DE M. ED. JANCZEWSKI.

62. *O działaniu sodu na cholesterynę w wysokoku amyłowym.* — *Über die Wirkung von Natrium auf Cholesterin in der Lösung in Amylalkohol.* Note de MM. G. G. WILENKO et Z. MOTYLEWSKI, présentée par M. L. Marchlewski m. t.

Die Angabe, welche von Neuberg¹⁾ sowie gleichzeitig von Diels und Abderhalden²⁾ gemacht wurde, daß das *Cholesterin* in amyalkoholischer Lösung mittels Natrium in *Dihydrocholesterin* sich überführen läßt, und insbesondere die Vermutung von Neuberg, daß der von ihm erhaltene, bei einer Temperatur von 119–124° C schmelzende Körper mit dem von Bondzyński³⁾ in menschlichen Faeces gefundenen und von Bondzyński und

¹⁾ Ber. d. d. ch. Ges. 39 (1906), 1155 und Neuberg und Rauchwerger, Salkowski-Festschr. 279 (1904).

²⁾ Ber. d. d. ch. Ges. 39, 884.

³⁾ Ber. d. d. ch. Ges. 29 (1896) 476.



Humnicki¹⁾ als Dihydrocholesterin erkannten *Koprosterin* vom Schmelzpunkt 95—96° C identisch wäre, veranlaßte uns zu prüfen, in welcher Beziehung das von diesen Autoren synthetisch erhaltene Produkt zu dem normalen Bestandteil der menschlichen Faeces stünde. Während jedoch Neuberg von der Annahme sich leiten ließ, daß das *Koprosterin* etwa noch unrein sein könnte und daher einen gegenüber dem des synthetischen Dihydrocholesterin niedrigeren Schmelzpunkt aufwies, wurden wir im Gegenteil zu unserer Untersuchung durch den Umstand angeregt, daß sowohl das „*α-Cholestanol*“ von Diels und Abderhalden, wie auch das „*Dihydrocholesterin*“ von Neuberg keinen scharfen Schmelzpunkt aufwiesen, indem wir vermuteten, daß in beiden Fällen das erhaltene Produkt der Reduktion mit anderen cholesterinartigen Körpern verunreinigt sein könnte.

Die Reduktionsversuche haben wir bald nach der Vorschrift von Diels und Abderhalden, bald nach derjenigen von Neuberg ausgeführt. Neben einem in reichlicher Menge gebildeten öligen Körper, welcher das Hauptprodukt der Reaktion war, welcher jedoch zur Kristallisation nicht gebracht werden konnte, haben wir in ähnlicher Weise wie die genannten Autoren ein kristallinisches Rohprodukt erhalten, welches wir nun einer fraktionierten Kristallisation unterwarfen, indem wir dasselbe in Alkohol lösten und durch allmählichen Zusatz von Wasser eine Reihe von kristallinischen Fraktionen nacheinander ausfallen ließen.

Auf diese Weise haben wir in der Tat eine in langen Prismen kristallisierende Verbindung gewonnen, welche bei 118—126° schmolz, eine Drehung der Polarisationssebene nach rechts bewirkte²⁾ und auch in sonstigen Eigenschaften wie das *α-Cholestanol*, resp. wie das *Dihydrocholesterin* der genannten Autoren sich verhielt. Wir möchten jedoch gleich mitteilen — und zwar ohne die Einheitlichkeit des soeben beschriebenen Körpers, welcher übrigens inzwischen von Windaus³⁾ auf anderem Wege erhalten, für ein Isomer des Cholesterins erklärt und *Cyclocholesterin* genannt wurde, in Zweifel zu ziehen — daß wir neben diesem Körper, — welcher der Menge nach

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Ch. 22, 396.

²⁾ Über die Resultate wurde ein vorläufiger Bericht am 22 Juli 1907 in der Versammlung polnisch. Naturforscher und Ärzte in Lemberg erstattet.

³⁾ Neuberg, l. c.

⁴⁾ Ber. d. d. ch. Ges. 40 (1907), 2637.

die anderen kristallinischen Produkte überwog; — unter den Produkten der Wirkung von Natrium auf Cholesterin noch zwei andere bisher nicht bekannte cholesterinartige Verbindungen fanden, von denen wir die eine wegen ihrer Ähnlichkeit mit Koprosterin *l-Koprosterin*, die andere dagegen *γ-Cholesterin* nennen möchten.

1-Koprosterin

ist unter den drei durch Einwirkung von Natrium auf Cholesterin erhaltenen Körpern die in Äthylalkohol am leichtesten lösliche Verbindung; sie wurde deshalb bei der fraktionierten Kristallisation in den zu allerletzt kristallisierenden Fraktionen gefunden. Es kristallisierte in langen Nadeln, welche aus konzentrierten Lösungen, ähnlich wie die Kristalle des Koprosterins in schönen Warzen sich ausschieden. Nach vielfachem Umkristallisieren aus mäßig konzentriertem Alkohol und einige Wochen langem Stehenlassen über Schwefelsäure schmolzen die Kristalle bei 86—87° C. Die einzige Elementaranalyse, mit welcher wir uns begnügen mußten, — weil die Substanz trotz Verarbeitung von 140 g Cholesterin nach langwierigem Fraktionieren und vielen Kristallisationen uns schließlich nur in der Menge von etwa 0·4 g zur Verfügung stand, — ergab

0·1726 g Subst.: 0·5228 g CO₂; 0·1972 g H₂O

C₂₇H₄₈O. Ber. C 83·50; H 12·38

Gef. C 82·60; H 12·69,

und zwar wohl leider infolge eines Fehlers einen dem Koprosterin gegenüber etwas zu niedrigen Kohlenstoffgehalt, jedoch einen mit der Formel des Koprosterins gut übereinstimmenden Wasserstoffgehalt.

Die Verbindung glich dem Koprosterin außerdem auch vollkommen in seinem Verhalten in den Farbenreaktionen. Seine Lösung in Chloroform ließ nämlich beim Zusatz von Schwefelsäure ähnlich wie eine Lösung des Koprosterins nur träge die Farbenveränderung erscheinen und wurde nicht orangerot, sondern nur strohgelb gefärbt; und ebenso übereinstimmend mit dem Verhalten des Koprosterins verlief auch die Reaktion einer solchen Lösung mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure. Von Koprosterin unterschied sich die Verbindung außer durch ihren Schmelzpunkt durch ihr optisches Verhalten: sie drehte nämlich die Polarisationsebene im Gegensatz zum Koprosterin nach links, und zwar war $[\alpha]_D^{20} = -14·3$.

Trotz der Differenz in der spezifischen Drehung (für das gewöhnliche Koprosterin wurde $[\alpha]^D = +24^\circ$ gefunden) glauben wir, daß das l-Koprosterin ein optisches Isomer des Koprosterins ist.

γ -Cholesterin

wurde in etwas besserer Ausbeute als das l-Koprosterin aus den am schwersten löslichen Fraktionen des Reduktionsproduktes, und zwar in rhombischen, den Cholesterinkristallen ähnlichen glänzenden Plättchen erhalten. Nach vielfachem Umkristallisieren aus konzentriertem Alkohol und längerem Trocknen über Schwefelsäure schmolzen die Kristalle bei 135—137° C

0.1486 g Subst.: 0.4606 g CO₂, 0.1626 g H₂O

C₂₇H₄₆O . Ber. C 83.94; H 11.91

Gef. C 83.36; H 12.15

Obwohl die Verbindung viel Ähnlichkeit mit Cholesterin aufwies (Verhalten in der Farbenreaktion), so war sie doch mit demselben nicht identisch. Sie war nämlich leichter löslich in konz. Alkohol und im Gegensatz zum gewöhnlichen Cholesterin — nicht links drehend. Von zwei Präparaten, welche von uns erhalten wurden, lenkte nämlich das eine die Polarisationsebene nach rechts ($[\alpha]^D = +15.4^\circ$), das andere war zu unserem Erstaunen optisch inaktiv. Um aufzuklären, ob die erhaltene Verbindung nicht etwa ein Polymer des Cholesterins wäre, haben wir die Bestimmung ihres Molekulargewichtes mit ihrer Lösung in Benzol ausgeführt; M wurde zu 360 gefunden (für C₂₇H₄₆O ber. 386).

Essigsäureester.

Zur besseren Charakterisierung des γ -Cholesterins haben wir noch dessen Azetat und zwar durch Erhitzen des γ -Cholesterins $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf dem Wasserbade, Eindunsten der Reaktionsmasse in vacuo über Natronhydrat und Umkristallisieren aus Alkohol erhalten. Dasselbe stellte feine Nadeln dar, welche bei 100°—102° schmolzen.

Aus der Ähnlichkeit des γ -Cholesterins mit dem gewöhnlichen Cholesterin könnte man schließen, daß das erstere ein optisches Isomer des letzteren wäre, dem widerspricht jedoch die Beobachtung, daß das γ -Cholesterin Brom offenbar nicht addiert, weil beim Bromieren desselben in einer Lösung in Schwefelkohlenstoff auf 1 Molekül

γ -Cholesterin ein Bromverbrauch festgestellt wurde, welcher bloß einem $\frac{1}{2}$ Atom statt 2 Atomen Brom entsprach.

Es bleibt noch schließlich zu erwähnen, daß γ -Cholesterin in bedeutend besserer Ausbeute erhalten wurde, wenn die Wirkung von Natrium unter mäßiger Kühlung bei 110—115°, als wenn dieselbe bei der Siedetemperatur des Amylalkohols (130—131°) verlief. Die letztere Temperatur schien dagegen für die Entstehung des l-Koprosterins günstiger zu sein.

Lwów (Lemberg). Medizinisch-chemisches Institut.

63. *Badania ilościowe nad zachowaniem się w ustroju salolu oraz glicerydu dwustearylsalicylowego. — Quantitative Untersuchungen über das Verhalten von Salol sowie von Distearylsalizylglyzerid im Organismus.* Mémoire de MM. **ST. BONDZYŃSKI** et **V. HUMNICKI**, présenté par M. L. Marchlewski m. t. dans la séance du 6. Juillet 1908.

Die vorliegenden Untersuchungen haben wir im Anschluß an die von einem von uns¹⁾ vor einigen Jahren veröffentlichten Forschungen über das Verhalten einiger nahe verwandten Salizylsäureester im menschlichen Organismus unternommen.

Versuche mit Salol.

Das Verhalten von Salol im Organismus, sowie außerhalb desselben gegenüber verschiedenen tierischen Geweben und Säften wurde zwar vielfach zum Gegenstand von Untersuchungen gemacht, jene Untersuchungen waren jedoch meistens qualitativer Art; wir haben uns deshalb vorgenommen, an der Hand von quantitativen analytischen Methoden das Schicksal des Salols, d. h. den Verlauf der Resorption desselben in seiner ganzen Ausdehnung zu untersuchen. Ein solcher Versuch versprach unter anderen auch der Aufklärung der interessanten Frage zu dienen, warum das Salol, welches ja etwa 44% Phenol abspalten läßt, eine so harmlose Verbindung ist, daß in ihrer Form mehrere Gramm Phenol auf einmal

¹⁾ Bondzyński, Arch. f. exp. Pathol. und Pharmakol. Bd. 38, 88.

dem Organismus ohne merkliche schädliche Wirkung einverleibt werden können.

Um das Verhalten des Salols klarer hervortreten zu lassen, haben wir an die Versuche mit Salol einige ähnlich ausgeführte Versuche mit Salizylsäure angeschlossen.

Der Fortgang der Resorption, resp. der Spaltung von Salol ließ sich auf die Weise verfolgen, daß die Zeit nach der Einnahme desselben in mehrere Abschnitte geteilt und in jeder von den während der einzelnen Zeitperioden gesammelten Harnportionen eine Bestimmung der Salizylsäure, resp. eine Salizylsäure- und Phenolbestimmung ausgeführt wurde. Bei den Versuchen mit Salol haben wir nämlich unsere Aufmerksamkeit den beiden Spaltungsprodukten zugewendet.

Zuerst aber mußten analytische Methoden ausgearbeitet werden.

Eine Methode der Bestimmung von Salizylsäure ergab sich aus unserer Beobachtung, daß eine alkoholische Lösung von Salizylsäure mit einer wäßrigen Lösung von Baryumhydrat einen Niederschlag von basischem Baryumsalz gibt und daß Salizylsäure in dieser Form vollständig ausgefällt werden kann, daß ferner weder Benzoesäure noch flüchtige Fettsäuren aus alkoholischer Lösung beim Zusatz von Baryumhydrat ausfallen.

Die Bestimmung der Salizylsäure im Harn wurde also folgendermaßen ausgeführt. Der Harn wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (1 Vol. konz. Salzsäure zu 10 Vol. Harn) und 6 Stunden lang in einem Kolben am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde nach dem Erkalten mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt, auf einem Wasserbade bis zur Trockene eingedampft und der erhaltene Rückstand im Soxhlet'schen Apparate mit Alkohol ausgezogen. Der Alkoholauszug wurde nach dem Verjagen des Alkohols in Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und im Schwarz'schen Apparat mit Äther extrahiert. Aus dem Ätherextrakt wurde der Äther verdunstet, der Rückstand in Alkohol gelöst und mit einer konzentrierten wäßrigen Barytlösung gefällt. Der Niederschlag enthielt neben überschüssigem Baryumhydrat ein basisches Baryumsalizylat: derselbe wurde abgesaugt, mit 85% barythaltigem Alkohol, dann mit absolutem Alkohol und darauf mit Äther gewaschen, in Wasser unter Zusatz von Salzsäure gelöst und die Lösung im Extraktionsapparate mit Äther ausgezogen.

Die aus diesem Ätherextrakte nach dem Verdunsten gewonnene

Salizylsäure wurde bei 50—55°C bis zum konstanten Gewicht getrocknet und gewogen.

Bei Gegenwart von Phenol ließ sich die Salizylsäure nach diesem Verfahren nicht bestimmen, weil das Phenol in alkoholischer Lösung mit Baryumhydrat ebenfalls gefällt wurde. Da Salizylsäure und Phenol gegen die meisten Fällungsmittel überhaupt sich ähnlich verhalten, so war an eine Trennung dieser Körper durch Fällung nicht zu denken; es wurde daher versucht, die Salizylsäure an Baryt zu binden und das ungebundene Phenol durch Abdestillieren zu trennen. In der Tat konnten wir durch Zusatz von Baryt zu einer Lösung, welche Salizylsäure und Phenol enthielt, und durch Behandlung derselben mit Kohlensäure eine Lösung von salizylsaurem Baryum und Phenol erhalten, aus welcher das Phenol durch Abdestillieren sich vollständig entfernen ließ. Auf diese Beobachtung haben wir die Bestimmung der beiden Verbindungen nebeneinander gegründet. Der Harn wurde zu diesem Zweck mit Salzsäure angesäuert (10 : 1) und unter Zusatz von Wasser destilliert. In das Destillat (*a*) ging die ganze Phenolmenge sowie ein Teil der Salizylsäure über. Der größere Teil der Salizylsäure blieb im Destillationsrückstand (*a'*) zurück. Durch dieses Destillat wurde nun zur Entfernung der Kohlensäure kurze Zeit ein Luftstrom durchgeleitet, dann wurde die Flüssigkeit mit einer Barytlösung im Überschuß versetzt, mit Kohlensäure gesättigt, von kohlensaurem Baryum filtriert und das Filtrat wiederum einer Destillation unterworfen. Jetzt destillierte mit Wasserdampf nur das Phenol. Der Rückstand (*b'*) enthielt die bei der ersten Destillation übergegangene Salizylsäure als salizylsaures Baryum, das Destillat (*b*) war eine reine Phenollösung. Die Salizylsäure war also aus den Destillationsrückständen *a'* und *b'* zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde der erste Destillationsrückstand (*a'*) mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt und bis zur Trockene eingedampft. Der erhaltene Trockenrückstand wurde im Soxhlet'schen Apparate mit Alkohol ausgezogen; der Alkoholauszug wurde nach dem Verjagen des Alkohols in Wasser aufgenommen, mit dem das salizylsaure Baryum enthaltenden Destillationsrückstand (*b'*) vereinigt, die resultierende Lösung mit Salzsäure angesäuert und im Schwarz'schen Apparate der Extraktion mit Äther unterworfen. Der Ätherextrakt wurde nach dem Verdunsten des Äthers in Alkohol gelöst und mit einer Lösung von Baryumhydrat gefällt. Aus diesem Niederschlag wurde

die Salizylsäure in der bereits beschriebenen Weise in einigermaßen¹⁾ reinem Zustand erhalten und gewogen.

Im Destillat (b) ließ sich das Phenol bestimmen. Zu diesem Zweck wurde dieses Destillat unter Zusatz von Natronlauge konzentriert, dann mit Salzsäure angesäuert und das Phenol daraus mit Bromwasser gefällt; das erhaltene Tribromphenol wurde nach dem Schütteln mit verdünnter Lösung von Natriumbisulfit auf ein tariertes Filter gebracht, im Vakuumexsikkator bis zum konstanten Gewicht getrocknet und gewogen.

Selbstverständlich haben wir uns von der Zuverlässigkeit dieser Methoden durch besondere Versuche, auf welche hier nicht eingegangen werden kann, überzeugt.

Die Experimente wurden an 2 Personen ausgeführt.

Versuch A.

Verabreichung von Salizylsäure. Ein schwächlicher Mann von 24 Jahren hatte am 3. II., um 12 Uhr Mittags, 2·2 g Salizylsäure, als salizylsaures Natrium, eingenommen.

Perioden	Dauer der Perioden von	Perioden bis	Dauer d. Perioden in Stunden	Harnmenge in cm ³	Salizylsäure gefunden
I	12 M.	3 N.	3	445	0·2841 g
II	3 N.	6 N.	3	425	0·4100
III	6 N.	9 N.	3	340	0·1772
IV	9 N.	9 V.	12	530	0·7438
V	9 V.	9 N.	12	585	0·3206
VI	9 N.	12 M.	15	660	0·0690
zusammen					2·0047

Verabreichung von Salol. Dieselbe Versuchsperson hatte am 20. II. 3·5 g Salol (= 2·2 g Salizylsäure) eingenommen.

¹⁾ Bemerkung. Eine Verunreinigung der erhaltenen Salizylsäure mit fremden unbekanntem Substanzen war, obgleich geringer als bei der Fällung mit Bleiessig (vide Bondzyński, a. a. O.), auch bei dieser Methode nicht zu vermeiden. Es wurde daher bestimmt, wie viel von dieser Substanz aus der 24-stündigen Menge eines normalen Harns nach dem beschriebenen Verfahren erhalten wird. Es ergab sich im Mittel 0·12 g. Diese Zahl wurde bei unseren Bestimmungen in Betracht gezogen und von den Resultaten abgezogen.

Perioden	Dauer der Perioden von bis	Dauer d. Perioden in Std.	Harn- menge in cm ³	Salizyl- säure	Tribrom- phenol	Phenol gefunden
I	12 M. 3 N.	3	780	0·1366	0·1416	0·0402
II	3 N. 6 N.	3	490	0·1205	0·3235	0·0918
III	6 N. 9 N.	3	250	0·1490	0·2541	0·0721
IV	9 N. 9 V.	12	500	0·4443	1·1720	0·3327
V	9 V. 9 N.	12	840	0·1624	0·6617	0·1878
VI	9 N. 9 V.	12	610	0·3077	0·2632	0·0747
VII	9 V. 9 N.	12	730	0·4420	0·0410	0·0116
VIII	9 N. 9 V.	12	850	0·1765	0·0142	0·0040 ¹⁾
IX	9 N. 9 V.	12	720	0·0212	—	—
				<u>1·9402</u>		<u>0·8149</u>

Versuch B.

Verabreichung von Salizylsäure. Ein kräftiger gesunder über dreißig Jahre alter Mann hatte am 4. III. 2·2 g Salizylsäure in Form von Natriumsalizylat eingenommen.

Perioden	Dauer der von der Perioden bis	Dauer d. Perioden in Stunden	Harmmenge in cm ³	Salizylsäure gefunden
I	12 M. 3 N.	3	350	0·2018
II	3 N. 6 N.	3	275	0·3406
III	6 N. 9 N.	3	300	0·1588
IV	9 N. 9 V.	12	900	0·8402
V	9 V. 9 N.	12	950	0·2109
VI	9 N. 9 V.	12	1000	0·0532
VII	9 V. 9 N.	12	950	—
				<u>1·8075</u>

Verabreichung von Salol. Dieselbe Versuchsperson hatte am 10. III. 3·5 g Salol (= 2·2 g Salizylsäure) eingenommen.

Perioden	Dauer der Perioden von bis	Dauer d. Perioden in Std.	Harn- menge in cm ³	Salizyl- säure	Tribrom- phenol	Phenol gefunden
I	12 M. 3 N.	3	290	0·0898	1·2162	0·3452
II	3 N. 6 N.	3	360	0·3450	1·0540	0·2992
III	6 N. 9 N.	3	350	0·1736	0·3534	0·1003

¹⁾ Der Phenolgehalt der 24-stündigen Menge des normalen Harns betrug bei der Versuchsperson A nach unserer Bestimmung 0·004 g.

IV	9 N.	9 V.	12	750	0.8981	0.4150	0.1178
V	9 V.	9 N.	12	1050	0.5755	0.1463	0.0415 ¹⁾
VI	9 N.	9 V.	12	1180	0.0406	0.0796	0.0225
VII	9 V.	9 N.	12	1210	0.0608	0.0259	0.0073
VIII	9 N.	9 V.	12	650	—	0.0186	0.0052 ¹⁾
				zusammen	2.1834		0.9390

Sowohl im Versuch **A** wie im Versuch **B** wurde nach Saloleinnahme auch eine Bestimmung des Salolgehaltes in den Faeces ausgeführt. Es gelangten zu dieser Untersuchung die in 6 Tagen nach Saloleinnahme entleerten Stühle. Im Versuch **A** haben wir uns bemüht, Salizylsäure aus den Faeces zu gewinnen, und zwar nach dem von einem von uns²⁾ für die Untersuchung der Faeces auf die in Wasser unlöslichen Salizylsäureester angewandten Verfahren. Im Versuch **B** wurde dagegen das Phenol bestimmt. Die Phenolbestimmung wurde in folgender Weise ausgeführt. Die Faeces wurden zum Zweck der Spaltung von Salol mit verdünnter Natronlauge am Rückflußkühler gekocht, dann mit Salzsäure stark angesäuert und der Destillation mit Wasserdampf unterworfen. Das Destillat wurde mit Baryt versetzt, der Barytüberschuß mit Kohlensäure entfernt und das Filtrat noch einmal destilliert. Dieses Destillat wurde mit Natronlauge stark alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade konzentriert und nach dem Ansäuern mit Salzsäure zur Fällung mit Bromwasser verwendet. Aus dem gefundenen Salizylsäure-, resp. Phenolgehalte wurde der Gehalt der Faeces an Salol berechnet.

Im Versuch **A** wurden 0.1113 g Salizylsäure gefunden, was 0.172 g Salol entspricht.

Im Versuch **B** wurden 0.475 g Tribromphenol erhalten, woraus sich 0.3070 g Salol berechnen lassen.

Wir sehen aus den Resultaten der Analysen, daß sowohl nach der Einnahme von Salol als nach dem Einverleiben von salizylsaurem Natrium die Ausscheidung von Salizylsäure unter gewissen Schwankungen ziemlich gleichmäßig vor sich geht. Ein bemerkenswertes Steigern der Ausscheidung von Salizylsäure ist in der Periode II fast in allen Versuchen zu verzeichnen. Nur im Versuch **A**, und

¹⁾ Der Phenolgehalt der 24-stündigen Menge des Harns der Versuchsperson **B** betrug 0.0125 g.

²⁾ Bondzyński, a. a. O.

zwar nach der Einnahme von Salol ist die Ausscheidung von Salizylsäure in dieser Periode ein wenig schwächer als in den ersten 3 Stunden.

Es findet jedoch auch die erwartete Verzögerung der Resorption, resp. der Ausscheidung von Salizylsäure nach der Einführung von Salol in den Resultaten der beiden Versuche einen deutlichen Ausdruck.

Während in den Versuchen mit Salizylsäure in den ersten 21 Stunden nach der Einnahme der größere Teil der Salizylsäure in den Harn überging, so daß in der sechsten 12-stündigen Periode nur ein kleiner Rest ausgeschieden wurde, gelangte nach Salolgebrauch im Versuch B ein großer Teil, im Versuch A sogar der größere Teil der Salizylsäure gerade in dieser späteren, auf die ersten 21 Stunden folgenden Periode zur Ausscheidung. Bei der Versuchsperson A, wo die Resorption überhaupt einen protrahierten Verlauf hatte, dauerte die Ausscheidung von Salizylsäure 57 Stunden nach der Einnahme des Salols fort.

Die Verzögerung in der Ausscheidung von Salizylsäure nach der Einnahme von Salol ist wohl teils auf das mehr oder weniger passive Verhalten des Salols im Magen zurückzuführen, vielmehr jedoch darauf, daß das Salol vor der Resorption im Darm gespalten werden muß, sowie auf die besondere Fähigkeit der Salizylsäure, in alle Flüssigkeiten und Gewebe des Körpers zu gelangen und dort einige Zeit zurückgehalten zu werden. Durch die Verteilung des Resorptionsprozesses auf eine größere Fläche des Darms im Fall von Salol wird diese Durchtränkung der Gewebe mit Salizylsäure noch erleichtert.

Daß die Salizylsäure diesbezüglich sich eigentümlich verhält, läßt sich schließen beim Vergleichen der Ausscheidung der beiden Spaltungsprodukte nach Verabreichung von Salol. Im Versuch B ist fast die Hälfte des zur Ausscheidung gelangten Phenols in den ersten 3 Stunden nach der Einnahme ausgeschieden worden, und beinahe $\frac{3}{4}$ der ausgeschiedenen Phenolmenge fanden sich im Harn der ersten 6 Stunden (Periode I und II), während der Hauptteil der ausgeschiedenen Salizylsäure auf die Perioden IV und V fiel und auf einen Zeitabschnitt von 24 Stunden, die auf die ersten 9 Stunden folgten, sich ausgedehnt hatte. Im Versuch A war die Ausscheidung sowohl von Phenol wie von Salizylsäure verhältnismäßig langsamer, trotzdem sind die Unterschiede im Verhalten der zwei Verbindun-

gen ebenfalls deutlich. Die Ausscheidung des Phenols war in der Periode VII, also nach 46 Stunden, fast bis auf die Höhe des Phenolgehaltes des normalen Harns gesunken, während Salizylsäure noch reichlich ausgeschieden wurde und die Ausscheidung in der darauf folgenden 12-stündigen Periode noch fort dauerte.

Auf dem soeben beschriebenen Verhalten des Salols, sowie insbesondere auch auf dem zuletzt genannten Umstand, oder mit anderen Worten auf der eigentümlichen Fähigkeit des Zirkulationsapparates, sich des resorbierten Phenols rasch zu entledigen, beruht auch wahrscheinlich die Ungiftigkeit des Salols.

Denn daß das aus der Spaltung des Salols resultierende Phenol nicht in höherem Maße oxydiert wird, als das im freien Zustand eingeführte, beweist der Vergleich unserer mit Salol angestellten Versuche mit den Versuchen, welche andere Forscher mit Phenol ausgeführt hatten. So fand Tauber¹⁾, daß 45% bis 68%, Fr. Schaffer²⁾, daß 38% des eingeführten Phenols im Tierkörper (die Versuche wurden allerdings an Hunden ausgeführt) der Oxydation unterliegen. Unsere Experimente ergaben, daß von 1.53 g (= 3.5 g Salol) des in Form von Salol eingeführten Phenols die Versuchsperson **A** — 0.8149 g, die Person **B** sogar 0.9390 g im Harn erscheinen ließen, daß im ersten Fall 46%, im zweiten nur 37% der eingenommenen Menge im Organismus oxydiert wurden.

Wenn die Spaltung von Salol in den obersten Partien des Darms stattfindet, so wird doch ein geringer Teil bis in die untersten Partien desselben fortgeschoben. Macfayden, Nencki und Sieber haben bei Gelegenheit der an einer Frau mit einer Darmfistel angestellten Untersuchungen: „Über die chemischen Vorgänge im menschlichen Darm“ beobachtet, daß nach Saloleinnahme der an die Ileocoecal-Klappe gelangende Darminhalt Salizylsäurereaktion ergab. Wir haben uns überzeugen können, daß ein allerdings kleiner Teil des Salols (5–8%) der Spaltung entgeht und mit den Faeces ausgeschieden wird.

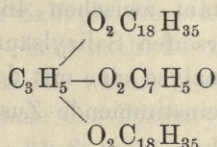
Es verdient noch hervorgehoben zu werden, daß die von uns untersuchten Prozesse offenbar sehr stark von individuellen Verhältnissen beeinflußt werden. In der Tat war im Fall **A** die Ausscheidung sowohl der Salizylsäure wie des Phenols gleichsam

¹⁾ Arch. f. exp. Pathol. und Pharmak. Bd. 28, S. 311.

²⁾ Journal f. prakt. Chemie 18, 282.

schleppend. Ob weniger energische Prozesse der Spaltung oder der Resorption oder ein weniger schneller Blutumlauf daran schuld waren, bleibt dahingestellt. Es ist möglich, daß mehrere Faktoren daran beteiligt waren — die Versuchsperson war ein zu Verdauungsstörungen hinneigender 24-jähriger Mann von allgemein schwachem Körperbau und schwachem Stoffwechsel.

Versuch mit Distearylsalizylglyzerid.



Die Beobachtung von einem von uns¹⁾, daß das Trisalizylglyzerid, das Trisalizylin im Verdauungskanal fast gar nicht gespalten, sondern unverändert mit den Faeces ausgeschieden wird, forderte dazu auf festzustellen, wie die nur einen Salizylsäurerest enthaltenden Triglyzeride im Organismus sich verhalten würden.

In erster Linie war hier an ein den Fetten nahe stehendes Glycerid zu denken. Es wurde daher beschlossen, das Distearylsalizylglyzerid zu diesen Versuchen zu verwenden. Eine solche Verbindung war aber noch nicht bekannt, sondern mußte erst erhalten werden. Sie ließ sich durch Einwirkung von stearinsäurem Silber auf den von Fritsch²⁾ erhaltenen Salizylsäuredichlorhydrinester darstellen. Den Salizylsäuredichlorhydrinester haben wir nach der Methode von Fritsch bereitet. Die erhaltenen Kristalle hatten die von diesem Autor angegebenen Eigenschaften und schmolzen bei 45° C. Diese Verbindung wurde nun mit trockenem stearinsäurem Silber unter Verreiben innig vermischt und in einem zugeschmolzenen Kölbchen 5 Stunden lang auf 125° erhitzt. Die Schmelze erstarrte nach dem Abkühlen zu einer harten Masse. Durch Ausziehen derselben mit Äther und Abdunsten des Äthers wurde eine ölige Substanz erhalten, welche beim Erkalten fest wurde und das Aussehen des nach dem Schmelzen erstarrten Butterfettes hatte. Dieser Rückstand wurde in heißem Alkohol gelöst; die alkoholische Lösung wurde beim Erkalten in einen Brei von schneeweißen Flocken

¹⁾ Bondzyński a. a. O.

²⁾ Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 24, 775.

umgewandelt, welche unter dem Mikroskop bei starker Vergrößerung als aus Nadelchen bestehend sich erwiesen. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen über Schwefelsäure wurde ein weißes Pulver erhalten, welches in seinen Eigenschaften und im Geschmack einem Fett sehr ähnlich war. Der Körper war in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Petroleumäther äußerst leicht löslich, etwas schwieriger in Alkohol. Durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt, zeigte die Substanz zwar keinen scharfen Schmelzpunkt, schmolz aber doch konstant zwischen 46° und 49° C. Die Verbindung lieferte beim Verseifen Salizylsäure und Stearinsäure und ergab bei der Elementaranalyse eine mit der Formel des Distearylsalizylsäureglyzerids übereinstimmende Zusammensetzung.

Gefunden:	Berechnet für $C_{46}H_{80}O_7$:
C — 74·66%	74·19%
H — 11·07 „	10·75 „

Die Versuchsperson A hatte nun am 23. III., um 12 Uhr Mitt. 5·5 g Distearylsalizylsäureglyzerid (= 1 g Salizylsäure) in Butterfett gelöst eingenommen.

Die Zeit nach der Einnahme wurde in 4 Perioden eingeteilt. Es ergab sich:

Perioden	Dauer der Perioden von	bis	Dauer d. Perioden in Stunden	Harnmenge in cm^3	Salizylsäure gefunden
I	12 M.	9 N.	9	500	0·1903
II	9 N.	9 V.	12	520	0·1935
III	9 V.	9 V.	24	1600	0·6809
IV	9 V.	9 V.	24	1670	0·0237
zusammen					1·0884

In den Faeces konnten wir nur Spuren des Distearylsalizylglyzerids nachweisen.

Das Distearylsalizylglyzerid wurde also im Gegensatz zum Verhalten des Trisalizylglyzerids im Organismus vollkommen resorbiert. Es bestätigt dies die Schlußfolgerung, welche einer von uns aus seinen Versuchen gezogen hatte, daß die nur einen Salizylsäurerest führenden Ester der Salizylsäure im Organismus leichter resorbiert werden als die Di- oder Trisalizylate.

Es ist bemerkenswert, daß wir die ganze Menge der in Form

des genannten Glyzerids eingeführten Salizylsäure im Harn wiederfanden.

Wenn aber das Distearylsalizylglyzerid vollkommen resorbiert wird, so vollzieht sich die Resorption allmählich und ist offenbar auf eine große Strecke des Darms verteilt, denn es ist eine deutliche Verzögerung in der Ausscheidung der Salizylsäure aus den Resultaten des Versuches ersichtlich. Während bei der Versuchsperson **A** nach der Salizylsäureeinnahme ungefähr die Hälfte der ausgeschiedenen Menge Salizylsäure schon in den ersten 9 Stunden in den Harn überging und nach 21 Stunden beinahe 80% der ganzen Menge ausgeschieden waren, wurde bei derselben Versuchsperson nach der Einnahme des Distearylsalizylglyzerids in 9 Stunden kaum 20% und in 21 Stunden nicht mehr als 38% der eingenommenen Menge ausgeschieden.

64. *Badania ilościowe nad wydzielaniem kwasów protei-
nowych w moczu zdrowych osób oraz w wypadkach
chorób. — Quantitative Untersuchungen über die Aus-
scheidung von Proteinsäuren im Harn von gesunden
Menschen sowie in einigen Krankheitsfällen.* Mémoire
de M. **WITOLD GAWIŃSKI**, présenté par M. N. Cybulski m. t.¹⁾.

Die Entdeckung und Erforschung der Proteinsäuren von St. Bondzyński und seinen Mitarbeitern Gottlieb, K. Panek und Stef. Dombrowski²⁾ wie auch der Umstand, daß diese

¹⁾ Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorgetragen in der Sitzung der physiologischen Sektion der Versammlung der polnischen Ärzte und Naturforscher in Lemberg am 23. Juli 1907. (Vide: Sprawozdanie z posiedz. sek. X. Zjazdu lek. i przyr. pol. we Lwowie, S. 100).

²⁾ St. Bondzyński und R. Gottlieb: „Über einen bisher unbekanntem normalen Harnbestandteil, die Oxyproteinsäure“. Zentralbl. f. d. med. Wiss. **33**, 557 (1897), und Przegląd lekarski (Krakau) 1898.

St. Bondzyński und K. Panek: „Über Alloxyproteinsäure, einen normalen Harnbestandteil“. Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovie, Octobre 1902 und Ber. d. deutsch. chem. Gesell., 1902.

St. Bondzyński, St. Dombrowski und K. Panek: „Über die Gruppe von in normalem Menschenharn enthaltenen Stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren“. Bulletin de l'Académie des Sciences de Cracovie, Juillet 1905 und Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XLVI, S. 83.

Verbindungen, was schon bei ihrer Erhaltung vermutet wurde, in nicht geringer Menge im Harn ausgeschieden werden, weiters ihre Eigenschaft, daß sie erste Zersetzprodukte des Eiweißes in dessen Stoffwechsel im Organismus bilden, und die sich darauf stützende Voraussetzung, daß in ihrer Ausscheidung die ganze Mobilität des lebendigen Eiweißmoleküls der tierischen Zelle und damit die verschiedenartigsten Einflüsse, welchen der Prozeß des Abbaues von Eiweiß unzweifelhaft unterliegt, welche jedoch an der Hand der bisherigen Harnuntersuchungen sich der Beobachtung entzogen, zum Ausdruck gelangen werden — machte die Erforschung der quantitativen Verhältnisse der Ausscheidung von Proteinsäuren zu einer der brennendsten Aufgaben der Stoffwechsellehre.

Als Grundlage der quantitativen Bestimmungen wurde die vollkommene Unlöslichkeit der Baryumsalze der Proteinsäuren in absolutem Alkohol angenommen. Um die Alkalisalze der Proteinsäuren in Baryumsalze zu verwandeln, wurde zu dem im Vakuum eingeeengten Harn verdünnte Schwefelsäure bis zum Erscheinen des Farbenumschlags an mit Kongo-Rot gefärbtem Papierstreifen zugesetzt und dann ein vielfaches Volumen von Alkohol zugegeben. Die von den Alkalisulfaten filtrierte alkoholische Lösung wurde nach reichlicher Verdünnung mit Wasser mit Baryumhydrat gefällt. Nach der Entfernung des Barytüberschusses durch Kohlensäure wurde die im Vakuumapparat bis zur Sirupdicke eingeengte Lösung behufs Entfernung des Harnstoffes mit Ätheralkohol (1:2) ausgezogen, der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Ein 100 cm³ Harn entsprechendes Volumen dieser Lösung wurde in einer Hofmeister'schen Schale mit Seesand vermischt, eingedamft und im Exsikkator getrocknet. Der samt Schale zerriebene Sand wurde in einem Soxhlet'schen Apparate 3—5 Stunden lang mit absolutem Alkohol extrahiert und darnach mit warmem Wasser ausgelaugt.

Diese Lösung, welche wir Baryumsirup nennen wollen, enthielt, wie das aus den eigens zu diesem Zweck unternommenen quantitativen Untersuchungen erhellt, nur Spuren von Harnstoff, Hippursäure und Kreatinin, beziehungsweise Kreatin.

Da sich die ganze in diesem Baryumsirup enthaltene Stickstoffmenge in dem durch Quecksilberazetat gefällten Niederschlage wiederfand, wurde daraus geschlossen, daß der ganze Stickstoff des Baryumsirups den Proteinsäuren angehörte.

Der Stickstoffgehalt in solchen Baryumsirupen wurde nach Kjeldahl bestimmt.

Diese Bestimmungen ergaben:

1^o daß der Stickstoff der Proteinsäuren in nach gemischter Kost erhaltenem Harn 4·5 — 6·8 % des Gesamtstickstoffes betrug, also einen viel größeren Prozentsatz dieses Stickstoffes als Harnsäure oder Kreatinin in Anspruch nahm;

2^o daß die genannten Proteinsäuren nach einer Milchkost in viel, und zwar beinahe um die Hälfte geringerer Menge (N : 2·9 % des Gesamtstickstoffes) ausgeschieden wurden;

3^o daß in Fällen von typhus abdominalis der Stickstoff der Proteinsäuren gegenüber dem in normalem Harn gefundenen so deutlich gesteigert gefunden wurde, daß er nur selten weniger als 7·5 % und oft sogar 9 — 14 % der ganzen Harnstickstoffmenge betrug.

Außer den Stickstoffbestimmungen wurde auch die Menge des sogenannten neutralen Schwefels der oben erwähnten Baryumsirupe bestimmt und dieselbe mit dem Neutralschwefelgehalt des Harns verglichen.

Die nahe Übereinstimmung dieser Ergebnisse bestätigt vollkommen die Annahme von Bondzyński und seinen Mitarbeitern, daß die ganze oder beinahe ganze Menge des neutralen Schwefels den Proteinsäuren angehört, und liefert auch einen Beweis für die Brauchbarkeit der Methode, indem gezeigt wurde, daß der Baryumsirup die ganze oder beinahe die ganze Menge der Proteinsäuren enthielt.

Das Verhältnis des Stickstoffgehaltes im Baryumsirupe zu dem neutralen Schwefel war in normalem Harn sowohl nach gemischter Nahrung wie auch nach Fleischkost fast konstant, da die Schwankungen sich zwischen 5 — 7·29 bewegten. Aus diesem Umstand läßt sich schließen, daß die Bestimmung des neutralen Schwefels im Harn sich ebenfalls als Grundlage einer Methode der quantitativen Bestimmung von Proteinsäuren verwerten läßt.

Lwów (Lemberg), Medizinisch-chemisches Institut der Universität.

65. *Badania nad tkanką gliową układu nerwowego pija-
wek na przednim i tylnym końcu ciała. — Untersuchun-
gen über das Stützgewebe des Nervensystems im vor-
deren und im hinteren Körperende der Hirudineen nebst
Bemerkungen über deren Neuromerie.* Mémoire de M.
A. W. JAKUBSKI, présenté par M. J. Nusbaum m. c.

(Planche XXX).

Einleitung und Methoden.

In meinen vorhergehenden Mitteilungen über das Stützgewebe des Nervensystems bei den Hirudineen (14, 15 u. 16) habe ich hauptsächlich das Vorkommen und die histologische Beschaffenheit des Gliagewebes in normalen Neurosomiten, die wie allgemein bekannt, nur in den mittleren Körperregionen auf typische Weise ausgebildet sind, untersucht. Die Frage über die Gliaverhältnisse in den reduzierten Neurosomiten der beiden Körperenden ließ ich dort fast unberücksichtigt. Da aber, meiner Ansicht nach, das Gliagewebe dieser Körperteile besonderes Interesse, auch in theoretischer Hinsicht, verdient, fühlte ich mich zur Wiederaufnahme der Untersuchungen im Bereiche des Nervensystems der Hirudineen veranlaßt. Indessen war ich bemüht, einerseits bei Anwendung verschiedener Färbungsmethoden das Gliagewebe von anderen Elementen des Nervensystems zu isolieren und es histologisch zu prüfen, andererseits die topographischen Verhältnisse der Gliazellen und deren Derivate hinsichtlich der Neuromerie in den Endkörperomiten aufzudecken und sie theoretisch aufzuklären.

Wie schon bei meinen früheren Arbeiten, fand ich auch bei der Bearbeitung des vorliegenden Themas in meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. Nusbaum einen wissenschaftlichen Leiter und Ratgeber, wofür ich Ihm an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

Als Untersuchungsmaterial wählte ich folgende Hirudineenarten: *Hirudo medicinalis*, *Aulostomum gulo*, *Nephelis vulgaris*, *Clepsine sexoculata*, *Pontobdella muricata* und *Piscicola geometra*. Als Konservierungsflüssigkeit diente meistens Carnoy's- oder Sublimat-Eisessig-gemisch; gefärbt wurde in Heidenhains Eisenhämatoxylin. Wie

ich schon früher hervorgehoben habe, bewährte sich das Färben des Gliagewebes nach dem Benda'schen Verfahren ausgezeichnet. Von zahlreichen anderen Methoden, die ich bei dieser Arbeit verwendete, erhielt ich wider Erwarten mit der Weigert'schen Gliafärbungsmethode auch im kleinsten Detail ausgezeichnete Resultate. Gefärbt wurden, wie es schon Benda eingeführt hat, in Paraffin eingebettete und bis 5 μ dicke Schnitte. Gleich muß ich aber hervorheben, daß ich die Methode in zweierlei Weise anwandte. Entweder wurden die in Carnoy's oder Sublimat-Eisessig-Mischung konservierten Stücke nach Weigerts Verfahren gefärbt, oder die Methode wurde in vorgeschriebener Weise vom Anfang an durchgeführt. Was die Dauer anbelangt, in welcher die Schnitte in verschiedenen Flüssigkeiten bleiben sollten, sei folgendes bemerkt: Die von Paraffin befreiten Schnitte kommen auf 5 Min. in reduzierende 0.3% Kaliumpermanganatlösung, werden dann mit destilliertem Wasser abgespült, um ferner in Chromogen-Ameisensäure-Natriumsulfat auf 10 Min. gelegt zu werden; nach kurzem Abspülen kommen sie dann auf 15—30 Min. in 5% Chromogen. Die weitere Behandlung geschieht in üblicher Weise. Das ganze Verfahren muß sehr vorsichtig durchgeführt werden, damit die Schnitte nicht austrocknen, auch muß der Objektträger von jeder Flüssigkeit peinlich abgetupft werden. Nach einiger Übung erhält man ganz einwandfreie Resultate. Auf gut gelungenen Bildern sind im ganzen Nervensystem die Neurogliafasern dunkelblau gefärbt; außerdem saugen die Kernkörperchen der Ganglien- und Gliazellen begierig den Farbstoff auf. Daneben wird die Neurilemmhülle samt den in ihr eingebetteten Elementen blau bis violett mitgefärbt. Alles andere: die Ganglienzellen, ihre Ausläufer, besonders aber auch die Nervenfibrillen und das die Abstände zwischen den Ganglienzellen im Innern der Pakete einnehmende Füllgewebe wird vom Farbstoff nicht angegriffen. Das Neurogliaegerüst kommt hier (Fig 1 und 8) in so großer Anzahl von Gliabalken und -fibrillen zum Vorschein, wie man sie bei Färbung mit Eisenhämatoxylin nicht annähernd erhalten kann. Die intrazellulären Gliaetze in den Gliazellen sowie die feinsten Verästelungen der Gliafasern in ihrem extrazellulären Verlaufe treten sehr deutlich hervor. Besonders schön sind die Gliafaserkörbe an der Oberfläche der Ganglienzellen zu sehen (Fig. 1). Einige dicke Gliafasern ziehen sich aus der Punktsubstanz längs der Ganglienzellenfortsätze in losem Geflechte gegen ihren Zelleib

hin, wo sie sich wiederholt teilen und in dichtem, aber feinem Netze den ganzen Zelleib umspinnen. Aus diesem oberflächlichen Netze treten einige Fasern in das Zellinnere, ohne aber die ektoplasmatische Schicht zu durchbrechen.

Topographie der Gliazellen.

I. Die Unterschlundganglienmasse.

Der feinere histologische Bau des Nervenschlundringes, wie des Unterschlund- und Analganglions im Gegensatz zu normalen viernervigen Ganglien, ist von der Wissenschaft noch nicht genügend erforscht worden. Alle älteren Angaben über diesen Gegenstand beziehen sich nur auf grobe anatomische Befunde, größtenteils um die Metamerie der Körperenden zu lösen. Deshalb wurde die histologische Beschaffenheit des Nervensystems in diesen Gegenden durchwegs in groben Zügen behandelt, insofern sie mit der Neuromerie zusammenhing. Zwar wurden schon seit langem Unterschlund- und Analganglien als eine gewisse Anzahl normaler Ganglien erklärt, die durch Konkreszenz zusammengerückt sind, dagegen wußte man nur wenig über die Zahl und die Lage der in ihnen liegenden Gliazellen, die damals für „multipolare Ganglienzellen“ gehalten wurden. Hermann (12) gibt an, daß in diesen Teilen des Zentralnervensystems multipolare Zellen in der Medianreihe liegen, eine hinter der anderen; ihm sind also nur die sog. Medianzellen bekannt, dagegen über deren Zahl in der Unterschlund- wie auch in der Analganglienmasse gibt er nichts näheres an. Die durch Konzentration der Ganglien hervorgerufene Lagenänderung der Gliaelemente war ihm fremd geblieben, was aus folgenden Worten zu schließen ist: „Das Querschnittsbild des unteren Schlund- oder letzten Ganglions ist demnach auch vom einem im gleichen Sinne durch ein viernerviges Ganglion geführten in topographischer Hinsicht nicht verschieden“. — Hoffman (13), Vignal (32), François (10) bestätigten nur im allgemeinen diese Befunde, fügten aber wenig Neues hinzu. Zwar bemerkte Rohde (29) in den Endgliedern der Bauchganglienkette in der Zentralfasermasse multipolare Zellen, die von ihm an verschiedenen Orten unregelmäßig an der Neurilemmhülle gefunden wurden, ihre Natur aber, symmetrische Lage und begrenzte Anzahl, geschweige denn deren Homologie mit anderen „multipolaren Zellen“ des Bauchstranges

blieben ihm fremd. Was die Retzius'schen Angaben (28) über die Unterschlundganglienmasse bei *Hirudo* und *Aulostomum* anbelangt, so muß ich nur meine früheren Einwendungen wiederholen. Die von ihm mittels der Ehrlich'schen Methylenblaufärbung gewonnen und dargestellten „multipolaren Medianzellen“ entsprechen keineswegs unseren medianen Gliazellen. Die Retzius'schen Gebilde liegen flach auf der Dorsalseite der Ganglienzentralfasermasse, symmetrisch nebeneinander, nahe der Mittellinie und unterscheiden sich in ihrer Form von den Gliazellen wesentlich. Die Kerne sind in ihnen nicht gefunden worden. Die Zelleiber sind langgestreckt, spindelförmig mit Verästelungen, die weit in die Peripherie hinauslaufen. Übrigens ist es noch zweifelhaft, ob man berechtigt ist, diesen Gebilden den Namen Zellen beizulegen. Ein ihnen entsprechendes Äquivalent ist in meinen Präparaten nicht vorhanden. Sie wurden von Retzius nur in normalen und in Unterschlundganglien beobachtet; das Gehirn soll dagegen solcher Gebilde entbehren. Eines muß aber hervorgehoben werden: Diese Gebilde, die vielleicht Neurilemmmuskelzellen sind, was aus ihrer Lage, Zahl und Gestalt zu vermuten ist, weichen in den vorderen Partien der Unterschlundganglienmasse auseinander; während sie mit ihren vorderen Spitzen auseinanderlaufen, konvergieren sie dagegen mit den hinteren. Dies dient auch als Beweis für die Richtigkeit meiner Beobachtungen (siehe unten). Andere Forscher wie Apáthy (1), Oka (27), Leuckart (22), Whitman (33), Bristol (8) ließen in ihren Untersuchungen über die Neuromerie die histologische Beschaffenheit der Endganglien unberücksichtigt. Es sei nur bemerkt, daß Whitman 4 Paar mediane Zellen in der Unterschlundganglienmasse bei *Clepsine* fand, wogegen Bristol deren 5 Paare bei *Nephelis* beschrieb. Auch die letzte Arbeit, mit der ich diese Übersicht abschließen möchte, nämlich die Abhandlung von Livanow (23) (die auch als anatomisch bezeichnet werden dürfte), berührt dieses Thema nur wenig. Was die Kommissurzellen in der Unterschlundganglienmasse anbelangt, muß hervorgehoben werden, daß es Livanow's Verdienst ist, diese Zellen entdeckt und sie als Äquivalente der übrigen Konnektivzellen erkannt zu haben. Da er aber annahm, daß die Unterschlundganglienmasse nur aus vier Ganglien aufgebaut sei, so bemerkte er nur drei Paare solcher Zellen; die vierte, die zwischen dem ersten und dem zweiten Ganglion schon im Bereiche der Schlundkommissuren liegt, hat er zwar

gesehen, ihr aber eine andere Deutung gegeben. Allen diesen Forschern, Apáthy und Livanow ausgenommen, blieb die Natur aller dieser Zellen, die heute als Gliazellen erklärt werden, fremd; es ist also leicht zu begreifen, daß sie diesen „multipolaren Ganglienzellen“ keinen gebührenden Wert beileigten ¹⁾.

Gehen wir zu unseren eigenen Untersuchungen über. Die Unterschlundganglienmasse bei *Hirudo* stellt sich von oben gesehen, wenn ich Leuckart's Worte wiederhole, „als ein Kartenherz“ dar; die hinteren Ganglien sind kleiner und schmaler, die vorderen dagegen nehmen an Breite zu, gleichzeitig aber nimmt ihre Höhe ab. Nur bei *Pontobdella* ist ihre Gestalt mehr rechtwinkelig-viereckig, was vom rudimentären Bau des Nervenschlundringes abhängt (siehe weiter unten). Das vom typischen Aussehen abweichende und mit Lageveränderung verbundene Auftreten der Gliaelemente in den Endgliedern der Bauchganglienmasse steht im innigen Zusammenhange mit der Reduktion der Ganglien. In der Unterschlundganglienmasse und der unteren Hälfte des Schlundringes kommen 18 Gliazellen vor, deren Zahl und Lage streng mit der Neuromerie zusammenhängt. Prüfen wir zuerst bloß ihre Lage, die vergleichend untersucht wichtige Tatsachen aufweist. Wie schon Livanow (23, 24) hervorhob, treten in Unterschlundganglien zweierlei Gliazellen auf: die einen entsprechen den Medianzellen in den normalen Bauchganglien, die anderen sind Konnektivzellen, die „an der Ventralseite jedes Konnektivstammes peripher gelegen, zahlreiche Fortsätze in letzteren abgeben“. Wenn man vorsichtig transversale Serienschnitte durch die Schlundganglienmasse durchmustert, trifft man bei verschiedenen Hirudineenarten Übergangsverhältnisse, die diese Tatsache völlig begründen. So sieht man im letzten Konnektivstamm, der die Unterschlund-, wie auch die Analganglienmasse mit den ersten normalen Bauchganglien verbindet, zwei wichtige Momente. Das erste ist, daß die Konnektivzellen nicht in der Mitte der Konnektivlänge liegen, sondern sich mehr der Unterschlund-, resp. der Analganglienmasse nähern. Es ist ein direkter Beweis da-

¹⁾ In neuester Zeit erschien eine histologische und histogenetische Arbeit über die sog. Leydig'sche Punktsubstanz bei den Hirudineen von E. Mencl (25). Vielen Resultaten dieses Autors kann ich bezüglich der Histologie des Gliagewebes nicht beipflichten, teils weil sie mittels sich hierfür wenig eignender Methoden angestellt worden sind, teils weil seine Erklärungen mir nicht stichhaltig erscheinen.

für, daß das Konnektiv in der Region zwischen dem Konnektivkern und den Endganglien schwächer als im Teile zwischen diesem Kerne und den Bauchganglien in die Länge wächst. Bei *Hirudo* und *Aulostomum*, wo jeder Konnektivstamm auf seinen Eintrittsstellen in die Nachbarganglien durch Neurilemmsepta in eine gewisse Zahl von Nervenfaserbündeln zerlegt wird, liegt der Gliazelleib mit dem Kern im erwähnten Konnektive dicht an jenen Neurilemmscheidewänden, die an die Endganglien grenzen. Auf diese Weise kommen bei den obigen Gnathobdelliden die Kommissurenzellen, ohne peripher zu wandern, schon im letzten Konnektivstamme in innige Berührung mit der Neurilemmhülle. Anders verhält es sich bei den Rhynchobdelliden und *Nephetis* — und dies ist das zweite Moment. Bei *Pontobdella* liegen diese Zellen exzentrisch (Fig. 17); bei verschiedenen Exemplaren variiert ihre Lage beträchtlich und bald werden sie nahe der Mitte, bald ganz an der Peripherie liegend angetroffen. Wie wir also sehen, bildet die Lage dieser Zellen, resp. ihr Verhältnis zum Neurilemm zwei unabhängig voneinander auftretende Zwischentypen, die durch die Natur der Konnektivstämme bei verschiedenen Hirudineenarten bedingt sind, und zwar zwischen den normalen, im Konnektivzentrum und den ganz an der Peripherie der Zentralfasermasse liegenden Konnektivzellen.

Wenn wir auf lückenlosen Schnittserien die Unterschlundganglienmasse betrachten, so drängt uns die Lage und Zahl der Gliazellen die Vermutung auf, daß diese Masse aus 5 reduzierten Ganglien zusammengesetzt ist. Bei *Hirudo* und *Aulostomum* ist das erste Teilganglion wenig reduziert, in seiner Länge steht es nur wenig den typischen Ganglien nach; die medianen Gliazellen stehen in etwas geringerem Abstände voneinander als sonst; die durch Neurilemmscheidewände gebildeten Ganglienzellenpakete mit 6 in ihrem Innern vorkommenden Gliazellen weichen vom typischen Ganglion nicht ab. Nur die Verkürzung des Ganglions und die mehr oder weniger angedeutete schräge Stellung der Medianpakete zur Längsachse bietet das einzige Zeichen seiner Zugehörigkeit zur Unterschlundganglienmasse dar.

Zwei Zentralfaserabschnitte, einige μ lang, die den Konnektiven entsprechen, verbinden das Ganglion mit dem nächstfolgenden. Im allgemeinen existieren die Kommissuren in der Unterschlund- wie

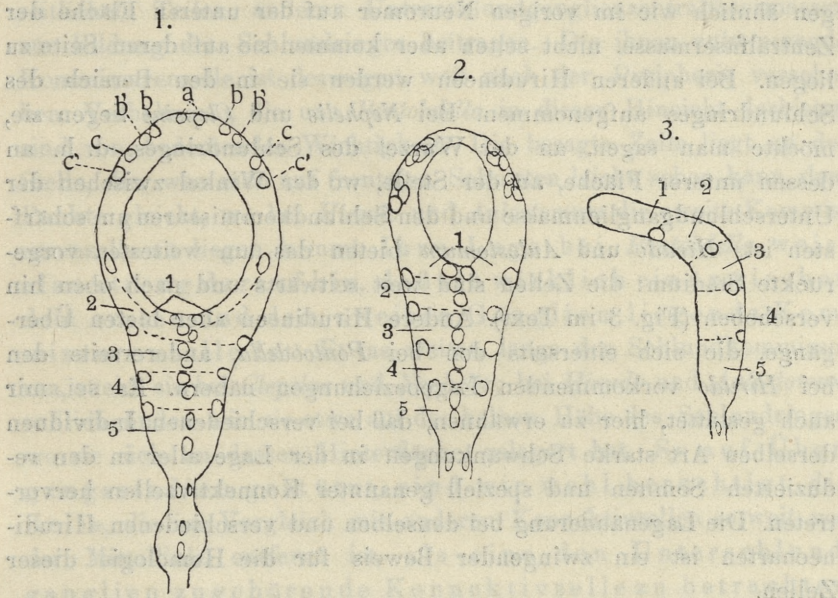
auch Analganglienmasse als differenzierte Gebilde nicht; die Verlötung der Zentralfasermassen der einzelnen Ganglien geschieht unmittelbar auf ihrer ganzen Fläche. Die Grenze zwischen den Ganglien wird nur nahe der Mittellinie durch kurze dorso-ventral verlaufende Neurilembalken angedeutet. Dies beruht auf embryonalem Zustande, da die Entwicklung der Kommissuren gänzlich unterbleibt und einzelne Ganglien voneinander nicht getrennt werden. Wie eben gesagt, wird das erste Ganglion vom zweiten durch 2 paramedian auftretende Neurilemmscheidewände, die oben zusammenfließen, geschieden, wodurch auch der Faivre'sche Mediannerv nicht wie sonst an der oberen, sondern an der unteren Fläche zwischen beiden Zentralfaserabschnitten erscheint. Die Konnektivzellen liegen schon an der Peripherie und größtenteils auf der unteren Seite (vergleiche Figur 8, Tafel I meiner letzten Arbeit); nicht selten findet man aber Übergangsverhältnisse. So sehen wir auf Fig. 4 im Text (Seite 879), die zwar die Lage der ersten Konnektivzelle im Analganglion bei *Aulostomum* darstellt, nicht selten aber auch in Unterschlundganglien in dieser Lage vorzukommen scheint, diese Zelle noch etwas von der Peripherie entfernt.

Das folgende Ganglion ist mehr zusammengedrückt. Dies äußert sich besonders in der Längenabnahme und in der Translokation der Ganglienzellenpakete. Ich will hier auf diesen Punkt nicht näher eingehen, sondern verweise auf die Arbeit von Livanow (23). Das fünfte und das vierte Ganglion (Fig. 1 im Text) haben noch andere Merkmale, in denen sie den normalen Ganglien ähneln; es sind nämlich zwei dorsoventral, paramedial durch die Mitte des Ganglions verlaufende Neurilembalken, die das Ganglion in die vordere und die hintere Hälfte teilen (Fig. 2). Dies Zeichen tritt bei allen folgenden Ganglien nicht auf. Solche Verhältnisse werden bloß bei Gnathobdelliden beobachtet; bei Rhynchobdelliden fehlen sie vollständig.

Die zwischen dem vierten und dem dritten Ganglion auftretenden Konnektivzellen liegen nicht mehr am unteren Rande, sondern sind mehr seitwärts gelagert. Das dritte, zweite und erste Ganglion weisen immer weiter fortschreitende Änderungen auf. Im dritten Ganglion, dessen Länge etwa die Hälfte der Normallänge beträgt, stoßen beide medianen Gliazellen mit ihren Plasmaleibern aneinander; manchmal, wie bei *Nepheleis* verlieren die Zellen ihre mediane Lage, indem die eine rechts, die andere links von der Medianlinie ver-

schoben wird. Dagegen nimmt die Breite zu, so daß die Querdurchmesser des dritten Ganglions um einen Bruchteil diejenige des normalen übertrifft.

Bis hieher sind die topographischen Verhältnisse der Gliazellen der Zentralfasermasse bei allen untersuchten Hirudineenarten fast



Schemen zur Versinnlichung der Lage der Gliazellen im Ober- und Unterschlundganglion bei *Hirudo* und *Pontobdella*. Die Lage der Gliazellen wurde mittels des Abbe'schen Zeichenapparates entworfen.

Fig. 1 und 3 *Hirudo*; Fig. 2 *Pontobdella*. Fig. 1 Ansicht von oben; Fig. 3 Profilansicht. Die Grenzen zwischen den einzelnen Ganglien 1—5 sind durch gestrichelte Linien wiedergegeben. Die in oder ganz nahe der Mittellinie liegenden Zellen sind Medianzellen, die seitlich liegenden sind Konnektivzellen. Auf Fig. 3 sind nur die Konnektivzellen sichtbar. Auch das erste kurze Konnektiv ist dargestellt.

identisch, nur durch sekundäre Merkmale der betreffenden Arten gekennzeichnet. So ist bei *Nephelis* die Selbständigkeit der Ganglien und Kommissuren viel klarer erhalten, was mit der histologischen Beschaffenheit ihrer Gliaelemente zusammenhängt. Bei *Clepsine* nimmt die Höhe der Ganglien gegen das Körperende immer mehr ab (Fig. 6). Bei *Pontobdella* sind die Medianzellen von auffällender Größe, so daß sie infolgedessen miteinander in unmittelbare Berührung treten (Fig. 2 im Text).

Die nachfolgende Kommissur mit dem unten liegenden Fairé'schen Nerven wird wie die vorige durch zwei kurze Neurilembalken angedeutet. In der Breite nimmt sie stark zu, denn lateralwärts nimmt sie am Aufbau des Nervenschlundringes teil. Nur bei *Pontobdella* finden sich primitivere Verhältnisse. Die Gliazellen liegen ähnlich wie im vorigen Neuomer auf der unteren Fläche der Zentralfasermasse, nicht selten aber kommen sie auf deren Seite zu liegen. Bei anderen Hirudineen werden sie in den Bereich des Schlundringes aufgenommen. Bei *Nepheleis* und *Clepsine* liegen sie, möchte man sagen, an der Wurzel des Schlundringes, d. h. an dessen unterer Fläche, an der Stelle, wo der Winkel zwischen der Unterschlundganglienmasse und den Schlundkommissuren am schärfsten ist. *Hirudo* und *Aulostomum* bieten das am weitesten vorgerückte Stadium: die Zellen sind weit seitwärts und nach oben hin verschoben (Fig. 3 im Text). Andere Hirudineen aber bieten Übergänge, die sich einerseits den bei *Pontobdella*, andererseits den bei *Hirudo* vorkommenden Lagebeziehungen nähern. Es sei mir auch gestattet, hier zu erwähnen, daß bei verschiedenen Individuen derselben Art starke Schwankungen in der Lage aller in den reduzierten Somiten und speziell genannter Konnektivzellen hervortreten. Die Lagenänderung bei denselben und verschiedenen Hirudineenarten ist ein zwingender Beweis für die Homologie dieser Zellen.

Die Verkürzung des zweiten Ganglions äußert sich auf diese Weise, daß die „medianen“ Gliazellen ihre Lage in der medianen Längsachse verlieren, eine schräge Stellung zu ihr einnehmen, während die eine rechts, die andere links von ihrer normalen Lage zu liegen kommt (Fig. 1 im Text). Dabei haben sie sich einander noch mehr genähert, so daß die totale Länge des Ganglions dem vorigen ein wenig nachsteht (Fig. 2 und 6). Auch die Höhe des Ganglions nimmt in der Mittellinie ab; besonders deutlich tritt es bei *Clepsine* hervor (Fig. 6); laterale Portionen aber, die, wie schon oben gesagt, am Aufbau des Schlundringes teilnehmen, erleiden keine Minimation. Bei *Pontobdella* weichen die Zellen von ihrer Medianlage nur wenig ab (Fig. 2 im Text); schon mehr bei *Hirudo* und *Aulostomum*; bei *Nepheleis* liegen sie fast transversal zueinander. Die Zusammendrückung des Ganglions hat hier ihren Höhepunkt erreicht.

Der nächstfolgende Zentralfasermassenabschnitt ist nur schwach

angedeutet. Zwei von unten emporsteigende Neurilembalken, die etwa in ihrer halben Höhe zusammenfließen, trennen die Zentralfasermasse (wie vorher) in drei Abschnitte: die unten in der Medianlinie liegende Portion, die zweifellos dem Faivre'schen Nerven entspricht, und zwei mächtige laterale Portionen, die mit den seitlichen Teilen anderer Unterschlundganglienzentralfasermassen zur Bildung des Schlundringes beitragen. Die ihnen zukommende Kommissurenzelle ist deswegen weit nach der Peripherie verschoben. Verhältnisse, die uns *Pontobdella* in dieser Hinsicht darbietet, sind von bedeutender Wichtigkeit. Die besagte Zelle liegt an der Stelle, die, was man auf frontalen Schnitten leicht sehen kann, dem Punkte gleicht, wo bei *Hirudo* und *Aulostomum* die zweite Kommissurenzelle zu liegen kommt. Ihre Lage bei *Pontobdella* weist also streng daraufhin, daß sie wirklich eine zwischen dem ersten und dem zweiten Ganglion liegende Kommissurenzelle ist. Etwas weiter, längs der Schlundkommissuren, rückt sie bei *Clepsine* und *Nephele*; bei *Hirudo* und *Aulostomum* endlich finden wir sie etwa auf der halben Höhe des Schlundringes, wo sie sich an dessen Hinterfläche gelagert hat. So auf Übergangsstadien gestützt, sind wir wohl berechtigt, die Zelle, die im Vergleich mit anderen Konnektivzellen so weit von der Mittellinie entfernt ist, als eine den Unterschlundganglien zugehörige Konnektivzelle zu betrachten.

Wir gehen jetzt zum ersten Ganglion über. Seine Gestalt und Größe unterliegt einer völligen Änderung. Dies beruht nicht nur auf der Verkürzung, die etwa $\frac{1}{4}$ der Normallänge des Ganglions beträgt (Fig. 2), sondern auch auf Verminderung der Zahl der es aufbauenden Elemente. Mediane Gliazellen, die schon im zweiten Ganglion schräg aneinander lagern, liegen hier in der transversalen Achse dicht nebeneinander, wie z. B. bei *Pontobdella*; oder sie sind bei anderen Hirudineen etwas seitlich verschoben (*Nephele*). Ihr Zellleib ist spindelförmig, transversal ausgezogen.

Die transversale Lage der medianen Gliazellen muß als Folge des reduzierten Baues des Ganglions in der Längsachse angesehen werden und sie erscheint als die letzte Stufe der in den hinteren Unterschlundganglien schon angedeuteten Lagenänderung (*Nephele*) der genannten Zellen. Die dem ersten und dem zweiten Ganglion angehörenden Pakete sind teilweise miteinander verschmolzen. Mediane Ganglienzellenpakete, die ähnlich wie im vorigen Ganglion nicht

hinter- sondern nebeneinander gelagert sind, sind den Zentralfasermassen beider Ganglien gemeinsam. Man kann vermuten, daß sich keine transversale Neurilemmwand gebildet hat, die dieses Packet in eine vordere, dem ersten Ganglion angehörende, und eine hintere, dem zweiten Ganglion zukommende Portion teilt. Daß dies Packet aus zweien zusammengesetzt ist, beweist der Umstand, daß die im vorderen Teile liegenden Ganglienzellen mit ihren Fortsätzen in die Zentralmasse des ersten, die im hinteren Abschnitte liegenden in diejenige des zweiten eintreten.

In allen Packeten der Unterschlundganglien kommt je eine Rohde'sche Gliazelle vor, die in Lage und Gestalt vollkommen denen der normalen Bauchganglien gleicht.

Die ganze Unterschlundganglienmasse zeigt uns klar, daß die Verkürzung von vorne nach hinten sich vollzogen hat; es werden also die vordersten Ganglien in ihrer Längsachse am stärksten zusammengedrückt. Mit diesem Prozeß geht ein entgegengesetzter vor sich: je mehr die Ganglien an ihrer Länge verlieren, desto mächtiger entwickeln sie sich in der transversalen Ebene. Die Folge davon ist, daß die Konnektiv- und die Medianzellen immer weiter von der Medianlinie nach beiden Seiten hin verschoben werden und in die untere Portion der Schlundkommissuren geraten. Es fehlt zwar, wie schon oben gesagt worden, in der Unterschlundganglienmasse die Ausbildung der Konnektive, die Anwesenheit der Konnektivzellen beweist jedoch, daß die Konnektive potentiell in den Endganglien verborgen liegen und nur zwischen den auseinandertretenden Bauchganglien zum Vorschein kommen.

Es erübrigt noch, die morphologische Bedeutung der Schlundkommissuren zu besprechen. Die Schlundkommissuren, die den Nervenschlundring aufbauen helfen, sind bisher mehr aus theoretischen Gründen, als auf Grund eingehender Observation als selbständige Gebilde gedeutet worden. Nach Leuckart (21, 22) sind sie sogar den übrigen Commissuren der Bauchganglienkette im großen und ganzen homolog; sie sollen bloß auseinanderweichen, um das Schlundrohr durchzulassen. Da aber auf Grund vergleichender Studien die in den Schlundkommissuren vorkommenden Elemente nur der Zentralfasermasse der vorderen Unterschlundganglien zugerechnet werden müssen, so sind die Schlundkommissuren als eine Anzahl zu einer einheitlichen Masse zusammenschmolzener lateraler Portionen von Ganglien und der sie ver-

bindenden Konnektive zu deuten. Die Schlundkonnektive bilden keineswegs ein Homologon der übrigen Konnektive des Bauchstranges, sondern sie stellen ein zusammengesetztes Gebilde dar, dessen morphologischer Wert im Bereiche der Hirudineenfamilie stark variiert.

Embryologische Untersuchungen verschiedener Forscher (Leuckart (22), Nusbaum (26), Bergh (37), Salensky (30), Filatow (9)) haben nachgewiesen, daß die Unterschlundganglienmasse vom Gehirn getrennt angelegt wird und im Laufe der Ontogenie erst später durch Umwachsen des Schlundes mit ihm zusammenfließt. Der obengenannte Prozeß soll in dem Sinne verstanden werden, daß nicht einzelne Ganglienzellenfortsätze bloß auswachsen und mit entgegenwachsenden Fortsätzen der Oberschlundganglienmasse sich kreuzen, sondern daß die Gesamtmasse der vorderen Ganglien, die in der Längsachse kurz bleiben, sich rekompensatorisch nach den Seiten hin vergrößert, nach oben umbiegt und mit den seitlichen Teilen des Hirns zusammenschmilzt. In ähnlichem Sinne spricht sich auch Vejdovský in seinem „System und Morphologie der Oligochaeten“ aus, daß nämlich die Schlundkommissuren nicht „als Verlängerungen der Fibrillensubstanz des Hirns nach unten entstehen“. Weiter lesen wir bei ihm: „Die Schlundkommissuren sind demnach nur als direkte Fortsetzungen der Bauchstrangshälften anzusehen“. Die Vereinigung beider Schlundganglien kommt also zustande nicht auf dem Wege einer mittelbaren Verbindung, sondern dadurch, daß beide Massen mit ihren lateralen Portionen direkt ineinanderstoßen und durch gegenseitiges Einwachsen ihrer Ganglienzellfortsätze einheitlich erscheinen. Zwar können die die Schlundkommissuren bildenden Ganglienzentralmassen als morphologische Gebilde nicht unterschieden werden, aber ebensolchen Verhältnissen begegnen wir auch in der ganzen Unterschlundganglienmasse und nicht bloß im Bereiche des Schlundringes. Hier wie dort werden die Zentralfasermassen der einzelnen Ganglien nicht im geringsten voneinander abgegrenzt, nichtsdestoweniger erkennen wir ihren zusammengesetzten Bau, ja sogar die Zahl der sie aufbauenden Ganglien. Wie schon oben gesagt, ist die Zusammensetzung der Zentralfasermasse der unteren Schlundganglien durch die Ursprungsstellen der Seitennerven, durch nahe der Medianlinie liegende Neurilemmsepta und durch die Zahl der medianen und

der Konnektivzellen ausgeprägt. Eben solche Momente finden wir auch beim Studium des Baues der Schlundkommissuren, nur mit dem Unterschiede, daß die im Medianfelde liegenden Teile in Wegfall kommen, da nur die seitlichen Teile der Zentralmassen am Aufbau der Schlundkommissuren teilnehmen. Von der Anzahl der die Schlundkommissuren bildenden Unterschlundganglienmassen hängt ihre Stärke ab. Bei *Pontobdella*, wo der ganze Schlundring als rudimentär angesehen werden kann, werden seine seitlichen Portionen lediglich vom ersten Ganglion und der nächstfolgenden Kommissur gebildet.

Im allgemeinen ist man nach der Lage der ersten Konnektivzelle berechtigt anzunehmen, daß die Unterschlundganglienmasse bei *Pontobdella* nur wenig zum Aufbau des Schlundringes beiträgt und der überwiegende Teil der Schlundkommissuren das Oberschlundganglion vorstellt. Wir können nur schematisch die Grenzen zwischen den Zentralmassen angeben, indem wir die Lage der Konnektivzellen als Anhaltspunkte verwenden und durch sie die Grenzlinie zwischen beiden Nachbarganglien führen. Auf diese Weise sind wir imstande festzustellen, daß am Bau der unteren Portion der Schlundkommissuren mehrere Ganglien teilnehmen als im oberen Teile. Das vorderste Unterschlundganglion reicht in die Schlundkommissuren am weitesten. Auf Fig. 1 und 2 im Text wird seine Lage schematisch dargestellt. Bis wie weit seine vordere, resp. obere Grenze reicht, bin ich nicht imstande anzugeben, und zwar schon aus dem Grunde, weil dieses Ganglion vor allen anderen mit dem Hirne zusammenwächst. Jedenfalls aber muß er vor die erste Konnektivzelle zu liegen kommen; mehr kann man aus anatomischen Befunden nicht erschließen, vielleicht wird uns die Embryologie genauere Aufschlüsse schaffen. Das erste Ganglion ist am stärksten am Bau der Schlundkommissuren beteiligt. Das folgende Ganglion kann schematisch als von der ersten Kommissurenzelle nach unten und hinten (siehe Fig. 1—3 im Text) bis zu der zweiten Konnektivzelle sich erstreckend dargestellt werden.

Nur ein ganz kleiner Teil des dritten Ganglions wird in den Schlundring aufgenommen und zwar nur bei *Hirudo* (Fig. 3 im Text) und *Aulostomum*; bei anderen Hirudineen liegt es im großen und ganzen außerhalb der Schlundkommissuren. Die Schlundkommissuren entsprechen also den seitlichen Teilen

einiger zu einereinheitlichen Masse verschmolzenen Neuromeren, die sich mit dem Hirne verbinden. Sie sind also nicht als selbständige Gebilde anzusehen, sondern als ein mit der Unterschlundganglienmasse genetisch und morphologisch verknüpftes, einheitliches Ganze.

Bisher wurde die Zahl der Seitennerven, die aus der Unterschlundganglienmasse herkommen, mit 5 Paar angegeben, von denen die zwei hintersten aus dem letzten Unterschlundganglion austreten, die drei nachfolgenden Paare den drei folgenden Ganglien entsprechen. Was ihre Ursprungsstellen betrifft, kann ich im allgemeinen die Beobachtungen Livanow's (23) bei *Hirudo*, Bristol's (8) bei *Nephelis* und Whitman's (33) bei *Clepsine* bestätigen. Anders verhält es sich mit der Deutung des aus den Schlundkonnectiven entspringenden Nervenpaares. Auf Grund der obenangeführten Erwägungen muß es als ein dem ersten Unterschlundganglion angehörendes Seitennervenpaar gedeutet werden. Für die Richtigkeit dieser Auffassung sprechen verschiedene Momente. Die Verlaufsrichtung dieser Nerven (Fig. 12) schräg von unten nach oben und vorne in der ganzen Masse, wie auch der Verlauf der einzelnen Nervenfasern, die sich weit in der Zentralfasermasse verfolgen lassen, zeigen zweifellos, daß die Zentralteile der diesen Nerven aufbauenden Elemente ganz unten zu suchen sind, nämlich in den Ganglienpacketen des vordersten, vielleicht auch des zweiten Unterschlundganglions. Die Lage dieser Nerven variiert stark bei verschiedenen Hirudineenarten. Bei *Rhynchobdelliden* und bei *Nephelis* ist ihre Homologie mit anderen Unterschlundseitennerven unzweifelhaft; ihre Ursprungsstellen liegen dicht an denen des nächstfolgenden Neurosoms (Fig. 12). Bei *Hirudo* und *Aulostomum* ist die Ursprungsstelle dieser Nerven, und zwar der Beschaffenheit des ersten Ganglions entsprechend, weiter nach oben hin verschoben, so daß er etwa auf der halben Höhe des Schlundringes erscheint, d. h. auf der Höhe der ersten Konnectivzelle, die, wie oben gesagt, auf der Hinterfläche der Schlundkommissur liegt. Seitlich davon, also unzweifelhaft aus den seitlichen Teilen des ersten Unterschlundganglions tritt der genannte Nerv hervor. Es werden also in der ganzen Unterschlundganglienmasse 6 Paar von Seitennerven getroffen, die streng den Zentralmassen der 5 Neuromeren entsprechen.

Im innigen Zusammenhange mit der reduzierten Zahl der Sei-

tennerven infolge des Zusammenschmelzens ihrer Wurzeln steht die Beschaffenheit der Leydig'schen Gliazellen. Damit will ich mich jedoch nur nebenbei beschäftigen, da die Verhältnisse, die bei *Nepheleis* von Bristol (8) geschildert wurden, auch anderen Hirudiniden gemeinsam sind. Bei *Hirudo* und *Aulostomum* liegen die Leydig'schen Zellen eine Strecke weit von den Ganglien entfernt; nur im letzten Unterschlundganglion liegen sie in unmittelbarer Nähe des Ganglions im Winkel zwischen den beiden Nervenästen. In anderen Nerven liegen sie an deren Peripherie längs ihrer Achse spindelförmig ausgezogen. Im vorletzten Unterschlundnerven, der, wie schon aus älteren Arbeiten bekannt, aus zwei Wurzeln entspringt, liegt diese Gliazelle im Winkel zwischen den beiden Wurzelästen auf der dem Ganglion zugekehrten Seite.

Besonders klar liegen diese Verhältnisse bei *Pontobdella* vor. In den Mittelkörpernerven sind die Leydig'schen Zellen, wie bekannt, multipolar, da sie alle drei Hauptnervenstämme und die von ihnen ausgehenden kleineren Nervenzweige mit gesonderten Zellausläufern versehen. In den Nerven der Endganglien dagegen liegt jedem Nerven je eine Gliazelle dicht an, die nicht wie sonst von ihm eine Strecke entfernt ist, sondern sich ihm mit ihrer ganzen Fläche dicht anschmiegt.

In der Literatur herrscht keine Einigkeit hinsichtlich der die Unterschlundganglienmasse bildenden Zahl der Neurosomiten. Abgesehen von alten Untersuchungen von Leydig und Leuckart (21), nach denen die Unterschlundganglienmasse als eine aus drei Ganglien entstandene, wie auch von jenen von Vignal (32), nach denen sie aus 2 Ganglien aufgebaut erklärt wurde, treffen wir zum erstenmal in der Hermann'schen Arbeit (12) eine eingehendere Besprechung dieses Themas. Jene in jeder anderen Richtung so ausführliche Arbeit stellt uns den Bau der die Bauchganglienmasse schließenden Endglieder nicht einwandfrei dar. „Während bei diesen (Bauchganglien) — sagt er — entsprechend den zwei jederseits entspringenden Nerven, zwei paarig angelegte Faserkomplexe die Fibrillen der Kommissuren, Nerven und Zellen vereinigen, finden sich im unteren Schlund und letzten Ganglion mehrere solche für sich abgegrenzte Zentralteile, und zwar in Übereinstimmung mit der Nervenzahl in ersterem sechs, in letzterem sechs bis acht, von denen jeder von der inneren Kapsel seine Umhüllung erhält“. Wenn ich also Hermann's Worte recht verstehe, wird nach ihm die Unterschlund-

ganglienmasse aus 6 reduzierten Ganglien aufgebaut. Erst von François (10) wurde die genannte Masse als eine aus 5 normalen, sich aber voneinander nur undeutlich unterscheidenden Ganglien zusammengesetzte erklärt. Nach Retzius (28) scheint die Unterschlundganglienmasse „aus wenigstens vier einfachen Ganglien aufgebaut zu sein, indem diese sich von vorn nach hinten aneinander gedrückt haben und ohne Vermittlung von besonderen Längskommissuren zusammengelötet sind“. Das Kriterium der Zusammensetzung der Unterschlundganglienmasse liegt nach ihm in der Zahl der Riesenganglienzellen, die einem normalen Ganglion in Zweizahl zukommen. Da in der genannten Masse ihrer acht vorkommen sollen, beträgt also nach seiner Meinung die Zahl der zusammenschmolzenen Ganglien mutmaßlich vier. Da ich nach der Zahl dieser Riesenganglienzellen nicht geforscht habe, bin ich also außer stande anzugeben, ob man wirklich nur 8 solche Zellen in der Unterschlundganglienmasse annehmen muß; wenn dem auch so wäre, so ist man doch noch nicht berechtigt, aus ihrer Zahl auf die Zahl der Ganglien zu schließen, da sie in den reduzierten Ganglien vielleicht auch einer Größenabnahme unterliegen.

Mit den Endresultaten der Untersuchungen Whitmans (33) über *Clepsine* und besonders mit seinen Ausführungen kann ich mich nicht einverstanden erklären. Zwar stimme ich ihm, was die Zahl der die Unterschlundganglienmasse aufbauenden Neuromeren anbelangt, bei, aber die von ihm angewendete Methode scheint mir zu sehr gezwungen zu sein. Bloß nach der Zahl der Ganglienpakete wird die Zahl der Ganglien selber angegeben. Die Pakete, die einem jeden Ganglion als ihm eigentümlich bezeichnet werden, werden ohne Rücksicht auf ihre Lage dazu verwendet, z. B. das vordere Seitenpaket des zweiten und beide Seitenpakete des ersten Unterschlundganglions sollen nach ihm auf die Hinterfläche der Oberschlundganglienmasse verschoben sein und dort zusammen mit Hirnganglienpaketen in inniger Berührung mit der Hirnzentralmasse stehen. Diese Vermutung beruht auf der irrthümlichen Voraussetzung, daß die Pakete ihre Individualität und Zahl streng bewahren, obwohl andere Eigenschaften des Zentralnervensystems in den reduzierten Somiten einer augenfälligen Rückbildung unterworfen sind. In dieser Hinsicht muß ich Livanow beipflichten, daß für die Zugehörigkeit der Pakete zu den Ganglien nur die Verlaufsrichtung und die Eintrittsstellen in die Zentral-

masse der im betreffenden Packet liegenden Ganglienzellen von entscheidender Bedeutung sind. Man muß also alle im Oberschlundganglion liegenden Ganglienpakete dem Hirne und alle in der Unterschlundganglienmasse liegenden dieser selbst zurechnen. In der Arbeit von Bristol (8) (Whitman's Schüler) über die Metamerie bei *Nepheleis* finden wir dieselbe, durch keine Tatsachen begründete Willkür im Zurechnen der Pakete zu den einzelnen Schlundganglien. Seine schematischen, die Lage der Ganglienpakete darstellenden Zeichnungen sind in einigen Punkten ungenau. Die im ganzen unsymmetrische Lage der medianen Ganglienpakete, wodurch auf der linken Seite der Unterschlundganglienmasse ein Packet mehr als auf der anderen zu liegen kommt, wird von Livanow, dem ich mich anschließe, nicht bestätigt.

Nach Leuckart (22) soll die Unterschlundganglienmasse aus 5 Ganglien aufgebaut werden, die „einzeln auf die Hälfte der früheren Zusammensetzung reduziert sind“.

Livanow's (23) Ansichten über die Neuromerie des vorderen Körperendes der Hirudineen kann ich im allgemeinen nicht als richtig annehmen. Die Zahl der die Unterschlundganglienmasse zusammensetzenden Ganglien beläuft sich nach ihm auf vier. Es sind nämlich die von mir als vier hintere Unterschlundganglien bezeichneten Neurosomiten; Livanow's Angaben über deren Lage, Gestalt und andere Eigenschaften kann ich vollkommen bestätigen. Das von mir als erstes am stärksten modifiziert bezeichnetes Ganglion wird von ihm nicht als solches, sondern als „eine lokale Besonderheit im Bau des Nervensystems, nämlich durch Bildung eines Schlundringes bedingt“ gedeutet. Es soll nach ihm dem Faivre'schen Mediannerven entsprechen, dem sich noch Nervenfasern zugesellen, „welche nicht in unmittelbarer Verbindung mit letzteren stehen, jedoch die Mächtigkeit dieses Nervenquerschnitts sehr verstärken, was vielleicht eine Folge von sekundären Bildungsvorgängen ist“. Die in ihm liegenden Gliazellen „stellen wahrscheinlich ein wenig weggerückte Gliazellen der Schlundkonnektive dar“. Und doch stellt es kein rätselhaftes Gebilde dar, wie es Livanow will, sondern sein ganglionärer Bau ist leicht zu erkennen. Es bildet das letzte Glied, am schärfsten modifiziert in der Kette der sich nach vorne verkürzenden Bauchganglien. Weiter folgt daraus, daß der bisher sog. Schlundkonnektivnerv dem ersten Ganglion als sein Seitennerv zugerechnet werden muß.

II. Die Oberschlundganglienmasse.

Die Gliazellen der Oberschlundganglienmasse wurden bisher nur von Whitman (33), Bristol (8) und Livanow (23) beschrieben. Die Beobachtungen von Whitman und Bristol sind unzulänglich, da diese Forscher nur zwei von diesen Zellen gesehen haben und ihnen außerdem die Natur dieser Zellen rätselhaft geblieben ist. Bei *Gnathobdelliden* enthält nach Livanow jede Hälfte der Oberschlundganglienmasse sechs solche Zellen. Er beschränkte sich nur auf die Angaben ihrer Zahl und Lage; histologisch wurden sie weiter nicht untersucht. „Von ihnen befindet sich eine Gliazelle nahe der Medianlinie unter dem mittlern Ganglienzellenpaket auf der vorderen Fläche der Oberschlundganglienmasse; lateralwärts auf derselben Fläche liegen die weiteren vier Gliazellen, jedem Paar der betreffenden Pakete entsprechend, und die sechste Gliazelle ist unter dem äußersten unpaaren Paket schon auf der hinteren Hirnseite gelagert“. Bei *Rhynchobdelliden* (*Protolepsis tessellata*) findet man nach ihm die gleiche Zahl von Gliazellen. Bei *Acanthobdella peledina* (24) gibt es aber jederseits je acht Zellen; diese Zahl kann jedoch variieren und auf 7, ja sogar auf 6 sinken.

Ich konnte mich überzeugen, daß 1) verschiedene Hirudineenarten eine verschiedene Zahl von Gliazellen im Hirne besitzen und 2) daß die Zahl der besprochenen Zellen im Bereiche der einzelnen Arten bei verschiedenen Individuen nicht konstant, sondern recht schwankend ist, daß aber eine gewisse Zahl doch am häufigsten vorkommt, weshalb sie als typisch angenommen werden kann. Besonders *Nephelis* ist diesen individuellen Schwankungen unterworfen, und ich kann konstatieren, daß bei stärker entwickelten Individuen, deren Hirn größer als sonst war, auch die Zahl der Gliazellen zunahm. Alle diese Zellen liegen der Neurilemmhülle dicht an, oder sind ein wenig von ihr entfernt; sie befinden sich auf der vorderen, äußeren, sogar auf der hinteren Fläche der Hirnzentralmasse, niemals aber auf der inneren, dem Schlundrohr zugekehrten Fläche. In der Lage wird strenge Symmetrie zur Medianebene bewahrt, so daß die Gliazellen, die in der linken Hälfte vorkommen, ihre Äquivalente in der rechten haben. Bei verschiedenen Individuen derselben Art werden nur selten dieselben Lagebeziehungen der Gliazellen bemerkt. Ihre Lage unterliegt in gewissen Grenzen stärker oder schwächer angedeuteten Schwankungen.

Die am häufigsten bei *Hirudo* vorkommenden Lageverhältnisse der Gliazellen sind folgende. Die Zellen liegen paarweise und gewöhnlich finden sich fünf Paare. Im Gegensatz zu den Angaben Livanow's sehe ich das sechste Paar, das von Livanow noch zum Hirn gerechnet wird, schon als die erste Konnektivzelle der Unterschlundganglien an, was bereits oben erörtert worden ist. Die Zellenpaare berühren sich manchmal mit ihren Leibern, sie können aber auch eine Strecke auseinandergehen und auf diese Weise wird ihr charakteristisches Auftreten verwischt.

Beginnen wir in der Mitte des Hirns. Das erste Zellenpaar (Fig. 1 a im Text) liegt nahe der Mittellinie auf der Dorsalseite des Hirns in einer Ebene; manchmal aber verschieben sich die Zellen gegeneinander, so daß sie eine hinter der anderen in der Mittellinie zu liegen kommen. Die zwei Gliazellen der zwei folgenden Paare (b und b') liegen jederseits dicht nebeneinander, indem die der Medianlinie näher liegende der oberen, die distale der vordern Hirnfläche zugewendet ist. Die Zellen, die zu den zwei letzten Paaren gehören (c und c'), sind weiter voneinander entfernt; die mehr zentral gelegene kann sich den Zellen des zweiten Paares so nähern, daß sie mit ihnen eine Gruppe von drei Zellen bildet. Während sie von oben und vorn der Zentralmasse anliegt, ist die distale ganz nach vorn zugewendet.

Diese Beschreibung kann auch für *Aulostomum* gelten, jedoch mit dem Unterschied, daß die Abstände zwischen den einzelnen Zellen viel größer sind, da der ganze Schlundring mächtiger als bei *Hirudo* entwickelt ist, was wohl durch die Lebensweise des Tieres bedingt wird.

Bei *Nepheleis* existiert diese paarige Anordnung durchaus nicht. Die Zellen, deren Zahl bis auf zwölf steigen, anderenfalls bis auf sechs sinken kann, sind nicht nur auf die obere Portion des Schlundringes wie bei *Hirudo* beschränkt, sondern breiten sich auch auf dessen laterale Portionen aus und reichen bis in die Nähe der Unterschlundganglienmasse. Dies auffallende Auftreten der Gliazellen hängt ja selbstverständlich vom Umfange des Hirnes ab, das bei *Nepheleis* und *Rhynchobdelliden*, wie schon längst bekannt, sich weit seitwärts erstreckt. Dies wird durch die Ursprungsstelle der Hirnnerven gekennzeichnet, die den Unterschlundnerven ganz nahe zu liegen kommen. Ich verzichte darauf, die Lage der einzelnen Zellen zu besprechen, es soll nur hervorgehoben werden, daß sie

keinesfalls alle an der Vorderfläche der Hirnzentralmasse liegen, sondern die einen sich auf der vorderen, die andern auf der äußeren, d. h. der oberen, resp. lateralen, ja sogar auf der Hinterfläche befinden.

Die Zahl der Gliazellen im Hirne bei *Clepsine sexoculata* bin ich nicht im stande anzugeben. Einigemal habe ich nur zwei Gliazellen jederseits bemerken können; die höchste Zahl, die ich nur ein einziges Mal gefunden habe, betrug vier auf jeder Hirnseite.

Besonders schöne Bilder in bezug auf die Gliazellen liefert hingegen *Pontobdella*. Die Oberschlundganglienmasse ist sehr schwach entwickelt und entsendet jederseits nur einen Nerven, da der untere, der sog. Schlundkonnektivnerv dem ersten Unterschlundganglion zuzurechnen ist, was durch sein Verhältnis zu den Konnektivzellen bewiesen ist. Die Zellen (Fig. 2 im Text) je sechs auf beiden Seiten, bilden, indem sie sich gegenseitig berühren, vier Dreiergruppen. Gewöhnlich finden sich in jeder Gruppe zwei Zellen auf der Vorderfläche der Zentralmasse und die dritte lagert der oberen Hirnseite auf. So stellen die zu einer Gruppe gehörenden Zellen ein Dreieck dar; die Zellen können aber auch aus ihrem Verband auseinanderweichen und dadurch wird diese regelmäßige Anordnung ein wenig gestört.

Hinsichtlich des Hirnes und der dieses mit der Unterschlundganglienmasse verbindenden Schlundkonnektiven wurden verschiedene Meinungen ausgesprochen. Bald wurde der ganze Schlundring, d. h. die Ober- und Unterschlundganglienmasse zusammengenommen, für eine einbeitliche Masse erklärt, mit dem Namen „Gehirn“ belegt und den Bauchganglien gegenübergestellt (Leydig); bald wurde einerseits das Hirn mit den übrigen Ganglien und andererseits die Schlundkommissuren mit den Bauchkommissuren homologisiert; bald wurde die Oberschlundganglienmasse für ein selbständiges Gebilde *sui generis* gehalten.

Die Leydig'sche Ansicht, der sich auch später Hermann anschloß, erscheint durch keine Tatsachen begründet. Zwar stellt sich bei ausgewachsenen Tieren der ganze Nervenschlundring als eine morphologische Einheit dar, die auf beiderseitigem Austausch der Elemente der oberen und der unteren Schlundganglienmasse beruht, vom embryologischen Standpunkt dagegen muß diese Ansicht widerlegt werden. Wie es nämlich aus den Untersuchungen Kleinenberg's (17), Salensky's (30), Bergh's (45), Fi-

latow's (9), Hatschek's (11) erhellt, entsteht erstens die Anlage des Ganglion supraoesophageum im ganzen getrennt von der Anlage des Bauchmarks und schmilzt erst sekundär mittels seitlicher Auswüchse mit derselben zusammen, zweitens ist die untere Portion des Schlundringes, d. h. die Unterschlundganglienmasse kein einheitliches Gebilde, es ist vielmehr aus einer gewissen Anzahl der Bauchganglien zusammengesetzt.

Nur vorübergehend will ich mich mit der Arbeit von Vignal (32) beschäftigen. Seine Ansicht: „Le cerveau ou ganglion sus-oesophagien est formé par la réunion de deux ganglions soudés l'un à l'autre sur la ligne médiane“ wird vom Verfasser durch keine anatomischen und embryologischen Daten begründet.

Die Ansicht von Whitman steht auch mit embryologischen Tatsachen im Widerspruch. Das Oberschlundganglion soll nach ihm jedem gewöhnlichen Bauchganglion äquivalent sein mit dem Unterschied, daß sich ihm Elemente des zweiten und des dritten Neuromers angeschlossen haben. Die dorsale Lage dieses ersten Ganglions soll nach ihm erst sekundär erworben sein; primär lag es präoral auf der Bauchseite und lagerte sich, nach hinten verschoben, dem Schlundrohr auf.

Dieselbe Meinung wird auch von Bristol vertreten. Auf Seite 51 seiner Arbeit lesen wir: „This discovery enables us now to say, without reserve, that every element recognized in the body neuromere is found in the supra-oesophageal ganglia, and therefore that the supra-oesophageal ganglion or »brain« is homologous with a body neuromere“. Die ganze Homologisierung des Hirnes mit den Bauchganglien steht aber auf schwachen Füßen. Es sollen sich nämlich manche Ganglienpakete aus der unteren auf die obere Schlundganglienmasse verschieben. Die Unzulänglichkeit dieser Auffassung erhellt schon daraus, daß bei verschiedenen Hirudineenarten die Zahl der Hirnganglienpakete stark variiert; bei *Hirudo* z. B. gibt es ihrer 20. Nach Whitman's Theorie sollte also das Hirn von *Hirudo* wenigstens aus drei Ganglien aufgebaut sein, bei *Nepheleis* dagegen wie auch bei *Clepsine* entspricht es nach ihm nur einem Neuromer. Die überzähligen Hirnganglienpakete, die Bristol beim Kombinieren der einzelnen Ganglien übrig blieben, werden von ihm ganz willkürlich dem sympathischen System zugerechnet. Wenn man aber ohne vorgefaßte Vermutung an das Studium des Hirnes geht, so muß man zugeben, daß der Bau des Hirns sich auf den

Grundplan eines Bauchganglions nicht zurückführen läßt. Weder die Zahl der dem Hirne zukommenden Gliazellen, noch die Anordnung und Zahl der Ganglienpackete, noch der Bau des Gehirnnervenpaares, mit einem Worte der ganze anatomische Aufbau des Hirnes beweist nicht im mindesten dessen zusammengesetzte Natur; im Gegenteil, es muß als ein einheitliches Gebilde aufgefaßt werden, das genetisch und morphologisch von den übrigen Ganglien streng zu unterscheiden ist. Mit dem Whitman'schen Satze also „... the ganglionic centers of the ventral cord are simple repetitions, element for element, of the »brain«“ kann ich mich daher durchaus nicht einverstanden erklären. Auch die Verlagerung des Hirns von der Bauchfläche auf die Dorsalseite wird nicht von der Embryologie bestätigt. Ebenfalls zeigt uns die Embryologie, daß die hinteren wie auch die vorderen Hirnganglienpackete nicht eingewanderte, sondern autochthone Gebilde darstellen.

Eine entgegengesetzte Meinung, die als Folge weitgehender theoretischer Erwägungen erscheint, wurde von Lang (18, 19) aufgestellt. Nach ihm sind die Hirudineen unter den gegliederten Würmern die nächsten Verwandten der Plathelminthen. Besonders die Rüsselegel (*Clepsine*) sollen mit *Gunda* phylogenetisch in enger Beziehung stehen. Unter anderem sagt er: „Das Zentralnervensystem von *Gunda* läßt sich in der Tat bis ins Einzelne mit demjenigen der Hirudineen und Anneliden vergleichen“. Der sensorielle Teil des Gehirns von *Gunda*, dem ausschließlich Sinnesnerven entspringen, soll dem Oberschlundganglion und der motorische Teil dem Unterschlundganglion der Hirudineen entsprechen. Es ist also nach ihm die Oberschlundmasse weder morphologisch noch physiologisch den Bauchganglien homolog. Daß sich das Hirn auf das Schema eines Bauchganglions als ein ihm nicht gleichwertiges Gebilde nicht zurückführen läßt, darin stimme ich Lang bei; jedoch die Bauverhältnisse der Hirnnerven sprechen dagegen, daß zwischen dem Hirne und den übrigen Ganglien eine physiologische Differenz existieren sollte. In der Tat sind, wie mehrere Forscher übereinstimmend beschreiben, die Hirnnerven gradeso wie andere Nerven von gemischter Natur. Besonders Whitman, Bristol und Livanow verdanken wir genaue Beobachtungen über den Verlauf und die Endigungsweise der Seitennerven und speziell der Hirnnerven, und aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Hirnnerven, was die

Topographie anbelangt, die vordersten Körperringe innervieren, aber, ähnlich wie andere Nerven, motorische wie auch sensorische Nervenfaserbündel einschließen. Später gab Lang selbst (20) seine bisherigen Anschauungen über die Natur des Hirns auf, indem er zugab, daß sich auch im Hirne motorische Fasern befinden. Diesen letzten Standpunkt Lang's, den auch Hatschek (11) einzunehmen scheint, teile ich vollständig.

Auch Livanow (23) hat gegen Whitman's Homologisierung des Gehirns mit den Bauchganglien Einwände erhoben und sich dahin geäußert, daß keine Gründe vorliegen, die eine solche Annahme berechtigten. Nach Livanow treten bei *Nepheleis* (*Herpobdella*) und bei *Rhynchobdelliden* primitivere Stadien in der Entwicklung des Hirnes auf, dessen Bau infolge der sekundären Teilung seiner Ganglienzellenpakete bei *Hirudo* und *Aulostomum* komplizierter wird. Die Ansicht Livanow's, daß das Hirn morphologisch den übrigen Ganglien gegenübergestellt werden muß, die Ansicht, die auch schon von Leuckart (22) hervorgehoben wurde, muß ich auf Grund der anatomischen Daten im vollen Umfange bestätigen. Anders aber steht es mit der Deutung der Schlundkommissuren, die von beiden genannten Forschern als den übrigen Konnektiven gleichwertige Gebilde angesehen wurden. Wie das Hirn mit den Unterschlundganglien verbunden ist, wie die Schlundkommissuren zu deuten sind, wurde schon oben erörtert.

III. Die Analganglienmasse.

Über die Analganglienmasse will ich bloß kurz berichten.

In den älteren Arbeiten über die Zellen der Zentralfasermasse der Analganglien [Hermann (12), François (10), Rohde (29)] finden wir nur ungenaue Angaben bezüglich der Zahl und Lage der in Rede stehenden Elemente. Hermann beschrieb im Analganglion bloß mediane Zellen, ohne jedoch deren Zahl anzugeben. Rohde sah in dieser Region unregelmäßig zerstreute Zellen, deren Natur und Homologie mit denen der normalen Neurosomiten er nicht erkannte. Erst Livanow (24) hat in den Untersuchungen über *Acanthobdella peledina* nachgewiesen, daß im Analganglion auch für die Gliazellen im großen und ganzen dieselben Verhältnisse gelten, wie sie von ihm als für die Unterschlundganglienmasse charakteristisch beschrieben worden sind. Es werden nämlich infolge der Verkürzung der Commissuren (richtiger gesagt: beim

Ausbleiben ihrer Entwicklung) die Konnektivzellen von der Mitte nach der Peripherie hin verschoben und gewinnen hier ein den Medianzellen ähnliches Aussehen. Hier muß ich betonen, daß im Gegenteil die primitive Lage der Konnektivzellen am Boden des sich entwickelnden Konnektivs ist und daß sie eigentlich erst später durch das fortwährend wachsende Konnektiv in dessen Mitte eingeschlossen werden.

Gelegentlich möchte ich auch eine Annahme erwähnen, daß die medianen Gliazellen nicht eigentlich den Ganglien, d. h. den Nervenknoten zuzurechnen sind. Wie allgemein bekannt, liegen sie in der Medianlinie, jede unter einem Quernervenfaserstrange, der den Querkommissuren im Strickleiternnervensystem entspricht. Wenn man also das Nervensystem der Hirudineen mit dem Strickleiternnervensystem zu homologisieren wagt, erscheinen die medianen Gliazellen als Gebilde der zwei in jedem Neurosomit liegenden Querkommissuren und nicht als solche der eigentlichen Ganglienmassen, in deren Bereich sie erst später durch Hineinwachsen ihrer Fortsätze eindringen. In dieser Deutung besitzen bloß Längs- und Querkommissuren, wie auch laterale Nerven ihre besonderen Gliazentren, während die Ganglien ihre Gliafasern erst sekundär erhalten. In gewissem Grade wird diese Meinung durch die Embryologie bestätigt, da ja, wie aus Berg h's (6) und Apáthy's (2) Untersuchungen hervorgeht, die Gliazellen ontogenetisch älter sind als das definitive Nervensystem, indem sie Überreste des provisorischen Nervenplexus darstellen, sich dem neuentstehenden Nervensystem an bestimmten Stellen anlegen und durch histologische Differenzierung innig mit ihm verbunden werden.

Wie in dem Unterschlund- so steht auch im Analganglion die Zahl der Gliazellen im engen Konnex mit derjenigen der Neurosomiten. Da aber das Analganglion von mehreren Forschern [Apáthy (1), Whitman (33), Bristol (8), Leuckart (22), Oka (27)] hinsichtlich der es bildenden Neumerenzahl richtig beurteilt wurde, und da die Ergebnisse meiner Beobachtungen in diesem Punkte mit denen der oben genannten Forscher übereinstimmen, will ich mich damit nur kurz befassen.

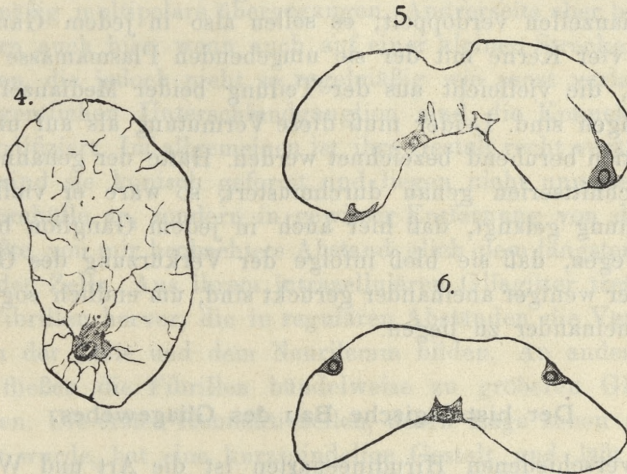
In seiner bekannten Arbeit unterscheidet Apáthy in der hinteren Körperregion zwei streng voneinander getrennte Ganglienmassen: das sg. Analganglion, dessen laterale Nerven die letzten Körpersomiten innervieren und das Haftscheibenganglion, das, wie

es schon die Bezeichnung sagt, in der Haftscheibe liegt. Besonders klar treten diese Verhältnisse bei *Piscicola* zutage. Bei ihr wird die Analganglienmasse aus drei normalen, durch kurze (nur einige μ lange) Konnektive verbundenen Ganglien gebildet. Eine normale Kommissur verbindet sie mit dem Haftscheibenganglion, das vielleicht, was ich leider nicht bestimmt konstatieren konnte, aus fünf stark modifizierten Ganglien besteht. Bei anderen Hirudineen sah auch ich, wie andere, daß das Haftscheibenganglion aus 7, die Analgangliengruppe aus 3 Ganglien gebildet wird. Bei *Nephelis* sind, wie Bristol angibt, beide Gangliengruppen zusammengetreten, so daß diese Masse aus 10 Ganglien zusammengesetzt ist. Gegen das Ende werden die Ganglien immer mehr reduziert; sie nehmen an Masse und hauptsächlich an Länge ab, so daß das letzte Ganglion (bei *Nephelis* zwei letzte Ganglien) wesentlich in seinem Bau modifiziert erscheint. Das dem Faivre'schen Nerven entsprechende, mediane Längsnervenfaserbündel verläuft bei allen von mir untersuchten Hirudineen zwischen den einzelnen Ganglien auf der unteren Fläche der beiden Hauptstämme, um weiter in den normalen Konnektiven dorsal zu verlaufen.

Die medianen Gliazellen liegen in der Medianlinie hintereinander; bei Arten, bei denen die Zellen groß sind und die Verkürzung der Ganglien stark hervortritt (*Pontobdella*), berühren sich die in jedem Ganglion liegenden Zellen mit ihren Plasmamassen. Bei *Gnathobdelliden* wird in den letzten vier Ganglien deren lineare Anordnung dadurch gestört, daß die Zellen infolge des gegenseitigen Druckes ihre mediane Lage verlassen, indem sich die eine nach rechts, die andere nach links verschiebt; bei *Nephelis* werden sie sogar nicht selten, nicht so häufig bei den Hirudiniden auf demselben Querschnitte getroffen (Fig. 5 im Text). Es treten also auch in den Analganglien dieselben Lageverhältnisse der medianen Gliazellen auf, wie in den zwei vordersten Ganglien der Unterschlundganglienmasse, was nichts anderes als die Folge der bedeutenden Verkürzung der Ganglien darstellt.

Bei *Hirudo* und *Aulostomum* kommen nicht selten solche Bilder vor, wo die Kommissurenzelle, die zwischen dem ersten und dem zweiten Analganglion (von der Körpermitte an gerechnet) liegt, nicht an die Peripherie, sondern von allen Seiten von der Zentralmasse, wenn auch nicht in ihrer Mitte, umhüllt, zu liegen kommt (Fig. 4.

im Text). Andere Kommissurenzellen der folgenden Neurosomiten liegen schon dicht an der Neurilemmhülle und zwar die in den Somiten der Leibesmitte näher gelegenen nehmen die untere Fläche der Zentralfasermasse ein. Die Symmetrie wird aber nicht streng eingehalten. Die eine der zwei korrespondierenden Zellen liegt der Medianlinie näher, die andere ist seitwärts verschoben. Gegen das



Halbschematische Figuren mittels des Abbe'schen Zeichenapparates gezeichnet. Fig. 4. *Aulostomum*. Querschnitt, Kommissurenzelle zwischen dem ersten und dem zweiten Analganglion (von der Körpermitte an gerechnet) (Zeiss. DD, Komp. Ok. 6). Fig. 5. *Hirudo*. Querschnitt durch das Analganglion. Fast auf derselben transversalen Fläche erscheinen zwei Medianzellen (zwischen ihnen liegt im Medianfelde der Faivre'sche Nerv, durch zwei Neurilembalken angedeutet) und zwei Konnektivzellen. (Zeiss. C. Komp. Ok. 4).

Fig. 6. *Hirudo*. Querschnitt durch die Analganglienmasse weiter als auf Fig. 5 hinten geführt. Die Konnektivzellen liegen auf der Dorsalseite. (Zeiss. C, Komp. Ok. 4).

Körperende nimmt diese Ortsveränderung in der transversalen Fläche immer mehr zu. Einerseits (*Nephelis*) treten die Konnektivzellen gegen die Medianlinie und erreichen auf diese Weise die innere einander zugekehrte Oberfläche der Zentralmasse, andererseits werden sie immer weiter seitwärts verschoben; in den hintersten Neurosomiten verlassen sie auch diese Lage und kommen nun dorsal, oberhalb der Nervenursprungsstellen zu liegen (Fig. 6 im Text). Auch in der Längsachse kann die eine der entsprechenden Konnektivzellen eine Strecke nach vorne, die andere nach hinten rücken.

Die Grenzen dieser Translokation werden aber von den medianen Gliazellen bestimmt. Niemals findet man die Konnektivzellen vor, resp. hinter die nächsten Medianzellen verschoben. Nicht selten aber, besonders in den hintersten Neurosomiten werden die Konnektivzellen auf derselben transversalen Fläche mit den Medianzellen beobachtet (Fig. 5 im Text und Fig. 11).

Nach Mencl (25) sind in den Ganglien der Haftscheibenregion die Medianzellen verdoppelt; es sollen also in jedem Ganglionabschnitte vier Kerne mit der sie umgebenden Plasmamasse vorhanden sein, die vielleicht aus der Teilung beider Medianzellen hervorgegangen sind. Leider muß diese Vermutung als auf ungenauer Observation beruhend bezeichnet werden. Hätte der genannte Autor, ganze Schnittserien genau durchmustert, so wäre er vielleicht zu der Meinung gelangt, daß hier auch in jedem Ganglion bloß zwei Zellen liegen, daß sie bloß infolge der Verkürzung des Ganglions mehr oder weniger aneinander gerückt sind, um endlich sogar transversal zueinander zu liegen.

Der histologische Bau des Gliagewebes.

Bei verschiedenen Hirudineenarten ist die Art und Weise der Ausbildung des Gliagewebes mannigfaltig entwickelt. Dies hängt von der Größe und Gestalt der Gliazellen, wie auch von der Zahl und Mächtigkeit der sie verlassenden Fortsätze ab.

In der Unterschlundganglienmasse bei *Hirudo* sind die medianen Gliazellen in bezug auf ihre Größe durchaus denjenigen der normalen Bauchganglien ähnlich. Eine Differenz sehe ich bloß darin, daß ihre Länge in strenger Proportion zur Länge der entsprechenden Ganglien steht. Deshalb finden wir in den hinteren Unterschlundganglien die am wenigsten vom typischen Aussehen abweichenden Zellen; gegen das Körperende verlieren sie immer mehr an Länge, so daß im vordersten Ganglion beide Medianzellen stark in der Längsachse komprimiert erscheinen, nach beiden Seiten dagegen stark an Länge zunehmen. Es erscheint infolgedessen ihr Zelleib spindelförmig in der transversalen Achse ausgezogen.

Das in ihnen liegende Gliagitter besteht aus unregelmäßigen, stärkeren und dünneren, ja sogar kaum sichtbaren Fibrillen. An der Peripherie sammeln sich die Fibrillen konisch zu Bündeln, die in verschiedener Zahl die Zelle verlassen.

Die Konnektivzellen sind verschieden ausgebildet. Im Konnektiv zwischen dem ersten Bauch- und dem letzten Unterschlundganglion liegt eine Gliazelle, die in ihrem fibrillären Aufbau eine Zwischenstufe zwischen den normalen und den Unterschlundkonnektivzellen darstellt. Da, wie schon oben gesagt, das Konnektiv auffallend kurz ist und der Plasmaleib unmittelbar den Neurilemmscheidewänden anliegt, ist die Gestalt der Zelle aus der spindelförmigen in eine unregelmäßig multipolare übergegangen. Andererseits aber bilden die Gliafasern auch hier, wenn auch auf einer kleinen Strecke, radiäre Gliasepten, die jedoch nicht so regelmäßig wie sonst verlaufen.

Im eigentlichen Unterschlundganglion sind die Konnektivzellen stark modifiziert. Im allgemeinen ist ihre Gestalt recht veränderlich; oftmals sind sie konisch geformt und liegen nicht unmittelbar der Neurilemhülle an, sondern in gewisser Entfernung von derselben. Der größte von mir beobachtete Abstand glich dem längsten Durchmesser der Zelle. Aus ihrem intrazellulären Gliagitter treten zahlreiche Fibrillen hervor, die in regulären Abständen die Verbindung zwischen der Zelle und dem Neurilemm bilden. An anderen Zellflächen fließen die Fibrillen bündelweise zu größeren Gliabalken zusammen. Die ersten Konnektivzellen, deren Lage schon oben geschildert wurde, hat eine kurzspindelige Gestalt und läßt mehrere gröbere und feinere Gliafasern aus ihrem Leibe hervortreten. Im Oberschlundganglion besitzen alle Zellen, deren Größe stark variiert, unregelmäßige Formen; mit breiter Basis liegen sie dem Neurilemm an, und ihre Fortsätze sind dem Zentrum zugewendet.

In seinem extrazellulären Verlauf verleiht das Gliageflecht der ganzen Ober- und Unterschlundganglienmasse einen einheitlichen Charakter. Es sei erwähnt, daß hier das Gliagewebe viel mächtiger als in normalen Ganglien ausgebildet ist. Dies bezieht sich sowohl auf die Stärke, als auch auf die Zahl der Gliafasern und der aus ihnen heraustretenden Fibrillen. Die Art des Verlaufes der Gliafasern im Ober- und Unterschlundganglion ähnelt in groben Zügen der der normalen Bauchganglien. Das von den medianen Gliazellen stammende Gliagerüst bildet so wie in normalen Ganglien keine Gliascheiden um die Nervenfasern; die aus den Zellen tretenden, zusammengesetzten Gliafasern teilen sich in ihrem Verlauf vorwiegend dichotomisch, laufen wirt durcheinander, sich in verschiedensten Richtungen kreuzend, bis endlich einzelne Gliafibrillen, aus ihrem Verband gelöst, frei verlaufen und wie gewöhnlich dem

Neurilemm sich anschmiegen, oder längs der Ganglienzellfortsätze sich auf deren Leibe ausbreiten. Die charakteristische Gruppierung der Gliafasern, die in den Konnektiven in der Ausbildung der Gliasepten und Gliascheiden um die einzelnen Nervenfasern ihren Ausdruck findet, wird in der Unterschlundganglienmasse gänzlich aufgehoben. Die Gliafasern der Konnektivzellen in der Unterschlundmasse weichen in ihrer Ausbildungsweise von der der Medianzellen nicht ab. Auf diese Weise trägt die Ausbildung der Gliafasern der Konnektivzellen beträchtlich zur Einheitlichkeit des histologischen Baues der ganzen Unterschlundganglienmasse wie auch des der Schlundkommissuren bei. Die Fasern, die sich reichlich unter stumpfen und spitzen Winkeln verästeln, ziehen von ihrer Ursprungsstätte weit nach vorn und hinten in die Nachbarganglien. Ob sie hier in zusammenhängende Netze verbunden sind, kann ich nicht bestimmt entscheiden, da es unmöglich ist, in einem so dichten Gewirr die einzelnen Fibrillen auf weitere Strecken hin zu verfolgen. So erscheint die ganze Ober- und Unterschlundganglienmasse von unzähligen Fasern und Fibrillen durchwoben, die ihr ein stark einheitliches Gepräge verleihen. Es kann also hier von der Selbständigkeit der Ganglien keine Rede sein; die Grenzen zwischen den einzelnen Ganglien können nur schematisch angegeben werden, in Wirklichkeit existieren aber keine.

In der ganzen genannten Zentralfasermasse, besonders aber im Schlundringe findet man auf Querschnitten folgende Bilder: Die aus den Zellen direkt kommenden, mächtigen Gliafasern nehmen meistens die Richtung gegen das Zentrum (Fig. 3 und 7). Unterwegs zweigen sie nur spärlich Äste nach den Seiten ab, in die Mitte der Zentralmasse gelangt, teilen sie sich in eine Anzahl von Fibrillenbündeln, die sich größtenteils längs des Schlundringes umbiegen und sich auf weite Strecken hin verfolgen lassen. Eine aber nicht kleine Anzahl von Gliafasern verläuft unregelmäßig in verschiedensten Richtungen in wellenförmigen oder stumpfgebrochenen Linien. Die gröberen Gliabalken treffen wir also hauptsächlich in der Mittelgegend der Zentralmasse an, und erst hier nach einem längeren oder kürzeren Verlauf teilen sie sich in immer dünnere Äste. Die so entstandenen Fibrillen laufen radiär gegen die Peripherie hin, um sich hier wie gewöhnlich entweder der Neurilemmhülle anzuschmiegen oder sie zu durchbohren und Gliafaserkörbe um die Ganglienzellen zu bilden. Im Gegensatz also zu den Mittel-

partieen der Zentralmasse, wo hauptsächlich nur gröbere, unregelmäßig verlaufende Gliabalken liegen, werden in deren Randpartieen nur dünne, radiär verlaufende Gliafibrillen angetroffen.

Nicht in allen Gegenden der Zentralmasse tritt das Gliagewebe mit derselben Kraft auf. Am mächtigsten ist das Gliageflecht im Oberschlundganglion in seinen lateralen Portionen entwickelt, was als Folge der hier angehäuften Gliazellen erscheint. In der sie verbindenden, im Medianfelde liegenden Partie der Zentralfaser-masse, wie aus Fig. 3 ersichtlich, nehmen die Gliafasern hauptsächlich transversale Richtung. Auf diese Weise wird die rechte Hirnportion mit Gliafasern versehen, die aus der linken stammen, und umgekehrt. In den seitlichen Teilen des Schlundringes ist das Gliagerüst am schwächsten entwickelt, da hier nur eine Konnektivzelle zu liegen kommt. Außerdem sind hier Gliafasern zu sehen, die einerseits von der unteren Schlundganglienmasse, andererseits vom Hirn herkommen. Diese Fasern verlaufen längs des Stammes und ziehen hauptsächlich durch dessen Mitte. Diese Verhältnisse bieten also einen klaren Beweis dafür, daß die Gliazellen der Ober- und der Unterschlundganglienmasse sich miteinander verbinden.

Ganz ähnliche Verhältnisse, nur mit unbedeutenden Modifikationen bietet uns *Aulostomum*. Bei dieser Gattung ist das intrazelluläre Gliagitter auffallend stark gebaut, was besonders in den Hirngliazellen hervortritt (Fig. 10 und 14.; vergl. auch Fig. 8, T. 1 meiner vorigen Arbeit (15)); dagegen sind die frei verlaufenden Gliafasern und -fibrillen bedeutend dünner und spärlicher entwickelt als bei *Hirudo*; ihre Verlaufs- und Verästelungsart gleicht aber vollkommen derjenigen von *Hirudo*. Wie aus Fig. 10 zu ersehen ist, sind die Konnektivzellen der Unterschlundganglienmasse von unregelmäßiger Gestalt und sind mit einer Anzahl unförmlicher Gliafortsätze, die in einiger Entfernung von ihrer Ursprungsstelle knotenförmig anschwellen, versehen. Bei stärkerer Vergrößerung werden in diesen Knötchen Gliafibrillen sichtbar; in den Knötchen nämlich treten die in den Fortsätzen dicht nebeneinander verlaufenden Fibrillen aus ihrem engen Verbands ein wenig heraus, um außerhalb des Knötchens wieder miteinander vereinigt eine Anzahl von Gliabalken zu bilden. Die Konnektivzellen liegen bei *Aulostomum* ein wenig von dem Neurilemm entfernter als bei *Hirudo*, was ebenfalls aus der Figur zu erkennen ist. Der ganze Schlundring wird viel schwächer als bei *Hirudo* mit Gliagerüst versehen, da es, wie schon oben

gesagt, von viel größerem Umfange und dennoch mit der gleichen Gliazellenzahl ausgestattet ist (Fig. 14). Um so leichter kann man die Verzweigungsart und den Verlauf der einzelnen Gliafasern und -fibrillen weit von ihrer Ursprungsstelle verfolgen.

Über den Bau der Leydig'schen Zellen und der Rohde'schen Packetzellen habe ich nichts neues zu berichten (vgl. darüber meine vorige Arbeit), da sie in ihrem histologischen Aufbau gänzlich denen des Bauchstranges gleichen.

Im Analganglion bei *Hirudo* wie auch bei *Aulostomum* tritt das Gliagerüst nur schwach hervor. Die Gliazellen sind kleiner als sonst und mit einem spärlichen intrazellulären Gliagitter ausgestattet, das nach außen in spärlichen Fasern ausläuft. Die Verbindung der einzelnen Ganglien mittels des Gliageflechtes ist nur schwach angedeutet. Nur die jedem Ganglion zukommenden Medienzellen stehen im innigen Zusammenhang, indem sie in dicken Faserausläufern miteinander kommunizieren. Im allgemeinen finden wir im Analganglion, wenn auch nur in schwächerem Grade ausgebildet, dieselben Verhältnisse, wie sie für die Unterschlundganglien als charakteristisch beschrieben wurden.

Ein wenig von den geschilderten abweichende Bilder finden wir bei *Nephelis*. In der ganzen Schlundganglienmasse ist das Gliagewebe im Vergleich mit normalen Ganglien stärker entwickelt. Die Gliazellen des Hirnes sind mannigfach geformt; alle sind mit reichlichem Plasmabelag versehen, ihre Größe und Gestalt variieren aber stark. Bald sind sie polygonal, bald konisch, bald spindelförmig gestaltet. Das endozelluläre Gliagitter (Fig. 9) tritt im Vergleich mit jenem von *Hirudo* und *Aulostomum* nur schwach hervor. Gleich nach ihrem Austritt aus der Zelle verzweigen sich die Gliafasern in immer dünnere Äste, so daß nur ausnahmsweise gröbere Gliabalken auf weite Strecken hin verfolgt werden können. Die Gliazellen der Unterschlund- wie auch der Analganglienmasse sind durchwegs von konischer Gestalt. Mit breiter Basis lagern sie sich gewöhnlich dem Neurilemm dicht an und nur ausnahmsweise (Konnektivzellen) verbinden sie sich mit demselben mittels Gliafaserbrücken. Nach oben sammeln sich die Fibrillen des endozellulären Glianetzes in ein oder zwei Fortsätze (selten werden mehrere gebildet), die nach oben verlaufen und sich erst weit von der Zelle in immer dünnere Zweige auflösen (Fig. 15). Besonders klare Bilder liefert uns die Weigert'sche Methode (Fig. 8), die die Gliafibrillen in allen ihren

Einzelheiten deutlich hervortreten läßt. Auch alle anderen, schon früher hervorgehobenen Merkmale¹⁾, durch die sich das Gliagewebe bei *Nepheleis* von dem bei *Hirudo* und *Aulostomum* unterscheidet, treten hier zutage. In die Ganglienpackete treten die Gliafibrillen der Zentralfasermasse äußerst selten ein und erreichen hier nur die Ganglienzellfortsätze, niemals aber ihren Zelleib, während man bei *Hirudo* distinkt gezeichneten Gliafibrillen rings um die ganze Zelle begegnet (Fig. 1).

Äußerst scharf hervortretende Bilder liefert uns *Pontobdella*. Die Mediagliazellen der Unterschlund- so wie auch der Analganglienmasse werden durch große, bläschenförmige Kerne scharf gekennzeichnet. Die Plasmamasse ist bis auf einen dünnen Plasmabelag rings um den Kern reduziert. Die medianen Gliazellen sind besonders in den vordersten, resp. hintersten Neurosomiten stark aneinander gedrängt, so daß sie mit ihren Kernen zusammenstoßen. Infolge der reduzierten Plasmamasse kann man eigentlich nicht von der Gestalt der Zellen sprechen, da sie nur von der Gestalt des Kernes abhängt. Die Konnektivzellen liegen der Neurilemmhülle dicht an, buchten sie sogar nicht selten so ein, daß es den Anschein gewinnt, als ob die Konnektivzellen von außen her der Zentralfasermasse anlägen. Die Zellen, die im Konnektiv liegen, das die zusammengeschmolzenen Ganglien mit dem nächsten, normalen Bauchganglion verbindet (Fig. 17), bewahren im großen und ganzen ihre typische Ausbildung; trotz der Verlagerung der Zelle sind die Gliasepten typisch aus den sich kreuzenden Gliafasern gebildet; sie sind jedoch nicht gleich lang, da ihre Länge durch die Lage der Konnektivzelle bestimmt wird. Ja es kommt sogar vor, daß an dieser Stelle, wo die Zelle am nächsten gegen die Peripherie verschoben ist, sich entweder keine oder nur rudimentäre Gliasepten anlegen und ihre Stelle einfach von den lose nach der Peripherie hinziehenden Gliafasern eingenommen wird. Auf diese Weise sind wir zu dem Schluß berechtigt, daß zwischen den Fasern, die die Konnektivzellen der Unterschlundganglienmasse (den Protoplasmabrücken nicht unähnlich) mit der Neurilemmhülle verbinden, und den Fasern, die in den Konnektiven am Bau der radiären Gliasepten teilnehmen, eine enge Homologie durchgeführt werden kann. Wie uns nämlich die Übergangsformen speziell bei *Pontobdella* zeigen,

¹⁾ Vgl. darüber meine vorige Arbeit (15),

sind im letzten Konnektivstamme die Gliasepten an der Stelle der größten Annäherung der Zelle an das Neurilemm nur undeutlich entwickelt. Außer den sich mehr oder weniger deutlich kreuzenden Gliafasern, wodurch Gliasepten entstehen, begegnen wir noch schwächer gegeneinander geneigten, ja sogar parallel verlaufenden Gliafasern. Das Gliafasergestüt ist in den beiden Endganglien außergewöhnlich stark entwickelt. Während in normalen Ganglien bei *Pontobdella* das endozelluläre Gliagitter leicht zu unterscheiden war, verliert es sich hier so gut wie gänzlich; dies steht mit den Reduktionsvorgängen an den Zellen im innigen Zusammenhange. Die Gliafasern sind dick, von starrem Aussehen, scheinen keinen Zusammenhang mit den Zellen zu haben (Fig. 11 und 12), verlaufen in verschiedenen Richtungen, teilen sich öfters dichotomisch oder laufen zu mehreren in einem Knotenpunkt zusammen, um weiter wieder auseinanderzutreten. Durch diese Anastomosenbildung gestaltet sich die ganze Zentralfasermasse der oben genannten Regionen zu einem einheitlichen Gebilde. Es liegt kein Zweifel vor, daß die Gliafasern der einzelnen Zellen miteinander verschmelzen, da die ganze Zentralmasse von einem zusammenhängenden Netze durchwoben ist. In dem mächtig entwickelten Analganglion prägt sich auch das Gliagerüst entsprechend stark aus (Fig. 16 und 18). Aber auch im Hirne, trotzdem es gleichsam rückgebildet erscheint (Fig. 12), nimmt das Gliagerüst an Stärke nicht ab, sondern bildet dichte und grobe Geflechte. Die Hirngliazellen sind kleiner als sonst und schmiegen sich dem Neurilemm an. An die Peripherie der Zentralmasse der in Rede stehenden Regionen gelangt, setzt sich ein Teil der Fasern mit konischen Anschwellungen dem Neurilemm an, ein anderer Teil dagegen biegt um und baut den peripheren Fibrillenmantel auf, der die Zentralfasermasse von dem Neurilemm abgrenzt. Am schönsten ist dieser Fibrillenmantel auf Fig. 16 und 18 zu sehen.

Noch einige Worte möchte ich über die Leydig'schen Zellen sagen. Die Zellen sind von elliptischer Gestalt und legen sich mit einer Fläche dem Neurilemm an. Durch diese Stelle tritt das Glianetz, das im Innern der Zelle in konzentrische Schichten gelagert ist, in den Bereich des Nerven ein, um ihm als Stützgerüst zu dienen (Fig. 13).

Bei *Clepsine* ist das Stützgewebe nur schwach entwickelt. In der Unterschlundmasse sind die Medianzellen der hinteren Ganglien

vollkommen denen der normalen Ganglien ähnlich; gegen des Vorderende werden sie immer kleiner, und ihre Plasmamasse nimmt immer mehr ab (Fig. 6). Das intrazelluläre Gliagitter wird kaum wahrnehmbar. Die Konnektivzellen, die in den typisch ausgebildeten Konnektiven außerordentlich groß sind, sind in der Unterschlundganglienmasse in hohem Grade rückgebildet. Dies gilt nicht nur für die Plasmamenge, die bis auf spärliche Reste geschwunden ist, sondern auch für den Kern. In den normalen Konnektivzellen nimmt er die halbe Breite des Konnektivs ein und in der Unterschlundmasse ist er vollkommen in Größe und Aussehen den medianen Kernen ähnlich. Auf verschiedensten Stufen der Rückbildung werden auch die Zellen des Nervenschlundringes angetroffen, wo endlich an Stelle der Zellen nur lokale Haufen von Körnern und Fibrillen von verschiedener Größe zu sehen sind. Das extrazelluläre Fibrillengerüst ist schwach entwickelt (Fig. 6). In den hinteren Portionen der Unterschlundganglienmasse ähnelt es dem der Bauchganglien; die Fasern sind sehr fein, teilen sich nur spärlich, anastomosieren miteinander nicht und verlaufen in geraden Linien dem Neurilemm zu. Die Konnektivzellen tragen nur wenig zum Aufbau des Gliagerüsts bei; nur unbedeutende Fibrillenbündel werden von ihnen gebildet, die sich in der Nähe der Zellen dem Neurilemm ansetzen. In den vorderen Unterschlundganglien wie auch im Hirne ist das Gliagerüst sehr schwach ausgebildet. Die an Zahl und Stärke reduzierten Gliafibrillen versorgen nur spärlich die Zentralfasermasse, ohne wie bei anderen Hirudineen so dichte Geflechte zu bilden.

Ganz eigentümliche Befunde, die jedoch schon bei *Pontobdella* und noch klarer bei *Clepsine* hervortraten, werden bei *Piscicola* angetroffen. Es kommt nämlich zum gänzlichen Schwunde der Gliazellen in den Endganglien. Während in den mittleren Bauchganglien, so wie auch in der von Apáthy so bezeichneten Analgangliengruppe die Medianzellen noch als Gliafasernanhäufungen in einer deutlichen Plasmamasse und nur mit rudimentären Kernen zu unterscheiden waren, sind sie in der Unterschlundganglienmasse und im Haftscheibenganglion bis auf wenige nur hie und da hervortretende Überreste geschwunden (Fig. 4 und 5). Das Gliagerüst ist in diesen Teilen des Nervensystems am mächtigsten entwickelt; man kann also daraus schließen, daß die Gliazellen gänzlich in dem Gliafaseraufbau aufgegangen sind. Die Kom-

missuren haben rings um den sehr großen, fein granulierten Kern einen nur dünnen Plasmabelag, in dem Gliasepten ihren Ursprung nehmen. In zusammengeschmolzenen Ganglien ist ihre Lage zwischen den Austrittsstellen der Seitennerven nur durch lokale Verdichtung des Glianetzes gekennzeichnet. Nur bei jungen Exemplaren finden wir da Zellen, die jedoch schon der Rückbildung anheimgefallen sind; die Stadien dieses Prozesses bilden Übergänge von lebensfähigen Zellen bis zu ganz in der Gliafaserbildung aufgehenden Zellrudimenten. Die ganze Zentralfasersubstanz der zusammengeschmolzenen Ganglien wie auch des Hirnes ist reichlich von gleich dicken, geschlängelt verlaufenden, reich anastomosierenden Gliafasern durchflochten. Selbst die Endverästelungen bleiben dick, verlaufen in den verschiedensten Richtungen und setzen sich, an die Peripherie gelangt, dem Neurilemm fest an, ohne es zu durchbohren.

Während wir also in der Hirudineenfamilie Formen vorfinden, wo die Gliazellen bei alten Individuen selbst als lebensfähig bezeichnet werden können z. B. *Hirudo* und *Aulostomum* (bei *Aulostomum* ist sogar das endozelluläre Gliagitter stärker als das extrazelluläre entwickelt), gibt es andere Gattungen, bei denen die Gliazellen in Rückbildung begriffen sind (*Clepsine*, *Pontobdella*). Das Endglied in dieser Kette stellt uns *Piscicola* dar, wo das ganze Stützgerüst des Nervensystems bloß als ein extrazelluläres gedeutet werden muß, da die Gliazellen selbst teilweise, ja sogar gänzlich dem Schwunde anheimgefallen sind.

Résumé.

1) In den reduzierten Neurosomiten wird die Zahl der Gliazellen bei den von mir untersuchten Hirudineenarten, *Clepsine* und *Piscicola* ausgenommen, der Veränderung nicht unterworfen; dagegen alle anderen Eigenschaften der Gliazellen: Lage, Gestalt und Größe werden proportional zu den sich in besprochenen Neurosomiten abspielenden Reduktionsvorgängen in geringerem oder höherem Grade wesentlich modifiziert.

2) In der Unterschlund- wie auch in der Analganglienmasse gibt es in den Endganglien, die am stärksten modifiziert sind, klare Übergangsstufen hinsichtlich des Baues des Gliagewebes mit den normalen Bauchganglien.

3) Die Zahl der medianen Gliazellen beläuft sich in der Unterschlundganglienmasse auf 10, die in 5 kopfwärts sich immer mehr reduzierenden Ganglien liegen.

4) Entsprechend der Zahl der Ganglien beträgt die Zahl der Konnektivzellen auch 5 Paar (einschließlich des ersten Konnektivstammes, der zwischen dem ersten Bauch- und dem letzten Unterschlundganglion liegt).

5) In der Oberschlundganglienmasse kommt eine schwankende Zahl von Gliazellen vor, und zwar nicht nur im Bereiche der verschiedenen Hirudineenarten, sondern auch bei verschiedenen Exemplaren derselben Art.

6) Die topographischen und die morphologischen Eigenschaften des Hirngliagewebes, wie auch der ganze histologische Aufbau des Hirnes sprechen entschieden gegen jede Homologisierung des Hirnes mit den Bauchganglien.

7) Die sog. Schlundkommissuren sind keineswegs den übrigen Commissuren äquivalente Gebilde zu nennen. Sie sind vielmehr im Verhältnis zu den Bauchkommissuren plurivalente Gebilde, die durch Ineinanderwachsen der seitlichen Teile des Hirnes und einer gewissen Anzahl von Unterschlundganglien und der sie verbindenden Konnektivanlagen zustande kommen. Das vorderste Unterschlundganglion ist am Aufbau des Schlundringes am stärksten beteiligt. Sein medianer Teil ist nur schwach entwickelt und teilweise mit dem nächsten Ganglion verschmolzen.

8) Der bisher so bezeichnete Schlundkommissurenerv muß als ein dem ersten Unterschlundganglion angehörender Seitennerv angesehen werden, was durch seine Ursprungsstelle und Verlaufsweise gekennzeichnet ist.

9) Alle Gliazellen schmiegen sich im Hirne wie auch in den Endganglien der Bauchganglienkette dicht der Neurilemmhülle an, oder liegen in einer Entfernung von einigen μ von derselben; in letzterem Falle sind sie mit ihr mittels zarter Gliafibrillenbrücken verbunden. Das ganze Aussehen aller Gliazellen in diesen Gegenden ähnelt dem der medianen Gliazellen in den typischen Bauchganglien.

10) Das extrazelluläre Gliagitter bildet wie in den mittleren Bauchganglien keine Scheiden um die Nervenfasern, sondern die Gliafasern, die sich reichlich verästeln, ziehen in den verschie-

densten Richtungen, bis sie zur Peripherie gelangen, und hier zeigen sie dieselbe Endigungsweise wie in den Bauchganglien.

Aus dem zoologischen Institut der Universität Lemberg.

Literaturverzeichnis.

- 1) Apáthy St. Analyse der äußeren Körperform der Hirudineen (Mitt. a. d. zool. Station zu Neapel. Bd. 8. 1888).
- 2) — Keimstreifen und Mesoblaststreifen bei Hirudineen (Zool. Anz. 14. J. 1891).
- 3) Bergh R. S. Tatsachen aus der Entwicklungsgeschichte der Blutegel (Zool. Anz. 7. J. 1884).
- 4) — Über die Metamorphose von Nephelis (Zeitschr. f. wiss. Zool. 41. V. 1885).
- 5) — Die Metamorphose von Aulastoma gulo (Arb. a. d. zool.-zootom. Institute in Würzburg 7. B. 1885).
- 6) — Neue Beiträge zur Embryologie der Anneliden. I. Die Schichtenbildung im Keimstreifen der Hirudineen (Zeitschr. f. wiss. Zool. 52. Bd. 1891).
- 7) — Die Schichtenbildung im Keimstreifen des Blutegels (Anat. Anz. 13. J. 1890).
- 8) Bristol C. L. The Metamerism of Nephelis. A Contribution to the Morphology of the Nervous System, with a Description of Nephelis lateralis (Journ. of Morph. 15. Vol. 1899).
- 9) Filatow D. Einige Beobachtungen über die Entwicklungsvorgänge bei Nephelis vulgaris. M. T. (Zool. Anz. XXI. Bd. 1898).
- 10) Francois¹⁾. Contribution à l'étude du système nerveux central des Hirudinees (Tablett. zoolog. Poitiers. Tome I., 1886).
- 11) Hatschek B. Studien über Entwicklungsgeschichte der Anneliden. Ein Beitrag zur Morphologie der Bilaterien (Arb. a. d. zoolog. Inst. d. Univ. Wien, T. I. 1878).
- 12) Hermann E. Das Zentralnervensystem von Hirudo medicinalis (München 1875).
- 13) Hoffmann C. K.¹⁾ Untersuchungen über den Bau und die Entwicklungsgeschichte der Hirudineen (Naturk. Verh. Holl. Maatsch. d. Wetensch. Haarlem 1880).
- 14) Jakubski A. W. Z badań nad tkanką wspierającą (neuroglią) układu nerwowego u pijawic (Hirudinei) (Sprawozd. z posiedz. nauk. w sekcjach X Zjazdu lek. i przyrod. polsk. we Lwowie. Lwów 1907/8).
- 15) — Badania nad zrębem (neuroglią) systemu nerwowego pijawek (Rozpr. Wydz. mat.-przyrodn. Akad. Um. w Krakowie T. XLVII. Ser. B. 1908).
- 16) — Untersuchungen über das Stützgewebe des Nervensystems bei den Hirudineen (Bull. Intern. de l'Acad. d. Sc. de Cracovie. Classe d. Sc. math. et natur. 1908).
- 17) Kleinenberg N. Die Entstehung des Annelids aus der Larve von Lopadorhynchus. Nebst Bemerkungen über die Entwicklung anderer Polychaeten (Zeitschr. f. wiss. Zool. 44. Bd. 1886).

¹⁾ Die mit ¹⁾ bezeichneten Arbeiten waren mir nur in Referaten zugänglich.

- 18) Lang A. Untersuchungen zur vergleichenden Anatomie und Histologie des Nervensystems der Plathelminthen. IV. Das Nervensystem der Tricladen. V. Vergleichende Anatomie des Nervensystems der Plathelminthen (Mitt. a. d. zool. Station zu Neapel. 3. Bd. 1882).
- 19) — Der Bau von *Gunda segmentata* und die Verwandtschaft der Plathelminthen mit Coelenteraten und Hirudineen (Ebenda).
- 20) — Beiträge zu einer Trophocoeltheorie. Betrachtungen und Suggestionen über die phylogenetische Ableitung der Blut- und Lymphbehälter, insbesondere der Articulaten. Mit einem einleitenden Abschnitt über die Abstammung der Anneliden (Abdruck aus d. Jena Zeitschr. f. Naturwiss. Bd. XXXVIII, N. F. XXXI 1903).
- 21) Leuckart R. Die menschlichen Parasiten und die von ihnen herrührenden Krankheiten (1863).
- 22) — Dasselbe (I B. 5. Lief. Leipzig 1894).
- 23) Livanow N. Untersuchungen zur Morphologie der Hirudineen. II. Das Nervensystem des vorderen Körperendes und seine Metamerie (Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ontog. d. Tiere 20. Bd. 1904).
- 24) — *Acanthobdella peledina* Grube 1851 (Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ontog. der Tiere 22. Bd. 1906).
- 25) Mencl E. Über die Histologie und Histogenese der sogenannten Punktsubstanz Leydig's in dem Bauchstrange der Hirudineen (Zeitschr. f. wiss. Zool. 89. Bd. 1908).
- 26) Nusbaum J. Zur Entwicklungsgeschichte der Hirudineen (Zool. Anz. B. 7. 1884).
- 27) Oka Asajiro. Beiträge zur Anatomie der Clepsine. (Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 58. 1894).
- 28) Retzius G. Biologische Untersuchungen. Neue Folge II. Zur Kenntnis des zentralen Nervensystems der Hirudineen (Stockholm 1891).
- 29) Rohde E. Histologische Untersuchungen über das Nervensystem der Hirudineen. (Zool. Beiträge Bd. III 1892).
- 30) Salensky. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Anneliden. (Biol. Zentralbl. 1882—83, Bd. 2).
- 31) Vejdovský F. System und Morphologie der Oligochaeten (Prag, 1884).
- 32) Vignal W. Recherches histologiques sur les centres nerveux de quelques invertébrés (Arch. de Zool. expérim. et génér. Deuxième S. T. I. 1883).
- 33) Whitman C. O. The Metamerism of Clepsine. (Festschrift für Leuckart, Leipzig, 1895).

Erklärung der Abbildungen (Tafel XXX).

Fig. 1. Schnitt durch die Ganglienzellengruppe bei *Hirudo*. Die linke und die rechte Zelle ist durch den Schnitt oberflächlich getroffen, die mittlere halbiert. Es sind Gliafasern auf den Ganglienzellfortsätzen und Glianetze auf den Zelleibern zu sehen. Weigertsche Methode Leitz. Hom. Immers. $\frac{1}{12}$; Ok. 2.

Fig. 2. Medianschnitt durch die Unterschlundganglienmasse bei *Hirudo*. Halbschematische Darstellung. In der Zentralfasermasse sind nur die Konturen der

medianen Gliazellen angegeben. Auf der linken Seite das nächste Konnektiv. Zeiss, A.; Komp. Ok. 6.

Fig. 3. Frontalschnitt durch die Oberschlundganglienmasse bei *Hirudo*. Am oberen Rande der Zentralfasermasse liegen zwei Gliazellen. Auftreten von zahlreichen Neurogliafasern in der Zentralsubstanz und Gliafaserkörbe um die Ganglienzellen. Carnoy's Gemisch, Eisenhämatoxylin. Zeiss, C.; Ok. 2.

Fig. 4. Frontalschnitt durch die Analganglienmasse; es ist nur die Zentralsubstanz wiedergegeben. *Piscicola*. Carnoy. Eisenhämatoxylin. Zeiss, Ok. 2.; Apochrom 4/mm, Tubuslänge 160.

Fig. 5. *Piscicola*. Querschnitt durch ein Unterschlundganglion. Carnoy. Eisenhämatoxylin. Zeiss, Apochrom, 4/mm; Ok. 2.

Fig. 6. *Clepsine*. Medianschnitt durch die Unterschlundganglienmasse. Es ist hier bloß die Zentralfasermasse wiedergegeben. Die hinteren (nach rechts liegenden) Ganglien sind größer mit besser entwickeltem Gliagerüst, als die vorderen (links). Das erste Ganglion ganz rudimentär. Carnoy. Eisenhämatoxylin. Leitz. Obj. 6; Ok. 2.

Fig. 7. Querschnitt durch die Oberschlundganglienmasse in der Region der Zellen cc' (siehe Fig. 1 im Text). *Hirudo*. Carnoy. Eisenhämatoxylin. Zeiss, Obj. C; Kompens. Ok. 4.

Fig. 8. *Nepheleis*. Analganglion transversal schräg getroffen. Unten in der Mittellinie sieht man eine Medianzelle. Oberhalb derselben zwei paramedian liegende, tangential angeschnittene Konnektivzellen. Von den Ganglienzellen sind nur einige wiedergegeben. Reichliche Verästelung der Gliafasern. Weigertsche Methode, Zeiss. Ok. 2; Obj. DD.

Fig. 9. Transversalschnitt durch die linke Hälfte der Oberschlundganglienmasse bei *Nepheleis*. Die gestrichelte Linie MM bezeichnet wie in Fig. 3, die Medianlinie. Intrazelluläre Glianetze. Carnoy. Eisenhämatoxylin. Zeiss. Ok. 2; Obj. DD.

Alle obigen Zeichnungen sind mit dem Abbe'schen Zeichenapparat entworfen; sämtliche photographische Aufnahmen sind mittels eines mikroskopischen Reichertschen Photographieapparates angefertigt worden, und zwar unter gütiger Mitwirkung des Herrn Dr. J. Nowak, wofür ich Ihm an dieser Stelle meinen Dank ausspreche. Die Vergrößerungen sind nur annähernd angegeben.

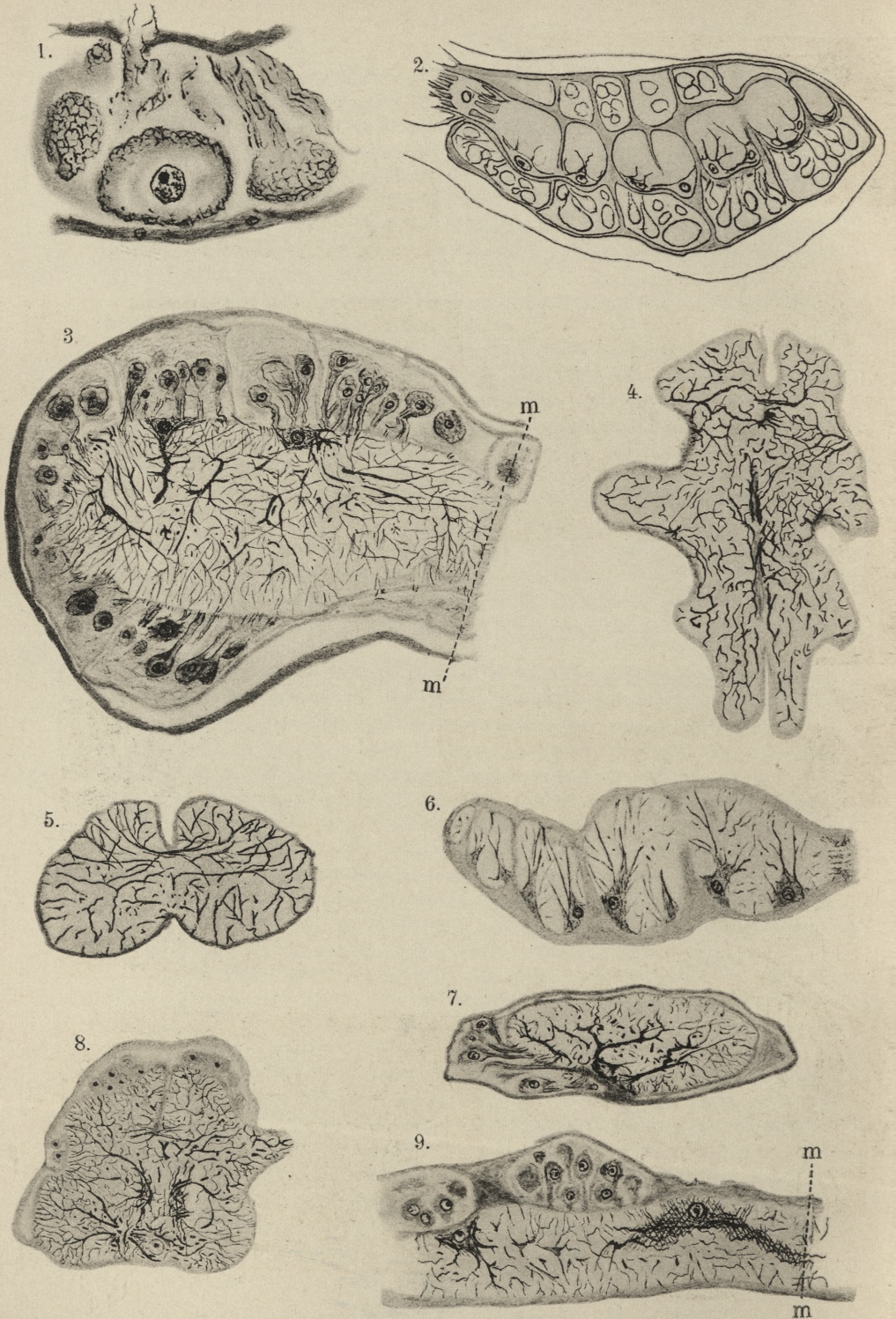
Fig. 10. Paramedianer Schnitt durch die Unterschlundganglienmasse bei *Aulostomum*, zwei hintere Konnektivzellen darstellend. Diese Figur wie auch alle nachfolgenden sind nach den in Carnoy's Gemisch konservierten und mit Eisenhämatoxylin gefärbten Präparaten gezeichnet. 100fache Vergr.

Fig. 11. *Pontobdella*. In der Mitte liegt die mediane Gliazelle, und seitlich dicht unter der Austrittsstelle der Seitennerven beide Konnektivzellen. Das Neurogliagerüst mit der peripheren Mantelschicht ist hier gut sichtbar. Transversalschnitt. 100fache Vergr.

Fig. 12. Linke Portion (nicht die Hälfte) des Nervenschlundringes mit zwei Seitennervenzurzeln. Über der Austrittsstelle des oberen Nerven liegen drei Gliazellen: zwei nebeneinander, die dritte weiter oben. Transversalschnitt. *Pontobdella* 100fache Vergr.

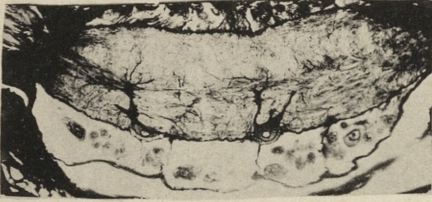
Fig. 13. Ein Unterschlundnerv mit der Leydig'schen Gliazelle schräg getroffen. Die Zelle ruht mit breiter Basis auf dem Nerven, wohin sie starke Gliacheiden aussendet. *Pontobdella*. 110fache Vergr.



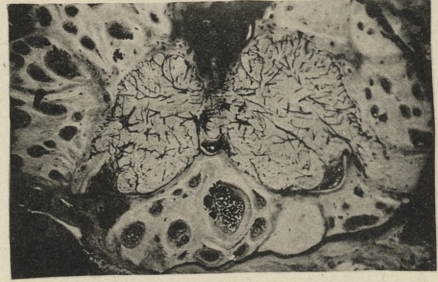


A. W. Jakubski.

10.



11.



12.



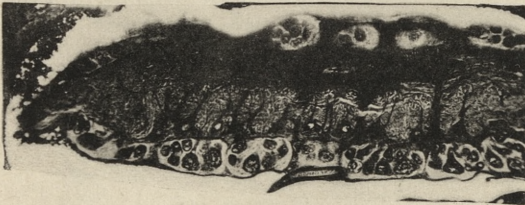
13.



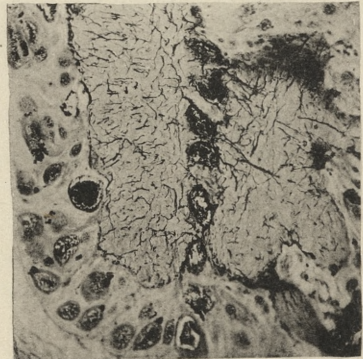
14.



15.



16.



17.



18.



Fototypia A. Trybalski w Krakowie.

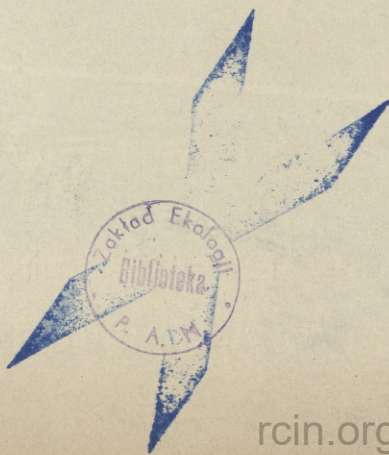


Fig. 14. *Aulostomum*. Gehirn transversal geschnitten, oben nahe der Medianlinie eine Gliazelle. Das Gliagerüst tritt nur schwach hervor. 90fache Vergr.

Fig. 15. *Nepheleis*. Analganglion median geschnitten. Man sieht 6 Ganglien, jedes mit 2 Medianzellen, nur im ersten und letzten ist bloß je eine Gliazelle getroffen. 165fache Vergr.

Fig. 16 und nachfolgende stellen das Gliagewebe bei *Pontobdella* dar. Fig. 16. Frontalschnitt durch 3 Analganglien auf der Höhe der Medianzellen geführt. Auf der linken Seite liegen in den Ganglienpacketen drei Packetzellen; die oberste von ihnen liegt knapp oben am Rande der Photographie und ist deshalb nur zur Hälfte sichtbar. 100fache Vergr.

Fig. 17. Querschnitt durch das erste Konnektiv. Man sieht zwei Konnektivstämme und oben zwischen ihnen den Faivre'schen Mediannerven. Im rechten Konnektivstamme, nahe seinem unteren Rande liegt exzentrisch die Gliazelle. Die Gliasepten verlaufen in diesem Stamme nicht so regulär wie in dem anderen. 175fache Vergr.

Fig. 18. Frontaler, schräg geführter Schnitt durch die Analganglienmasse; am unteren Rande der Zentralfasermasse liegen 4 Konnektivzellen in den Einkerbungen. 100fache Vergr.

66. *Badania doświadczalne nad rozwojem cech płciowych u motyli. (Doniesienie tymczasowe). — Experimentaluntersuchungen über die Entwicklung der Geschlechtscharaktere bei Schmetterlingen. (Vorläufige Mitteilung). Mémoire de M. STEFAN KOPEĆ, présenté par M. K. Kostanecki m. t.*

Die tägliche Erfahrung der Züchter hat seit jeher die Tatsache festgestellt, daß die Entwicklung und überhaupt das Auftreten der sekundären Sexualcharaktere bei den Wirbeltieren, wie z. B. beim Huhn, Rind etc. von der Anwesenheit und dem physiologischen Entwicklungszustand der Geschlechtsdrüsen unmittelbar abhängt. Nun erhob sich für den Zoologen die wichtige Frage, ob der Sexualdimorphismus überall, also auch bei wirbellosen Tieren, insbesondere bei Insekten, wo er an Schmetterlingen, Käfern und dgl. in sehr auffallender Weise auftritt, ebenfalls lediglich durch die Fortpflanzungsdrüsen bedingt wird.

Trotz der großen theoretischen Wichtigkeit dieses Problems und des praktischen Interesses, welches dasselbe naturgemäß hervorrufen mußte, hat sich erst Oudemans¹⁾ vor einem Dezennium

¹⁾ I. Th. Oudemans. Falter aus kastrierten Raupen, wie sie aussehen und wie sie sich benehmen. Zool. Jahrb., Abteil. für Syst., Bd. XII. 1899. Erster

mit dieser Frage bei den Insekten befaßt. Er kam auf den ingenösen Gedanken, die Falter schon als Raupen, vom Stadium nach der dritten Häutung angefangen, zu kastrieren, und zwar als die definitiven Gonaden der Schmetterlinge noch nicht vollkommen entwickelte, rundliche Gebilde darstellen, die sich infolgedessen leicht aus dem umgebenden Bindegewebe herauslösen lassen. Aus den von Oudemans an dem Spinner *Lymantria dispar* L. ausgeführten Versuchen hat sich ergeben, daß die Gestalt, die Größe und die Farbe der Flügel, welche für die beiden Geschlechter so auffallend verschiedene Sexualcharaktere bilden, sich nach der Kastration gar nicht verändern. Somit würde hier ein ganz anderes Verhalten als bei den Säugetieren beobachtet. Da diese Tatsache recht befremdend wirken mußte, hat man gegen das Ergebnis Oudemans' den Einwand erhoben, seine Versuche seien an allzuspäten Raupenstadien ausgeführt worden, weshalb man auf Grund jener Experimente über das Fehlen eines Einflusses der Gonaden auf die dimorphischen Merkmale selbst für *Lymantria dispar* L. keinen bestimmten Schluß machen könne. Da Oudemans nur eine Spezies untersuchte, stellte er selbst die Frage, ob bei der von ihm erwähnten Form die sekundären Sexualcharaktere phylogenetisch nicht etwa zu stark „fixiert“ seien, so daß er es für verfrüht hält, das Ergebnis seiner Experimente zu verallgemeinern.

Einige Jahre später befaßte sich mit obgenannter Frage der Amerikaner Kellogg¹⁾. Zu seinen Experimenten wählte er die Raupen des Seidenspinners; wiewohl er die Versuche gleich nach der zweiten Häutung ausgeführt und sich auch einer anderen Methode als Oudemans bedient hatte, konnte er doch bei den Kastraten gar keine Abweichungen der dimorphischen Merkmale feststellen. Somit wurde für die Aufstellung Oudemans' eine erweiterte Basis gewonnen. Die Unabhängigkeit der sekundären Sexualcharaktere von den Geschlechtsdrüsen, die bei zwei verschiedenen Spinnerfamilien und unter Anwendung zweier verschiedener Methoden festgestellt wurde, dürfte ein allgemeines Verhalten darstellen.

holländischer Originalbericht in: „Handelingen van het Zesde Nederlandsch Natuur-en Geneeskundig Congres“, 23. en 24. April 1897.

¹⁾ V. L. Kellogg. Influence of the primary reproductive organs on the secondary sexual characters. Journal of Exper. Zoology, Vol. I. 1904.

Bald nachdem mir das Thema vorliegender Untersuchungen von Herrn Professor Tad. Garbowski zugeteilt wurde, erschien eine dritte Abhandlung von Meisenheimer¹⁾, die denselben Gegenstand behandelt. Meisenheimer kastrierte die Raupen von *Lymantria dispar* L. bereits nach der zweiten Häutung; nichtsdestoweniger haben sich dieselben zu Schmetterlingen von vollständig normalen sekundären Sexualcharakteren entwickelt. Außerdem hat er versucht, Gonaden aus Raupen des einen Geschlechtes in die Jugendstadien des anderen zu transplantieren, und trotzdem sich die andersgeschlechtliche Gonade in dem neuen Organismus normal entwickelt hatte, verblieb sie dennoch ohne bemerkbaren Einfluß auf die äußere Gestalt der Imago. Somit wurde bei den Schmetterlingen eine Unabhängigkeit des Geschlechtsdimorphismus von den Geschlechtsdrüsen mit hinlänglicher Bestimmtheit festgestellt.

Das Problem.

Hiermit taucht ein neues Problem auf. Es handelt sich nämlich um die experimentelle Eruiierung der Ursachen, infolge deren bei wirbellosen Tieren, im Gegensatz zu den Vertebraten, kein Abhängigkeitsverhältnis zwischen den Gonaden und den sekundären Sexualcharakteren besteht, ferner um die Erklärung, warum die letzteren nach der Kastrierung der Schmetterlinge, ja sogar nach der Transplantation der Gonaden aus Raupen des einen Geschlechtes in kastrierte Raupen des anderen keine Veränderung erleiden.

Es lag die Vermutung nahe, ob diese dimorphischen Charaktere nicht vielleicht in augenfälliger Weise durch die physiochemische Stimmung des weiblichen und des männlichen Organismus bedingt werden. In Erwägung der Tatsache, daß das Blut bei den Arthropoden nicht in einem geschlossenen Gefäßsystem zirkuliert, sondern sich zwischen die Gewebe des Körpers frei ergießt und dabei auch mit den Gonaden in Berührung kommt, mußte die Frage aufgeworfen werden, ob dieses Blut, dessen Beschaffenheit bei beiden Geschlechtern eine verschiedenartige sein dürfte, nicht etwa den Gesamtorganismus der Schmetterlinge, namentlich aber die

¹⁾ J. Meisenheimer. Ergebnisse einiger Versuchsreihen über Exstirpation und Transplantation der Geschlechtsdrüsen bei Schmetterlingen. Zoologischer Anzeiger, Bd. XXXII. 1907.

Differenzierung des Integuments beeinflusse. Um hierüber Klarheit zu erlangen, war es vor allem nötig, Experimente mit der Transplantation des Blutes selbst vorzunehmen, um die Wirkung kennen zu lernen, die das infundierte Blutgewebe im Organismus des anderen Geschlechtes hervorruft.

Im engen Anschluß an diese Versuchsreihe standen Experimente über die morphologische und physiologische Wirkung jener Substanz, die am tierischen Geschlechte das wesentlichste ist, und zwar des Keimzellenplasmas selbst. Es mußte ein Versuch ange stellt werden, die Gonadensubstanz des einen in ein möglichst frühes Stadium des anderen Geschlechtes einzuführen, so daß ein fremdes Keimplasma durch die Blutströmung in verschiedene Gegenden des Organismus gelangen und in innigsten Kontakt mit den Geweben des Körpers treten könnte. Etwaige gestaltende Einflüsse der Geschlechtszellen müßten sodann an Größe, Gestalt und Färbung des künftigen Falters, insbesondere an den Antennen, an den Flügeln u. s. w. zum Ausdruck kommen. Mit anderen Worten, würde sich daraus in ganz unmittelbarer Weise das Vermögen einer Selbstdifferenzierung, beziehungsweise der Umfang und Grad der im Organismus bestehenden Korrelation zwischen äußeren und inneren Geschlechtsmerkmalen ergeben.

Dabei könnte es sich herausstellen, daß eine fremde Gonade, in ein andersgeschlechtliches Exemplar eingebettet, im Laufe der Entwicklung ihre eigene Natur unter dem Einflusse fremdartiger Umgebung und Ernährung verändert. Es wäre alsdann nicht nur die Unabhängigkeit der äußeren dimorphischen Merkmale vom Keimplasma, sondern umgekehrt, die Beeinflußbarkeit der ersteren durch den Organismus nachgewiesen. Es ergibt sich daraus die Notwendigkeit einer weiteren Gliederung der Transplantationsversuche mit unversehrten Anlagen der Gonaden, um einerseits das Bestehen der Autodifferentiation in der Metamorphose eingehend zu untersuchen, andererseits um durch das verschiedene Verhalten der unter verschiedenen Bedingungen implantierten Organe die vermutlich bestehenden korrelativen Zusammenhänge aufzudecken. Zu dem Behufe war es angezeigt, das Schicksal der Geschlechtsanlagen erstens in einer anderen Körpergegend, also in einem anderen Segment eines zweiten, womöglich andersgeschlechtlichen Exemplars verschiedenen Alters, zweitens in entsprechenden Entwicklungsstadien anderer Spezies genauer zu verfolgen. Es war somit nötig,

nicht nur Puppenstadien in den Kreis der Versuche einzubeziehen, sondern die Experimente auf mehrere, in denselben Formenkreis gehörende Arten zu erweitern. Erst auf diese Weise ließe sich eine genügende analytische Basis gewinnen, den im Verhalten kastrierter Insekten und Wirbeltiere so auffallenden Unterschied von allgemeinem Standpunkte aus zu beurteilen.

Es ist mir gelungen, die oben auseinandergesetzten experimentellen Postulate an mehreren Spinnerarten durchzuführen, die sämtlich in denselben Verwandtschaftskreis gehören. Und zwar experimentierte ich aus der Familie

der Lymantriiden mit *Lymantria dispar* L.,
Psilura monacha L.,
Porthesia similis Fuessl.,
Euproctis chryorrhoea L.,
 von Lasiocampiden mit *Malacosoma neustria* L.,
 von Saturniiden mit *Saturnia pavonia* L.

Die Hauptrolle spielte dabei, wie es nicht anders zu erwarten war, *Lymantria dispar* L. (Schwammspinner), sowohl wegen des leicht in großer Menge zu beschaffenden Zuchtmaterials, als wegen der hohen Widerstandsfähigkeit der Raupen und Puppen gegen operative Eingriffe. Eine siebente Art, um die ich mich vielfach bemüht habe und die sich gerade sehr gut zu Kreuzungsversuchen mit *dispar* in dem oben angedeuteten Sinne eignen würde, *Stilpnotia salicis* L. ging in meinen Kulturen leider an einer Ansteckung zugrunde.

Naturgemäß zerfallen meine Experimente in zwei Teile: Einerseits mußte ich die gewöhnliche Kastration an meinem Materiale wiederholen, andererseits Transplantationsversuche mit Blut, Gonadensubstanz, endlich mit unversehrten Geschlechtsdrüsen in oben dargelegter Weise variieren. Mehrere Hunderte von Raupen wurden operiert. Im folgenden möge der Verlauf meiner Experimente in Kürze geschildert werden.

Die Kastrationsversuche.

Die paarigen Geschlechtsanlagen liegen bei Raupen von *L. dispar*, wie dies bereits von Oudemans beschrieben wurde, im fünften Abdominalsegmente, unter zwei Rückenwarzen, paramedian, ober-

halb des Darmes, unterhalb des Pericardialseptums. Dies ist auch bei den meisten Schmetterlingsraupen der Fall. Es sind kleine rundliche Gebilde, die schon nach der zweiten Häutung der Raupe je nach dem Geschlechte zwei verschiedene charakteristische Gestalten aufweisen. Die Anlagen der Hoden (Fig. 1 a). sind mehr länglich und leicht mondformig gebogen, die künftigen Ovarien (Fig. 1 b) mehr gerundet und kleiner. In beiderlei Gonaden lassen sich bereits bei Lupenvergrößerung vier bläschenartig angedeutete Teile unterscheiden. Hierbei habe ich zu bemerken, daß sowohl die Gestalt als die zuweilen als ein sexuelles Unterscheidungsmerkmal

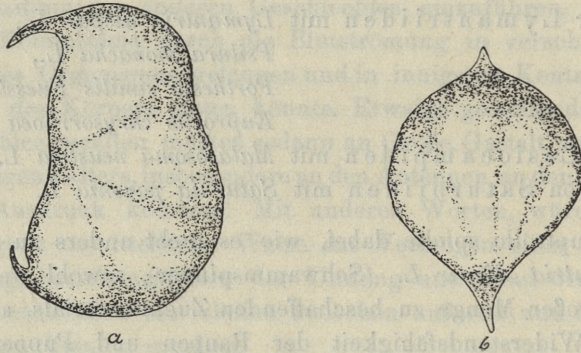


Fig. 1.

angegebene Färbung der jungen Drüsen ziemlich großen individuellen Schwankungen unterworfen ist, wobei allerdings die Gestalt weniger veränderlich erscheint als die erwähnte Vierteilung und die Farbe. Diese variiert von hellgelb bis dunkelorange, und zwar gilt das von beiden Geschlechtern. Was die weitere Entwicklung der Gonaden anbelangt, so vergrößern sich die Hoden allmählich, ohne ihre Gestalt zu verändern. Gegen das Ende des Raupenlebens verwachsen sie, wie seit Hering bekannt ist, miteinander zu einem unpaaren, kugelförmigen Organ. Allerdings habe ich einen Fall beobachtet, wo es selbst nach der Verpuppung zur Verschmelzung der paarigen Anlagen nicht gekommen ist. Die Eierstockanlagen verändern sich nach der fünften Häutung, ja manchmal schon vor derselben, in hervorragender Weise. Im Innern gewahrt man alsdann eng verschlungene Stränge, die sich rasch vergrößern, am Anfange des Puppenlebens aus der bindegewebigen Umhüllung heraustreten und beiderseits je vier

Eiröhren bilden. Die paarigen Samenleiter des Männchens entspringen an der Ventralseite der Hoden, um nach zahlreichen Umbiegungen in den gemeinsamen Ductus ejaculatorius einzumünden. Die Anhangsdrüsen sind nur in einem Paare vorhanden. Im Gegensatze zu den männlichen Ausführungswegen sind die paarigen Eileiter sehr kurz und vereinigen sich bald zu einem langen und breiten Eiergang.

Oudemans schnitt bei der Kastrierung der Raupen die Gonaden heraus, Kellogg dagegen entfernte sie durch Versengung mit einer glühenden, an der betreffenden Stelle des fünften Abdominalsegmentes eingeführten Nadel. Da aber die kleinen Geschlechtsdrüsen einer jungen Raupe mit der Nadel schwer auffindbar sind, gibt die Methode Kellogg's keine Gewähr dafür, ob die Kastration wirklich stattgefunden hat. Wie ich mich nämlich selbst überzeugen konnte, kommt es häufig vor, daß die Gonade von der eingeführten Nadel gar nicht getroffen wird. Bei der Anwendung seiner Operationsmethode hatte übrigens Kellogg selbst eine sehr starke Mortalität der Raupen zu verzeichnen, wofür er die häufig eintretende Verletzung der Herzröhre verantwortlich macht. Die Richtigkeit dieser Vermutung war indessen schon deshalb anzuzweifeln, weil nach den allgemein bekannten Versuchen Crampton's¹⁾ selbst völlig zerschnittene Stücke von Schmetterlingspuppen die Operation überstehen und zusammenwachsen. Dabei möchte ich besonders hervorheben, daß das larvale Herz in der Puppe keiner Phagocytose unterworfen ist, sondern sich unmittelbar zum definitiven Herzen der Imago ausbildet. Die Behauptung also, die Verwundung dieses Organs in der Raupe müsse notwendigerweise ihren Tod herbeiführen, hielt ich von vornherein für unbegründet. Um den Sachverhalt auf experimentellem Wege festzustellen, wurde von mir folgender Versuch ausgeführt: Mit Hilfe einer scharfen Schere habe ich am Rücken der Raupe einen so tiefen Einschnitt gemacht, daß aus der weit klaffenden Wunde der Darm herausragte. Trotzdem aber in diesem Falle eine vollständige Durchschneidung des Herzens der Quere nach erfolgt sein mußte, lebten die Raupen bei entsprechender Pflege fort und verwandelten sich mit der Zeit in gesunde Falter.

¹⁾ H. E. Crampton. An experimental study upon Lepidoptera. Arch. für Entw. Mech., Bd. IX., 1899.

Meine Kastrierungsmethode beruhte auf mechanischer Entfernung der Gonaden, wich aber von der Methode Oudemans' wesentlich ab. Mit einer starken Stahlnadel durchstach ich die bereits im zarten Jugendstadium derbe und einen bedeutenden Widerstand entgegensetzende Raupenhaut am Rücken des fünften Abdominalsegmentes. In die auf solche Weise gebildete Öffnung führte ich ein sichelförmiges, aus einer Stahlnadel hergestelltes Häckchen ein. Für die ganz jungen Raupen wurden die Häckchen aus feinem Draht angefertigt. Bei kunstgerechter Einführung und Umwendung der Häckchen läßt sich die Gonade mit verhältnismäßiger Sicherheit aus dem Fett- und Bindegewebe mit dem Instrumente durch die Öffnung herausziehen, und zwar in völlig unversehrtem Zustand. Für jederseitige Anlage muß eine besondere Öffnung gemacht werden. Unter Anwendung dieser Methode konnte ich die Raupen unmittelbar nach überstandener zweiter Häutung, als die Länge der Tierchen ungefähr 7—8 mm beträgt, kastrieren. Selbstverständlich war dies eine schwierige Aufgabe. Die Wunde ist nämlich nach der Operation verhältnismäßig groß; wenn nun keine Betäubungsmittel wie Äther oder Chloroform angewendet werden, so kommt es häufig vor, daß die sich während der Operation stark bewegenden Raupen den Darm nach außen herausdrängen, was genügt, um den Tod der Tiere herbeizuführen. Andererseits geht ein großer Teil der narkotisierten Exemplare infolge der Ermattung zugrunde. Insbesondere gelten diese Schwierigkeiten für die Raupen des Ringelspinners; die durchsichtigen Gonaden derselben sind so zart, daß sie nur schwer aufzufinden sind und sich mit dem Häckchen kaum in unverletztem Zustande vollständig herausheben lassen; außerdem krümmen sich eben die *Neustria*-Raupen während der Operation in so heftigen Windungen, daß der Darm sich in den meisten Fällen durch die Wunde nach außen hervorstülpt, wodurch jegliches Resultat vereitelt wird; unter der Narkose dagegen geht diese Spezies bald zugrunde. Nach der Operation pflegte ich, namentlich bei den ersten Versuchen, die Wunde mit einer sehr stark mit Äther verdünnten Kollodiumlösung zu verschließen. Dieses Vorkehrungsmittel hatte aber häufig eine Schimmelbildung an der Oberfläche des Kollodiumhäutchens zur Folge, wodurch die Tiere bald getötet wurden. Indessen habe ich mich überzeugt, daß bei der Operation älterer Raupen die Schließung der Wunde durch das Kollodium überflüssig wird, weil das

aus der Wunde heraussickernde Blut bereits nach Verlauf von einer halben Stunde, manchmal noch früher gerinnt und die Haut gegen verderbliche äußere Einflüsse abschließt. Das Prozentverhältnis der zugrunde gehenden Raupen ist naturgemäß unter den nach der zweiten Häutung operierten Stücken am beträchtlichsten und vermindert sich mit der zunehmenden Größe der Tiere. Eine große Sterblichkeit, nicht bloß unter den operierten, sondern überhaupt unter allen gepflegten Raupen, wurde durch die gerade heuer zu jener Zeit ausgebrochene und etwa zehn Tage dauernde pebrinartige Krankheit hervorgerufen. Die Raupen erhoben den hinteren Teil des Körpers regungslos in die Höhe oder ließen den Vorderteil schlaff herabhängen; dabei wurde die kranke Körperhälfte mit einer sich aus dem After absondernden Flüssigkeit klebrig überzogen. Nach einigen Tagen wurden die kranken Tiere schwarz, schrumpften zusammen und gingen schließlich ein. Sonst kann man ein günstiges Resultat erzielen, selbst wenn die Kastration hart vor einer neuen Häutung vorgenommen wird. Es kam sogar vor, daß eine Raupe zwei Stunden nach der Operation die Häutung anstandslos überstand. Ziemlich häufig wird aber die Raupe, zumal in älteren Stadien, durch das zur Schließung der Wunde verwendete Kollodium oder selbst durch das geronnene Blut an der operierten Stelle so stark beengt, daß es zu einer tiefen Einschnürung kommt, die das Herauskriechen der Raupe aus der alten Haut mechanisch unmöglich macht. Die Spuren der Operation sind meistens an der neuen Haut sichtbar und bleiben, wie ich es häufig beobachtet habe, selbst nach zweitnächster Häutung bestehen. Die Haut erscheint an der gewöhnlich stark eingesenkten Stelle zeichnungslos, unbehaart und sticht besonders durch ihre hellere Färbung von dem normalen Integumente ab. Werden die Raupen erst nach der fünften Häutung kastriert, so lassen sich Spuren der Operation oft sogar an der Puppe beobachten. Das fünfte Abdominalsegment ist alsdann sattelförmig eingesenkt; war die infolge der Operation entstandene Wunde sehr groß, dann geschah es häufig, daß auch das korrespondierende Stigma des fünften Abdominalringes obliterierte (Fig. 2). Auf das reichhaltige mir zu Gebote stehende Beobachtungsmaterial gestützt, kann ich die interessante, in den meisten Fällen zutreffende Behauptung aufstellen, daß durch die Operation die Häutung beschleunigt und auch die Dauer des Puppenstadiums verkürzt wird. Die normalen Männchen leben nämlich als Puppen

ungefähr 18 Tage und die Weibchen noch länger, während die kurz vor der Verpuppung operierten Weibchen nur 13–14 Tage zur Verwandlung brauchen.

Die Kastration wurde an einer oder an beiden Seiten vorgenommen. Bei total kastrierten Weibchen habe ich bemerkt,

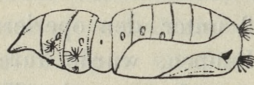


Fig. 2.

daß der Eiergang sich verschiedenartig entwickelt. In einigen Fällen bleibt er so lang wie bei normalen Exemplaren (Fig. 3 a), in anderen dagegen wird er bedeutend länger, gleichmäßig breit oder am Ende keulenförmig aufgetrieben, manchmal seitwärts gebogen

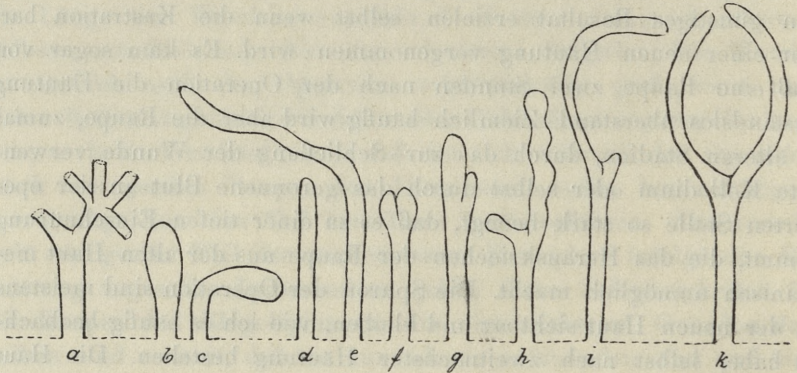


Fig. 3.

(b–e) und hat überhaupt einen sehr verschiedenen Durchmesser. Neben dem Eiergang entwickeln sich oft auch, stärker oder schwächer, die Eileiter, zu beiden Seiten gleichmäßig oder in verschiedenem Grade, wobei der eine von ihnen mitunter unverhältnismäßig lang werden kann (f–k). Die Ausführungsgänge liefen stets blind aus. Diese Mannigfaltigkeit wird durch die Operationsmethode bedingt. Das in das Innere des Körpers eingeführte Häkchen verursacht in den Geweben der Tiere, namentlich bei sehr beweglichen Exemplaren zweifelsohne erhebliche Störungen. Es kommt in weiterer Folge zu sehr bedeutenden Veränderungen im korrelativen Gleichgewicht der Gewebe, so daß einzelne Teile einerseits

durch verlagerte Gewebsmassen in ihrer Entwicklung Hemmungen erleiden und verkümmern oder in ihrer Anlage selbst verletzt werden, anderseits aber hypertrophisch auswachsen können.

Als ich die weiblichen Raupen der *L. dispar* nach der dritten Häutung einseitig kastrierte, fand ich, daß bei den fertigen Faltern der entsprechende Eileiter bald fehlte, bald ebenfalls hypertrophisch entwickelt war. Das interessanteste dabei war, daß er stets einige Eier enthielt, die in sein Lumen aus dem übriggelassenen Eierstock gelangten. Außerdem wiesen die Schmetterlinge eine hervorragende Hypertrophie der zurückgebliebenen Gonade auf. Ich habe die Beobachtung gemacht, daß die Zahl der von den normalen Weibchen gelegten Eier wesentlichen Schwankungen unterworfen ist und von der Größe des betreffenden Exemplars abhängt. In einigen Fällen konnte ich 300—400, in anderen mehr, in einem Falle sogar 817 von einem einzigen Weibchen abgelegte Eier zählen. Das zurückgebliebene Ovarium der oberwähnten, ziemlich kleinen, einseitig kastrierten Exemplare enthielt in einem Falle 397, in einem anderen sogar 419 Eier, insofern ich dieselben auch an den Enden der Ovarialröhrchen bei Lupenvergrößerung mit dem Auge erreichen konnte. Die Länge der einzelnen Zweige dieser Eierstöcke betrug über 8 cm, während die Eierstockröhrchen normaler Weibchen von genau derselben Größe und derselben Zucht kaum 5.5 cm messen und die Zahl sämtlicher in den beiden Ovarien enthaltenen Eier sich auf bloß etwa 400 beläuft. Diese hypertrophisch ausgewachsenen und von den normalen beinahe um 3 cm längeren Eieröhrchen der einseitig kastrierten Weibchen füllten das Abdomen vollständig aus, so daß es sich infolgedessen trotz der Kastration äußerlich von einem normalen weiblichen Hinterleib gar nicht unterschied. Auch diese Tatsachen liefern uns einen klaren Beweis der im Organismus bestehenden Korrelation in der Größe verschiedener Organe. In dieser Beziehung verhalten sich die Schmetterlinge genau wie die Wirbeltiere, bei denen bekanntlich die Entfernung z. B. der einen Niere eine stärkere Entwicklung der zurückgebliebenen veranlaßt.

Was die dimorphen Merkmale anbelangt, so habe ich gleich meinen Vorgängern, namentlich Oudemans und Kellogg, bei den Kastraten beiderlei Geschlechtes durchwegs keine Veränderungen vorgefunden. Meisenheimer glaubte allerdings feststellen zu können, daß sich bei einem allgemeinen Überblick der aus nor-

malen und kastrierten Raupen erhaltenen Falter ein gewisser Unterschied wahrnehmen läßt. Erstens hält er die Kastrate für noch variabler als normale *Dispar*-Falter, namentlich die Weibchen; zweitens ist ihm an kastrierten Weibchen ein gelblichbräunlicher Anflug auf der Oberseite beider Flügelpaare aufgefallen, was nach ihm möglicherweise als ein Hinneigen zu den Eigenschaften des entgegengesetzten Geschlechtes gedeutet werden könnte. Nun könnte ich nach genauer Durchsicht meines Materials die erwähnten Unterschiede kaum als vorherrschende Regel ansehen. Die Variabilität ist in beiden Falterreihen in demselben Grade vorhanden, namentlich beim Männchen. Höchstens hätte ich zu bemerken, daß der Prozentsatz sehr dunkler, besonders stark und schön gezeichneter Männchen unter den Kastraten größer ist, obwohl stark melanotische Stücke auch unter normalen keineswegs fehlen. Die Weibchen zeigen auch bei Normalfaltern überaus häufig einen gelblichen Anflug, zumal an der Basalhälfte der Flügel. Dies scheint eher mit Lokalrassen zusammenzuhängen. Mein Zuchtmaterial stammte zum Teil aus der Umgebung von Krakau, zum Teil aus Warschau, zum Teil aus Hessen (Maingegend). Fast alle Falter meiner Zucht sind ziemlich klein, was auf die ungünstige Beengung der Raupen in den Zuchtbehältern zurückzuführen wäre. Die von Prof. Garbowski im Hochsommer 1908 im Warschauer Gouvernement beobachteten Freilandsweibchen waren unvergleichlich größer und fielen durchgehends durch eine fast rein weiße Grundfarbe auf. Bei meinen Untersuchungen konnte nun das Zuchtmaterial nach seiner Provenienz leider nicht gesondert bleiben. In betreff der Weibchen kann ich also nur die ganz allgemeine Beobachtung vermerken, daß der zackige Mittelstreif, der bei dem mondförmigen Fleck die Vorderflügel durchquert, bei den Kastraten außerordentlich viel häufiger als bei Normalfaltern sich zu einem bis 3 mm breiten, schwärzlichbraunen Bande erweitert, eine Erscheinung, die eher als Folge sonstiger Nebeneinflüsse, denn als Wirkung der Kastration zu betrachten ist. Im großen und ganzen wurde also die Unabhängigkeit dieser Merkmale von den Gonaden nochmals festgestellt. Der einst gegen Oudemans erhobene Einwand, die erst nach der dritten Häutung vorgenommene Kastration sei zu spät erfolgt, als daß seine Resultate für maßgebend gehalten werden könnten, ist nicht begründet. Ich mache nämlich darauf aufmerksam, daß die Geschlechtsdrüsen der Raupen von *L. dispar* nach der zweiten Häutung noch

ganz kleine, unentwickelte Körperchen sind, deren Länge in diesem Stadium bei den Männchen $\frac{3}{4}$, bei den Weibchen dagegen kaum $\frac{1}{2}$ mm beträgt. Nach der dritten Häutung sind sie nur unerheblich größer, es ist aber angesichts der sonst konstatierten Unabhängigkeit kaum anzunehmen, daß sie selbst in diesem fortgeschritteneren Stadium die übrigen Gewebe des Körpers beeinflussen könnten.

Transplantationsversuche.

a) Experimente mit Bluttransfusion. Wie aus dem oben entworfenen Arbeitsplane hervorgeht, mußten in der zweiten Versuchsreihe vor allem die für das ganze Problem entscheidenden Wirkungen von Bluttransfusion untersucht werden.

Die Transfusion wurde sowohl an Raupen derselben Form als auch unter Repräsentanten verschiedener Familien vorgenommen. Es wurden dazu nur kastrierte Raupen verwendet. Durch einen dorsalen Nadelstich — wobei der Darm auf keinen Fall verletzt werden darf — entfernte ich eine möglichst große Menge des grünen Blutes, welches zuerst von selbst ziemlich reichlich herausfließt, nachher aber unter Ausübung eines vorsichtig gesteigerten Drucks aus der Raupe herausgepreßt werden muß, bis der Körper ganz schlaff wird. Das Blut wurde unter Anwendung sterilisierter Instrumente in kleine Uhrgläschen gesammelt. In die solcherart behandelten Raupen, deren Geschlecht selbstverständlich vorher genau bestimmt werden muß, wurde nunmehr das ebenso gewonnene Blut eines normalen, andersgeschlechtlichen Exemplares mittels einer Pravatz'schen Spritze injiziert. Je nach der Größe der Tiere konnte auf diese Weise $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ ccm fremden Blutes eingeführt werden, also verhältnismäßig riesige Mengen, was besonders beachtet werden möge. Damit die den Körper auf's neue straff füllende Blutflüssigkeit bei den energischen Bewegungen der Raupe durch die Wunde nicht herausfließe, pflegte ich auch hier die Einstichöffnung mit einer feinen Kollodiumschichte zu verschließen. Alle Exemplare, denen man das Blut von Raupen ungefähr desselben Alters, aber verschiedenen Geschlechtes und verschiedener Spezies infundiert hat, hören bald darauf auf sich zu bewegen, werden starr und fallen endlich kraftlos zu Boden unter bogenförmigen Krümmungen des ganzen Körpers. In diesem Zustande verbleiben sie

manchmal zwei Stunden, worauf die Elastizität des Körpers und das Bewegungsvermögen wiederkehrt. Eine ähnliche Erscheinung wurde neulich von Metalnikoff¹⁾ beobachtet. Indem er sich nämlich auf experimentellem Wege überzeugen wollte, einerseits ob das Raupenblut während der histolytischen Vorgänge bei der Verpuppung gewisse, die Vernichtung verschiedener Larvalorgane während der Phagocytose bewirkende Toxine ausscheidet, andererseits indem er ermitteln wollte, wann diese Toxine im Blute der Raupe entstehen, hat er das Blut aus den betreffenden Stadien ganz jungen Exemplaren injiziert, um auch in diesen die eventuelle Wirkung der vermuteten Toxine hervorzurufen, wobei er die Beobachtung gemacht hat, daß jedes Tier nach der Operation starr wird und umfällt, so oft man das implantierte Blut von Exemplaren, die sich schon nach 2—3 Tagen in Puppen verwandeln sollten, oder von ganz jungen, höchstens 3 Tage alten Puppen, herrührte. Da ich nun bei meinen Versuchen an allen Tieren nach der Bluttransfusion (selbst aus gleichartigen und ganz jungen Raupen) solche Lähmungserscheinungen vorübergehend auftreten sah, so ergibt sich daraus, daß diese Erscheinungen gar nicht durch die Anwesenheit histolytischer Toxine hervorgerufen werden können, sondern einfach als eine Folge des fremden Blutgewebes aufzufassen sind. Ich machte ferner die Beobachtung, daß einige der operierten Exemplare eine Zeit lang außerstande sind, die Kotballen nach außen vollständig herauszustößen, wieweil der Kot nach der Operation, wahrscheinlich infolge des durch das infundierte Blut bewirkten größeren Druckes reichlicher und weicher wird. Die aus dem After herausragenden Kotballen mußte ich manchmal noch am nächsten Tage mit Hilfe einer Pinzette entfernen. Bald nach stattgefundener Transfusion trat bei zahlreichen Individuen ein starker Vorfall des Mastdarmes ein; ein großer Teil der Raupen ging dabei zugrunde. Bei vielen stülpte sich jedoch der Darm wieder ein, zuweilen erst nach mehreren Stunden, so daß er bereits am nächsten Tage regelmäßig funktionieren konnte.

Um die für unser Problem ausschlaggebende Wirkung der Transfusion möglichst allseitig kennen zu lernen, habe ich sie bald innerhalb einer und derselben Spezies, bald zwischen Individuen,

¹⁾ S. Metalnikoff. Zur Verwandlung der Insekten. Biol. Centralblatt, Bd. 27. 1907.

welche zwei verschiedenen Arten, ja sogar zwei verschiedenen Familien angehörten, vorgenommen. Im ersten Fall habe ich das Blut normaler *Dispar*-Raupen nach der dritten Häutung den kastrierten andersgeschlechtlichen Exemplaren ebendesselben Alters infundiert. Leider ist es mir teils infolge der Operation selbst, welche von jungen Exemplaren nur schwer überstanden wird, teils infolge der Ansteckung, die, wie erwähnt, unter meinem Zucht- und Versuchsmateriale großen Schaden angerichtet hat, nicht gelungen, von den operierten Exemplaren auch nur ein einziges dauernd am Leben zu erhalten. Ich sah mich genötigt, identische Operationen an älterem, ganz gesundem Freilandsmaterial zu wiederholen. Diese kräftigen Raupen ertrugen denn auch die Operation außerordentlich gut. Zur Illustration möge die Angabe genügen, daß von 16 *Dispar*-Raupen, die nach der fünften Häutung operiert wurden, kaum eine einzige zugrunde ging, während alle zurückgebliebenen sich in Puppen verwandelten und später ganz tadellose Schmetterlinge lieferten. Es hat sich dabei herausgestellt, daß diese Falter weder an Färbung, noch an Gestalt und an Größe der Flügel, noch an anderen sekundären Sexualcharakteren, abgesehen von der üblichen individuellen Variabilität, irgendwelche Veränderungen erlitten haben, trotzdem die Menge des infundierten Blutes verhältnismäßig bedeutend war. Im zweiten Falle habe ich den *Dispar*-Raupen das Blut von anderen Formen, und zwar von *Psil. monacha*, *Sat. pavonia*, und *Mal. neustria* injiziert. Bei der letzteren habe ich die Operation an jungem Materiale ausgeführt, wo die *Dispar*- und *Neustria*-Raupen die dritte Häutung eben überstanden hatten. Bei der Bluttransfusion aus *Sat. pavonia* und *Psil. monacha* in *Lymantria*-Raupen konnte ich mich dagegen nur eines älteren Materials bedienen. Alle Raupen, die mir zu Gebote standen, hatten nämlich die letzte Häutung durchgemacht. Bei allen diesen Experimenten war die Mortalität unter den operierten Raupen beträchtlich, ein Teil der Tiere aber blieb am Leben. Die aus den überlebenden Raupen entwickelten Falter unterschieden sich wieder nicht im geringsten von normalen Stücken. Das in eine andere Spezies infundierte Raupenblut übt also keine gestaltende oder tinktorische Wirkung aus.

b) Keimplasmatransplantation. Auch die Transplantation des Keimplasmas nahm ich nicht bloß an Raupen einer Spezies, sondern auch innerhalb zwei verschiedener Formen vor. In beiden

diesen Versuchsgruppen exstirpierte ich aus lebenskräftigen Raupen nach der bereits geschilderten Methode die Geschlechtsanlagen und zerrieb sie möglichst fein mittels eines flachen sterilisierten Stahlinstrumentes auf einem hohlgeschliffenen Objektträger mit einer kleinen Menge des Blutes desselben Tieres. Wenn man die auf solche Weise gewonnene breiartige Flüssigkeit mikroskopisch untersuchte, sah man verschieden große Zellkomplexe, einzelne Zellen, sowie eine Menge sehr kleiner, von zerrissenen Zellen stammender Plasmaklumpchen in der Lymphe flottieren. Das Ganze wurde mit Hilfe einer Pravat'schen Spritze kastrierten Raupen des anderen Geschlechtes injiziert, wobei die Spritzenkanüle in das erste Abdominalsegment, also gerade in jener Körpergegend eingestochen wurde, wo sich die Imaginalscheiben der Schmetterlingsflügel befinden. Das Verhalten der Tiere nach der Operation war im allgemeinen dasselbe wie nach der Infusion des Blutes. Leider standen mir für die beiden Versuchsreihen nur Raupen zur Verfügung, die bereits die letzte Häutung überstanden hatten. Selbstverständlich trachtete ich in jedem einzelnen Falle eine möglichst große Menge der Gonadensubstanz einzuführen. Zu diesem Behufe transplantierte ich in die weiblichen *Dispar*-Raupen das Keimplasma von nicht weniger als sechs larvalen Hoden, in die männlichen dagegen -- von vier Ovarien. Dabei ging mir kein einziges operiertes Exemplar zugrunde.

Bei den Experimenten mit der kreuzweisen Transplantation, implantierte ich den Schwammspinnerraupen das Keimplasma von vier Geschlechtsdrüsen der *Neustria*- oder *Monacha*-Raupen, oder umgekehrt, führte ich in die jungen Raupen der Nonne das Keimplasma aus je vier *Dispar*-Raupen. Hier war die Sterblichkeit der operierten Tierchen groß. Nichtsdestoweniger haben sich die am Leben gebliebenen Raupen anstandslos verpuppt, und die auschlüpfenden Falter wiesen in bezug auf die sexuellen und spezifischen Merkmale wieder keine Veränderungen auf.

c) Transplantation ganzer Gonaden. Nachdem solchermaßen die Selbstdifferenzierung der äußeren Sexualcharaktere, unabhängig von der Anwesenheit der Geschlechtsdrüsen, bzw. einer fremden Blutflüssigkeit und fremder Keimsubstanz nachgewiesen wurde, hieß es nunmehr, in umgekehrter Richtung das Schicksal und die eventuelle Beeinflussbarkeit der Keimdrüsen unter verschiedenen variierten Entwicklungsbedingungen zu verfolgen. Wie ich bereits erwähnt

habe, wurden Transplantationen unversehrter Gonaden einerseits aus Raupen in gleichgeschlechtliche oder andersgeschlechtliche Exemplare derselben Art und desselben oder verschiedenen Alters, andererseits zwischen Repräsentanten zweier verschiedenen Arten, Gattungen oder gar Familien vorgenommen.

Bei diesen Experimenten bediente ich mich einer Methode, welche von der Methode Meisenheimer's verschieden war. Ich schnitt die Haut der Raupe, der ich eine fremde Geschlechtsdrüse implantieren wollte, an der erwählten Stelle auf, worauf ich die in einem Blutstropfen aufbewahrte Gonade von dem betreffenden Hohlglase samt der Lymphe in eine reine und entsprechend dünne Glaspipette zu heben pflegte, die letztere 1—2 mm tief in die vorbereitete Wunde des operierten Tieres einführte und durch einen vorsichtigen Druck auf die Gummikappe die in der Pipette befindliche Gonade in das Innere der Raupe hineingleiten ließ. Wie bei allen anderen Versuchen muß auch speziell hier darauf geachtet werden, daß in die Raupe mit der Gonade keine Luftbläschen gelangen, da dies unfehlbar den Tod des Tieres herbeiführt. Nach der Injektion wurde die Wunde in der üblichen Weise mit einem Kollodiumhäutchen verschlossen, die Pipette dagegen vor weiteren Versuchen auf das sorgfältigste sterilisiert. Bei dieser Methode ist die Gewißheit, die Gonaden in wirklich unversehrtem Zustande zu transplantieren, bedeutend größer, als bei der Methode Meisenheimer's, der sie mittels eines Hohlmeißels einführte. Bei Anwendung dieses Instrumentes hatte ich übrigens oft mit der Schwierigkeit zu kämpfen, das fest anhaftende Keimorgan von dem Metalllöffelchen abzustreifen. Mit der Pipette arbeitete ich auch bei der Implantation der Gonaden in die Puppen; diesen wurde das harte Integument mit einem scharfen Skalpell geöffnet; beim Einführen der Pipette wurde das spröde Chitin oft eingedrückt oder es bekam größere Risse. Die während der Operation sich heftig windenden, starken weiblichen Puppen stießen mitunter durch die Wunde sogar Teile von Ovarialröhren hervor. In solchen Fällen schnitt ich die hervorquellenden Teile der Geschlechtsorgane einfach ab und bestrich die Wunde so rasch wie möglich mit geschmolzenem Paraffin.

Bei Transplantationsversuchen von unversehrten Gonaden innerhalb derselben Art waren naturgemäß wieder zwei Fälle möglich: entweder wurde die Raupengonade in ein Exemplar des-

selben oder des anderen Geschlechtes implantiert. Es sei hier von vornherein mit Nachdruck bemerkt, daß ich diese Versuche ausschließlich an *Dispar*-Raupen ausführte.

Galt es, Gonaden innerhalb des gleichen Geschlechtes zu transplantieren, so erschien es mir angezeigt, Weibchen den Männchen vorzuziehen, und zwar deswegen, weil es bei den ersteren leichter ist festzustellen, ob sich die implantierten Geschlechtsdrüsen in der neuen Umgebung zu einem normalen Eierstock entwickelt haben, als bei den Hoden. Das entwickelte Ovarium mit frei ausgezogenen Eiröhren besitzt nämlich eine weit mehr charakteristische Gestalt, als die männliche Gonade, die einen verhältnismäßig kleinen, kugelförmigen Körper von ziemlich wechselnder Färbung bildet und besonders bei etwa einsetzenden Degenerationsprozessen in den reichlichen Fettmassen schwer auffindbar ist. Nicht kastrierten weiblichen Raupen implantierte ich unmittelbar nach der fünften Häutung je ein von einem Exemplare desselben Alters herrührendes Ovarium. In den meisten Fällen fand ich die implantierten Gonaden im Vorderteile des Abdomens, etwa im zweiten Segmente in typisch entwickelter Gestalt, mit je vier Eiröhren. Eine jede von diesen Gonaden war reichlich mit Tracheen und Fett umwachsen, und besaß kaum 15—20 mm lange, manchmal noch kürzere Eiröhren, die nur 3—6 entwickelte und etliche helle, noch unreife Eier enthielten. Alle vier Ovarialröhren vereinigten sich in typischer Weise zu einem Eierkelch, der aber blind auslief.

Eine sehr interessante Erscheinung habe ich an einem nach der Injektion entwickelten Ovarium beobachtet. Seine Eiröhren waren länger als bei den oben beschriebenen Gonaden, und der gemeinschaftliche Eierkelch lief in einen bogenförmigen, über 6 mm langen, am Ende in drei Arme sich verästelnden Eileiter aus (Fig. 4); der eine von den Endfortsätzen war über 2 mm lang. Es leuchtet ein, daß man hier mit einer regenerativen Bildung zu tun hat. Wie dies nämlich aus der Entwicklungsgeschichte der Insekten, insbesondere seit den Untersuchungen von Heymons bekannt ist, bildet bei den Weibchen der vordere Teil der Geschlechtsanlagen oder der sogenannten Genitalstränge an der Ventralseite die proximalen Teile der Ausführungsgänge, die Eierkelche; in unmittelbarem Zusammenhang mit diesen Eierkelchanlagen stehen die Endteile der Genitalstränge; diese Endteile liefern nach dem Schwunde der Keimzellen die rein epithelialen Eileiter. In dem

oberwähnten Falle ist nun höchstwahrscheinlich zusammen mit der Gonade und der Eierkelchanlage auch ein weiterer Teil von jenem Genitalstrange implantiert worden; dieser Teil hat, indem er sich zu dem definitiven Eileiter entwickelte, nicht nur den ganzen Ausführungsgang der betreffenden Seite, sondern auch, was besonders interessant ist, den Eileiter der anderen Seite samt dem Eierkelch regeneriert, welcher noch drei kurze Ovarialansätze aufweist, wie das aus der Fig. 4 klar zu entnehmen ist. Die Möglichkeit

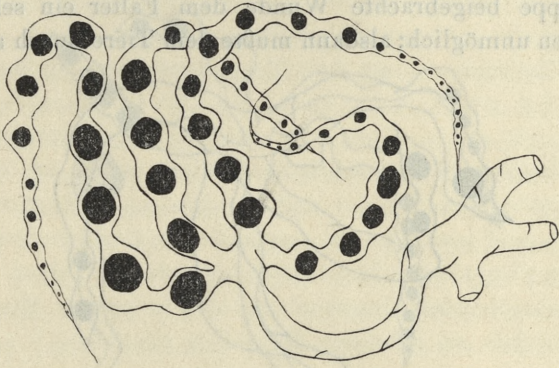


Fig. 4.

hingegen, daß beim Herausnehmen der Gonade aus der Raupe zusammen mit dieser Gonade und der Anlage ihres Eileiters auch die Eileiteranlage der anderen Körperhälfte herausgenommen und dem operierten Tiere implantiert worden wäre, ist ausgeschlossen.

Die äußeren Geschlechtscharaktere sämtlicher Weibchen erlitten trotz der Anwesenheit des in ihrem Innern entwickelten dritten Eierstockes nicht die geringste Veränderung.

Außerdem injizierte ich die weiblichen Gonaden aus Exemplaren nach der fünften Häutung nichtkastrierten weiblichen Puppen, und zwar sehr jungen, 1—2 Tage alten, somit im Stadium der Phagoeytose befindlichen, wie auch beinahe völlig entwickelten Puppen gleichfalls weiblichen Geschlechtes. Ein in frühem Puppenalter operiertes *Dispar*-Weibchen zeigte nach dem Ausschlüpfen ein winziges, unter den normalen Eierstöcken seitlich zwischen dem Darm und der Körperwand verborgenes, sonst ganz normal gebautes Ovarium, dessen jedes Eiröhrchen 3—5 mm lang war und 4—6 noch unvollkommen ausgebildete Eier enthielt. Es tritt hier also der interessante Sachverhalt zutage, daß eine Raupengo-

nade, welche in unversehrtem Zustande in eine ganz junge Puppe eingeführt wurde, in jenem Stadium, wo eine ganze Reihe der Organe der Phagocytose unterworfen und aufgelöst wird, der Vernichtung ebensowenig unterliegt, wie die normalen Geschlechtsdrüsen der diesbezüglichen Raupen. Als ich fortgeschritteneren, ungefähr 2 Wochen alten Puppen je ein Ovarium aus einer Raupe unmittelbar nach der fünften Häutung implantierte, entwickelten sich daraus die Falter bereits nach 4 bis 7 Tagen. Manchmal machte die der Puppe beigebrachte Wunde dem Falter ein selbständiges Ausschlüpfen unmöglich; alsdann mußte dem Tiere durch allmähliche



Fig. 5.

Entfernung der Abdominalhülle geholfen werden. In sämtlichen Exemplaren befanden sich die implantierten Gonaden im Bläschenstadium mit noch im Innern enthaltenen Eiröhrchen. Diese Geschlechtsdrüsen standen in demselben Entwicklungsstadium, in welchem sich zu gleicher Zeit die korrespondierenden Gonaden der anderen Seite befanden, die in den operierten, normal heranwachsenden Raupen zurückgelassen wurden. Nach mißglückter Operation ändert die implantierte Gonade im neuen Organismus schon nach 2—3 Tagen in auffälliger Weise ihre Färbung, Größe und Gestalt und degeneriert zu einem harten, kleinen, dunklen Gebilde. Die Transplantation an und für sich übt also, sofern sie gelungen ist, nicht nur keinen Einfluß auf die Entwicklungsfähigkeit der Geschlechtsdrüsen aus, sondern alteriert sogar das Tempo ihrer Entwicklung nicht im mindesten.

Bei Gonadentransplantation unter zwei verschiedenen Geschlechtern implantierte ich die Geschlechtsdrüsen sowohl kastrierten, als

auch normalen Individuen. Die meisten von den operierten Faltern, deren zum Teil kastrierten Raupen nach der fünften Häutung je eine Hode aus gleichaltrigen Raupen implantiert wurde, besaßen eine männliche gut entwickelte Gonade. Diese war in Fettmassen und Tracheen eingebettet und besaß dieselbe Färbung wie die normale Hode des Falters. Im nämlichen Alter operierte Männchen enthielten typisch entwickelte Ovarien, deren Eiröhren bald kaum 3—5 mm (Fig. 5), bald gegen 20 mm lang waren. Die Eierkelche

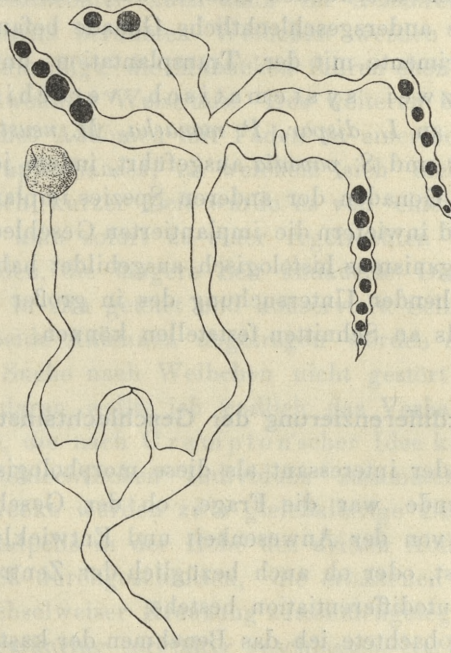


Fig. 6.

dieser Ovarien waren in der Regel gegen die Leibeshöhle blind abgeschlossen, ohne mit dem Vas deferens des Männchens in Verbindung zu treten. Meisenheimer beschrieb einen Fall, wo ein in ein einseitig kastriertes Männchen implantiertes Ovarium zusammen mit der übriggebliebenen Hode in einen Samenleiter einmündete; das Vas deferens wurde somit gewissermaßen in einen Zwitterleiter umgewandelt, während das blindgeschlossene Vas deferens der anderen Seite frei daneben lag. Einen die Beobachtung Meisenheimer's in charakteristischer Weise ergänzenden Fall fand ich bei

einem im Raupenstadium nach der dritten Häutung einseitig kastrierten Männchen, dem an Stelle der entfernten Hode ein Ovarium implantiert wurde. Die implantierte Gonade entwickelte sich zu einem typischen, wenn auch kleinen Eierstock, dessen Eierkelch ganz regelrecht mit dem Vas deferens derjenigen Körpersseite zusammengewachsen war, an der die Raupe kastriert wurde (Fig. 6).

Wie es nicht anders zu erwarten war, wiesen die Falter in keinem einzigen unter den beschriebenen Fällen irgend welche Veränderungen in ihrem sexuellen Habitus auf, trotzdem sich in ihnen eine entwickelte andersgeschlechtliche Gonade befand.

Meine Experimente mit der Transplantation unversehrter Gonaden unter zwei systematisch verschiedenen Formen habe ich an *L. dispar*, *P. monacha*, *M. neustria*, *E. chryso-rhoea*, *P. similis* und *S. pavonia* ausgeführt, indem ich den *Dispar*-Raupe larvale Gonaden der anderen Spezies implantierte und umgekehrt. Ob und inwiefern die implantierten Geschlechtsdrüsen sich im fremden Organismus histologisch ausgebildet haben, werde ich erst nach eingehender Untersuchung des in großer Menge konservierten Materials an Schnitten feststellen können.

Selbstdifferenzierung der Geschlechtsinstinkte.

Nicht minder interessant als diese morphologischen und anatomischen Befunde war die Frage, ob der Geschlechtstrieb der Schmetterlinge von der Anwesenheit und Entwicklung der Gonaden abhängig ist, oder ob auch bezüglich der Zentren des Nervensystems eine Autodifferentiation bestehe.

Zunächst beobachtete ich das Benehmen der kastrierten Schmetterlinge und fand, daß sie in ihrem Geschlechtsleben von normalen Faltern gar nicht zu unterscheiden sind, was übrigens bereits Oudemans an *Dispar*-Kastraten konstatierte. Kastrierte Weibchen kopulieren sowohl mit normalen als auch mit kastrierten Männchen; außerdem reiben sie von ihrem Abdomen die Wolle ab und verfertigen die üblichen Schwämmchen, selbstverständlich ohne Eier. Auch operierte Männchen verbinden sich ebenso gern mit normalen, wie mit kastrierten Weibchen. Der Geschlechtsinstinkt verändert sich aber auch bei Faltern mit implantierten andersgeschlechtlichen Gonaden in keiner Weise, selbst dann nicht, wenn den Raupen das Blut oder das Keimplasma aus Raupen des anderen Ge-

schlechtes, ja einer anderen Spezies implantiert werden. Diese Beobachtungen veranlaßten mich zu mehreren Experimenten, um eine eventuelle Relation zwischen dem Nerven- und dem Geschlechtssystem näher zu analysieren. Bekanntermaßen sitzen die weiblichen Schwammspinner träge an Baumstämmen, die Männchen dagegen fliegen auch bei Tage lebhaft umher und umwerben stürmisch die gefundenen Weibchen behufs sofortiger Kopula. Zunächst habe ich den lebenden Faltern das Abdomen abgeschnitten und bemerkte, daß beide Geschlechter auch dann ihr Gebahren nicht ändern: die des Abdomens beraubten Weibchen werden dadurch in keiner Weise beunruhigt, die Männchen führen ebenfalls ihren Hochzeitsflug in gewohnter Weise aus. Des weiteren befestigte ich ein großes weibliches Abdomen mit Faden an einer belichteten Seitenwand des Puppenhauses, in welchem sich mehrere Männchen befanden. Nach kurzer Zeit wurde es von einem Männchen erreicht und es kam sofort zu einer regelrechten Verbindung zwischen den beiden, die längere Zeit andauerte. Das seltsame Paar wurde sodann in situ getötet und konserviert. Selbst solche Männchen, denen beide Antennen abgetragen worden sind, werden dadurch in der Suche nach Weibchen nicht gestört und kopulieren. Im Anschluß daran wollte ich endlich das Verhalten von Faltern kennen lernen, die nach Crampton'scher Idee künstlich aus zwei verschiedengeschlechtlichen Individuen zusammengesetzt werden. Zu diesem Zwecke wurden zwei gleichalterige *Dispar*-Puppen mit Hilfe eines Skalpell in der Höhe des dritten Abdominalsegmentes der Quere nach durchgeschnitten, die erhaltenen Hälften wurden sodann in wechselweiser Kreuzung zusammengelegt und die Wunde mit einem Paraffinring sorgfältig geschlossen. Nach 15 Tagen entwickelte sich daraus ein Weibchen mit männlichem Abdomen. Durch entsprechende Reizung konnte ich mich überzeugen, daß in der Innervierung des ganzen Körpers eine lückenlose Einheitlichkeit zustande gekommen ist. Der Falter reagierte nämlich lebhaft, wenn der männliche Hinterleib in verschiedenster Weise gereizt wurde, und am Vorderkörper erfaßt und gereizt, bewegte er das Abdomen in der für normale Spinner charakteristischen Weise. Sich selbst überlassen, saß er nach Weibchenart regungslos da, wurde aber von keinem von den vorbeifliegenden oder vorbeilaufenden Männchen irgendwie beachtet.

Schließlich wollte ich feststellen, ob die Zahl der gelegten Eier

und die Art der Ablegung in irgend welchem Grade durch den Kopulations- und Befruchtungsakt beeinflusst wird. Bei parthenogenetisch eierlegenden Weibchen fand ich, daß die Eierzahl und das Ablegen selbst die gleichen waren, wie bei befruchteten Exemplaren. In beiden Fällen legen die Weibchen entweder alle im Eierstock befindlichen Eier ab, oder es wird nur ein geringer Rest in den Gonaden zurückbehalten. Ebenso pflegt in beiden Fällen von annähernd gleich großen Exemplaren eine gleiche Menge von Eiern, und zwar der weitaus größere Teil, am ersten Tage abgelegt zu werden.

Aus allen diesen Beobachtungen geht hervor, daß erstens der Geschlechtstrieb der Schmetterlinge sich in den Nervenzentren der Kopf- und Thorakalganglien konzentriert und auf die Geschlechtsmerkmale des anderen Geschlechtes gerichtet ist, selbst wenn es sich um Kastrate handelt; zweitens, daß dieser Instinkt durchaus nicht von der Anwesenheit und der Qualität der Gonaden abhängig ist und daß die stattfindende Kopulation niemals irgendwelchen Einfluß, sei es auf den Legetrieb, sei es auf die Eierzahl erkennen läßt.

Ergebnisse und Schlüsse.

Aus den dargestellten Beobachtungen ergibt es sich, daß bei der Entwicklung der Insektenimago, wenigstens bei Schmetterlingen, Selbstdifferenzierung die Hauptrolle spielt, daß aber auch korrelative Abhängigkeiten nicht fehlen.

Die Selbstdifferenzierung bezieht sich in erster Linie auf sämtliche äußere Charaktere der Imago, die sekundären Geschlechtsmerkmale inbegriffen. So hängt die Größe, Zeichnung und Färbung der Flügel und des ganzen Falters in keiner Weise davon ab, ob er normal oder in frühem Raupenstadium kastriert worden ist. Die sekundären Sexualcharaktere werden auch dann weder in ihrer Entwicklung gehemmt noch irgendwie beeinflusst, wenn sich im Organismus fremde, frühzeitig implantierte Gonaden befinden; selbst das Blut andersgeschlechtlicher Individuen oder Injektionen fremder Keimzellsubstanz vermögen daran nichts zu ändern, mag es sich um Individuen derselben Art oder um systematisch ganz verschiedene Organismen handeln.

Auch die Gonaden an sich differenzieren sich unabhängig von der geschlechtlichen Qualität des Nährbodens und der Körperge-

gend, in welchen sie sich entwickeln; phagocytischen Prozessen setzen sie ebenfalls einen siegreichen Widerstand entgegen.

Selbstverständlich ließ sich auch ein gewisser Grad von Korrelation nachweisen, da man hier eigentlich mit der Entwicklung symbiotisch wachsender Organe zu tun hat. Diese Korrelation äußert sich einerseits durch Hypertrophie der Gonade, beziehungsweise ihrer Ausführungswege in einseitig kastrierten Individuen, zweitens kann es zu regenerativen Regulationen kommen. In geschlechtlich intakten Exemplaren wird hingegen die implantierte Geschlechtsanlage schon mechanisch in ihrer Entwicklung behindert und pflegt nur zwerghafte Organe zu liefern. In dieser Hinsicht dürfte also zwischen den Wirbellosen und den Vertebraten kein namhafter Unterschied bestehen.

Wie ließe sich nun der geschilderte Sachverhalt erklären? Die Vermutung Oudemans', die Festigkeit des Geschlechtsdimorphismus könne bei diesen Faltern auf einer zu stark fixierten phylogenetischen Konsolidierung der Formen beruhen, haben wir bereits oben als unbegründet zurückgewiesen, weil gerade die Arten dieser Spinnergruppe eine recht große Amplitude individueller Variation aufweist. Die Lösung des Problems dürfte eher auf dem bereits von Kellogg angedeuteten Wege zu suchen sein. Es darf nicht vergessen werden, daß wir hier mit metabolischen Tieren zu tun haben, dazu mit solchen, bei denen die erworbene Form der Metamorphose ihren Höhepunkt erreicht hat. Beinahe der ganze Körper des Reifestadiums entwickelt sich bei ihnen aus Imaginalscheiben, die in der Larvalperiode in ganz unentwickeltem Zustande verharren. Nur wenige Organe, wie das Nervensystem, das Herz und vor allem anderen die Gonaden persistieren. So ist nicht zu verwundern, wenn der vorerst nur in Form von winzigen Zellgruppen angelegte Organismus weder mit physiochemischen noch morphologischen Qualitäten metamorphischer Stadien zusammenhängt und sich mit ihnen zum Teil wie ein Fremdkörper auf einem Nährboden entwickelt. Es handelt sich hier sozusagen um zwei verschiedene Organismen, die miteinander nicht identisch sind.

Die Richtigkeit dieser Auffassung wird sich allerdings erst nach Durchführung ganz analoger Versuche an Insekten mit sog. unvollkommener, d. h. ursprünglicher Verwandlung feststellen lassen, was den Gegenstand einer weiteren Mitteilung bilden soll.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Prof. Garbowski, der mir nicht nur beim Entwerfen des Planes dieser Untersuchungen und beim Auffinden geeigneter Methoden behilflich war, sondern mich die ganze Zeit auf Schritt und Tritt beraten und geleitet hat, meinen herzlichsten und tiefempfundenen Dank auszusprechen.

(Aus dem zoologischen Laboratorium des Hrn. Prof. Garbowski an der Jagell. Universität zu Krakau).

67. *Studia doświadczalne nad synchronatyzmem Hippolyte varians Leach (wiadomość tymczasowa). — Étude expérimentale du synchronatisme de Hippolyte varians Leach.* Note préliminaire de M. ROMUALD MINKIEWICZ, présentée par M. M. Siedlecki m. c.

I. Avant-propos.

C'est au cours de mes recherches sur l'instinct de déguisement¹⁾ que j'ai été amené à substituer au terme darwiniste de mimétisme le terme objectif de synchronatisme ne contenant aucune tendance explicative. Je me crois donc autorisé à m'en servir dorénavant, d'autant plus que les faits que j'exposerai dans ce qui suit sont, sous ce rapport, des plus concluants.

En commençant mes expériences sur le synchronatisme de *Hippolyte varians*, en été 1906, au laboratoire Lacaze-Duthiers (Roscoff-Finistère), dirigé par M. Yves Délage, j'avais deux questions principales à résoudre:

I-mo, établir l'étendue chromatique des changements possibles de couleur des *Hippolyte* dans les conditions expérimentales de nos aquariums;

II-do, préciser les voies par lesquelles les propriétés chromatiques du milieu ambiant exercent leur

¹⁾ R. Minkiewicz. 1. *Analyse expérimentale de l'instinct de déguisement chez les Brachyures ozyrhynques.* Arch. Zool. Expér. Vol. VII, Nr. 2, 1907.

— 2. *Próba analizy instynktu metodą obiektywną.* „Przegląd Filozof.” (Revue Polonaise de Philosophie), Varsovie, 1907—1908, Vol. X et XI.

influence sur l'organisme des *Hippolyte*, en forçant leurs chromatophores de prendre toutes les fois la couleur du milieu.

Voici l'exposé extrêmement succinct de ce que mes recherches m'ont donné jusqu'à présent, relativement aux deux problèmes posés ci-dessus.

II. L'action du fond blanc et noir.

Ici, je suis heureux de pouvoir confirmer complètement les données de G. Pouchet¹⁾ et de MM. Keeble et Gamble²⁾.

1. Sur le fond blanc toutes les *Hippolyte* (quelle que soit leur couleur initiale) deviennent d'un bleu transparent: les chromatophores (ou plutôt les pigments dans les chromatophores) se rétractent.

2. Le fond noir produit un effet diamétralement opposé: les pigments des chromatophores se dilatent, et la couleur des animaux devient de plus en plus foncée (brune ou brunâtre).

3. La nuit provoque toujours la contraction des pigments et par conséquent une couleur bleue.

Mais je peux ajouter à ces données, bien établies par mes prédécesseurs, quelques faits nouveaux.

4. Les *Hippolyte*, exposées à la lumière diffuse, sur des fonds en verre transparent, et éclairées ainsi aussi bien d'en dessous que d'en dessus, deviennent foncées (brunâtres), tout comme si elles se trouvaient sur un fond noir. Ce qui prouve une fois de plus que le fond n'exerce son influence sur les *Hippolyte* que grâce à ses propriétés lumineuses.

5. Il existe des *Hippolyte* très rebelles aux changements (jusqu'à huit jours et plus). Mais, si elles arrivent à changer de couleur, ce n'est qu'après la mue¹⁾ qu'apparaît ce changement, soit en partie, soit en totalité. Ce qui prouve que la mue n'est point un processus externe, mais un processus qui affecte tous les tissus en augmentant leur plasticité.

6. Une fois changée, la couleur des *Hippolyte*, même chez les plus rebelles, devient plastique et peut être changée avec une rapidité frappante, quelquefois dans une dizaine de minutes.

¹⁾ G. Pouchet. *Les changements de coloration sous l'influence des nerfs*. Journ. Anat. et Physiol. (1876). T. 12.

²⁾ F. Keeble and F. W. Gamble. *The Colour-Physiology of higher Crustacea*. Part. II. Philos. Transact. Vol. 196 (1904).

Le fait me paraît fort intéressant, parce qu'il démontre le rôle que peut avoir l'habitude dans le sens purement physiologique du mot, c'est-à-dire „l'emploi ou le défaut d'emploi“ d'un organe (comme le disait Lamarck), dans la formation des variétés stables d'un animal, primitivement polychrome.

Ainsi, les idées de Lamarck, plus d'une fois tournées en dérision, reprendraient la place qui leur est due.

III. Les fonds colorés.

Toutes nos connaissances à ce sujet se bornaient jusqu'à présent aux belles expériences de MM. Keeble et Gamble²⁾ et à celles de M. Hornell³⁾ (plus anciennes et probablement inconnues à MM. Keeble et Gamble) dans lesquelles les auteurs anglais arrivent à changer réciproquement les couleurs verte, rouge et brune, sur des algues de couleur correspondante.

Cependant, la question étant d'une importance capitale, il faudrait élargir le champ d'expériences et les effectuer dans de meilleures conditions.

Dans mes nombreuses expériences de 1906—1907, je me suis servi de petits aquariums (à courant continu) en verre transparent, éclairés également par la lumière diffuse, et dont je couvrais le fond et les parois — jusqu'à une certaine hauteur — avec du papier fort de couleur voulue. En voici les principaux résultats.

1. J'ai obtenu des nombreuses *Hippolyte* de couleur suivante:

A. Couleurs simples, c'est-à-dire où les pigments correspondants sont seuls dilatés:

a) rouge: foncée et claire,

b) jaune: foncée, claire et blanchâtre,

c) bleue et bleuâtre (transparente).

B. Couleurs composées:

d) orange (pigment jaune + p. rouge),

e) verte: citron et olive (p. jaune + p. bleu en mélanges différents),

f) violette: foncée et lilas (pigm. rouge + p. bleu),

¹⁾ La mue des *Hippolyte*, comme c'est le cas chez d'autres Crustacés, s'effectue habituellement pendant la nuit.

²⁾ *Op. et loc. cit.* Part III. Vol. 198 (1905).

³⁾ James Hornell. *Note on the protective devices of the Genus Hippolyte.* Journ. Marin. Zool. Vol. II. Nr. 6 (1897).

sans compter les couleurs habituelles: verte, brune et brunâtre (les deux dernières sont composées de mélanges des pigments rouge + jaune + bleu).

Ainsi, j'ai obtenu toutes les couleurs fondamentales du spectre solaire avec des nombreuses nuances, correspondant toujours à la couleur du papier employé. Ce qui est frappant dans les résultats ci-dessus, ce sont les couleurs vives jaune, bleue et violette qu'on ne rencontre pas dans le milieu naturel des *Hippolyte*, habitant les herbiers et les algues. Il résulterait de ce fait que l'étendue de la plasticité synchronomatique des *Hippolyte* n'est point due à la sélection naturelle, qu'elle est plutôt d'origine primaire et dépend directement des agents chromatiques du milieu.

Un autre fait qui saute aux yeux, c'est que le fond bleu et le fond blanc ont la même influence, c'est-à-dire qu'ils provoquent tous les deux la contraction complète des pigments figurés des chromatophores et amènent la coloration bleue de l'animal.

2. Les changements de couleur se produisent non seulement chez les *Hippolyte* jeunes, mais aussi chez les adultes, même chez celles de grande taille (jusqu'à 20 mm dans mes expériences).

3. Toute variété chromatique, naturelle ou obtenue expérimentalement, peut être changée en n'importe quelle autre.

4. L'intensité de l'éclairage coloré joue un rôle beaucoup moins important que sa qualité chromatique; c'est ce qu'on peut conclure du moins d'après les expériences de 1906 où j'ai obtenu les mêmes colorations des *Hippolyte* avec des intensités variées de l'éclairage, dans des petits cristallisoirs enveloppés de fins papiers de couleur. Cette méthode est bien un peu trop primitive, mais elle était la seule dont j'ai pu me servir.

5. L'animal, d'habitude, ne change pas de couleur d'emblée. Sa coloration passe par des stades successifs de nuances, stades qui sont constants pour chaque couleur initiale et définitive, étant déterminés par le jeu des trois pigments sous l'influence du milieu chromatique.

6. Le changement ne se produit pas non plus simultanément dans toutes les parties de l'organisme. Ce sont les parties périphériques des lames des antennes et des lames du telson, ainsi que les pédoncules oculaires, qui synchronatisent habituellement les premiers. L'abdomen est au contraire le plus rebelle et résonne le plus tard.

7. Après un long séjour dans les aquariums bleus, les *Hippolyte* perdent leur pigment bleu et deviennent incolores et transparentes. (Le même fait, à ce qu'il me semble, se produit dans les aquariums blancs). Est-ce l'épuisement de la fonction productrice des chromatophores? ou la destruction lente du pigment diffus par la lumière du jour?

IV. Explication provisoire des phénomènes synchronomatiques.

En présence des faits exposés plus haut et réunis dans le tableau ci-joint, la première idée qui vient à l'esprit est que les milieux chromatiques exercent leur influence sur les chromatophores des *Hippolyte* par voie directe.

TABLEAU
démontrant l'action des agents lumineux sur les chromatophores des *Hippolyte varians* Leach.

Chromatophores	jour	d i f f u s							nuit	éclairage fond	agents lumi- neux
	nul	noir	rouge	jaune	violet	vert	bleu	blanc			
pigment rouge	+	+	+		+						
pigment jaune	+	+		+		+					
pigment bleu					+	+	+	+	+		

Mes recherches sur le chromotropisme¹⁾ des animaux les plus disparates (antédon, nemèrtes, hirudinées, daphnies, crabes, pagures, larves des décapodes et des poissons etc.), dont je n'ai publié jusqu'à présent qu'une partie, m'ayant montré la généralité et l'importance des phénomènes chromotropiques, j'étais disposé à considérer les contractions et les dilatations toujours synchronomatiques des pigments des *Hippolyte* comme résultat, elles aussi, de leur réaction chromotrope vis-à-vis des radiations lumineuses.

¹⁾ Découvert, comme phénomène indépendant, au cours de mes recherches sur les *Nemèrtes*. Voir mes notes dans les *C. R. Ac. Sc. Paris*. Novembre et Décembre 1906.

Il n'était pas trop difficile de trouver une explication de ce synchromatisme chromotropique. Il faudrait seulement admettre que le premier moment de l'action de toute (ou presque toute) radiation chromatique sur chaque pigment reste toujours le même: c'est une tendance initiale des pigments à se dilater. Quelque chose de semblable à la „sensibilité lumineuse brute“ dont l'existence dans la rétine humaine est prouvée par les belles expériences de M. Aug. Charpentier.

Ainsi, l'absence de toute action lumineuse correspond à l'état de repos, c'est-à-dire à la contraction complète des pigments vers le centre des chromatophores. Comme, par exemple, la contraction des pseudopodes d'une amibe ou d'un rhizopode est également son état de repos.

Prenons pour exemple l'action du milieu rouge. La tendance primitive de tous les pigments est à s'élargir. Mais en même temps, le pigment bleu est détruit par les radiations rouges qu'il absorbe; le pigment jaune, pénétré aussi par la lumière rouge, est excité et doit se contracter. Or, c'est le rouge seul qui persiste dans ce stade primitif, provoqué par la sensibilité lumineuse brute, car, en réfléchissant les radiations rouges du milieu, il n'éprouve aucune excitation de la part de ces radiations. Cependant, sa tendance à se dilater, une fois provoquée, persiste, et le pigment s'étale de plus en plus et coule. comme un rhizopode, par les canaux ramifiés des chromatophores complexes de *Hippolyte*.

Il en est de même pour le pigment jaune dans le milieu jaune.

Quant au pigment bleu, non figuré et diffus, j'ai certaines raisons pour le considérer comme un pigment d'origine primaire (= „lipochromogen“ d'après Krukenberg et Newbigin¹⁾) se formant, à l'état normal, incessamment dans le plasma des chromatophores. La lumière du jour et, spécialement, les rayons absorbés par ce pigment (rouges, jaunes) le détruisent. Les rayons verts (et bleus) sont les seuls qui ne le détruisent point; peut-être même les verts facilitent-ils sa formation.

La lumière du jour (et le fond noir) déterminent une coloration brune ou brunâtre; les pigments rouge et jaune ne manifestent alors

¹⁾ M. I. Newbigin. *Colour in Nature. A Study in Biology*. London, 1898 pp. 124-129.

que leur phototropisme („sensibilité lumineuse brute“), tandis que le pigment bleu est détruit.

Cette explication, par le phototropisme d'une part et le photochimisme de l'autre, étant fort attrayante, il ne lui manquait qu'une confirmation expérimentale décisive. Celle-ci consisterait à démontrer que tous les phénomènes synchromatiques persistent après l'ablation des yeux.

Or, voici ce que nous apprennent les expériences à ce sujet.

V. Le rôle des yeux.

A. L'ablation d'un oeil.

1. L'opération en question n'influence point la fonction des chromatophores chez *Hippolyte* (fait bien démontré d'ailleurs par G. Pouchet chez d'autres crevettes), et les animaux synchromatisent d'une façon tout à fait normale.

2. L'ablation d'un oeil ne paraît pas provoquer une différence appréciable dans la coloration des deux côtés (normal et opéré).

B. L'ablation totale des yeux.

3. L'opération est tellement grave pour les animaux en question qu'ils périssent inévitablement, si on les prive des deux yeux à la fois. Il faut enlever chaque oeil séparément, et le temps écoulé entre les deux opérations ne peut être inférieur à deux jours, comme il résulte nettement de mes nombreuses expériences de 1907.

Les animaux ainsi aveuglés perdent leurs facultés synchromatiques, bien que les chromatophores restent actifs. (Le même résultat a été obtenu par G. Pouchet et MM. Keeble et Gamble).

4. Les pigments ne se dilatent nullement après l'opération, en dépit de ce qu'affirment Pouchet et MM. Keeble et Gamble. Néanmoins, ils ne restent pas *in statu quo ante*. Il se produit, au contraire, dans leur constitution des changements importants. Il est étonnant que ces faits n'aient pas été observés par les auteurs précités. Ces changements consistent dans une diminution croissante du pigment bleu et sa disparition finale, ce qui amène des changements des couleurs composées (telles que le vert et le violet) dont le pigment bleu forme une des parties constituantes. Si l'on n'analyse pas ce phénomène, on a l'impression

que les pigments jaune et rouge (ou l'un d'eux) se sont dilatés, ce qui a dû induire en erreur Pouchet et MM. Keeble et Gamble. Non seulement ces pigments ne se dilatent jamais (sur aucun fond), mais quelquefois, avec le temps, ils peuvent se contracter, au moins le pigment rouge.

5. La disparition du pigment bleu peut amener un synchronisme accidentel, si les *Hippolyte* séjournent, par hasard, sur le fond ayant la couleur du pigment qui reste intact, ce qui m'est arrivé à plusieurs reprises. Mais ce n'est qu'une coïncidence, et les expériences de contrôle le démontrent nettement: une fois le pigment bleu disparu, les *Hippolyte* transférées dans un milieu d'une couleur quelconque ne synchronisent plus.

6. La nuit provoque constamment chez les *Hippolyte* aveuglées, comme chez les normales, la contraction des pigments figurés et la production du pigment bleu. J'ai pu observer ce phénomène même un mois après l'opération.

VI. Conclusions.

1. En dépit de ce que j'attendais, les expériences ont montré que le synchronisme des *Hippolyte* n'est pas direct: il est avant tout oculaire (resp. rétinien) et réflexe, passant à travers tout le système nerveux, central et périphérique, à partir des récepteurs rétiniens jusqu'aux terminaisons chromatophoriques.

2. Néanmoins, l'influence directe des agents du milieu n'est pas nulle.

Premièrement: la coloration nocturne se produisant chez les animaux aveuglés d'une manière toute normale, il est évident que la disparition du pigment bleu est due non pas à l'ablation des yeux, mais à l'action directe de la lumière incidente du jour, détruisant ce pigment (et peut-être même inhibant sa production).

Deuxièmement: les pigments figurés conservent leur sensibilité phototropique („brute“) dans les parties détachées du corps, comme l'ont montré déjà MM. Keeble et Gamble.

3. Nous sommes donc forcés de conclure que les deux voies, oculaire et directe, collaborent dans le déterminisme normal de ce synchronisme polychrome, chacune ayant son champ d'action spécifique.

En ce qui concerne l'essence du synchronisme, c'est-à-dire les mouvements des pigments granulés (et l'action des fonds colo-

rés), la voie directe ne reste peut-être pas inactive, bien que son rôle soit de beaucoup inférieur et qu'elle ne garde qu'une fonction de contrôle.

4. Comme chez les *Hippolyte* non opérées les pigments arrivent à prendre chaque fois une position déterminant le synchronisme parfait de l'animal, et comme ce synchronisme s'effectue par la voie rétinéo-neurale, il est évident que l'excitation communiquée aux chromatophores par l'intermédiaire des nerfs est en rapport étroit avec les propriétés chromatiques du milieu. Autrement, l'animal n'arriverait jamais à synchroniser d'une manière aussi parfaite.

Il est donc évident que le système nerveux conduit aussi bien les différences soi-disant „qualitatives“ des agents excitants (c'est-à-dire les différences de longueur d'onde) que les différences soi-disant „quantitatives“ (= différences d'amplitude d'onde), conclusion à laquelle j'ai déjà été amené par mes recherches sur le déguisement des *Maja*¹⁾ et qui me paraît avoir une grande importance bio- et physiologique.

Il semble, d'ailleurs, que la longueur d'onde d'une radiation est tout aussi bien une quantité que l'amplitude de l'onde.

VII. Généralités sur la »ressemblance protectrice« des animaux.

(»Cryptic colours« de Poulton).

1. Si nous rapprochons maintenant les faits de synchronisme histologique des *Hippolyte* et les faits de synchronisme instinctif (ou accidentel) des *Maja*, nous verrons que la nature des deux phénomènes est identique, et qu'elle consiste en une résonance chromocinétique en réponse aux agents lumineux du milieu.

Par l'intermédiaire de la voie rétinéo-neurale, cette résonance se manifeste chez les *Hippolyte* par les phénomènes cinétiques des chromatophores; tandis que chez les *Maja* elle se traduit par les phénomènes chromocinétiques de l'animal tout entier, c'est-à-dire par les mouvements chromatropes qui déterminent le déguisement synchronomatique.

2. Le synchronisme histologique apparaît quelque-

¹⁾ R. Minkiewicz. *Próba analizy instynktu metodą obiektywną*. Partie troisième. Revue de Philosophie Polonaise. T. XI, Nr. 1—2, Varsovie (1908).

fois sous une autre forme chez les animaux dont les changements de couleur ne sont pas dûs aux mouvements des pigments des chromatophores mais aux changements photochimiques des tissus pigmentés. Telles sont les larves et les Chrysalides des Lépidoptères et d'autres insectes, d'après les belles expériences de M. E. B. Poulton (1887—1892—1899—1903).

Il paraît probable, d'après ces expériences, que les changements chromochimiques de l'épiderme des larves-chrysalides ne sont pas non plus directs (s'il est vrai que leur peau résonne tout entière d'une manière continue, bien qu'on applique des agents chromatiques différents sur les deux moitiés de l'animal).

Il est donc probable qu'ici encore l'intermédiaire de la conductibilité nerveuse (le réseau périphérique) est nécessaire afin que le synchronisme puisse se réaliser. Seulement, ce ne sont plus les éléments rétiniens qui servent ici de récipients des influences chromatiques du milieu, mais la peau elle-même avec ses terminaisons nerveuses, ainsi que le démontrent les expériences de M. Poulton sur les larves aveuglées.

3. La résonance chromocinétique se rencontre chez beaucoup d'autres groupes d'animaux: reptiles, amphibiens, poissons, céphalopodes etc.

Sa forme plus ou moins développée, plus ou moins restreinte, ne dépend que de la plasticité chromocinétique des éléments périphériques, le système nerveux, à mon avis, ayant dans tout le règne animal les mêmes propriétés fondamentales. Ainsi on pourrait peut être trouver enfin l'explication causale des couleurs synchrones des cocons d'araignées et des oeufs d'oiseaux, leurs colorants recevant, au moment de leur développement dans les voies génitales¹⁾ de l'animal, l'influence des agents chromatiques du milieu dans lequel la femelle se prépare à la ponte.

Cette influence par voie rétino-neurale n'est pas ici plus difficile à comprendre que dans le cas de mes *Hippolyte*, ou surtout dans le cas des chenilles (de M. Poulton) qui, en recevant les influences du milieu, ne changent pas elles-mêmes de couleur, mais

¹⁾ Quelle que soit, d'ailleurs, la partie chromogène: aussi bien l'oviducte et l'utérus, comme le croient MM. Carus, Leuckart, Coste, Sorby, que l'ovaire comme le croit M. Wickmann (H. Wickmann. *Die Entstehung der Färbung der Vogeleier*, 1893).

élaborent les couleurs synchrones des chrysalides qu'elles préparent par leur métamorphose. Il n'est point impossible de soumettre cette opinion à une épreuve expérimentale. Il faudrait simplement faire pondre des araignées et des oiseaux dans des milieux différents d'éclairage, de couleur, de disposition des taches etc. Evidemment, les animaux dont les oeufs (ou cocons) varient à l'état naturel sont de beaucoup préférables, étant donnée la plasticité des substances colorantes, élaborées dans leur appareil génital. Tel est, par exemple, *Cisticola schoenicola*, ou peut-être même notre canard domestique etc. — parmi les oiseaux; *Lycosidae* — parmi les araignées.

4. Les faits que je viens d'exposer, surtout ceux où la couleur n'a aucune valeur protectrice, comme c'est le cas de la coloration nocturne (fait naturel) des *Hippolyte* ou de leur coloration foncée à l'éclairage diffus (fait expérimental), ou bien ceux de l'obtention expérimentale des couleurs vives (jaune, violet), n'existant point dans le milieu naturel des *Hippolyte* qui habitent les herbiers (zostères etc.); les mouvements des pigments dans les chromatophores des parties invisibles (intestins, péritoine etc.) des divers animaux, tels que amphibiens, reptiles etc., fait bien connu depuis longtemps; les expériences remarquables de M. W. Flemming (1882, 1896—7), sur l'action destructive du fond blanc sur les pigments des larves des Salamandres et celles de I. T. Cunningham (1891, 93, 95) sur l'action chromogène de la lumière du jour sur les poissons dissymétriques (Pleuronectides, Soles) etc. etc.; enfin, les expériences bien connues de MM. Poulton, Standfuss, Fischer, Merrifield, Marie v. Linden etc. sur les divers groupes d'insectes; tous ces faits démontrent suffisamment:

1) premièrement, que la plasticité¹⁾ chromatique des animaux est d'origine primaire et non acquise par voie de sélection;

2) deuxièmement, que la „coloration protectrice“ (resp. synchrone) des animaux s'est développée sous l'influence directe des agents lumineux du milieu, en d'autres termes par adaptation chromatique directe („directe Anpassung“), si l'on veut employer cette expression pas précisément fortunée;

¹⁾ Cette plasticité chromatique est comparable, d'ailleurs, à celle de certaines substances chimiques, celles dont on se sert pour la photographie en couleurs ou celles dont s'est servi M. Carey Lea dans ses célèbres expériences de 1887.

troisièmement, que les couleurs animales, en général se sont développées sous l'influence directe des divers agents externes (lumière, chaleur etc.) et de l'emploi continu ou du défaut d'emploi de certains éléments de la plasticité chromatique initiale, emploi déterminé par ces agents.

Paris, en Octobre 1908.

68. *Studia nad Azotobakterem. — Untersuchungen über Azotobacter chroococcum Beij.* Mémoire de M. **SEVERIN KRZEMIENIEWSKI**, présenté par M. E. Godlewski m. t. dans la séance du 6. Juillet 1908.

(Planche XXXI).

I. Die Ansichten über die Stickstoffassimilation durch Azotobacter chroococcum.

Es sind kaum sieben Jahre her, seit Beijerinck das Azotobacter chroococcum (1) isoliert und dessen Bedeutung für die Bindung des freien Stickstoffs dargetan hat, und schon ist die diesen Organismus betreffende Literatur derart angewachsen, daß bereits gegenwärtig eine Zusammenstellung (2) derselben mit Genugtuung zu begrüßen ist.

Bekanntlich haben Beijerinck und van Delden (3) aus ihren Forschungen den Schluß gezogen, daß der Azotobakter nicht an und für sich, sondern erst gemeinsam mit anderen Bakterien imstande ist, den freien Luftstickstoff zu verwerten. Indessen haben Gerlach und Vogel (4) gefunden, daß der Azotobakter allein, ohne Zuhilfenahme irgend welcher anderen Organismen den Stickstoff binden kann.

Diesen Widerspruch der Resultate versuchte man auf verschiedene Art zu deuten. Löhnis (5) war geneigt, die Ursache der negativen Versuchsergebnisse Beijerincks und van Deldens in dem Alter der Azotobakterkulturen zu suchen. Doch sowohl er selbst (6), wie auch später N. K. Pillai (7) fanden gleichfalls nur sehr geringe Zunahmen von Stickstoff in den Reinkulturen des Azotobacters, während diese Zunahme in den Rohkulturen verhältnismäßig bedeutend war. Denn was hat schließlich eine Zunahme

von 1.68 *mg* Stickstoff, die man im Laufe von 3 Wochen in Reinkulturen erreicht, zu bedeuten gegenüber der Zunahme, die bis zu 10 *mg* in derselben Menge von Nährlösung steigt und welche dieselben Autoren bereits nach 10 Tagen in Rohkulturen feststellen konnten?

Ebenso fand z. B. Freudenreich (8) in Reinkulturen von Azotobakter in 250 *ccm* Nährlösung, welche 2% Mannit enthielt, nach Verlauf von 9 Wochen Stickstoffgewinne von 2.9 *mg*, in Rohkulturen dagegen bis zu 20 *mg*. Bessere Resultate erzielte derselbe Autor, indem er den Azotobakter auf Gipsplatten, die mit Glukose-lösung befeuchtet wurden, züchtete. In der Zeit von 6 bis 31 Tagen betragen die Stickstoffgewinne auf 0.5 *g* Glukose von 3 bis 5.8 *mg*. R. Thiele (9) beobachtete im Verlauf von 125 Tagen sogar bei Durchleitung von Luft über die Kulturen auf 1 *g* Mannit höchstens 4.7 *mg*, auf 1 *g* Glukose — 4.4 *mg* Stickstoffzunahme. J. Stoklasa (10) erhielt auf 1 *g* Mannit 3.7—6.23 *mg*, auf 1 *g* Glukose 4.45—10.5 *mg* Stickstoffgewinn. Die relativ größten Stickstoffzunahmen verzeichnen A. Koch (11) und H. Fischer; sie erhielten sie bei Züchtung des Azotobaktters auf Agar-Agar- oder Gipsplatten. Die auf ein Liter Nährlösung berechneten Zunahmen betragen 180 *mg* Stickstoff. Zur Vervollständigung des Bildes will ich noch die von Krainsky (13) und Heinze (17) angegebenen Ziffern anführen und alle Angaben zur besseren Übersicht in einer Tabelle zusammenstellen.

TABELLE I.

Stickstoffgewinne (in *mg*) in den Reinkulturen von Azotobakter pro 1 *g* Kohlenstoffquelle in der Nährlösung

	mit Glukose	mit Mannit
Beijerinck u. van Delden	0	0
Gerlach und Vogel . . .	5.77—10.66	—
Löhnis	1.68	—
Pillai	0.47—1.89	—
Freudenreich	12.6 (?)	1.02
Thiele	2.29—4.4	1.86—4.9
Stoklasa	4.45—10.5	3.7—6.23
Heinze	2.3—3.3	—
Krainsky	1.35	5.7

Stimmen somit alle Forscher darin überein, daß die Stickstoffgewinne in Rohkulturen sehr beträchtlich sein können, so sind, wie wir aus obiger Darstellung sehen, die Unterschiede bezüglich der Reinkulturen direkt auffallend. Beijerinck und van Delden, Löhnis und Pillai sowie Krainsky beobachten in Glukosekulturen sehr geringe Zunahmen, während Freudenreich eben dasselbe für Mannit findet. Die neueren Untersuchungen scheinen darauf hinzuweisen, daß die Unterschiede in den Resultaten der Versuche mit Reinkulturen auf der Existenz von verschiedenen physiologischen Rassen des Azotobacters beruhen. So hat Lipman (14) 4 Formen von Azotobakter isoliert, von denen die eine (*Az. Woodstownii*) ähnlich wie der von Chester (15) isolierte Azotobakter überhaupt keinen Stickstoff bindet, während die drei übrigen in dieser Hinsicht bedeutende Unterschiede aufweisen. Dieselben Beobachtungen haben E. Freudenreich (8) und Ashby (16) gemacht. Doch auch die Annahme der Existenz solcher Rassen erklärt uns immer noch nicht, warum die Stickstoffzunahmen in Rohkulturen größer sind als in Reinkulturen. Am einfachsten wäre es, irgend einen Einfluß auf die Stickstoffbindung seitens anderer mitbeteiligter Organismen anzunehmen. Eben in dieser Voraussetzung schreibt Beijerinck diesen anderen Organismen die Fähigkeit der Bindung des freien Stickstoffs zu, welcher, durch diese Organismen in gebundener Form nach außen abgeschieden, erst vom Azotobakter absorbiert würde. Heinze (17) dagegen ist der Ansicht, daß die anderen Organismen die Kohlenstoffquellen des Azotobacters bereichern, indem sie die bei der Impfung von Rohkulturen mit Erde vermengten Humussubstanzen in solche organische Verbindungen umsetzen, die für die Ernährung des Azotobacters von Nutzen sind. Diese Vermutung steht jedoch im Widerspruch mit der von demselben Autor gemachten Beobachtung, nach welcher der Azotobakter zu seiner Ernährung die Humusstoffe angeblich direkt verwendet; er soll nämlich in einer 1% Lösung von Humussäuren mit einer minimalen Zugabe (0.02—0.1%) von Glukose vorzüglich gedeihen (18).

Alle diese Erklärungen für die Art und Weise, wie die fremden Organismen die Bindungsfähigkeit der Rohkulturen für Stickstoff erhöhen, sind indessen insofern nicht stichhaltig, als die Tatsache selbst, daß gerade sie diese Erhöhung verursachen, durchaus noch nicht erwiesen ist. So hat Löhnis (5) in gemeinsamen Kul-

turen des Azotobaktters mit anderen aus Rohkulturen isolierten Organismen durchaus keine größeren Stickstoffzunahmen feststellen können, obgleich er dem ersteren sowohl wie auch den letzteren die Fähigkeit der Stickstoffbindung zuschreibt. Gerlach und Vogel (4) konstatieren dagegen direkt einen negativen Einfluß anderer Organismen auf die Bindung des Stickstoffs seitens des Azotobaktters. Lipman endlich steht mit seiner Ansicht gewissermaßen in der Mitte, indem er darlegt, daß für die einen Formen des Azotobaktters die Gegenwart anderer Organismen nützlich ist, für andere dagegen nicht.

Mit einem Worte: wir stehen vor einer ganzen Reihe einander widersprechender Behauptungen und Ansichten, und darum erheischt vor allem die Frage, warum die Rohkulturen von Azotobakter größere Stickstoffzunahmen aufweisen als Reinkulturen, eine nähere Untersuchung.

Als wir an die Untersuchungen, die diese Frage klarstellen sollten, herantraten, besaßen wir bereits aus eignen Beobachtungen genug Beweise dafür, daß die Bindung von Stickstoff in Reinkulturen des Azotobaktters im Verhältnis zu der in Rohkulturen beobachteten verschwindend klein ist. Um gleichzeitig eine Erklärung für die krassen Meinungsdivergenzen in bezug auf die chemischen Prozesse, die sich bei der Bindung des Stickstoffs durch den Azotobakter abspielen, zu finden, haben wir in unseren Versuchen, welche die Lösung des ersten Problems bezweckten, stets auf den Stoffwechsel bei der Ernährung des Azotobaktters unser Augenmerk gerichtet.

II. Die Isolierung des Azotobaktters und seine Morphologie.

Um eine Reinkultur des Azotobaktters zu erhalten, wurde eine mit gewöhnlichem Leitungswasser hergestellte Mannitnährlösung ohne jeglichen Zusatz von Stickstoffverbindungen mit Erde vom Versuchsfeld infiziert. Bei der Überimpfung der Haut auf Agarplatten zogen stets einige besondere Typen von Kolonien die Aufmerksamkeit auf sich. Die einen von ihnen waren mattweiß mit regelmäßigen Konturen und gingen bald in halbflüssigen Zustand über; es waren dies Azotobakterkolonien. Neben diesen konnte man stets stark wachsende, sphärisch-konvexe, fast wie Wassertropfen durchsichtige Kolonien beobachten; ferner bemerkte

man Kolonien, die sich in Gestalt einer unregelmäßig geränderten, durchsichtigen Decke auf der Oberfläche des Agars nur langsam entwickelten und im durchfallenden Licht hellbraun, im schräg einfallenden schön irisierend erschienen. Oft zeigten sich noch außer diesen sehr schnell wachsende Kolonien von mattglänzender, charakteristisch gekräuselter Oberfläche, härter als die übrigen, ungefähr von Käsekonsistenz. Beim Vergleich unserer Wahrnehmungen mit den Beschreibungen Beijerincks und anderer sind wir geneigt, die durchsichtigen Kolonien als Bakterien vom Radiobaktertypus anzusprechen, obgleich sie sich von *Radiobacter inuline*, welcher uns auf Ersuchen Prof. Godlewskis zusammen mit einer Azotobakterkultur Prof. Beijerinck gütigst übersandt worden ist, ein wenig unterscheiden. Diese in Gestalt von winzigen Stäbchen auftretenden Bakterien bilden, durch Strichimpfung auf Agar-Mannitplatten ohne Stickstoffzugabe übertragen, längs des Striches farblose, durchsichtige und hochehabene Verdickungen. Auf Agar Glukose nehmen sie alsbald die ganze Agar-Oberfläche ein, fließen von derselben herab und bilden im Kondensationswasser einen weißen Niederschlag. Gelatine wird von ihnen nicht verflüssigt. Wird eine Kultur auf Gelatine mit Mannit, jedoch ohne Stickstoffzugabe übergeimpft, so ergibt sie auf der Oberfläche ihres Nährbodens eine Kolonie von glänzender Oberfläche, einem Stearintropfen ähnlich; ebenso verhält es sich mit Bouillongelatine. In Nährflüssigkeiten gedeihen sie am kräftigsten in Gegenwart von Glukose oder Rohrzucker und bei Zugabe von Pepton oder Fleischextrakt. (Nr. I u. Ia A. Meyer: Praktikum der botanischen Bakterienkunde, S. 24) Sie bilden in diesem Falle an den Wänden des Gefäßes einen breiten, weißen Ring, sowie am Boden desselben einen reichlichen, weißlichen Satz. Rohrzucker, Glukose, Dextrin, Glycerin und Mannit wird von ihnen in eine dickliche Gallertmasse verwandelt, dagegen wird Fruktose nicht angegriffen.

Die irisierenden Kolonien werden von bedeutend kleineren als die eben besprochenen Bakterien gebildet, die sich auf Agar-Agar ohne Stickstoffzugabe, wie gesagt, nur sehr langsam in Gestalt einer äußerst dünnen Haut von unregelmäßigen Umrissen auf ihrem Nährboden entwickeln. Auf Agar mit Pepton und Mannit wachsen sie sehr intensiv, und zwar in Form von glänzend-gelben, flachen Kolonien, das stärkste Wachstum weisen sie aber auf Agar mit Pepton und Glukose auf. Gelatine wird von ihnen sehr schnell ver-

flüssigt. Was flüssige Nährböden anbelangt, so entwickeln sie sich am besten in Meyers Nährlösungen Nr. I, Ia, III und X. Diese Bakterien, die sich erst in Stickstoff enthaltenden Nährlösungen voll entwickeln, würden kein besonderes Interesse beanspruchen können, falls nicht die Tatsache vorläge, daß man sie in dem oben erwähnten letzten Typus von Kolonien, nämlich in dem mit gekräuselter Oberfläche, gleichzeitig mit unserem Azotobakter gefunden hätte. Diese gekräuselten Kolonien bestehen nämlich stets aus Azotobakter und den in Rede stehenden irisierenden Bakterien. Es ist gelungen, diese symbiotische Genossenschaft zu trennen und sie dann künstlich wieder zu vereinigen, wobei man den Eindruck davontrug, als ob der Azotobakter durch die Gegenwart der irisierenden Bakterien zu intensiverer Entwicklung angespornt würde. Fig. 1 der beigefügten Tafel zeigt in natürl. Größe die auf einer Agarplatte sich entwickelnden ursprünglichen Kolonien dieser Typen. In Fig. 2 sehen wir die künstlichen Kolonien. Davon stellen die zwei glänzenden, einander gegenüberliegenden, mit deutlich konzentrischen Schichten und mit Radien versehenen Kolonien — Azotobakterkolonien dar; neben ihnen zeigen sich — kaum sichtbar — die unregelmäßigen Konturen der irisierenden Bakterien, und schließlich sehen wir noch zwei gekräuselte Kolonien, die aus der gleichzeitigen Impfung von Azotobakter und von irisierenden Bakterien resultieren. Man kann stets ruhig behaupten, daß man in jedem Falle, wo man auf den Platten die charakteristischen, grobgekräuselten Kolonien vorfindet, auch auf die Anwesenheit des Azotobakters mit Sicherheit schließen kann. Indes bietet seine Isolierung, seine Trennung von den obengenannten Bakterien ganz bedeutende Schwierigkeiten. Je nach der Beschaffenheit des Erdbodens, den man zur Infizierung der Mannitnährlösung verwendet, ist die Züchtung von Reinkulturen des Azotobakters leichter oder schwerer. So war es z. B. schwerer, den Azotobakter aus einer ungekalkten Parzelle des Versuchsfeldes zu isolieren, weil eben neben ihm auf den Platten stets irisierende Bakterien auftraten. Entnahm man jedoch die Erde der benachbarten, gekalkten Parzelle, so genügten schon 3—4 Überimpfungen, um eine Reinkultur von Azotobakter zu erhalten. Auch in der einschlägigen Literatur finden wir Bemerkungen über die Schwierigkeiten, auf die man bei der Isolierung des Azotobakters gestoßen ist. „*Bacillus molestus*“ nennt z. B. Thiele (9) bezeichnenderweise

ein Bakterium, von dem es ihm **fast** niemals gelungen ist, seine Azotobakterkulturen frei zu erhalten. Ebenso hatte auch Pillai (7) seine Not mit der anfänglichen Beseitigung eines Bakteriums, das er für eine Zwischenform von *Bact. Pneumoniae* und *Aërogenes* ansieht. In Ermangelung genauerer Beschreibungen fällt es schwer, das von uns erhaltene mit dem einen oder dem anderen der erwähnten Bakterien zu indentifizieren. Eins muß jedoch hervorgehoben werden, daß nämlich Thieles Vermutung, Beijerinck hätte infolge der Schwierigkeiten bei der Isolierung des Azotobakters Versuche mit Reinkulturen unterlassen, mir doch ein wenig gewagt vorkommt, zumal die Kultur, die wir von Prof. Beijerinck erhalten haben, sich als vollständig rein erwiesen hat.

Die Azotobakterkolonien auf Agar ohne Stickstoff, die anfangs ziemlich konsistent sind, werden alsbald halbfüssig und fließen in diesem Zustande bei einer Neigung der Platte von derselben herab. Das Zentrum der Kolonie beginnt sich schnell zu trüben. Von ihm aus gehen nach der Peripherie trübe Strahlen und um dasselbe herum bilden sich konzentrische Ringe. Schließlich nehmen sie eine braune Färbung an, und zwar geschieht es rascher bei Gegenwart von Glukose als von Mannit, wie es bereits Beijerinck (1) beobachtet hat. Wir könnten hinzufügen, daß das Braunwerden der Kolonie auf den Platten desto eher eintritt, je dünner die Agarschicht ist. Ist die Mitte der Platte etwas erhaben, so zeigt sich die Bräunung am ehesten in der Mitte. Überdies scheint der Eintritt der Bräunung auch von dem Alter der Kultur abzuhängen: Kolonien, die von älteren Kulturen abstammen, bräunen sich auch umso früher. Das Erscheinen des braunen Farbstoffs in benachbarten Kolonien findet für gewöhnlich an den einander nicht zugewandten Rändern der Kolonien statt, wie aus Fig. 3 der Tafel ersichtlich, wo sich auf der Platte ältere, durch Strichimpfung übertragene Kolonien befinden. Pillai (7) ist der Ansicht, daß das Braunwerden der Azotobakterkolonien eine Folge ihrer Verunreinigung durch die Pilze *Dematium pullulans* und *Torula* sei, die man angeblich in scheinbar reinen Kulturen von Azotobakter wegen ihrer großen Ähnlichkeit mit dem letzteren leicht übersehen könnte. Kulturen, die von diesen Pilzen frei sind, sollen stets farblos bleiben. So hat sich z. B. eine von Löhnis bereits im Jahre 1904 erhaltene und noch bis heute ununterbrochen auf Agar-Mannit gezüchtete Azotobakterkultur durchaus nicht gebräunt, während der

Azotobakter in Gegenwart von *Dematium* oder *Torula* schon nach Verlauf von 8—14 Tagen eine intensiv braune Färbung annimmt. Tatsächlich erwähnt auch Beijerinck (1) das Auftreten dieser Formen in Rohkulturen neben Azotobakter; auch wir haben zwar auf unseren Platten ab und zu Torulakolonien angetroffen, da jedoch diese Organismen größer sind als der Azotobakter, so ist es schwer anzunehmen, daß niemand sie bisher in den braunen Kolonien wahrgenommen hätte, wenn sie in der Tat darin enthalten wären. Was unsere sich gleichfalls bräunenden Kolonien anbelangt, so unterliegt es keinem Zweifel, daß sie rein waren.

Nach Heinze (18) soll das Braunwerden bedingt sein bald durch die Quantität und Qualität der Stickstoffverbindungen im Nährboden, bald durch die Anwesenheit von Kalk in demselben, der diese Erscheinung beschleunigen soll. An einer anderen Stelle (20) gibt jedoch Heinze an, daß der Azotobakter, von einem kalkfreien Nährboden auf einen ebensolchen übertragen, braun geworden ist, während er, von einem kalkhaltigen auf einen kalkfreien Nährboden übergeimpft, ungefärbt geblieben ist. Keding (21) hat beobachtet, daß ein 5—8% Zusatz von NaCl zur Nährsubstanz das Braunwerden verhindert.

In jungen Kolonien unseres Azotobakters sehen wir bei schwacher Vergrößerung, daß seine Zellen in Gestalt von dicken Stäbchen oder Diplokokken nebeneinanderliegen, die, ins Kondensationswasser gebracht, sich lebhaft bewegen. Am Rande der Kolonie sind die Zellen meistens dicht aneinandergedrängt, woraus hervorgeht, daß ihre Membranen nur von einer dünnen Gallerthülle umgeben sind. In diesem Stadium sehen wir den Azotobakter in Fig. 5 der Tafel. Er stellt sich in Gestalt von dicken Stäbchen mit abgerundeten Enden dar; seine Dimensionen betragen im Durchschnitt $3-4 \mu \times 5-6 \mu$. Neben den einzelnen Stäbchen bemerken wir eine ganze Menge von Doppelformen, der für den Azotobakter so charakteristischen Diplokokken. Der Inhalt der jungen Zellen weist keine deutliche Differenzierung auf; er färbt sich mit Methylenblau ganz gleichmäßig, ebenso mit Jod blaßgelb. Oft kann man in jungen Kulturen mehrere Zellen zu einer Kette verbunden antreffen. H. Fischer (22) hat beispielsweise eine solche aus 16 Zellen bestehende Kette beobachtet. Nach Freudenreich (8) können sich die Zellen unter dem Einfluß höherer Temperatur zu Fäden verlängern, deren Länge 10—14 μ erreicht. Ähnliche Fäden haben

auch Gerlach und Vogel (4) beobachtet. Auch wir haben Gelegenheit gehabt, dieselbe Erscheinung zu beobachten, und zwar besonders auf Agar-Glukose, wobei die Fäden bogenförmig den Rand der jungen Kolonie umfaßten, um alsdann in gesonderte Zellen auseinanderzufallen. Solche Fäden, in einen hängenden Tropfen gebracht, entwickeln sich weiter, bewegen sich, um schließlich in einfache Zellen auseinanderzufallen, wobei dieser Zerfall nicht momentan in der ganzen Länge des Fadens geschieht, sondern an den beiden Enden beginnend allmählich nach der Mitte zu fortschreitet. Besonders geneigt zur Fadenbildung zeigen sich Kulturen, die eine längere Zeit hindurch auf stickstofffreiem Agar gezüchtet wurden. Am deutlichsten wies diese Eigenschaft die uns von Prof. Beijerinck überlassene Azotobakterkultur auf. Doch nicht immer zerfallen diese Fäden in einzelne Zellen; unter gewissen Umständen werden an ihren Enden nur einige Zellen abgeschnürt, die sich immer weiter spalten, während die übrigen Fadenteile zerfließen und eingehen, wobei ihre Umrisse sich allmählich verwischen. Fig. 10, 11 und 12 zeigen eben solche verschwommene Formen, wie sie von der Platte zusammen mit der Agarschicht losgelöst, auf ein Objektivglas gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt worden sind. Das Präparat wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen photographiert. Wie aus dem Bilde ersichtlich, befindet sich in der Mitte des Fadens eine Anschwellung. Gleichzeitig sehen wir hier, wie sich die Azotobakterzellen von normaler Größe (Fig. 10) allmählich teilen und spalten, während die daraus resultierenden sekundären Zellen nicht mehr weiterwachsen (Fig. 11 u. 12). Wir hätten somit hier mit einer weitergehenden Teilung der Zellen zu tun, wobei das Wachstum der Tochterzellen verhindert wäre. Wir sind vor der Hand nicht imstande, diese Erscheinung durch den Einfluß eines einzigen Faktors zu erklären. Unser Präparat befand sich in anormalen Bedingungen: die im Agar eingebetteten Bakterien waren mit einem Deckgläschen bedeckt, dessen Ränder mit Vaseline luftdicht abgeschlossen waren. Am Zustandekommen dieser Resultate konnten somit verschiedene Faktoren mitgewirkt haben: der Mangel an Sauerstoff, der Überschuß an CO_2 , vielleicht auch der Mangel an Feuchtigkeit und an Nährstoffen.

Überhaupt variiert die Form, in welcher der Azotobakter schon in den Anfangsstadien seiner Entwicklung auftreten kann, in äußerst weiten Grenzen und wird vielleicht durch verschieden kombinierte

äußere Umstände bedingt, wie durch Nährboden, Feuchtigkeitsgehalt des Mediums, Sauerstoffzutritt, Temperatur u. s. w. Düg-geli (23) beschreibt z. B. verschiedene Formen von Azotobakter, die er in Rohkulturen beobachtet hat je nach dem zur Impfung benutzten Erdboden, der Temperatur und dem größeren oder geringeren Sauerstoffzutritt. So nimmt beispielsweise nach Düg-geli ein in Erlenmeyerschen Kolben bei einer Temperatur von 20° C gezüchteter Azotobakter die Form von langgestreckten Diplokokken an; bei 30° C nimmt er eine streptokokkenartige Gestalt an, wobei die langgestreckten Zellen mit ihren längeren Rändern aneinandergereiht sind; bei 37° C besitzen die einzelnen Zellen der Kette eine sphärische Form. Schließlich kann man den Azotobakter unter den verschiedenartigsten Involutionsformen antreffen, zu denen auch die von uns beobachteten Fäden zu rechnen wären. Diese Variabilität in der Form des Azotobakters hat vielleicht Heinze (18) den Anlaß dazu gegeben, in demselben bald eine Abart der Leguminosenknöllchenbakterien zu erblicken, bald ihn der Gruppe der farblosen Cyanophyceen zuzurechnen, deren nachträgliche Färbung Heinze sogar beobachtet haben soll. Abgesehen von dem Einfluß äußerer Umstände auf die Form des Azotobakters, kann man ihre Veränderlichkeit mit fortschreitender Entwicklung an jeder Zelle beobachten.

In jungen Kolonien des Azotobakters beginnen sich bald abwechselnd dunklere und hellere konzentrische Schichten und radiale Streifen zu bilden. Das Auftreten dieser Schichten und Streifen steht im Zusammenhange mit der Bildung von Schleimhüllen seitens der Zellenmembran. Vor allem beginnen die älteren, die Mitte der Kolonie einnehmenden Zellen ihren Umfang zu verringern und eine mehr ovale Form anzunehmen. Gleichzeitig hüllen sie sich in eine dicke Schleimschicht ein, die die einzelnen Zellen auseinanderrängt. Auf diese Weise vergrößert ein gewisser Teil von Zellen, die das Zentrum der Kolonie einnehmen, ihr Gesamtvolumen, wodurch die äußeren, jüngeren Zellen von der Mitte weggedrängt und gewissermaßen über die allerjüngsten, peripherischen geschoben werden; die auf der Oberfläche befindlichen Zellen können dagegen in Gruppen getrennt werden, zwischen die sich die zentralen, mit der Schleimhülle versehenen Zellen einschieben. Auf diese Weise erklären wir uns sowohl die Entstehung der konzentrischen Schichten, sowie der längs des Radius verlaufenden Streifen. Die am Rande

der Kolonie befindlichen Zellen behalten lange Zeit ihre ursprüngliche Form bei und liegen dicht aneinander. Bei den auf Agarmannit gezüchteten Kulturen kommt es häufiger vor, daß die von einer Gallerthülle umschlossenen Zellen bis an den Rand der Kolonie reichen; wir finden alsdann an der Peripherie lose zerstreute, kleine ovale Azotobakterzellen, während auf Agarglukose die peripheriale Schicht aus dicht aneinandergelagerten Zellen besteht.

Unter dem Mikroskop im optischen Durchschnitte betrachtet, erscheinen die mit Gallerte umgebenen Zellen als ob sie gallertlos wären. Auf Anwesenheit von Gallerte kann man jedoch schließen, wenn man die passiven Bewegungen der Zellen im Wasser unter dem Deckgläschen beobachtet; man sieht dann größere oder kleinere Komplexe von ihnen, die sich derart bewegen, daß die einzelnen Zellen ihre gegenseitige Lage nicht ändern. Und es genügt auch tatsächlich, unter ein Gläschen ein wenig Methylenblau einzuführen, um die zwischen den Zellen stark entwickelte Gallerte sichtbar zu machen. Die Konturen der Gallerte nehmen eine intensiv blaue Farbe an, während sich die Gallerte selbst schwach rotviolett färbt. In der Gallerte liegen eingebettet je 2—4 Zellen, von denen jede wiederum mit einer kleineren Hülle umgeben ist, die sich jedoch stärker metachromatisch färbt. Die zwei Zellen einhüllende Gallerte zerfließt später an der Grenze zwischen den Zellen und behält nur ihre Konturen auf der Verlängerung der Linie, welche die Zellen verbindet, etwas länger bei. Nach vollständigem Zerfließen der Gallerte bleibt die Zelle nur von der inneren, dünnen Gallerthülle umgeben. Fig. 6 zeigt eben einen Azotobakter in diesem Stadium der Gallertbildung (ohne Färbung), Fig. 7 einen ebensolchen mit Methylenblau gefärbt. Jetzt beginnt sich der Zelleninhalt deutlich zu differenzieren. Es zeigen sich darin kugelförmige, glänzende Körperchen, in einer Substanz suspendiert, die sich nach der Fixierung mit Formalin oder Osmiumsäure mit Hämatoxylin oder Giemza'schem Farbstoff stark färbt. Durch diesen Farbstoff werden die sphärischen Körperchen in den Zellen deutlich sichtbar; sie färben sich mit roter Farbe und geben nach H. Fischer (22) charakteristische Reaktionen des Volutins. Mit Jod färbt sich jetzt der Azotobakter intensiv braun, was nach Heinzes (18) Ansicht auf die Anwesenheit von Glykogen in demselben hinweist. Sobald die Azotobakterkolonien sich zu bräunen beginnen, treten in denselben immer zahlreichere Zellen

auf, deren Membranen sich mit den gewöhnlichen Farbstoffen intensiv färben lassen. Ihr gallertartiger Charakter bleibt erhalten, doch die Gallerte selbst wird anscheinend kompakter; bei ihrer Fixierung mittels Formalin gerinnt sie und wird an der Oberfläche uneben und rauh. Oft bleiben auch weiterhin mehrere Zellen innerhalb ihrer gemeinsamen Membranhülle miteinander in Verbindung;



Fig. 1.

diese ist jedoch jetzt bedeutend dünner und läßt die Konturen der Bakterien deutlicher hervortreten. Dieses Stadium erinnert an die Sarcinenform und wurde als solche bereits beschrieben. Schon Beijerinck sah darin eine Dauerform des Azotobaktters, welcher keine eigentlichen Sporen bildet. Viele Zellen bleiben jedoch in diesem Stadium lose nebeneinander liegen, ohne sich zu einer Sarcina zusammenzufügen, wie aus der Photographie (Fig. 8) ersichtlich ist. Unter entsprechenden Bedingungen entwickeln sich diese Zellen weiter, wobei sie aus ihren Membranen ausschlüpfen. Man kann sich davon leicht überzeugen, wenn man etwas Material von den braunen, jedoch noch nicht eintrocknenden Kolonien auf einen neuen Nährboden überträgt. Bald kann man eine ganze Menge von leeren einzelnen oder zu mehreren miteinander verbundenen Membranhüllen beobachten; es sind dies die abgelegten Sarcinahäute. In Fig. 9 ist das Ausschlüpfen einer Azotobakterzelle aus der Membran festgehalten worden; die zweite, starkgefärbte Zelle

befindet sich im Ruhezustande. Auf der beigefügten Figur 1 a bis h ist der ganze Keimprozeß einer Dauerform des Azotobakters dargestellt, wie er unter dem Mikroskop auf einer dünnen Agarschicht im Verlauf von $5\frac{1}{2}$ Std. bei einer Temperatur von etwas über 20°C beobachtet worden ist.

Schließlich müssen wir hier noch bemerken, daß dasjenige, was H. Fischer (22) über die Entwicklung der Dauerformen des Azotobakters angibt, durch unsere Beobachtungen nicht bestätigt werden konnte. Nach diesem Autor entwickeln sich die Dauerzellen des Azotobakters, auf einen neuen Nährboden gebracht, weiter, ohne ihre Membranhüllen abzuwerfen.

III. Die Stickstoffbindung und der Gaswechsel in den Azotobakterkulturen.

Wir haben schon erwähnt, daß der von uns isolierte Azotobakter sich fast gänzlich unfähig gezeigt hat, Stickstoff zu binden, während wir in Rohkulturen stets bedeutende Stickstoffzunahmen konstatieren konnten. Aus diesem Grunde haben wir uns vorgenommen, die Ursachen dieser Unterschiede näher zu ergründen und gleichzeitig die Frage der Atmung und des Stoffwechsels während des Prozesses der Stickstoffbindung ins Auge zu fassen. Diese Frage verlangte unsomehr eine eingehendere Erforschung, da die Ansichten darüber weit auseinander gingen. Beijerinck nennt unter den vom Azotobakter produzierten Gasen nur CO_2 , während Stoklasa (10) außerdem noch Wasserstoff und in dem Nährboden selbst noch organische Säuren und Alkohol gefunden haben will.

Bei unseren Versuchen über die Atmungsprozesse des Azotobakters bedienten wir uns der Methode und der Apparate von Prof. Godlewski sen., die schon oftmals schätzenswerte Dienste geleistet haben. Ich will hier nicht auf die Einzelheiten dieser übrigens bekannten Methode (24) eingehen, sondern will nur bemerken, daß sie die Möglichkeit bietet, sowohl die Menge des absorbierten Sauerstoffs als auch die der ausgeschiedenen CO_2 gleichzeitig zu bestimmen, und zwar dadurch, daß in den Apparat ein kleines Gefäß mit einer bestimmten Menge von KOH -Lösung gestellt wird, aus welcher alsdann CO_2 als BaCO_3 gefällt und gewogen wird. Da alle CO_2 durch KOH absorbiert wird, läßt sich die Sauerstoffabnahme aus der Verringerung des Gesamtvolumens

der Gase im Apparat berechnen. Diese Verringerung läßt sich leicht an dem Steigen des Quecksilbers in einem seitlich am Apparat angebrachten Manometerröhrchen ablesen. Der absorbierte Sauerstoff wird durch neuen, welcher nach Bedarf durch dasselbe Röhrchen direkt aus dem Entwicklungsgefäß in den Apparat eingeleitet wird, ersetzt. Zur Darstellung des Sauerstoffs benutzten wir statt Retorten dickwändige Röhren aus schwer schmelzbarem Glas. Vor Beendigung eines jeden Versuches wurden mittels einer Quecksilberpumpe Gasproben dem Apparat entnommen, in Eudiometer übergeführt und hier genau analysiert. Die Durchführung einer vollständigen Analyse war deswegen unumgänglich notwendig, weil die Verringerung der Gasvolumina im Apparat nur dann einen genauen Maßstab für die Sauerstoffabsorption abgeben kann, wenn es zweifellos feststeht, daß die ganze ausgeschiedene CO_2 vom KOH absorbiert wurde und daß außer CO_2 kein anderes Gas infolge von chemisch-physiologischen Prozessen, die im Nährboden eventuell stattfinden könnten, sich entwickelt hat. In unseren Versuchen mußte aber mit der Möglichkeit der Wasserstoffbildung gerechnet werden, ferner auch damit, daß angesichts der reichlichen und raschen CO_2 -Ausscheidung der Fall nicht ausgeschlossen war, daß das KOH nicht imstande war, die ganze CO_2 -Menge schnell genug zu binden. Insgesamt führten wir in diesen Apparaten 28 Versuche aus. In erster Linie beschäftigten wir uns mit den Rohkulturen.

1. Versuche mit Rohkulturen des Azotobaktters.

In diesen, wie in den weiteren Versuchen wurde die Nährlösung für die Azotobakterkulturen mit Leitungswasser hergestellt. Für Rohkulturen wurde dem Wasser 2% Mannit und 0.05% K_2HPO_4 zugesetzt. Zur Impfung der Nährlösung wurden je 10 g frische Erde verwendet. Im Verlauf des Versuches wurde in den Apparat Sauerstoff eingeleitet, und zwar in dem Maße, wie er verbraucht wurde; von Zeit zu Zeit wurde auch das KOH-Gefäß ausgewechselt. Vor jedem solchen Wechsel entnahm man den Apparaten Gasproben zur Analyse und vor jedesmaliger Schließung der Apparate wurde das Gasmisch in denselben durchgelüftet. Als Beispiel wollen wir einen Versuch eingehend besprechen; von den übrigen führen wir nur die Endergebnisse an.

Versuch I. Der Apparat, dessen Volumeninhalt 830 ccm be-

trug, wurde am 28/X 1906 zusammengestellt. Am 3., 4. und 5. November wurde in denselben Sauerstoff eingeleitet, am 6. wurde das KOH-Gefäß ausgewechselt und der ganze Apparat durchgelüftet. Später wurde das Kaligefäß noch am 10. und 21. November umgewechselt, und am 4. Dezember war der Versuch beendet. Er dauerte somit 37 Tage lang, und seinen Verlauf veranschaulichen die in Tab. II zusammengestellten Zahlen.

(Siehe Tab. II, Seite 944).

Die Ziffern dieser Tabelle geben für jede Ablesung an: das Datum und die Stunde, die Temperatur, die auf 0° C. und 0.76 m Druck reduzierten Gasvolumina im Apparat, die Volumenabnahme des betreffenden Gases bis zum Augenblick der jedesmaligen Ablesung, und zwar entweder vom Anfang des Versuches oder von der letzten Sauerstoffzuleitung an gerechnet, und schließlich die Volumenabnahme der Gase, berechnet auf je eine Stunde zwischen zwei aufeinander folgenden Ablesungen, welche letztere Erscheinung annähernd als Maßstab für die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme dienen kann¹⁾. Wenn wir diese letzten Ziffern genauer betrachten, so sehen wir, wie am Anfang des Versuches nach jedesmaliger Sauerstoffzuleitung auch die Absorption desselben allmählich steigt, um dann wieder zurückzugehen. Schon vom 7. XI. an sehen wir den gesteigerten Sauerstoffverbrauch nur unmittelbar nach seiner Zuleitung, eine weitere Steigerung ist nicht zu beobachten, sondern es folgt im Gegenteil ein schrittweiser Rückgang in seiner Aufnahme. So könnte man den Verlauf der Sauerstoffaufnahme zwischen der einen und der anderen Zuleitung desselben am Anfang des Versuches durch eine Kurve mit einem Maximum in der Mitte ausdrücken; in der zweiten Hälfte des Versuches wird das Maximum am Anfang der Kurve zu liegen kommen, in ihrem weiteren Verlauf wird sie nur noch fallen.

Um uns diesen Verlauf der Sauerstoffaufnahme zu erklären, müssen wir folgendes in Betracht ziehen. Der Sauerstoffverbrauch ist offensichtlich eine Folgeerscheinung der Atmung der Mikroorganismen, die sich in der Nährlösung entwickeln. Die Geschwindigkeit, mit welcher dieser Verbrauch stattfindet, hängt ab:

¹⁾ Wir sagen „annähernd“, weil in Wirklichkeit wegen der Wasserstoffausscheidung diese Volumenverringering kleiner ist als das Volumen des absorbierten Sauerstoffs.

TABELLE II.

Datum		t°.	Luftvolumen im Apparate in ccm	Volumverminderung	Volumverminderung pro Stunde	Datum		t°.	Luftvolumen im Apparate in ccm	Volumverminderung	Volumverminderung pro Stunde
Tag	Uhr					Tag	Uhr				
28/X	12.—	17.7	732.65	—	—	7	4.45	18.1	742.19	—	—
29	3.30	18.1	732.09	0.56	0.02	"	6.—	18.7	739.34	2.85	2.28
30	11.00	17.0	728.66	3.99	0.17	8	9.15	16.8	699.51	42.68	2.61
31	1.15	18.3	725.74	6.91	0.11	"	11.30	17.3	695.41	46.78	1.82
1/XI	1.15	18.7	701.64	31.01	0.96	"	6.30	19.0	685.03	57.16	1.48
2	10.—	17.8	641.48	91.17	2.81	9	10.—	17.6	668.37	73.82	0.43
"	1.—	18.2	631.10	101.55	3.13	"	7.45	18.4	666.07	76.12	0.24
"	4.—	18.3	624.10	108.55	2.67	10	9.30	15.8	667.88	74.31	—
3	10.15	16.3	592.49	140.16	1.73	"	11.40	16.6	667.86	74.32	—
"	11.30	16.7	591.32	141.33	0.94	II Wechsel des KOH-Gefäßes					
Sauerstoff zugeführt 152.45 ccm						"	12.25	—	710.06	—	—
"	12.15	17.3	741.80	—	—	"	6.—	16.6	707.50	—	—
"	12.45	17.1	740.49	1.31	2.62	11	10.30	15.0	706.43	—	—
"	1.30	17.1	737.81	3.99	3.57	12	9.30	13.8	707.04	—	0.15
"	3.15	16.9	729.81	11.99	6.86	13	8.20	16.4	708.18	—	—
"	4.15	16.8	723.51	18.29	6.30	14	9.20	17.5	704.31	5.75	—
4	10.45	16.1	633.01	108.79	4.89	15	9.—	17.1	701.87	8.19	0.10
"	12.45	16.2	626.96	114.84	3.03	16	9.15	17.6	697.60	12.46	0.18
"	3.15	16.1	618.77	123.03	3.28	17	10.30	18.7	693.75	16.31	0.15
"	3.45	16.3	617.08	124.72	3.38	18	11.45	19.3	688.21	21.85	0.22
Sauerstoff zugeführt 124.71 ccm						19	10.—	18.35	683.69	26.37	0.20
"	4.45	16.3	737.13	—	—	"	10.40	18.7	683.84	26.22	—
"	6.00	16.4	729.86	7.27	5.82	Sauerstoff zugeführt 39.60 ccm					
5	10.30	17.1	645.40	91.73	5.12	"	1.—	19.5	722.79	—	—
"	12.—	17.6	641.38	95.75	2.68	20	11.—	19.—	715.70	7.09	0.34
Sauerstoff zugeführt 101.32 ccm						21	10.30	17.85	708.29	14.50	0.32
"	4.—	17.6	726.51	—	—	III Wechsel des KOH-Gefäßes					
"	6.—	17.6	718.66	7.85	3.93	"	12.50	—	726.48	—	—
6	9.30	16.1	657.10	69.41	3.97	"	6.30	18.2	725.02	1.46	—
"	10.50	16.7	651.72	74.79	4.04	22	8.30	16.6	721.42	5.06	0.26
I Wechsel des KOH-Gefäßes						23	9.—	16.8	714.66	11.82	0.28
"	11.25	—	746.60	—	—	24	10.—	18.2	707.76	18.72	0.28
"	12.25	17.0	741.60	5.—	5.—	25	9.40	18.9	701.35	25.13	0.27
"	1.—	17.0	738.68	7.92	5.01	26	9.40	18.6	694.03	32.45	0.31
"	3.—	17.0	728.82	17.78	4.93	27	12.40	19.4	686.71	39.77	0.27
"	4.43	17.2	723.54	23.06	3.30	28	9.40	17.5	680.59	45.89	0.29
7	10.05	16.9	669.20	77.40	3.11	1/XII	11.45	18.1	656.96	69.52	0.32
"	3.20	17.6	663.58	83.02	1.07	2	3.—	17.6	646.27	80.21	0.39
Sauerstoff zugeführt 82.31 ccm						3	11.40	18.1	638.87	87.61	0.36
"						4	9.45	17.9	630.90	95.58	0.36
"						"	12.15	—	630.—	96.48	—

1) von der Anzahl der sich in der Nährlösung entwickelnden Organismen,

2) von der ihnen im gegebenen Entwicklungsstadium eigentümlichen Fähigkeit einer stärkeren oder schwächeren Atmung,

3) von den äußeren Bedingungen, d. h.

a) von der Temperatur,

b) von der vorhandenen Menge von Atmungsmaterial,

c) vom partiellen Druck des Sauerstoffs.

Infolge des größeren Reichtums an Nährstoffen (Mannit) sowie des größeren Sauerstoffvorrats ging am Anfang des Versuches die Entwicklung der mit der Erde eingeführten Mikroorganismen sehr energisch vonstatten. Darum war die Anzahl dieser Mikroorganismen und somit auch ihr Bedarf an Sauerstoff in schnellem Wachstum begriffen; durch diesen Umstand läßt sich die fortschreitende, sehr erhebliche Steigerung der Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in den ersten Versuchstagen sehr leicht erklären. Der weiteren Steigerung dieser Geschwindigkeit wird durch die allmähliche Abnahme der Sauerstoffmenge im Apparat ein Ziel gesetzt. Dieser immer größer werdende Mangel an Sauerstoff verursacht wiederum seinerseits eine wachsende Schwächung der Atmungsprozesse. Wird die Ursache dieser Schwächung durch Sauerstoffzuführung aufgehoben, so kehrt die Atmungsgeschwindigkeit auf ihre frühere Höhe zurück; da aber auch die Vermehrung der Organismen weiter fortschreitet, so wächst auch die Menge des verbrauchten Sauerstoffs von neuem, bis wieder der eintretende Mangel an Sauerstoff den Verbrauch desselben herabdrückt. Solch eine allmähliche Steigerung und Verringerung des Sauerstoffverbrauchs wiederholt sich bei seiner jedesmaligen Zuführung so lange, bis die Entwicklung der Mikroorganismen ihren Höhepunkt erreicht hat. Tritt dieses ein, so hängt der weitere Verlauf der Atmungsprozesse nunmehr lediglich von dem Grade der Atmungsintensität der Mikroorganismen in dem gegebenen Entwicklungsstadium, von dem Partialdruck des Sauerstoffs und von der Menge des vorhandenen Atmungsmaterials ab. In diesem Stadium wird also der Sauerstoffverbrauch am intensivsten nach seiner jedesmaligen Einleitung in den Apparat sein, was wir auch im weiteren Verlauf des Versuches tatsächlich beobachten. Doch abgesehen davon sehen wir in den späteren Stadien auch eine immer langsamere Sauerstoffabnahme. Dieses Nachlassen der Atmungsenergie am Ende der Versuche ist

eine natürliche Folge der Erschöpfung des Atmungsmaterials, in gewisser Hinsicht hängt sie vielleicht davon ab, daß die Mikroorganismen in ihren späteren Entwicklungsstadien ihre Fähigkeit zum intensiven Atmen nach und nach verlieren.

Nach diesen allgemeinen Betrachtungen gehen wir zu der speziellen Erörterung der Versuchsergebnisse über.

Vor dem ersten Wechsel des KOH Gefäßes wurden am 6. XI. dem Apparat, in welchem das Gasvolumen 651.72 ccm betrug, zwei Gasproben entnommen und in Eudiometer eingeleitet. Die Analysen ergaben folgende Resultate (Tab. III).

TABELLE III.
Reduzierte Gasvolumina in den Eudiometern.

I. Portion		II. Portion	
	im Mittel		im Mittel
23·544	—	26·537	—
23·595	23·565 <i>ccm</i>	26·573	26·552 <i>ccm</i>
23·556	—	26·546	—
Nach CO ₂ -Absorption		Nach der Explosion mit Knallgas	
23 308	23·308 "	25·566	25·566 "
Nach O ₂ -Absorption		Nach CO ₂ -Absorption	
21·423	—	25·224	—
21·432	—	25·262	25·250 "
21·399	21·412 "	25·263	—
21·552	—	Nach O ₂ -Absorption	
21·325	—	23·307	23·307 "
21·338	—		

Nach diesen Analysen bestand das Gasgemisch im Apparat aus-

	I. Portion	II. Portion	im Mittel	demnach in <i>ccm</i>
CO ₂	1·091%	1·189%	1·14%	7·43
O ₂	8·360 "	8·579 "	8·47 "	55·20
H ₂	—	2·536 "	2·54 "	16·55
N ₂	—	—	87·85 "	572·54

Das aus KOH gefällte BaCO₃ enthielt 0·9891 g CO₂, woraus nach Abzug der im KOH bereits gebundenen Kohlensäure auf die wäh-

rend des Versuches absorbierte CO_2 0.9213 g entfällt, welche Gewichtsmenge 468.87 cm^3 entspricht. Dazu muß hinzugefügt werden: 7.43 cm^3 als das im Apparat auf Grund der Analyse gefundene CO_2 Quantum und 0.91 cm^3 als diejenige Menge desselben, welche nach der Berechnung in der Nährlösung als absorbiert enthalten sein mußten. Auf diese Weise erhalten wir 477.21 cm^3 CO_2 , als die ganze von den Mikroorganismen ausgeschiedene CO_2 -Menge, zuzüglich derjenigen, die sich im Apparat schon bei Beginn des Versuches befunden hat.

Den Mikroorganismen standen aber während dieser ersten Versuchsperiode zur Verfügung: 732.65 cm^3 der am Anfange des Versuches im Apparate eingeschlossenen Luft und 377.59 cm^3 des während des Versuches zugeleiteten Sauerstoffes.

Angenommen, daß die Luft 0.04% CO_2 , 20.93% O_2 und 79.03% N_2 enthielt, also im ganzen aus 0.29 cm^3 CO_2 , 153.36 cm^3 O_2 und 579.00 cm^3 N_2 bestand, gestaltet sich die Bilanz des Gasaustausches im Apparate während der Zeit vom 28/X bis 6/XI folgendermaßen:

	CO_2	O_2	H_2	N_2	Zusammen
	<i>ccm</i>	<i>ccm</i>	<i>ccm</i>	<i>ccm</i>	<i>ccm</i>
Es wurde den Organismen geboten:	0.29	530.93	—	579.00	1110.22
Gefunden am 6/XI:	477.21	55.20	16.55	572.54	1121.22
Differenzen	+ 476.92	— 475.73	+ 16.55	— 6.46	+ 11.28

Diese Zahlen besagen, daß die betreffende Kultur 476.92 ccm CO_2 und 16.55 ccm Wasserstoff ausgeschieden, dagegen 475.73 ccm Sauerstoff verbraucht und 6.46 ccm Stickstoff gebunden hat. Nach Einstellung eines neuen KOH-Gefäßes wurde der Apparat geschlossen und zum zweitenmale am 10. XI geöffnet. In dieser Zeit wurde nur ein einziges Mal Sauerstoff eingeleitet, und zwar in einem Quantum von 82.31 ccm . Das Luftvolumen in dem neuerdings zusammengestellten Apparat betrug 746.60 ccm , am 10. XI dagegen 667.87 ccm . Die Ergebnisse der Analysen der Gasproben, die dem Apparat vor dem abermaligen Wechsel des Kaligefäßes entnommen waren, stellen wir in Tab. IV zusammen, wobei alle Ablesungen der Gasvolumina in den Eudiometern die in größeren Zeitabständen stattfanden, angegeben sind, um so einen Maßstab für die Genauigkeit der Analysen selbst zu geben.

TABELLE IV.

Reduzierte Gasvolumina in den Eudiometern.

I. Portion		II. Portion	
	Mittelzahlen		Mittelzahlen
11-123	—	24-243	—
11-094	—	24-201	—
11-110	—	24-168	24-197 <i>ccm</i>
11-079	11-100 <i>ccm</i>	24-167	—
11-094	—	24-207	—
11-099	—		
		Nach O ₂ -Zugabe	
Nach Explosion mit Knallgas	—	32-626	—
10-867	—	32-634	32-647 <i>ccm</i>
10-865	—	32-681	—
10-865	10-866 <i>ccm</i>		
10-866	—	Nach Explosion	
		28-583	—
		28-622	—
Nach O ₂ -Zugabe	—	28-598	28-604 <i>ccm</i>
16-951	—	28-611	—
16-938	16-942 <i>ccm</i>		
16-938	—	Nach CO ₂ -Absorption	
Nach Explosion mit Knallgas	—	28-427	—
15-288	—	28-447	28-439 <i>ccm</i>
15-325	15-302 <i>ccm</i>	28-444	—
15-293	—		
		Nach CO ₂ -Absorption	
15-263	—		
15-207	—		
15-208	15-226 <i>ccm</i>		
15-225	—		
		Nach O ₂ -Absorption	
9-744	—		
9-772	—		
9-752	9-765 <i>ccm</i>		
9-790	—		

Aus der Analyse der ersten Probe ersieht man, daß sich das Gasvolumen im Eudiometer nach der Explosion etwas verringert hat; nach Einleitung von Sauerstoff in das Eudiometer und einer abermaligen Explosion war die Abnahme größer; somit war die Sauerstoffmenge im Eudiometer nicht hinreichend für die vollständige Verbrennung des Wasserstoffs und nach der ersten Explosion ist von Sauerstoff nichts mehr übriggeblieben. Da nun 6.076 *ccm* desselben in das Eudiometer eingeführt wurden, wovon 0.547 *ccm* auf die Verbrennung des Wasserstoffs verwendet worden sind, so müßten noch 5.529 *ccm* O₂ verblieben sein. Nach Einführung von Pyrogallol betrug aber die Volumenabnahme nur 5.447 *ccm*, was vielleicht durch die bekannte Ausscheidung von geringen Mengen von CO bei der Sauerstoffabsorption durch Pyrogallol zu erklären ist. In Anbetracht dessen würde sich der tatsächliche Analysenfehler auf 0.03 reduzieren; rechnen wir diesen Fehler auf das ganze im Apparat befindliche Gasvolumen um, so erhalten wir zirka 1 *ccm*, woraus hervorgeht, daß die im Apparat gefundene Stickstoffabnahme, welche die Menge von 1 *ccm* bedeutend überschreitet, außerhalb der Grenze der Beobachtungsfehler liegt.

Wenn wir unseren Berechnungen die Durchschnittszahlen der einzelnen Ablesungen der Gasvolumina in den Eudiometern zu grunde legen, so erhalten wir für die Zusammensetzung der Luft im Apparat folgende Ziffern.

	I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂	0.820%	0.678%	0.749%
O ₂	0.697 „	—	0.697 „
H ₂	11.245 „	11.142 „	11.194 „
N ₂	87.238 „	—	87.360 „

Daraus berechnen sich die in den 667.87 *ccm* enthaltenen Mengen der einzelnen Gase, die sich im Apparat im Augenblick der Probenahme befanden, wie folgt:

CO ₂ —	5.00 <i>ccm</i>	H ₂ —	74.76 <i>ccm</i>
O ₂ —	4.66 „	N ₂ —	583.45 „

Im Kaligefäß wurden 291.50 *ccm* und in der Nährlösung 0.67 *ccm* CO₂ gefunden.

Die Zusammenstellung der Luftbestandteile nach der Schließung des Apparates am 6. XI und der am 10. XI erhaltenen Analysenergebnisse weist folgende Differenzen auf:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
vom 6. XI. wurden den Organismen geliefert:	ccm 0·30	238·57	—	591·40
am 10. XI. gefunden:	„ 297·17	4·66	74·76	583·45
Änderungen während des Versuches ±	+ 296·87	— 233·91	+ 74·76	— 7·95

In der zweiten Versuchsperiode wurden also auf 233·91 *ccm* verbrauchten Sauerstoff 296·87 *ccm* CO₂ und 74·76 *ccm* Wasserstoff ausgeschieden; die Abnahme des Stickstoffs in der Luft betrug 7·95 *ccm*.

Das Gasvolumen in dem am 10. XI. zum dritten Male zusammengestellten Apparat belief sich auf 710·06 *ccm*, am Ende des Versuches am 21. XI. 707·80 *ccm*. Während dieser Zeit wurden dem Apparat nur 39·60 *ccm* Sauerstoff zugeführt. Die Zusammensetzung der Gase vor der am 21. XI. erfolgten Öffnung des Apparates war die folgende:

	I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂	0·552%	0·693%	0·623%
O ₂	17·100 „	16·200 „	16·650 „
H ₂	3·217 „	3·281 „	3·248 „
N ₂	79·131 „	79·826 „	79·479 „

Im Kaligefäß und in der Nährlösung wurden 68·89 *ccm* CO₂ gefunden. Der Vergleich der Volumina der Bestandteile am Anfang und am Ende dieser dritten Versuchsperiode zeigt folgende Änderungen ihrer Mengen:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Zu Anfang am 10/XI.	0·28	188·22	—	561·16 <i>ccm</i>
Gefunden am 21/XI.	73·30	117·85	22·99	562·55 „
Änderung:	+ 73·02	— 70·37	+ 22·99	+ 1·39 „

Selbstverständlich beruht die Stickstoffzunahme von 1·39 *ccm* im Apparat auf einem analytischen Fehler. Im Verlauf dieser 11 Tage hat, wie wir sehen, die Wasserstoffausscheidung nicht nachgelassen, während die Sauerstoffaufnahme bedeutend zurückgegangen ist.

Als der Apparat am 21/XI. zum vierten Male zusammengesetzt wurde, enthielt er 726·48 *ccm* Luft, die sich bis zum endgültigen Abschluß des Versuches auf 630·00 *ccm* reduziert haben. Sauerstoff

wurde nicht mehr zugeleitet. Die Analyse der vor der endgültigen Öffnung des Apparates entnommenen Luft ergab folgende Zusammensetzung:

CO ₂ -- 0.894%	H ₂ -- 0.951%
O ₂ -- 6.951 "	N ₂ -- 91.204 "

Im Kaligefäß, sowie in der Nährlösung waren 106.59 *ccm* CO₂ enthalten. Die Änderungen in den Mengen der Luftbestandteile in dieser Versuchsperiode waren folgende:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
am Anfang am 21/XI.	0.29	152.05	—	574.14 <i>ccm</i>
am Ende am 4/XII.	112.22	43.79	5.99	574.59 "
eingetr. Änderungen ±	+111.93	-108.26	+5.99	+0.45 "

Wiederum ist also eine Abnahme des Stickstoffs nicht zu verzeichnen, Wasserstoff wird auch weiterhin, wenn auch in schwächerem Grade, ausgeschieden, an Sauerstoff wurden noch 108.26 *ccm* verbraucht, an CO₂ 111.93 *ccm* ausgeschieden. Wenn wir nun die Zu- und Abnahmen der Gasmengen während dieser vier Versuchsperioden zusammenstellen, so erhalten wir:

Dauer der einzelnen Phasen des Versuches	CO ₂ -Ausscheidung in <i>ccm</i>	Sauerstoff-Absorption in <i>ccm</i>	Wasserstoff-Ausscheidung in <i>ccm</i>	Wechsel des N ₂ -Gehaltes in <i>ccm</i>	Der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
9 Tage	476.92	475.73	16.55	- 6.46	1.00
4 "	296.87	233.91	74.76	- 7.95	1.27
11 "	73.02	70.37	22.99	+ 1.39	1.03
13 "	111.93	108.26	5.99	+ 0.45	1.03
37 "	958.74	888.27	120.29	- 12.57	1.08

Der gesamte Verbrauch des Luftstickstoffs im Apparat beträgt demnach 12.57 *ccm*. Da nun nach Beendigung des Versuches in der Nährlösung insgesamt 26.18 *mg* N₂ gefunden wurden, so erhalten wir nach Abzug des mit ihren Bestandteilen und mit der Erde in die Nährlösung eingeführten Stickstoffs in der Gesamtmenge von 9.31 *mg* als reinen Gewinn 16.87 *mg* = 14 *ccm*.

In ähnlicher Weise wurden auch die folgenden Versuche ausgeführt: doch beschränken wir uns bei ihrer Besprechung nur auf die Angabe der Hauptergebnisse.

Versuch II. Am 4. III. 1906 wurde der Apparat mit 100 *ccm* Nährlösung, welche 2% Mannit und 0.05% K_2HPO_4 enthielt, zusammengestellt. Zur Infektion derselben wurden 10 *g* frische Erde verwandt. Das Gasvolumen im fertigen Apparat betrug 830.40 *ccm*. Der Versuch dauerte 10 Tage, während dieser Zeit wurde Sauerstoff 5 mal in einer Gesamtmenge von 512.23 *ccm* zugeleitet. Das Kaligefäß wurde nicht gewechselt.

Das Gasvolumen im Apparat am Ende des Versuches betrug 778.33 *ccm*; die Zusammensetzung der Gase war die folgende:

CO_2 — 5.44%	H_2 — 11.14%
O_2 — 0.51 "	N_2 — 82.91 "

Im Kaligefäß waren 628.04 *ccm*, in der Nährlösung 4.26 *ccm* CO_2 absorbiert.

Auf Grund dieser Resultate stellt sich die Verschiebung der Gasmengen in diesem Versuche folgendermaßen dar:

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Die Bakterien erhielten	0.33	686.03	—	656.17 <i>ccm</i>
am Schluß wurden gefunden	674.64	3.97	86.71	645.31 "
Änderungen während des Versuchs	+ 674.31	— 682.06	+ 86.71	— 10.86 "

Die Stickstoffzunahme in der Nährlösung betrug 15.15 *mg* = 12.12 *ccm*, der Quotient $\frac{CO_2}{O_2} = 0.99$.

Versuch III. Am 28/X. 1906 wurde der Apparat mit 100 *ccm* 2%-iger Mannitnährlösung zusammengestellt, die mit 10 *g* frischer Erde infiziert wurde. Während der 37-tägigen Versuchsdauer wurde das Kaligefäß dreimal gewechselt und 6 mal Sauerstoff zugeleitet. Für die erste Periode dieses Versuches vom 28/X. bis zum 3/XI. betrug das Anfangsvolumen der Gase im Apparat 834.33 *ccm*, das Endvolumen vor dem Wechsel des Kaligefäßes 690.41 *ccm*. Bei der Öffnung des Apparates war die Zusammensetzung der darin befindlichen Gase die folgende:

CO₂ — 0·426% H₂ — 0·373%
 O₂ — 4·042 „ N₂ — 95·159 „

Im Kaligefäß fand man 146·80 *ccm*, in der Nährlösung 0·36 *ccm* CO₂.

Der Gasaustausch für diese Zeit stellt sich folgendermaßen dar:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Ursprüngl. befanden				
sich im Apparat:	0·33	174·63	—	659·37 <i>ccm</i>
Vor dem Wechsel				
des Gefäßes fand				
man:	150·10	27·90	2·57	656·85 „
Differenz ±	+ 149·77	— 146·73	+ 2·57	— 2·52 <i>ccm</i>

Der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1·02$.

Für die zweite Versuchsperiode vom 3/XI bis 10/XI betrug das Anfangsvolumen der Gase im Apparat 835·88 *ccm*, das Endvolumen 745·63 *ccm*. Während dieser Zeit wurde dreimal Sauerstoff in einer Gesamtmenge von 367·50 *ccm* eingeleitet.

Die Analysen der Gasproben, die dem Apparat vor dem neuen Wechsel des Kaligefäßes entnommen wurden, ergaben folgende Resultate:

I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂ — 0·642%	CO ₂ — 0·568%	CO ₂ — 0·605%
O ₂ — 0·0 „	O ₂ — 0·0 „	O ₂ — 0·0 „
H ₂ — 10·378 „	H ₂ — 10·514 „	H ₂ — 10·446 „
N ₂ — 88·980 „	N ₂ — 88·918 „	N ₂ — 88·949 „

Im Kaligefäß waren 622·79 *ccm* CO₂ absorbiert, in der Nährlösung 0·49 *ccm* CO₂ gelöst.

Die Bilanz des Gaswechsels wird also in dieser zweiten Periode folgendermaßen aussehen:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Der Apparat enthielt ursprüng-				
lich mit Berücksichtigung				
des zugeleiteten Sauerstoffs:	0·33	542·45	—	660·60
am 10/XI. wurde gefunden	627·79	—	77·89	663·23
Differenz ±	+ 627·46	— 542·45	+ 77·89	+ 2·63

Wie aus dieser Zusammenstellung ersichtlich, ist in dieser Periode die Stickstoffmenge im Apparat gestiegen. Dies läßt sich dadurch erklären, daß man beim Umwechselln des Kaligefäßes vergessen hat, den Apparat durchzulüften und auf diese Weise in denselben mehr Stickstoff eingeschlossen hat, als sich davon normalerweise in der atmosphärischen Luft befindet. Diese Tatsache ist in den Analysenergebnissen sofort zur Geltung gekommen, denn an Stelle der erhofften Stickstoffabnahme müssen wir eine Zunahme desselben von zirka 3 *ccm* konstatieren, eine Erscheinung, die nicht mehr in den Grenzen der zulässigen analytischen Fehler liegt.

Für unsere dritte Versuchsperiode vom 10/XI. bis zum 21/XI. betrug das Anfangsvolumen der Gase im Apparat 815·75 *ccm*, das Endvolumen 749·77 *ccm*. An Sauerstoff wurden in dieser Zeit zugeleitet 376·58 *ccm*.

Die Analysen der Gasproben, die dem Apparat vor dem Wechsel des Kaligefäßes entnommen wurden, zeigten folgende Zusammensetzung des Gasgemisches:

	I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂	0·755%	0·860%	0·808%
O ₂	14·232 "	14·079 "	14·156 "
H ₂	0·048 "	0·048 "	0·048 "
N ₂	84·965 "	85·013 "	84·989 "

Im Kaligefäß waren 329·21 *ccm*, in der Nährlösung 0·64 *ccm* CO₂ absorbiert.

Die Bilanz des Gaswechsels in der dritten Periode wird also folgende sein:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Die Organismen haben erhalten:	0·33	547·32	—	644·69
Es verblieb am 21/XI.:	335·91	106·42	0·08	637·22
Differenz ±	+ 335·58	— 440·90	+ 0·08	— 7·47

Schießlich waren in der letzten Periode des Versuches am 21/XI. im Apparat 823·51 *ccm* Luft eingeschlossen, deren Volumen nach beendetem Versuch am 4/XII. — 717·87 *ccm* betrug. Sauerstoff wurde in dieser Zeit nicht mehr zugeleitet.

Nach Beendigung des Versuches hat die Analyse der im Apparat befindlichen Gase folgende Zusammensetzung derselben ergeben:

CO₂ — 0.954% H₂ — — „
 O₂ — 8.241 „ N₂ — 90.805 „

In dem Kaligefäß wurden 104.57 *ccm*, in der Nährlösung 0.71 *ccm* CO₂ gelöst gefunden. Darauf wird sich die Bilanz des Gaswechsels im Apparat folgendermaßen gestalten:

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
am 21/XII. waren vorhanden:	0.33	172.36	—	650.82
„ 4/XII. wurde gefunden:	112.13	59.16	—	651.86
Eingetretene Änderungen ±	+ 111.80	— 113.20	—	+ 1.04

Wir wollen nunmehr die Resultate der Untersuchungen über den Gaswechsel in allen vier Versuchsperioden zusammenstellen:

Periode	Ausgeschiedenes CO ₂	Verbrauchter O ₂	Ausgeschiedener H ₂	Zu-, resp. Abnahme von N ₂	Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$
I. 6 Tage	149.77	146.73	2.57	— 2.52	1.02
II. 7 „	627.46	542.45	77.89	+ 2.63 (?)	1.16
III. 11 „	335.58	440.90	0.08	— 7.47	0.76
IV. 13 „	111.80	113.20	—	+ 1.04	0.98
37 Tage	1224.61	1243.28	80.54	— 6.32	0.99

Der Gesamtverlust der Luft im Apparat an Stickstoff beträgt demnach 6.32 *ccm*, während in der Nährlösung an gebundenem Stickstoff 16.24 *mg* = 13 *ccm* gefunden wurden. Diese bedeutende Differenz findet, wie oben gesagt, darin ihre Erklärung, daß wir vergessen haben, den Apparat beim ersten Wechsel des Kaligefäßes zu lüften.

Schließlich zeigen die Resultate der drei Versuche dieser Serie, wie groß der Zuwachs an Stickstoff in den Rohkulturen sein kann; dabei stellen sie aber auch fest, daß dieser Zuwachs auf die Bindung des freien Luftstickstoffs zurückzuführen ist. Diese Bindung wird in Rohkulturen stets begleitet von einer Wasserstoffausscheidung, die wiederum auf die in der Kultur stattfindende Buttersäuregärung zurückzuführen ist. Nachdem die Apparate auseinandergenommen waren, reagierten die Nährlösungen stets sauer und wiesen einen deutlichen Geruch nach Buttersäure auf. Der ausgeschiedene

Wasserstoff verdeckt allerdings bis zu einem gewissen Grade die Sauerstoffabnahme, auf welche aus der Verringerung des Gasvolumens im Apparate geschlossen wird; auf die endgültigen Bilanzen der Gase hat er jedoch keinen Einfluß, da diese auf Grund der Zusammensetzung der Gasgemische am Anfang und am Ende der Untersuchungen aufgestellt werden.

2. Versuche mit Reinkulturen bei Gegenwart von pasteurisierter Erde.

Da in Rohkulturen bekanntlich neben dem Azotobakter und den Bakterien der Buttersäuregärung eine ganze Reihe anderer Mikroorganismen vegetiert, so wurden zwecks Feststellung ihrer Anteilnahme an dem Prozesse der Stickstoffbindung die beiden nachfolgenden Versuche angestellt. Zur Infizierung der Nährlösung wurde pasteurisierte, d. h. keine zur Sporenbildung unfähigen Organismen enthaltende Erde verwendet. Da während der Pasteurisation auch der Azotobakter vernichtet wurde, so wurde er besonders einer Reinkultur entnommen und in die Nährlösung eingeführt.

Versuch IV. In den 770·94 ccm fassenden Apparat wurden 100 ccm 2% -iger Mannitnährlösung nebst 0·05% K_2HPO_4 eingebracht. Zur Infizierung der Nährlösung wurde 1 g pasteurisierte Erde und Azotobakter von 9-tägiger Agarplatte verwendet. Der Versuch dauerte 20 Tage, während welcher Zeit 9 mal frischer Sauerstoff dem Apparat zugeführt, das Kaligefäßchen jedoch nicht umgewechselt wurde. Nach Beendigung des Versuchs zeigte die Nährlösung genau wie bei Rohkulturen saure Reaktion und den Geruch nach Buttersäure. In Tab. V gebe ich den Gang des Versuches an, und zwar in derselben Weise, wie beim ersten Versuch mit der Rohkultur.

(Siehe Tab. V, Seite 957).

Zwei Gasproben, dem Apparat vor seiner Auseinandernahme entnommen, zeigten folgende Zusammensetzung:

	I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂	13·536%	13·415%	13·476%
O ₂	0·098 „	— „	0·049 „
H ₂	0·776 „	1·067 „	0·922 „
N ₂	85·590 „	85·518 „	85·553 „

TABELLE V.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparat in ccm	Gasvolumverminderung im Apparat in ccm	Volumverminderung pro Stunde	Datum		t°	Luftvolumen im Apparat in ccm	Gasvolumverminderung im Apparat in ccm	Volumverminderung pro Stunde	
Tag	Uhr					Tag	Uhr					
22/XII	5:30	15.5	770.94	—	—	5/I	1:23	17.6	750.81	—	—	
23	2—	15.1	770.64	0.30	0.01	"	3:35	17.8	740.18	10.63	4.72	
"	6:30	16.3	771.35	+0.41	—	"	10:50	16.2	652.74	98.07	9.50	
25	4:15	11.6	762.80	8.14	0.16	"	12—	17.0	651.60	99.21	0.97	
29	1:30	16.9	738.67	32.27	0.26	Sauerstoff zugeführt 107.96 ccm						
30	7—	17.0	674.74	96.20	2.17	"	1:20	17.5	756.65	—	—	
31	12—	18.7	631.01	139.93	2.57	"	3:20	16.9	754.47	5.18	2.59	
Sauerstoff zugeführt 111.08 ccm						"	7	10:45	16.6	696.60	60.05	2.83
"	1:30	19.4	736.63	—	—	"	12:25	18.3	693.47	63.18	1.88	
"	3:40	18.5	727.01	9.62	4.44	Sauerstoff zugeführt 58.11 ccm						
1/I	1:15	14.3	632.50	104.13	3.99	"	1:30	18.2	748.46	—	—	
2	10:30	13.3	607.54	129.09	1.17	"	3:50	17.7	740.70	7.76	3.33	
"	12—	14.2	607.71	128.92	—	"	8	10:40	17.5	693.13	55.33	2.53
Sauerstoff zugeführt 151.07 ccm						"	"	11:45	17.8	691.85	56.61	1.18
"	1:15	14.9	754.70	—	—	Sauerstoff zugeführt 64.75 ccm						
"	4—	15.0	743.47	11.23	4.08	"	1:20	18.2	751.84	—	—	
3	11—	15.1	653.84	100.86	4.72	"	4:50	17.8	742.31	9.53	3.43	
"	12—	16.8	650.57	104.13	3.27	"	9	11:30	18.2	702.26	49.58	2.06
Sauerstoff zugeführt 95.51 ccm						"	"	2:55	18.0	698.89	52.95	0.99
"	1:25	17.9	739.94	—	—	"	4:30	17.9	697.87	53.97	0.64	
"	4:10	18.0	726.15	13.79	5.02	Sauerstoff zugeführt 60.96 ccm						
4	10:20	15.4	620.14	119.80	5.84	"	5:50	18.1	756.23	—	—	
"	12:20	17.3	616.26	123.68	1.94	"	10	11—	17.3	717.58	38.65	2.25
Sauerstoff zugeführt 131.03 ccm						"	"	3:5	16.9	713.19	43.04	1.08
"	1:36	17.7	741.34	—	—	"	11	10:45	15.9	707.13	49.10	0.31
"	3:36	17.9	730.40	10.94	5.47	12:45 Versuch abgeschlossen.						
5	10:15	15.7	624.25	117.09	5.69							
"	11:55	16.9	621.16	120.18	1.85							

An CO_2 wurden im Kaligefäß 645·44 *ccm*, in der Nährlösung 11·82 *ccm* gefunden. Sauerstoff wurde im Verlauf der Untersuchung in den Apparat 916·48 *ccm* eingeführt.

Die Bilanz des Gaswechsels stellt sich folgendermaßen dar:

	CO_2	O_2	H_2	N_2	Zusammen
Eingeführt	0·31	1077·85	—	609·31	1687·47 <i>ccm</i>
Gefunden	752·55	0·35	6·52	604·97	1364·39 „
Differenz \pm	+752·24	-1077·50	+6·52	-4·34	-323·08 <i>ccm</i>

In der Kultur wurden 5·9 *mg* = 4·07 *ccm* Stickstoff gefunden.

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·70.$$

Versuch V. In den Apparat wurden 150 *ccm* Mannitnährlösung (2% Mannit, 0·1% CaCO_3 und 0·05% K_2HPO_4) eingeführt, zu ihrer Infizierung wurden 3 *g* pasteurisierte Erde und eine reine Azotobakterkultur genommen. Der Versuch dauerte 25 Tage lang. Das im Apparat eingeschlossene Gasvolum betrug am Anfang 742·03 *ccm*, am Ende des Versuchs 714·07 *ccm*. An Sauerstoff wurden in den Apparat 399·13 *ccm* eingeleitet. Am Ende des Versuches war das Gasgemisch im Apparat folgendermaßen zusammengesetzt:

$$\begin{array}{ll} \text{CO}_2 - 0·367\% & \text{H}_2 - 1·157\% \\ \text{O}_2 - 17·564\% & \text{N}_2 - 80·912\% \end{array}$$

Im KOH-Gefäß wurden 523·93 *ccm*, in der Nährlösung 0·44 *ccm* gebundene CO_2 gefunden. Somit wird die Bilanz des Gaswechsels bei diesem Versuche folgenderweise ausfallen:

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Eingeführt	0·30	554·43	—	586·43
Gefunden	526·99	125·42	8·26	577·77
Differenz \pm	+526·69	-429·01	+8·26	-8·66

In der Nährlösung wurden an gebundenem Stickstoff 13·56 *mg* = 10·85 *ccm* gefunden. Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1·23$.

Aus diesen beiden Versuchen würde hervorgehen, daß, wenn man neben Azotobakter in die Nährlösung pasteurisierte Erde einführt, d. h. wenn man aus der Kultur andere Bakterien, die keine Sporen bilden, entfernt, man auch in diesem Falle ebensogroße Stickstoffzuwächse erhält wie in Rohkulturen. Hier wie dort be-

obachtet man Wasserstoffausscheidung. In dem letzteren Versuche beobachten wir jedoch trotz eines geringeren Sauerstoffverbrauchs eine viel energischere Stickstoffbindung als im vorhergehenden, wozu viele aus der Zusammensetzung der Nährlösung resultierende Ursachen beitragen könnten. Im letzten Versuche wurde zur Infizierung der Nährlösung etwas mehr Erde verwendet und in dieselbe überdies noch 0.15 g CaCO_3 eingeführt. Es würde sich also in erster Linie die Frage ergeben, ob hier nicht die größere Menge der verwendeten Erde eine Rolle gespielt habe.

3. Versuche mit Rohkulturen ohne Erdezusatz.

In dieser Versuchsserie wurde die Infizierung der Nährlösung nicht mit Erde, sondern mit einem winzigen Teil der Haut vorgenommen, die sich bei der Entwicklung der Organismen auf der Oberfläche des mit frischer Erde geimpften Nährbodens bildet.

Versuch VI und VII. Es wurden gleichzeitig zwei Apparate zusammengestellt, welche 839.58, resp. 742.05 *ccm* Luft faßten. In beiden Apparaten befanden sich je 100 *ccm* Nährlösung, welche 2% Mannit, sowie 0.05% CaCO_3 und K_2HPO_4 enthielt. Diese Nährlösungen wurden mit der Haut einer Rohkultur infiziert. Der Verlauf der Versuche ist aus Tab. VI ersichtlich.

(Siehe Tab. VI, Seite 960).

Aus dieser Tabelle ersehen wir, wie schwach überhaupt der Verlauf der Atmung in beiden Versuchen gewesen ist. Im Verlauf von 19 Tagen wurden dem Apparat I (Vers. VI) kaum 66.71 *ccm*, dem zweiten 242.54 *ccm* Sauerstoff zugeführt. Als nach Verlauf von 19 Tagen die Apparate auseinandergenommen wurden, betragen die in ihnen befindlichen Gasvolumina 839.48, bzw. 644.56 *ccm*. Die den Apparaten unmittelbar vor Beendigung der Versuche entnommenen Gasproben zeigten folgende Zusammensetzung:

	Vers. VI	Vers. VII
CO_2	0.666%	0.777%
O_2	14.666 „	7.764 „
H_2	5.268 „	0.587 „
N_2	79.400 „	90.872 „

Im Kaligefäß und in der Nährlösung wurden im ersten Apparat 217.21 *ccm*, im zweiten 365.01 *ccm* CO_2 gefunden.

TABELLE VI.

Datum	Uhr	t°	Versuch VI			Versuch VII		
			Luftvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Gasvolumen- minderung im Apparate in <i>ccm</i>	Volumenmin- derung pro Stunde	Luftvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Gasvolumen- minderung im Apparate in <i>ccm</i>	Volumenmin- derung pro Stunde
28/I	1-30	17-95	839 58	—	—	742 05	—	—
1/II	9-—	16-2	822 59	16 99	0 19	733 41	8 64	0 09
2	3-15	17 55	817 14	22 44	0 18	728 35	13 70	0 17
3	4-20	16-8	812 59	26 99	0 18	721 56	20 49	0 27
4	9-55	16-5	809 37	30 21	0 18	712 00	30 05	0 54
5	9 40	16-9	804 86	34 72	0 19	693 24	48 81	0 79
6	11-—	16-8	799 91	39 67	0 19	670 73	71 32	0 88
7	9 40	16 0	793 53	46 05	0 28	650 76	91 29	0 88
8	10 45	13 5	789 62	49 96	0 16	633 17	108 88	0 73
„	1-—	15 0	790 35	49 23	—	632 14	109 61	0 32
„	3 45	14 6	836 65	—	—	747 46	—	—
9	11 30	13 8	853 17	3 48	0 17	718 39	29 07	1 47
10	4 35	14 7	851 23	5 42	0 07	680 60	66 86	1 30
13	12-—	16 9	846 24	10 41	0 07	620 87	126 59	0 88
15	10 10	13 7	841 49	15 16	0 10	676 15	—	—
16	9 25	12 6	839 78	16 87	0 07	646 35	29 80	1 28
„	11 30	15 4	839 48	17 17	0 14	644 56	31 59	0 90

Sauerstoff zugeführt 66 71 *ccm*Sauerstoff zugeführt 118 46 *ccm*Sauerstoff zugeführt 124 08 *ccm*

Die Bilanz der Gasänderung in beiden Apparaten wird also die folgende sein:

Versuch VI	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparat wurden zugeführt	0·34	242·43	—	663·52 <i>ccm</i>
Am Ende des Versuchs wurden gefunden	217·21	123·10	44·22	666·43 „
Die Differenzen be- trugen ±	+ 216·87	— 119·33	+ 44·22	+ 2·91 <i>ccm</i>
Versuch VII	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparat wurden zugeführt	0·30	397·85	—	586·44 <i>ccm</i>
Am Ende des Versuchs wurden gefunden	365·01	51·05	3·78	584·19 „
Die Differenzen betru- gen ±	+ 364·71	— 346·80	+ 3·78	— 2·25 <i>ccm</i>

Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ für Apparat I — 1·81, für II — 1·05.

Die in den Kulturen gefundenen Stickstoffzuwächse betragen im Apparat I — 2·87 *mg*, im Apparat II — 4·76 *mg*.

In diesen beiden Versuchen waren die Stickstoffzuwächse unvergleichlich geringer, als in den Versuchen der ersten Serien, wo zur Infizierung der Nährlösungen Erde verwendet wurde. Da nun hier die Nährlösungen mit den Mikroorganismen der Haut infiziert wurden, die sich auf mit frischer Erde infizierten Nährlösungen gebildet hatte, so erscheint es wenig wahrscheinlich, daß der Grund für die Differenzen zwischen den Versuchsergebnissen dieser und der ersten Serie in der Qualität der sich hier wie dort entwickelnden Organismen liegen sollte, vielmehr müßte sie in der Zusammensetzung des Nährbodens zu suchen sein. Das hier der Nährlösung zugesetzte CaCO₃ scheint keine ausschlaggebende Rolle gespielt zu haben. In der ersten Versuchsserie wurde es gar nicht zugesetzt und trotzdem waren die Stickstoffzuwächse groß, in der zweiten Serie waren die Zuwächse ob mit oder ohne CaCO₃-Zusatz die gleichen, endlich finden wir in der letzten Serie trotz Zugabe von CaCO₃ die Stickstoffzuwächse gering. Andererseits unterscheiden sich die Nährlösungen der ersten von denen der letzten

Serie durch die An-, resp. Abwesenheit von Erde, und doch mußte, wie aus der vorhergehenden Serie zu schließen wäre, nicht nur die Anwesenheit derselben, sondern auch ihre Menge auf die Stickstoffbindung einen Einfluß ausüben. So mußte denn genauer untersucht werden, ob und welchen Einfluß die Anwesenheit von Erde allein, ohne Rücksicht auf die sonstigen, in der Nährlösung vorhandenen Mikroorganismen auf die Entwicklung, die Atmung des Azotobakters und schließlich auf seine Stickstoffbindungsfähigkeit hat. Der Lösung dieser Aufgabe waren eben die beiden folgenden Versuchsserien gewidmet, die an Reinkulturen von Azotobakter angestellt wurden; die eine derselben umfaßt die Versuche, in denen der Nährlösung keine Erde zugesetzt wurde, in der anderen dagegen wurde Erde hinzugefügt, sie wurde jedoch vorher durch sorgfältige Sterilisation von jeglichen Mikroben befreit.

An erster Stelle wurden Versuche mit reinen Azotobakterkulturen ohne Zusatz von Erde vorgenommen.

4. Versuche mit Reinkulturen ohne Erdezusatz.

In dieser Serie bedienten wir uns zum ersten Male der von Prof. Godlewski etwas abgeänderten Apparate. Die bisher benutzten hatten nämlich den Fehler, daß sie die Anwendung größerer Kaligefäßchen nicht gestatteten. In den Versuchen mit Rohkulturen mußten diese Gefäße aus diesem Grunde von Zeit zu Zeit umgewechselt werden, da sonst bei längerem Stehen im Apparate die Kohlensäureabsorption infolge der vollständigen Sättigung der geringen Mengen von Kalihydrat gänzlich hätte aufhören müssen. Aus diesem Grunde konnte man sich auch ohne Wechsel der Kaligefäße keinen genauen Begriff von der Sauerstoffabsorption machen, andererseits dürfte auch die CO_2 -Ansammlung in dem Gasgemisch der Apparate nicht ohne Einfluß auf die Entwicklung der Kulturen gewesen sein. Der von Zeit zu Zeit bei den Versuchen mit Rohkulturen vorgenommene Wechsel der Gefäßchen bot ja sonst keine Schwierigkeiten, die Infizierung von außen her konnte in diesen Fällen keine Bedeutung haben. Anders bei Reinkulturen: hier versteht es sich von selber, daß ihre Infizierung mit fremden Organismen gänzlich ausgeschlossen werden mußte. Da nun ein Wechsel der Gefäßchen in den Apparaten ohne die Gefahr der Verunreinigung der Kulturen unmöglich war, so lag es nahe, durch Modifi-

kation der Apparate auf einmal größere Mengen von KOH in dieselben einzuführen. Sie bestehen (Fig. 2) im wesentlichen aus einer mäßig großen, flachen Glasglocke A, welche an eine runde Glasplatte B möglichst genau angeschliffen ist.

Ebenso wie der Helm der bisher benutzten Apparate ist die Glocke mit Röhren versehen, von denen jedoch die eine sich nicht

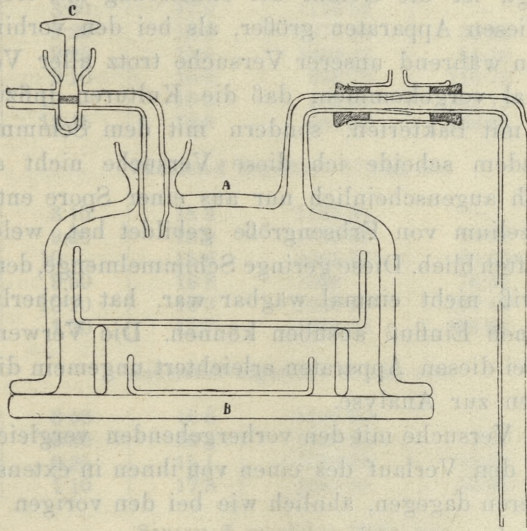


Fig. 2.

verjüngt und zugeschmolzen ist, sondern von einem mit Quecksilber gedichteten Glashahn (C) geschlossen wird. Obgleich diese Apparate eine Infizierung der Kulturen während des Versuches von außen verhüten, können sie selber eine Infizierung herbeiführen, falls sie nicht gehörig sterilisiert sind, was mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist. Ich habe die Sterilisierung derart vorgenommen, daß ich die Apparate möglichst sorgfältig mit Sublimat, Alkohol etc. ausgewaschen und sie schließlich mit einer Bunsenflamme durchgestreift habe. Nach der Zusammenstellung des Apparates wurde die Glocke über der Glasplatte ein wenig emporgehoben, und zwei auf einem Untersatz ruhende flache Gefäßchen, das eine mit der zusammen mit dem Gefäß sterilisierten Nährlösung, das andere unter den Untersatz mit konz. Kalilauge hineingeschoben. Nach Infizierung der Nährlösung mit einem ausgeglühten Platin-

draht wurde die Glasglocke, deren Rand mit Vaseline bestrichen war, auf die Platte aufgedrückt und die Verbindungsstelle von Glocke und Platte mit einem Gummiring dicht gemacht. Zum Zwecke einer noch sichereren Dichtung des Apparates kann man seinen unteren Teil noch in Wasser tauchen, obgleich sich diese Maßnahme bei meinen Versuchen als überflüssig erwiesen hat¹⁾.

Wie gesagt, ist die Gefahr der Infizierung mit fremden Organismen bei diesen Apparaten größer, als bei den vorhin benutzten. So ist es denn während unserer Versuche trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zweimal vorgekommen, daß die Kulturen infiziert wurden, jedoch nicht mit Bakterien, sondern mit dem Schimmelpilz *Penicillium*. Trotzdem scheidet ich diese Versuche nicht aus, da der Schimmel sich augenscheinlich nur aus einer Spore entwickelt und nur ein Mycelium von Erbsengröße gebildet hat, welches an der Oberfläche haften blieb. Diese geringe Schimmelmengung, deren Trockensubstanz gewiß nicht einmal wägbare war, hat sicherlich auf die Resultate keinen Einfluß ausüben können. Die Verwendung eines Glashahnes bei diesen Apparaten erleichtert ungemein die Entnahme von Gasproben zur Analyse.

Um diese Versuche mit den vorhergehenden vergleichen zu können, will ich den Verlauf des einen von ihnen in extenso anführen, von den anderen dagegen, ähnlich wie bei den vorigen Serien, nur die Endergebnisse verzeichnen.

Versuch VIII. Am 19/II. 1907 wurde der Apparat zusammengestellt, indem unter die Glocke ein Gefäß mit 100 ccm Nährlösung gebracht wurde, die mit Azotobakterreinkultur infiziert war und 1½% Glukose, sowie 0·05% K₂HPO₄ nebst 0·014 g Ca(NO₃)₂ = 2·5 mg N₂ enthielt. Zwecks Absorption von CO₂ wurde in den Apparat das Kaligefäß mit 25 ccm KOH eingestellt. Der Versuch hatte eine Dauer von 69 Tagen. Die Sauerstoffaufnahme vollzog sich nur langsam, wie aus der Zusammenstellung in Tab. VII ersichtlich ist. Im Verlauf des Versuches wurden dem Apparat 540·92 ccm Sauerstoff zugeführt.

¹⁾ Eines ähnlich konstruierten Apparates hat sich kürzlich H. Schröder (Jahrb. f. wissensch. Botanik, B. 44, 1907, S. 415) bedient, doch nur zu dem ursprünglich von Wolkow u. Meyer beabsichtigten Zwecke, den absorbierten Sauerstoff zu bestimmen. Selbstredend kann man die spezielle Bestimmung von CO₂ nur bis zu einem gewissen Grade mit der Menge des verbrauchten Sauerstoffs vergleichen.

TABELLE VII.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparate in ccm	Gasvolumver- minderung im Apparate in ccm	Volumvermin- derung pro Stunde
Tag	Uhr				
19/II	3:30	17.6	1116.52	—	—
24	9:20	16.6	1077.29	39.23	0.34
1/III	9:25	15.6	1032.42	84.10	0.37
6	9:10	15.6	996.73	119.79	0.30
11	10—	16.9	963.81	152.71	0.27
12	12:45	18.8	954.27	162.25	0.35
Sauerstoff zugeführt 172.45 ccm					
"	3:15	18.9	1125.36	—	—
13	9:20	18.0	1115.35	10.01	0.56
18	10—	15.6	1064.73	60.63	0.42
19	9:50	16.8	1049—	76.36	0.65
23	10:10	16.3	1021.96	103.40	0.28
"	1:20	17.7	1021.53	103.83	0.14
Sauerstoff zugeführt 101.48 ccm					
"	3:50	16.6	1122.90	—	—
"	6:30	16.4	1120.20	2.70	1.01
26	9:25	15.1	1089.39	33.51	0.50
"	1:10	17.3	1086.95	35.95	0.65
Sauerstoff zugeführt 70.54 ccm					
"	3:10	18.2	1156.14	—	—
"	6:40	18.7	1153.02	3.12	0.89
30	9—	16.5	1104.25	51.89	0.56
"	11—	17.4	1104.18	51.96	0.04
Sauerstoff zugeführt 40.02 ccm					
"	1:15	17.8	1142.81	—	—
"	3:15	17.4	1141.43	1.38	0.69
2/IV	9:15	19.4	1105.23	37.58	0.55
7	10:25	17.3	1060.75	82.06	0.37
10	9:40	16.4	1040.14	102.67	0.29
15	8:40	15.6	1008.77	134.04	0.26
20	8:40	15.0	978.47	164.34	0.25
"	12:40	15.8	978.23	164.58	0.06
Sauerstoff zugeführt 156.43 ccm					
"	6—	15.0	1132.98	—	—
21	3:15	15.2	1126.09	6.89	0.32
26	11:5	19.6	1087.84	45.14	0.33
28	10:45	18.7	1079.28	53.70	0.18
29	10:30	17.3	1068.92	64.06	0.43
"	—	—	1068.55	64.43	—

Die Analysen des dem Apparate am Ende des Versuches entnommenen Gasgemisches ergaben folgende Resultate:

TABELLE VIII.

Reduzierte Gasvolumina in den Eudiometern in *ccm*.

I. Portion		II. Portion	
	Mittelzahlen		Mittelzahlen
31·624		29·339	
31·681	31·655 <i>ccm</i>	29·402	29·356 <i>ccm</i>
31·660		29·327	
Nach der Explosion		Nach CO ₂ -Absorption	
31·615		29·318	
31·604	31·614 <i>ccm</i>	29·315	29·313 <i>ccm</i>
31·649		29·335	
31·589		29·283	
Nach CO ₂ -Absorption		Nach O ₂ -Absorption	
31·539		24·183	
31·552		24·203	
31·536	31·527 <i>ccm</i>	24·202	
31·495		24·158	24·184 <i>ccm</i>
31·515		24·170	
Nach O ₂ -Absorption			
26·078		24·209	
26·098		24·179	
26·061		24·166	
26·080	26·085 <i>ccm</i>		
26·110			
26·085			

	I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂	0·275%	0·146%	0·211%
O ₂	17·191 „	17·472 „	17·332 „
H ₂	—	—	—
N ₂	82·534 „	82·382 „	82·457 „

Wir führen hier alle Ablesungen der Gasvolumina in den Eudio-

metern an, da wir das erstmal keinen Wasserstoff in der Umgebung der Kultur gefunden haben.

Um CO_2 zu bestimmen, wurde der Inhalt des Kaligefäßes in einen 250 *ccm* fassenden Kolben gespült, dieser bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung in 50 *ccm*-Portionen (je $\frac{1}{5}$ des Ganzen) als BaCO_3 gefällt. Aus zwei Bestimmungen wurde das Mittel gezogen, welches mit 5 multipliziert die Menge des aus dem Gesamtquantum der KOH-Lösung gefällten BaCO_3 ergibt. So wurden in zwei Portionen 1·2478, bzw. 1·2328 *g* BaCO_3 , im Mittel 1·2403 *g* oder insgesamt ($\times 5$) 6·2015 *g* BaCO_3 erhalten. Nach Abzug der ursprünglichen Verunreinigung der Kalilauge mit Kaliumkarbonat verbleiben 5·2486 *g* BaCO_3 , was einer Gewichtsmenge von 1·1723 *g*, oder einer Volumenmenge von 596·58 *ccm* CO_2 entspricht. In der Nährlösung waren 0·17 *ccm* CO_2 gelöst.

Die Bilanz des Gasaustausches im Apparat sieht demnach folgendermaßen aus. Es wurden:

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0·47	774·61	—	882·39 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	598·90	185·31	—	881·10 „
Differenz \pm	+ 598·43	— 588·70	—	— 1·29 <i>ccm</i>

In der Nährlösung wurde eine Stickstoffzunahme von 1·98 *mg* = 1·58 *ccm* gefunden.

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.02.$$

Versuch IX wurde in derselben Weise und mit derselben Nährlösung ausgeführt, wie der vorhergehende. Die Dauer des Versuches erstreckte sich auch hier auf 69 Tage. Das Gasvolumen im Apparate betrug am Anfang des Versuches 881·06 *ccm*. An Sauerstoff wurden 428·85 *ccm* in den Apparat eingeführt. Das Gasvolumen am Ende des Versuches belief sich auf 696·77 *ccm*. Die Analysen der am Ende des Versuches dem Apparat entnommenen Gasproben ergaben folgende Resultate:

(Siehe Tab. IX, Seite 968).

Auf Grund dieser Ergebnisse war die Zusammensetzung der im Apparat eingeschlossenen Gase folgend:

CO_2 — 0·091%	H_2 — 0·0 %
O_2 — 0·173 „	N_2 — 99·736 „

9*

TABELLE IX.

Reduzierte Gasvolumina in den Eudiometern in *ccm*.

I. Portion		II. Portion	
	Mittelzahlen		Mittelzahlen
28-867		15-996	
28-817	28-832 <i>ccm</i>	16-013	16-002 <i>ccm</i>
28-813		15-996	
Nach O ₂ -Zugabe		Nach CO ₂ -Absorption	
32-956		16-005	
32-993	32-965 <i>ccm</i>	15-986	15-985 <i>ccm</i>
32-945		15-968	
Nach der Explosion		15-980	
32-977		Nach O ₂ -Absorption	
32-955	32-961 <i>ccm</i>	15-959	
32-952		15-940	
Nach CO ₂ -Absorption		15-941	
32-959		15-950	
32-941	32-939 <i>ccm</i>	15-942	15-949 <i>ccm</i>
32-916		15-954	
Nach O ₂ -Absorption		15-956	
28-811		15-946	
28-783	28-797 <i>ccm</i>		

In der KOH-Lösung wurden 1.2312 g = 626.55 *ccm* CO₂, in der Nährlösung 0.08 *ccm* absorbiert gefunden.

Die Bilanz des Gasaustausches wird somit in diesem Versuche, wie folgt, sich gestalten: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂	
Dem Apparate zugeführt:	0.35	613.26	—	696.30	<i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	627.27	1.20	—	694.93	"
Differenz ±	+ 626.92	- 612.06	—	- 1.37	<i>ccm</i>
Quotient $\frac{CO_2}{O_2} =$	1.02.				

In der Nährlösung wurde eine Stickstoffzunahme von 1.27 mg = 1.02 *ccm* gefunden.

Versuch X. Der Apparat wurde mit 100 *ccm* Nährlösung, welche 1½% Mannit, 0.05% K_2HPO_4 und 0.014 $Ca(NO_3)_2 = 2.5 \text{ mg } N_2$ enthielt, beschickt. Der Versuch dauerte 51 Tage. Das Gasvolum im Apparat betrug am Anfang des Versuchs 985.23 *ccm*. An Sauerstoff wurden 862.00 *ccm* zugeleitet. Das Gasvolumen am Ende des Versuches war = 903.92 *ccm*.

Die endgültige Gaszusammensetzung im Apparate war die folgende:

CO_2 — 0.298%	H_2 — 0.0 %
O_2 — 13.514 „	N_2 — 86.188 „

In der Kalilauge waren 1.7796 *g* = 905.64 *ccm* CO_2 absorbiert, in der Nährlösung 0.27 *ccm* gelöst.

Somit stellt sich die Bilanz des Gasaustausches während des Versuches wie folgt. Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0.40	1068.20	—	778.63 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	908.89	122.16	—	779.07 „
Differenz ±	+ 908.49	— 946.04	—	+ 0.44 <i>ccm</i>

In der Nährlösung fand man einen Stickstoffzuwachs von 1.07 *mg* = 0.85 *ccm*.

Versuch XI. Am 26/II. 1907 wurde der Apparat mit 100 *ccm* Nährlösung beschickt, welche 1.5% Glukose, 0.05% K_2HPO_4 und 0.012 *g* $Ca(NO_3)_2 = 2 \text{ mg } N$ enthielt. Der Versuch dauerte 31 Tage. Das Gasvolum im Apparate betrug am Anfang des Versuches 334.41 *ccm*, an Sauerstoff wurden 99.38 *ccm* zugeführt. Das Gasvolumen am Ende des Versuches war = 265.56 *ccm*. Die Zusammensetzung des Gasgemisches am Ende des Versuches war die folgende:

CO_2 — 0.505%	H_2 — 0.0 %
O_2 — 0.0 „	N_2 — 99.495 „

Die KOH-Lösung hatte 180.39 *ccm* CO_2 absorbiert. Die Bilanz des Gaswechsels war:

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0.13	179.37	—	264.29 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	181.73	—	—	164.22 „
Differenz ±	+ 181.60	— 179.37	—	— 0.07 <i>ccm</i>

Quotient $\frac{CO_2}{O_2} = 1.01$.

In der Nährlösung wurde eine Stickstoffzunahme von $0.28 \text{ mg} = 0.20 \text{ ccm}$ gefunden.

Versuch XII. Am 1/VI. 1907 wurde der Apparat mit 100 ccm Nährlösung beschickt, welcher 1.5% Mannit und 0.05% K_2HPO_4 zugesetzt waren. Der Versuch dauerte 48 Tage. Das Gasvolumen im Apparate betrug am Anfang des Versuches 422.05 ccm , das Volumen des zugeführten Sauerstoffs 111.18 ccm , das Gasvolumen am Ende des Versuches 382.36 ccm . Die Zusammensetzung der Gase am Ende des Versuches war:

CO_2 — 0.593%	H_2 — 0.0%
O_2 — 12.184%	N_2 — 87.323%

In der Kalilauge waren 148.60 ccm , in der Nährlösung 0.44 ccm CO_2 absorbiert.

Somit stellt sich die Bilanz des Gaswechsels wie folgt: Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0.17	199.52	—	333.54 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden: . . .	151.31	46.59	—	333.51 "
Differenz \pm	$+ 151.14$	$- 152.93$	—	$- 0.03 \text{ ccm}$

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0.99.$$

In der Nährlösung wurde eine Zunahme von $0.03 \text{ mg} = 0.02 \text{ ccm}$ Stickstoff gefunden.

In allen diesen Versuchen fand, wie aus der obigen Darstellung ersichtlich, durchwegs keine Wasserstoffentwicklung statt, obgleich die Menge der ausgeschiedenen Kohlensäure z. T. 900 ccm überstieg. Die Zuwächse an Stickstoff sind überall sehr gering, und zwar ohne Rücksicht darauf, ob die Nährlösung Mannit oder Glukose enthielt, ob man ihr gebundenen Stickstoff in kleinen Mengen zusetzte, oder nicht. Der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ betrug fast durchwegs zirka 1; etwas größer war er in den Versuchen mit glukosehaltigem Nährstoff, etwas kleiner in den mit Mannitnährlösung angestellten Versuchen.

5. Versuche mit reinen Azotobakterkulturen in Nährlösungen, die mit sterilisierter Erde versetzt waren.

Versuch XIII. Der Apparat wurde mit 100 ccm Nährlösung beschickt, welche 2% Mannit und 0.05 g K_2HPO_4 enthielt. Dieser

Nährlösung wurde 1 g im Autoklav unter einem Überdruck von 2 Atmosphären sterilisierte Erde zugesetzt. Zur Infizierung wurde eine reine Azotobakterkultur verwendet, welche in einer 40-tägigen Kultur auf einer Agarplatte bereits braun geworden war. Der Versuch wurde nach 20 Tagen beendet. Seinen Verlauf zeigt Tab. X.

(Siehe Tab. X, Seite 972).

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, fand der Atmungsprozeß der Kultur so energisch statt, daß im Laufe des Versuches nicht weniger als 8 mal dem Apparate Sauerstoff zugeführt werden mußte.

Vor der Auseinandernahme des Apparates wurden ihm zwei Gasproben zur eudiometrischen Analyse entnommen, deren Ergebnisse in Tab. XI verzeichnet sind.

(Siehe Tab. XI, Seite 973).

Nach diesen Analysen war die Zusammensetzung der Gase in den Apparaten am Ende des Versuches folgend:

	I. Portion	II. Portion	im Mittel
CO ₂	9·526%	9·690%	9·608%
O ₂	0·360 "	0·170 "	0·265 "
H ₂	—	—	—
N ₂	90·114 "	90·140 "	90·127 "

Im Kaligefäß wurde an gebundenem CO₂ 775·72 ccm gefunden, in der Nährlösung 8·05 ccm berechnet. Im Laufe des Versuches wurden dem Apparate 932·96 ccm Sauerstoff zugeführt. Somit stellt sich die Bilanz des Gaswechsels folgendermaßen dar: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
dem Apparate zugeführt:	0·35	1117·29	—	696·03 ccm
am Schluß gefunden: . .	857·57	2·04	—	692·28 "
Differenz ±	+ 857·22	- 1115·25	—	- 3·75 ccm

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·77.$$

In der Nährlösung betrug der Stickstoffzuwachs 4·7 mg = 3·76 ccm.

Versuch XIV. Am 22/II 1907 wurde der Apparat in derselben Weise wie vorher zusammengestellt, nur mit dem Unterschiede, daß der Nährlösung nicht 1 g sondern 3 g sterilisierte Erde zugesetzt wurden. Dauer des Versuches 25 Tage. Das Gasvolumen im Apparate betrug am Anfang des Versuches 663·58 ccm.

Tabelle X.

Datum		t ^o	Luftvolumen im Apparate in ccm	Volumenver- minderung seit der Zu- führung des Sauerstoffes in ccm	Volumvermin- derung pro Stunde
Tag	Uhr				
22/XII	5:30	15.5	881.16	—	—
23	6:30	16.3	881.17	—	—
25	4:15	11.6	875.28	5.89	0.12
30	7:—	17.0	851.52	29.65	0.19
31	12:—	18.7	829.82	51.35	1.28
1/I	1:15	14.3	759.39	121.78	2.79
2	10:30	13.3	713.75	167.42	2.15
"	12:—	—	711.98	169.19	1.18
Sauerstoff zugeführt 148.92 ccm					
"	1:15	14.9	858.05	—	—
"	4:—	15.0	851.—	7.05	2.56
3	11:—	15.1	777.14	80.91	3.89
"	12:—	16.8	776.—	82.05	1.14
Sauerstoff zugeführt 73.04 ccm					
"	1:25	17.8	844.80	—	—
"	4:10	18.0	834.20	10.60	3.86
4	10:20	15.4	740.46	104.34	5.16
"	12:20	17.3	733.29	111.51	3.59
Sauerstoff zugeführt 119.36 ccm					
"	1:36	17.8	846.24	—	—
"	3:36	17.9	835.22	11.02	5.51
5	10:15	15.7	736.46	109.78	5.30
"	11:55	16.9	731.06	115.18	3.24
Sauerstoff zugeführt 132.48 ccm					
"	1:23	17.6	855.82	—	—
"	3:35	17.8	842.03	13.79	6.27
6	10:50	16.2	734.19	121.63	5.60
"	12:—	17.0	731.67	124.15	2.16
Sauerstoff zugeführt 121.55 ccm					
"	1:20	17.5	846.06	—	—
"	3:20	16.9	833.18	12.88	6.44
7	10:45	16.6	730.50	115.56	5.29
"	12:22	18.3	725.29	120.77	2.61
Sauerstoff zugeführt 133.22 ccm					
"	1:30	18.2	852.46	—	—
"	3:50	17.7	837.44	15.02	6.44
8	10:40	17.5	734.68	117.78	5.46
"	11:45	17.8	732.35	120.11	2.15
Sauerstoff zugeführt 128.26 ccm					
"	1:20	18.2	855.66	—	—
"	4:51	17.8	846.56	9.10	3.31
9	11:30	18.2	796.74	58.92	2.57
"	2:55	18.0	787.78	67.88	2.62
"	4:30	17.9	785.05	70.61	1.72
Sauerstoff zugeführt 76.13 ccm					
"	5:50	18.1	858.16	—	—
10	11:—	17.3	811.90	42.26	2.69
11	10:45	15.9	768.12	90.04	1.84

Tabelle XI.
Reduzierte Gasvolumina in den Eudiometern.

I. Portion		II. Portion	
	Mittelzahlen		Mittelzahlen
31-050		27-633	
31-105	31-084 ccm	27-637	27-636 ccm
31-097		27-639	
Nach der Explosion		Nach CO ₂ -Absorption	
31-052		25-004	
31-065		24-959	
31-037	31-063 ccm	24-923	24-958 ccm
31-099		24-944	
Nach O ₂ -Zugabe		Nach O ₂ -Zugabe	
33-318		28-428	
33-339	33-329 ccm	28-429	28-452 ccm
Nach der Explosion		28-448	
33-320		Nach der Explosion	
33-382	33-351 ccm	28-506	28-487 ccm
Nach CO ₂ -Absorption		28-467	
30-452		Nach O ₂ -Absorption	
30-328	30-390 ccm	24-945	24-945 ccm
Nach O ₂ -Absorption			
27-998			
28-021			
27-991	28-010 ccm		
28-031			

Im Laufe des Versuches wurden an Sauerstoff 696-63 ccm zugeführt. Das Gasvolumen am Ende des Versuches betrug 521-86 ccm. Die Zusammensetzung der Gase im Apparate am Ende des Versuches war:

CO₂ — 0-816% H₂ — ——— %
O₂ — ——— % N₂ — 99-184 %

Im Kaligefäß wurden 714-50 ccm, in der Nährlösung 0-55 ccm CO₂ gefunden.

Die Bilanz des Gaswechsels verhält sich somit folgendermaßen:

Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂	
dem Apparate zugeführt:	0·27	835·51	—	524·43	<i>ccm</i>
am Schluß gefunden . . .	719·31	—	—	517·62	<i>„</i>
Differenz:	+ 719·04	— 835·51	—	— 6·81	<i>„</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·86.$$

In der Nährlösung war die Stickstoffzunahme 7·68 *mg* = 6·18 *ccm*.

Versuch XV. Am 27/IV. 1907 wurde der Apparat mit 150 *ccm* Nährlösung beschickt, welche 1·5% Mannit, 0·05 K₂HPO₄ und 3 *g* sterilisierte Erde enthält. Der Versuch dauerte 14 Tage, während welcher Zeit dem Apparat 851·83 *ccm* Sauerstoff zugeführt wurden. Das Gasvolumen im Apparate betrug am Anfang des Versuches 779·09 *ccm*, am Ende 720·96 *ccm*.

Die Zusammensetzung der Gase im Apparate am Ende des Versuches war:

CO ₂ — 12·832%	H ₂ — — %
O ₂ — 1·822 <i>„</i>	N ₂ — 85·346 <i>„</i>

Im Kaligefäß wurde an gebundenem CO₂ 684·73 *ccm* gefunden, in der Nährlösung 14·71 *ccm* berechnet.

Die Bilanz des Gaswechsels stellt sich somit folgendermaßen:

Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂	
dem Apparate zugeführt:	0·31	1015·45	—	617·83	<i>ccm</i>
am Schluß gefunden: . . .	791·95	13·14	—	615·31	<i>„</i>
Differenz ¹⁾ ±	+ 791·64	— 1002·31	—	— 2·52	<i>ccm</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·79.$$

In der Nährlösung betrug die Stickstoffzunahme 6·93 *mg* = 5·54 *ccm*.

Versuch XVI. Am 8/V. 1907 wurde der Apparat mit 100 *ccm*

¹⁾ Hier muß ein Fehler unterlaufen sein, in dessen Folge die Analyse eine nur verhältnismäßig geringe Absorption des atmosphärischen Stickstoffs aufweist. Hätte man den Versuch schon am 8. V. abgebrochen, wo das Gasvolumen im Apparate 614·25 *ccm* betrug, so würde seine Abnahme im Vergleich mit seiner ursprünglichen Menge im Gasgemisch des Apparates bereits 3·58 *ccm* betragen haben.

Nährlösung beschickt, welche 1.5 g Glukose, 0.05 g K_2HPO_4 und 3 g sterilisierte Erde enthält. Die Dauer des Versuchs betrug 10 Tage, in deren Verlauf dem Apparat 621.25 ccm Sauerstoff zugeführt wurden. Das Gasvolumen im Apparat belief sich am Anfang des Versuches auf 1081.41 ccm, am Ende auf 923.32 ccm. Die Zusammensetzung der Gase im Apparate am Ende des Versuches war:

CO_2 — 0.363%	H_2 — — %
O_2 — 7.658 „	N_2 — 91.979 „

Im Kaligefäß wurden 770.38 ccm, in der Nährlösung 0.26 ccm CO_2 gefunden.

Die Bilanz des Gaswechsels verhält sich demnach folgendermaßen. Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
dem Apparat zugeführt:	0.43	847.59	—	854.64 ccm
am Schluß gefunden:	773.99	70.71	—	849.26 „
Differenz ±	+ 773.56	— 776.86	—	— 5.38 ccm

$$\text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = 0.995.$$

In der Nährlösung waren 7.81 mg = 6.25 ccm Stickstoff gebunden.

Versuch XVII. Am 14/V. 1907 wurde der Apparat mit 150 ccm Nährlösung beschickt, welche 1½% Mannit, 0.05% K_2HPO_4 und 1.5 g sterilisierte Erde enthält. Der Versuch dauerte 9 Tage lang, während welcher Zeit dem Apparat 362.85 ccm Sauerstoff zugeführt wurden. Das Anfangsvolumen der Gase im Apparat betrug 778.48 ccm, das Endvolumen 628.44. Ihre Zusammensetzung am Ende des Versuches war folgend:

CO_2 — 0.370%	H_2 — — %
O_2 — 2.106 „	N_2 — 97.524 „

Im Kaligefäß waren 481.75 ccm, in der Nährlösung 0.37 ccm CO_2 aufgelöst.

Die Bilanz des Gaswechsels war: Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
dem Apparate zugeführt:	0.31	525.79	—	615.23 ccm
am Schluß gefunden:	484.46	13.23	—	612.87 „
Differenz ±	484.15	— 512.56	—	— 2.36 ccm

$$\text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = 0.94.$$

In der Nährlösung waren an gebundenem Stickstoff vorhanden $6.48 \text{ mg} = 5.18 \text{ ccm}$.

Aus allen diesen Versuchen der eben behandelten Serie geht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorhergehenden hervor, daß der Azotobakter während seiner Atmung überhaupt keinen Wasserstoff ausscheidet und daß der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ sich meistens der Einheit nähert, besonders wenn Glukose als Atmungs-material verwendet wird, daß er dagegen bei Mannit etwas kleiner ist. Jedoch finden wir im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorhergehenden Versuchsreihe, wo die Reinkulturen des Azotobakters ganz unbeträchtliche Mengen von Stickstoff gebunden hatten, daß hier die Stickstoffbindung an Menge der an den Rohkulturen beobachteten durchaus nicht nachsteht. Da nun der Unterschied zwischen den beiden letzten Versuchsserien nur darin bestand, daß in Serie IV die Nährlösungen überhaupt keinen Zusatz von Erde erhielten, während in Serie V den Nährlösungen stets eine gewisse Menge von sterilisierter Erde zugesetzt wurde, so kann es keinem Zweifel unterliegen, daß gerade dieser Zusatz von Erde die stärkere Bindung von Stickstoff seitens des Azotobakters verursacht hat.

Aus diesem Grunde sind wir berechtigt, den Schluß zu ziehen, daß die durch Infizierung der Nährlösungen mit Erde erhaltenen Rohkulturen nicht deswegen den Stickstoff energischer binden als die mit reinen Azotobakterkulturen infizierten, weil in ihnen neben dem Azotobakter noch andere Mikroorganismen emporwuchern, die auf irgendeine Weise die Stickstoffbindung begünstigen, sondern einfach dadurch, daß mit der den Nährlösungen zugesetzten Erde gewisse Substanzen in die Kulturen eingeführt werden, die die Entwicklung des Azotobakters und dessen Fähigkeit, Stickstoff zu binden, in erheblichem Maße fördern.

Nach Feststellung dieser Tatsache handelte es sich nunmehr darum zu konstatieren, welcher Bestandteil der Erde es sei, dem dieser oben erwähnte Einfluß zuzuschreiben wäre. Löhnis hat eine größere Ausgiebigkeit der Rohkulturen beobachtet, wenn er zur Nährlösung anstatt Wasser einen wässerigen Bodenextrakt genommen hat. Doch auch so hat er keine erheblicheren Stickstoffzuwächse in den Azotobakterreinkulturen erhalten, eine Erfahrung, die uns später in den Untersuchungen von N. K. Pillai wieder begegnet ist. Aus diesen könnte man also den Schluß ziehen, daß

nicht die in den wässrigen Extrakt übergehenden Erbestandteile, sondern andere Substanzen den günstigen Einfluß auf die Azotobakterentwicklung ausüben. Jedenfalls bezweckt die folgende Serie unserer Untersuchungen die Lösung der Frage, inwieweit der wässrige Bodenextrakt in der Nährlösung die Azotobakterentwicklung fördert.

6. Versuche mit Azotobakterreinkulturen in Nährlösungen mit wässrigem Bodenauszug.

Um einen wässrigen Auszug herzustellen, übergossen wir 30 g Erde in einem Kölbchen mit 50 *ccm* Wasser und erwärmten es 1½ Stunden lang, unter 1 Atm.-Druck. Nach dem Erkalten des Kölbchens wurde die Lösung filtriert und davon zur Nährlösung je 5 *ccm* genommen, was 3 g Erde entspricht, d. h. derjenigen Maximalmenge, die wir in den Untersuchungen der vorhergehenden Serie zur Nährlösung zugegeben haben. Auf ebendieselbe Weise haben später auch Löhnis und N. K. Pillai (7) den Auszug hergestellt.

Versuch XVIII. Am 24/IV. 1907 wurde der Apparat mit 150 *ccm* Nährlösung mit 1·5% Mannit- u. 0·05% K_2HPO_4 - Gehalt zusammengestellt. Zur Nährlösung wurden 5 *ccm* Auszug aus 3 gr Erde hinzugegeben und diese darauf mit Azotobakterreinkultur infiziert. Der Versuch dauerte 14 Tage, sein Verlauf ist in Tab. XII wiedergegeben.

(Siehe Tab. XII Seite 978).

Im Laufe des Versuches wurden dem Apparat 161·78 *ccm* O_2 zugeführt. Die Zusammensetzung der Gase im Apparate am Ende des Versuches war folgend:

CO_2	—	0361%
O_2	—	16·172 "
H_2	—	"
N_2	—	83·467 "

Im Kaligefäß wurden 180·68 *ccm* absorbiertes, in der Nährlösung 0·42 *ccm* gelöstes CO_2 gefunden.

Die Bilanz des Gaswechsels stellt sich also folgendermaßen dar:

Tabelle XII.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Luftvolum- verminderung in <i>ccm</i>	Volumvermin- derung pro Stunde
Tag	Uhr				
27/IV	12:50	18.2	669.83	—	—
28	10:45	17.5	668.10	1.73	0.08
29	10:30	17.0	665.95	3.88	0.09
30	9:15	19.1	659.80	10.03	0.27
1/V	9:20	19.3	640.82	29.01	0.80
2	9:—	18.0	621.76	48.07	0.66
"	12:15	19.9	620.26	49.57	0.46
Sauerstoff zugeführt 73.64 <i>ccm</i>					
"	3:15	19.9	692.03	—	—
"	6:45	19.8	689.64	2.39	0.68
3	8:50	18.5	677.29	14.74	0.88
4	10:30	18.7	661.62	30.41	0.61
5	9:15	19.1	648.03	44.—	0.60
6	10:50	19.8	632.15	59.88	0.62
7	8:50	20.5	618.99	73.04	0.60
8	9:45	21.5	603.01	89.02	0.64
"	12:—	22.5	601.85	90.18	0.04
Sauerstoff zugeführt 84.14 <i>ccm</i>					
"	3:20	22.3	687.14	—	—
"	5:20	22.6	685.34	1.80	0.90
9	10:16	22.2	671.34	15.60	0.82
10	10:10	22.3	652.28	34.86	0.80
11	9:—	21.8	636.11	51.03	0.70
"	10:30	22.1	635.34	51.80	0.52
"	11:40	—	634.74	52.40	0.51

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparate wurden zuge- führt:	0.27	301.98	—	529.36 <i>ccm</i>
Am Schluß wurden gefunden:	183.39	102.65	—	529.80 "
Differenz ±	+ 183.12	- 199.33	—	+ 0.44 <i>ccm</i>
Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} =$	0.92.			

In der Nährlösung wurde ein Stickstoffzuwachs von $0.98 \text{ mg} = 0.78 \text{ ccm}$ gefunden.

Versuch XIX. Am 8/V. 1907 wurde der Apparat mit 100 ccm Nährlösung beschickt, die 1.5 g Glukose, 0.05 g K_2HPO_4 und 5 ccm Bodenauszug aus 3 g Erde enthielt.

Der Versuch dauerte 10 Tage, während deren dem Apparat 87.27 ccm O_2 zugeführt wurden. Das Gasvolumen am Anfang des Versuches betrug 951.22 ccm , am Ende 925.53 ccm .

Die Zusammensetzung der Gase am Ende des Versuches war folgend:

CO_2 — 0.235%	H_2 — — $\%$
O_2 — $18.552 \text{ } "$	N_2 — $81.213 \text{ } "$

Im Kaligefäß wurden 121.17 ccm CO_2 absorbiert, in der Nährlösung 0.19 ccm gelöst gefunden. Die Bilanz des Gaswechsels gestaltet sich demnach folgendermaßen: Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0.38	286.36	—	751.75 <i>ccm</i>
Am Ende gefunden: . . .	123.53	171.71	—	751.65 <i>"</i>
Differenz \pm	$+123.15$	-114.65	—	-0.10 ccm

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.07.$$

In der Nährlösung befand sich $0.56 \text{ mg} = 0.45 \text{ ccm}$ Stickstoffzuwachs. Diese Untersuchungen bestätigen, daß der wässrige Auszug dem Azotobakter die Erde nicht zu ersetzen vermag, die Stickstoffzuwächse sind nämlich so unerheblich wie bei der Anwendung von reinem Wasser zur Nährlösung. Sonst blieb der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ derselbe wie in den vorhergehenden Versuchen, Wasserstoff wurde auch diesmal unter den Gasen im Apparate nicht konstatiert. Angesichts dessen wandte man sich zu einer anderen Komponente der Erde, nämlich zur Humussubstanz.

7. Versuche mit reinen Azotobakterkulturen in Nährlösungen mit Humussubstanzen.

Einen Humusauszug erhielt man aus Erde auf die Weise, daß man zur Erde, nach Durchwaschen mit stark verdünnter Salzsäure und dann mit Wasser, KOH- oder NaOH-Lösung hinzufügte. Aus

der dunkeln Lösung der Natrium- oder Kalisalze wurden mit HCl die Humussäuren gefällt. Nach sorgfältigem Durchwaschen mit Wasser dienten diese Säuren zur Darstellung von löslichen Salzen, die mit Ca-Salzen gefällt unlösliche Ca-Humate lieferten.

Versuch XX. Am 8/V. 1907 wurde der Apparat mit 100 ccm Nährlösung beschickt, die 1.5 g Glukose, 0.05 g K_2HPO_4 u. 3 ccm K-Humatlösung von 3.5 mg Stickstoffgehalt enthielt. Der Versuch dauerte 10 Tage, die Einzelheiten seines Verlaufs sind aus Tab. XIII zu ersehen.

(Siehe Tab. XIII. Seite 981).

Während des Versuches wurden dem Apparat 585.67 ccm O_2 zugeführt. Die Zusammensetzung der Gase im Apparate am Schluß des Versuches war, wie folgt:

	Nach der I. Probe	nach der II. Probe	durchschnittlich
CO_2	0.1590%	0.1190%	0.1390%
O_2	15.546 "	15.567 "	15.557 "
H_2	— "	— "	— "
N_2	84.295 "	84.314 "	84.305 "

Im Kaligefäß wurden 663.20 ccm CO_2 absorbiert, in der Nährlösung 0.11 ccm gelöst gefunden.

Die Bilanz des Gaswechsels im Apparate während der Dauer des Versuches stellt sich somit folgendermaßen dar: Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0.34	764.78	—	676.30 ccm
Am Schluß gefunden:	664.42	123.80	—	670.87 "
Differenz ±	+ 664.08	— 640.98	—	— 5.43 ccm

Quotient $\frac{CO_2}{O_2} = 1.04$.

In der Nährlösung betrug die Stickstoffzunahme 9.77 mg = 7.8 ccm.

Versuch XXI. Am 14/V 1907 wurde der Apparat mit 150 ccm Nährlösung beschickt, die 1.5% Mannit u. 0.05% K_2HPO_4 enthielt. Dazu kamen 3 ccm K-Humatlösung mit 0.07 g Trockenmasse u. 3.53 mg N. Der Versuch dauerte 7 Tage, während deren dem Apparat 5 mal Sauerstoff zugeführt wurde, im ganzen 615.56 ccm. Das Gasvolumen am Anfang des Versuches betrug 680.27 ccm, am Ende 558.60 ccm. Die Zusammensetzung der Gase am Ende des Versuches war folgend:

Tabelle XIII.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparate in ccm	Luftvolumen- verminderung in ccm	Volumver- minderung pro Stunde
Tag	Uhr				
8/V	8 10	22.4	855.75	—	—
9	10 16	23.5	849.20	6.55	0.47
10	10 10	23.3	783.20	72.55	2.76
11	9 —	23.6	729.06	126.69	2.37
"	12 25	23.1	725.99	129.76	0.90
Sauerstoff zugeführt 149.32 ccm					
"	3 10	23.0	864.64	—	—
"	6 10	23.1	853.01	11.63	3.88
12	9 45	23.5	773.90	90.74	5.08
13	5 45	22.3	719.94	144.70	6.80
"	8 45	24.7	710.42	154.22	3.17
Sauerstoff zugeführt 163.27 ccm					
"	11 30	24.4	862.30	—	—
"	1 10	25.2	853.94	8.36	5.02
14	9 —	25.6	737.53	124.77	5.87
"	11 40	25.7	723.37	138.93	5.31
Sauerstoff zugeführt 143.25 ccm					
"	12 45	25.4	857.57	—	—
"	3 —	25.1	837.20	20.37	9.04
15	9 45	24.8	733.97	123.60	5.51
"	12 —	25.0	728.23	129.34	2.55
Sauerstoff zugeführt 129.83 ccm					
"	1 30	25.3	854.16	—	—
"	3 50	25.5	848.07	6.09	2.96
16	9 35	24.9	818.25	35.91	1.68
17	9 35	21.8	803.89	50.27	0.60
18	9 35	20.1	796.37	57.79	0.31
"	11 30	20.5	795.98	58.18	0.20
"	12 30	—	795.78	58.38	0.20

	in der I. Probe	in der II. Probe	im Mittel
CO ₂	5·415%	5·310%	5·363%
O ₂	0·180 "	0·270 "	0·225 "
H ₂	— "	— "	— "
N ₂	94·405 "	94·420 "	94·412 "

Im Kaligefäß wurden 651·51 *ccm* CO₂ absorbiert, in der Nährlösung 5·53 *ccm* gelöst gefunden.

Die Bilanz des Gaswechsels im Apparate: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparate zugeführt:	0·27	757·94	—	537·62 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	687·00	1·26	—	527·38 "
Differenz ±	+ 686·73	- 756·68	—	- 10·24 <i>ccm</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·91.$$

In der Nährlösung wurden 11·03 *mg* = 8·82 *ccm* N-Gewinn gefunden.

Versuch XXII. Am 3/VI. 1907 wurde der Apparat mit 100 *ccm* Nährlösung beschickt, welche 1·5% Mannit und 0·05% K₂HPO₄ enthielt. Dazu kamen 5 *ccm* Na-Humatlösung mit einem Gehalt von 0·164 *g* Trockensubstanz und 4·83 *mg* N₂. Der Versuch dauerte 37 Tage, während deren dem Apparat 5 mal Sauerstoff zugeführt wurde in einer Gesamtmenge von 921·50 *ccm*. Das Gasvolumen im Apparate bei Beginn des Versuches betrug 1097·89 *ccm*, am Ende 1041·88 *ccm*. Die Zusammensetzung am Schluß des Versuches war:

CO ₂ — 0·153%	H ₂ — — %
O ₂ — 17·576 "	N ₂ — 82·271 "

In der Kalilösung fanden sich 904·09 *ccm* CO₂ absorbiert, in der Nährlösung 0·18 *ccm* gelöst.

Die Bilanz des Gaswechsels war folgend: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparate zugeführt:	0·44	1151·29	—	867·66 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	905·86	183·12	—	857·16 "
Differenz ±	+ 905·42	- 968·17	—	- 10·50 <i>ccm</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·935.$$

In der Nährlösung betrug der Stickstoffzuwachs $16.04 \text{ mg} = 13.07 \text{ ccm}$.

Versuch XXIII. Am 8/VI. 1907 wurde der Apparat mit 150 ccm Nährlösung beschickt, die 1.5% Glukose, 0.05% K_2HPO_4 und 0.1 g unlösliches Ca-Humat enthielt. Der Versuch dauerte 17 Tage, während deren dem Apparat 789.70 ccm O_2 zugeführt wurden. Das Gasvolumen am Anfang des Versuches betrug 782.96 ccm am Ende 610.76 ccm .

Die Zusammensetzung der Gase im Apparate am Schluß war die folgende:

CO_2 — 0.512%	H_2 — — $\%$
O_2 — — „	N_2 — 99.488 „

Im Kaligefäß wurden 972.57 ccm CO_2 absorbiert, in der Nährlösung 0.51 gelöst.

Die Bilanz des Gaswechsels war, wie folgt: Es wurden

	CO_2	O_2	H_2	N_2
Dem Apparate zugeführt:	0.30	953.58	—	618.78 <i>ccm</i>
Am Ende gefunden: . . .	976.20	—	—	607.64 „
Differenz \pm	+975.90	—953.58	—	—11.14 <i>ccm</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.02.$$

In der Nährlösung wurde eine Stickstoffzunahme von $12.10 \text{ mg} = 9.68 \text{ ccm}$ konstatiert.

Versuch XXIV. Am 3/VI. 1907 wurde der Apparat mit 100 ccm Nährlösung mit 1.5% Mannit und 0.05% K_2HPO_4 beschickt. Anstatt Humus aus Erde wurde ihr Na-Humat, künstlich aus Rohrzucker durch Kochen mit HCl erhalten, zugefügt, u. z. 0.158 g mit kaum 0.2 mg N_2 . Die Versuchsdauer war 37 Tage. Die Atmung des Azotobaktters war so langsam, daß sie an die Kulturen ohne Erde erinnerte. Während des Versuches wurde dem Apparat Sauerstoff in einer Menge von 81.89 ccm zugeführt. Das Gasvolumen am Anfang des Versuches betrug 866.86 ccm , am Ende 687.39 ccm . Die Zusammensetzung der Gase am Schluß des Versuches war folgend:

CO_2 — 0.281%	H_2 — — $\%$
O_2 — 0.074 „	N_2 — 99.645 „

Im Kaligefäß wurden 246.98 ccm CO_2 absorbiert, in der Nährlösung 0.29 ccm gelöst gefunden.

Die Bilanz des Gaswechsels folgt: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparat zugeführt:	0·37	263·32	—	685·08 <i>ccm</i>
Am Ende gefunden . . .	249·20	0·51	—	684·95 „
Differenz ±	+ 248·83	— 262·81	—	— 0·13 <i>ccm</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 0·946.$$

In der Nährlösung wurde eine Stickstoffzunahme von 2·18 *mg* = 1·74 *ccm* gefunden.

Alle Ergebnisse dieser Serie zeigen übereinstimmend, daß unter den in der Erde befindlichen Substanzen eine auf die Entwicklung des Azotobaktters und auf seine Stickstoffbindung einen sehr günstigen Einfluß ausübt, u. z. ist dies die Humussubstanz ebenso in löslicher wie in unlöslicher Form. Der letzte Versuch ist ein Beweis dafür, daß der natürliche Humus durch künstliches, aus Zucker durch Kochen mit Säuren erhaltenes Produkt nicht ersetzt werden kann. Dabei finden wir hier ebenso wie in den vorigen Untersuchungsserien mit Azotobakterreinkulturen in den Produkten seines Stoffwechsels keinerlei Spuren von Wasserstoff; der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ verändert sich je nach der Kohlenstoffquelle ebenso wie in den vorigen Serien. Schließlich sahen wir beispielsweise im Versuch XXIII, daß der Azotobakter den Sauerstoff im Apparat vollständig aufzehren kann, ohne eine Spur davon übrig zu lassen, und doch unterliegt das Verhältnis $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ keiner wesentlichen Veränderung. Schon daraus kann man schließen, daß die Fähigkeit des Azotobaktters zur intramolekularen Atmung sehr gering ist. Der näheren Untersuchung über die intramolekulare Atmung des Azotobaktters ist der folgende Abschnitt gewidmet.

8. Intramolekulare Atmung des Azotobaktters.

Um den Azotobakter noch weiter auf seine Fähigkeit zur intramolekularen Atmung zu prüfen, wurden kräftig in den Apparaten entwickelte Kulturen, nachdem sie bereits den Sauerstoff vollständig aufgezehrt hatten, noch einige Tage in dem Apparat ohne weitere Sauerstoffzufuhr gehalten und alsdann ihr gesamter Gasaustausch

durch Analyse festgestellt. Das in der Folge wegen der intramolekularen Atmung in sauerstofffreier Atmosphäre sich ausscheidende Kohlendioxyd dürfte nicht ohne Einfluß auf den Quotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ bleiben.

Versuch XXV u. XXVI. Am 25/V. 1907 wurden gleichzeitig 2 Apparate mit 150 *ccm* Nährlösung von 1½% Glukose-, resp. Mannitgehalt beschickt. Außerdem enthielten die Nährlösungen 0·05% K_2HPO_4 und je 0·07 *g* K-Humat aus Erde. Nach 5 Tagen, als die Kohlenstoffquellen in den Nährlösungen, nach der Menge des verbrauchten Sauerstoffs zu schließen, noch reichlich vorhanden waren, wurde den Apparaten zum letztenmal (zum drittenmal seit dem Beginn des Versuches) Sauerstoff zugeführt. 6 Tage nach dieser letzten Sauerstoffzuführung (am 11. Tage seit dem Anfang) wurden die Versuche abgeschlossen.

Da, wie es sich später herausstellte, in den Apparaten sich kein Wasserstoff entwickelte und die Menge von KOH ausreichend war, um das sich bildende CO_2 schnell und vollständig zu absorbieren, so können die Zahlen, die die Abnahme des Gasvolumens in den Apparaten angeben, als ein ziemlich genauer Maßstab für die Sauerstoffaufnahme dienen, da sie nur um das Volumen des durch die Kulturen gebundenen Stickstoffs von der wirklichen Sauerstoffaufnahme größer sind. Aus der Tabelle XIV ist zu ersehen, daß 2 Tage nach der letzten Zuführung des Sauerstoffes derselbe schon fast vollständig verbraucht wurde und die weitere Verminderung des Gasvolumens im Apparate nur noch eine minimale war.

Als das Quecksilber in den Seitenröhrchen der Apparate eine so große Verminderung des Gasvolumens anzeigte, daß man schon daraus auf einen starken Verbrauch von Stickstoff schließen konnte, wurden die Versuche abgeschlossen. Der Verlauf der Versuche ist durch die Tab. XIV. wiedergegeben.

(Siehe Tab. XIV, Seite 986).

Die Analysen der Gase aus den Apparaten vor ihrer Öffnung zeigten folgende Zusammensetzung:

	Apparat mit Glukose	Apparat mit Mannit.
CO_2	0·341%	0·366%
O_2	— "	— "
H_2	— "	— "
N_2	99·659 "	99·634 "

Tabelle XIV.

Datum		t°	Versuch XXV Nährlösung mit Glukose				Versuch XXVI Nährlösung mit Mannit			
			Luftvolumen in Apparate in <i>ccm</i>	Volumenverminderung seit der Zuführung des Sauer- stoffes <i>ccm</i> .	Die Partial-Pressung des Sauerstoffes in <i>mm</i>	Volumverminderung pro Stunde	Luftvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Volumenverminderung seit der Zuführung des Sauer- stoffes <i>ccm</i>	Die Partial-Pressung des Sauerstoffes in <i>mm</i>	Volumverminderung pro Stunde
Tag	Uhr									
25—V	8:30	21·9	767·60	—	147·3	—	673·93	—	147·8	—
26	9:40	21·7	765·92	1·68	145·3	0·13	673·39	0·54	147·1	0·41
27	9:55	20·3	748·39	19·21	129·8	0·72	667·22	6·71	140·0	0·25
28	9·8	20·9	655·17	112·43	44·6	4·02	594·59	79·34	64·8	3·13
"	10:56	21·0	652·57	115·03	42·4	1·45	582·05	91·88	51·7	6·97
			Sauerstoff zugeführt 139·04 <i>cm</i> ³			Sauerstoff zugeführt 111·06 <i>cm</i> ³				
"	12:35	21·0	785·83	—	163·4	—	679·28	—	152·8	—
"	3:25	21·1	775·48	10·35	154·1	3·65	654·62	24·66	127·4	8·70
29	7:50	20·0	705·84	79·99	90·5	4·24	564·50	114·78	33·2	5·49
"	9:50	20·2	696·90	88·93	82·4	4·47	559·07	120·21	27·5	2·72
			Sauerstoff zugeführt 96·53 <i>cm</i> ³			Sauerstoff zugeführt 137·15 <i>cm</i> ³				
"	11:8	20·6	787·35	—	164·6	—	691·16	—	164·9	—
"	12:20	20·5	780·20	7·15	158·0	5·96	685·91	5·25	159·4	4·37
30	9:15	20·1	671·79	115·56	59·4	5·18	564·82	126·34	33·6	5·79
"	10:35	19·8	666·91	120·44	54·9	3·66	558·42	132·74	26·8	4·80
			Sauerstoff zugeführt 128·04 <i>cm</i> ³			Sauerstoff zugeführt 140·85 <i>cm</i> ³				
"	12:25	19·7	786·08	—	163·2	—	686·82	—	160·1	—
"	4:5	19·9	767·72	18·36	146·5	5·01	660·71	26·11	133·1	7·12
31	8:35	18·1	684·19	101·89	70·3	5·06	553·84	132·98	21·9	6·48
1—VI	9:40	20·2	603·12	182·96	—3·5 ¹⁾	2·19	527·02	159·80	—6·2 ¹⁾	0·72
2	1:5	20·5	603·76	182·32	—3·0	0·04	527·57	159·25	—6·0	0·36
3	9	20·2	602·74	183·34	—3·8	0·05	526·51	160·31	—6·7	0·05
4	9:53	18·4	602·33	183·75	—4·2	0·02	526·26	160·56	—7·0	0·01
5	10	18·2	602·21	183·87	—4·3	0·01	525·97	160·85	—7·2	0·01

¹⁾ Die N-Bindung wird schon durch den Stand des Quecksilbers im Manometerrohr wahrgenommen.

In den Kaligefäßen wurden im Glukoseapparat 546·16 *ccm* CO₂, im Mannitapparat 487·41 *ccm* CO₂ gefunden; in den Nährlösungen waren absorbiert: im Glukoseapparat 0·34 *ccm*, im Mannitapparat 0·37 *ccm*. Dem Glukoseapparat wurden 363·61 *ccm*, dem Mannitapparat 389·06 *ccm* Sauerstoff zugeführt.

Die Bilanz des Gaswechsels war folgend: Es wurden

	bei Glukose				bei Mannit			
	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
dem Apparat zugeführt . . .	0·31	524·27	—	606·63	0·27	530·11	—	532·61
Am Schluß gefunden . . .	548·55	—	—	600·16	490·00	—	—	524·05
Differenz . . .	+548·24	-524·27	—	-6·47	+489·73	-530·11	—	-8·56

Quotient für Glukose = 1·04, für Mannit 0·92. In der Glukosenährlösung wurden 7·95 *mg* = 6·36 *ccm*, in der Mannitlösung 8·16 *mg* = 6·53 *ccm* Stickstoffgewinn gefunden. Da in der Glukosekultur 548 *ccm* CO₂ ausgeschieden wurden, so wurde darauf, abgesehen von der Kohlenstoffmenge in der Bakterienmasse, 0·81 *g* Glukose verwendet; es verblieben somit nach Schluß des Versuches in der Nährlösung über 1 *g*. Ebenso ist auch im zweiten Apparat viel Mannit übriggeblieben. Trotzdem kann man aus den Quotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ auf keine intramolekulare Atmung schließen.

Die zwei folgenden Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß die Kaligefäße nach einer gewissen Zeit aus den Apparaten entfernt und die Luft aus denselben vollständig ausgepumpt wurde. Selbstverständlich mußten für diesen Versuch Seitenröhren von entsprechender Länge benutzt werden. Das Sinken des Quecksilbers in diesen Röhren nach dem Auspumpen der Luft aus den Apparaten konnte als Maßstab für die seitens des Azotobaktors im Vakuum ausgeschiedene CO₂-Menge dienen.

Versuch XXVII. Am 8/VI. 1907 wurde der Apparat mit 150 *ccm* Nährlösung beschickt, welche 1·5% Glukose, 0·05% K₂HPO₄ und 0·07 *g* aus Erde erhaltenes humussaures Kali enthielt. Nach viermaliger Zuführung von Sauerstoff in den Apparat, als der Azotobakter am folgenden Tage nach der Sauerstoffzuführung 6 *ccm* Sauer-

stoff pro Stunde verbrauchte, wurden dem Apparat Gasproben entnommen, das Kaligefäß entfernt, alsdann der Apparat geschlossen, luftleer ausgepumpt und die Kultur darin noch 23 Tage lang belassen.

Die Resultate der Ablesungen der Gasvolumina im Apparate sind in Tab. XV u. XVI zusammengestellt.

(Siehe Tab. XV, Seite 989).

TABELLE XVI.

Nach der Evakuierung des Apparates.

Datum		t°	Gasvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Volumenzu- nahme zwi- schen je zwei Ablesungen in <i>ccm</i>	Volumenzu- nahme pro Stunde
Tag	Uhr				
18/VI.	3:40	20.7	1.22	—	—
19	9:15	20.3	3.67	2.45	0.140
20	9:20	20.0	5.05	1.38	0.058
21	9:7	20.8	6.02	0.97	0.041
22	10:0	21.0	7.24	1.22	0.049
25	9:55	21.0	8.13	0.89	0.012
29	7:40	23.8	9.63	1.50	0.015
3/VII.	7:40	25.6	10.68	1.05	0.010
7	7:40	24.5	11.10	0.42	0.004
11	7:40	24.6	11.34	0.24	0.002

Aus letzter Tabelle ersieht man, daß nur während der ersten Tage nach der Zuschmelzung des Verbindungsröhrchens zwischen Apparat und Luftpumpe das Gasvolumen zusehends wuchs, später dagegen diese Zunahme aufhörte, so daß sich insgesamt im Verlauf von 23 Tagen seit der Evakuierung des Apparates in demselben nur 11 *ccm* Gas (wahrscheinlich CO₂) ansammelten; eine Probenahme dieses Gases zur Analyse ist leider nicht gelungen.

Die Zusammensetzung der Gase unmittelbar vor der Evakuierung des Apparates war folgende:

CO₂ — 1.437% H₂ — 0.0 %
O₂ — 6.531 „ N₂ — 92.032 „

Im Kaligefäß waren 620.54 *ccm*, in der Nährlösung 1.94 *ccm*

Tabelle XV.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparate in ccm	Volumenver- minderung seit der Zu- führung des Sauerstoffes in ccm	Sauerstoff- Absorption in ccm pro 1 Stunde
Tag	Uhr				
8/VI	8·5	18·8	727·18	—	—
9	12·10	17·6	723·62	3·56	0·22
10	10·5	17·2	720·96	6·22	0·12
11	18·15	17·9	715·51	11·67	0·25
12	11·0	19·3	707·45	19·73	0·30
13	12·40	21·4	691·58	35·60	0·62
14	10·30	20·7	663·80	63·38	2·51
"	3·45	21·4	603·53	123·65	6·34
Sauerstoff zugeführt 120·66 ccm					
"	5·15	21·7	719·60	—	—
"	6·35	21·7	712·05	7·55	5·66
15	11·15	21·0	627·28	92·32	5·09
"	12·35	21·3	623·06	96·54	3·17
Sauerstoff zugeführt 110·45 ccm					
"	3·15	21·8	721·08	—	—
"	5·45	21·7	709·18	11·90	4·76
16	9·50	21·5	620·40	100·68	5·52
"	11·50	21·6	613·46	107·62	3·47
Sauerstoff zugeführt 121·54 ccm					
"	2·45	21·7	717·22	—	—
"	5·25	21·9	700·53	16·69	6·26
17	9·18	20·3	624·69	92·53	4·77
"	11·40	20·7	610·57	106·65	5·97
Sauerstoff zugeführt 124·69 ccm					
"	1—	21·0	731·91	—	—
"	3·20	21·2	726·60	5·31	2·28
18	9·30	19·6	621·91	110·00	5·76
"	11—	20·2	613·70	118·21	5·47
"	11·20	—	611·88	120·03	5·46

CO₂ absorbiert. Da dem Apparate an Sauerstoff 477·34 *ccm* zugeführt worden sind, so stellt sich die Bilanz des Gaswechsels im Apparate bis zum Augenblick der Evakuierung folgendermaßen dar: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparate zugeführt:	0·29	629·54	—	574·69
Am Schluß gefunden:	631·83	39·96	—	563·13
Differenz ±	+ 631·54	— 589·58	—	— 11·56

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1·06.$$

In der Nährlösung wurden am Schluß des Versuches an gebundenem Stickstoff 12·89 *mg* = 10·3 *ccm* gefunden.

Bei diesem Versuch wurde das Verbindungsrohr zwischen Apparat und Luftpumpe bereits zwei Stunden nach Beginn der Evakuierung zugeschmolzen. Man könnte somit die darauf folgende Gasausscheidung zum Teil auf das in der Nährlösung gelöste und nunmehr entweichende CO₂ zurückführen. Nach der Menge des im Apparate gefundenen CO₂ haben wir berechnet, daß in der Nährlösung zirka 2 *ccm* CO₂ enthalten sein konnten. In Anbetracht der intensiven Atmung ist es jedoch durchaus möglich, daß das Gleichgewicht zwischen dem in den Gasen des Apparates enthaltenen und dem in der Nährlösung gelösten CO₂ nicht schnell genug zustande kommt, so daß das CO₂ in der Lösung evtl. in größerer Menge vorhanden sein kann, als die theoretische Berechnung ergibt. Um dem CO₂ die Möglichkeit zu geben, aus der Nährlösung zu entweichen, wurde in dem nächstfolgenden Versuch folgendermaßen verfahren.

Versuch XXVIII. Am 18/X. 1907 wurde der Apparat mit 100 *ccm* Nährlösung beschickt, welche 2% Glukose, 0·05% K₂HPO₄ und 0·213 *g* humussaures Natron enthielt. Am 1/XI. 1907 wurden nach viermaliger Zuführung von Sauerstoff in den Apparat in einer Gesamtmenge von 451·28 *ccm*, als die Atmung seitens des Azotobaktters sehr energisch vor sich ging, dem Apparate Gasproben zur Analyse entnommen, das Kaligefäß wurde entfernt und alsdann die Luft an demselben Tage um 10^h 40^m Vorm., hierauf zum zweiten Male um 6^h 40^m Nachm. ausgepumpt, und das Verbindungsrohr zwischen Apparat und Luftpumpe zugeschmolzen. Die Kultur verblieb danach noch 20 Tage lang im Vakuum. Die Resultate dieses Versuches sind in Tabelle XVII und XVIII zusammengestellt.

TABELLE XVII.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Luftvolumen- abnahme in <i>ccm</i>	Volumvermin- derung pro Stunde in <i>ccm</i>
Tag	Uhr				
18/X	3 0	19.7	721.01	—	—
"	6.0	19.8	721.00	0.01	—
19	8.45	17.8	720.13	0.88	0.06
"	1.0	18.9	719.67	1.34	0.11
"	6.30	19.6	719.20	1.81	0.09
20	10.30	18.8	716.10	4.91	0.19
21	8.45	16.7	693.73	27.28	1.01
"	5.20	18.8	683.62	37.39	1.18
22	9.0	15.7	665.11	55.90	1.18
"	7.0	18.5	656.20	64.81	0.89
23	11.0	17.5	642.15	78.86	0.88
24	10.0	15.9	619.78	101.23	0.97
"	8.0	17.6	605.57	115.44	1.42
25	9.0	15.9	587.32	133.69	1.40
"	12.5	16.2	585.01	136.00	0.77
Sauerstoff zugeführt 161.56 <i>ccm</i>					
"	3 0	16.9	744.31	—	—
"	6.30	17.2	741.68	2.63	0.75
26	10.30	16.0	722.77	21.54	1.18
27	1.15	15.6	668.22	76.09	2.04
28	9.45	15.5	628.63	115.68	1.98
29	8.53	16.4	589.92	154.39	1.70
"	1.20	18.7	583.58	160.73	1.41
Sauerstoff zugeführt 138.35 <i>ccm</i>					
"	3.20	18.0	718.60	—	—
"	6.20	17.6	713.50	5.10	1.70
30	9.10	16.2	684.40	34.20	2.28
31	9.10	16.2	596.62	121.98	3.66
"	12.—	17.2	590.16	128.44	2.28
Sauerstoff zugeführt 151.37 <i>ccm</i>					
"	1.25	17.2	737.04	—	—
"	3.10	16.6	731.82	5.22	2.98
"	6.30	17.4	721.61	15.43	3.06
1/XI	9.30	16.4	656.01	81.03	4.37
"	10.30	16.5	650.71	86.33	5.30

TABELLE XVIII.

Nach der Evakuierung des Apparates.

Datum		t°	Luftvolumen im Apparate in <i>ccm</i>	Volumenzu- nahme zwi- schen je zwei Ablesungen in <i>ccm</i>	Volumenzu- nahme pro Stunde in <i>ccm</i>
Tag	Uhr				
1/XI.	6:40	17.6	0.79	—	—
2	12:30	15.7	3.51	2.72	0.153
3	8:45	14.4	4.63	1.12	0.056
5	3—	15.6	5.47	0.84	0.016
11	10—	17.5	6.57	1.10	0.008
20	3—	17.4	6.72	0.15	0.001

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurden am 1. Tage nach der Evakuierung des Apparates in demselben 2.72 *ccm*, am folgenden Tage nur noch 1.12 *ccm*, im Verlauf der weiteren 17 Tage kaum 2 *ccm* Gase entwickelt. Insgesamt hat die Azotobakterkultur im Lauf von 20 Tagen 6.72 *ccm* Gase ausgeschieden.

Die Zusammensetzung des Gasgemisches im Apparate unmittelbar vor seiner Evakuierung war folgend:

CO ₂ — 4.961%	H ₂ — —
O ₂ — 8.454 „	N ₂ — 86.585%

Im Kaligefäß waren 536.53 *ccm*, in der Nährlösung 4.02 *ccm* CO₂ absorbiert.

Die Bilanz des Gaswechsels im Apparate war folgend: Es wurden

	CO ₂	O ₂	H ₂	N ₂
Dem Apparate zugeführt:	0.29	602.19	—	569.81 <i>ccm</i>
Am Schluß gefunden:	572.83	55.01	—	563.42 „
Differenz ±	+ 572.54	— 547.18	—	— 6.39 <i>ccm</i>

$$\text{Quotient } \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2} = 1.64.$$

In der Nährlösung wurde eine Stickstoffzunahme von 9.31 *mg* = 7.45 *ccm* gefunden.

Die beiden ersten Versuche dieser Serie zeigen, daß die in einer sauerstofffreien Atmosphäre gehaltene Azotobakterkultur trotz zu reichendem Vorrat an Glukose oder Mannit sehr unerhebliche Men-

gen von CO_2 ausscheidet; wenigstens erfährt der Quotient $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ unter diesen Bedingungen keine merkliche Steigerung. Die beiden letzten Versuche, in denen das im Vakuum ausgeschiedene CO_2 durch KOH nicht absorbiert wurde, zeigen, daß diese Ausscheidung tatsächlich sehr minimal ist und in keinem Verhältnis zu den bei normaler Atmung ausgeschiedenen CO_2 -Mengen steht. Man kann sie nur in den ersten Tagen nach der Evakuierung der Gefäße mit den Kulturen wahrnehmen. Bietet man vor der endgültigen Zuschmelzung des Verbindungsrohres zwischen Apparat und Pumpe der in der Nährlösung absorbierten Kohlensäure die Möglichkeit zu entweichen, und zwar dadurch, daß man die Kultur eine gewisse Zeit lang im Vakuum stehen läßt (im letzten Versuche waren es 8 Stunden), so hört die Ausscheidung von CO_2 fast vollständig auf, obgleich die im Vakuum befindliche Azotobakterkultur in voller Entwicklung begriffen ist und genügend Atmungsmaterial zur Verfügung hat. In dem letzten Versuche wurden im Verlauf von 3 Wochen nur 6 *ccm* CO_2 ausgeschieden, obgleich unmittelbar vor der Evakuierung des Apparates innerhalb 24 Std zirka 100 *ccm* Sauerstoff verbraucht wurden. Demnach ist aus allen Versuchen dieser Serie mit Sicherheit zu schließen, daß die Fähigkeit des Azotobakters zur intramolekularen Atmung, wenn überhaupt vorhanden, jedenfalls eine äußerst minimale ist.

Indem wir hiermit den ersten Teil unserer Untersuchungen abschließen, wollen wir noch in Kürze die Resultate derselben zusammenstellen.

9. Zusammenstellung der Versuchsergebnisse.

Die Aufgabe der geschilderten Versuche war, wie gesagt, die Feststellung der Ursache, derentwegen die Rohkulturen des Azotobakters größere Stickstoffzuwächse aufwiesen, als die Reinkulturen. Wir haben uns überzeugt, daß für die Bildung von größeren Stickstoffmengen in Rohkulturen die Anwesenheit von Erde in denselben den Ausschlag gibt. Unter den mit der Erde in die Nährlösung des Azotobakters eingeführten Substanzen üben auf seine Entwicklung und somit auch auf seine Stickstoffaufnahme in erster Linie die Humussubstanzen einen günstigen Einfluß aus. Die in dieser Hinsicht in Betracht kommenden Humusstoffe, sei es, daß sie löslich

oder unlöslich sind, können weder durch ein wässriges Extrakt von Erde, noch durch ein künstliches Produkt, das anscheinend den Humusstoffen ähnlich sieht und aus Rohrzucker durch andauerndes Kochen desselben mit Mineralsäuren erhalten wird, ersetzt werden. Wenn wir nun die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit denen der letzten vergleichen, so gelangen wir zu der Überzeugung, daß an der Bindung des freien Stickstoffs hauptsächlich der Azotobakter beteiligt ist, daß dagegen die anderen in den Rohkulturen befindlichen Organismen mit selbstverständlicher Ausnahme von *Clostridium* hier gar nicht mitspielen. Die Bindung des freien Stickstoffs seitens des in humushaltiger Nährlösung gezüchteten Azotobaktters kann ebenso ausgiebig sein, wie die Bindung seitens der Rohkulturen. In unseren Versuchen haben wir gesehen, daß das Quecksilber in den Seitenröhrchen oft dasjenige Niveau überschritten hat, welches es eingenommen haben sollte, wenn in den Apparaten nur Sauerstoff vollständig absorbiert worden wäre. Auf diese Weise zeigte schon der Stand des Quecksilbers in der Druckröhre eine Abnahme von Stickstoff in der Umgebung der Azotobakterkultur. Die Analysen der den Apparaten am Ende eines jeden Versuches entnommenen Gasproben, die in Eudiometern nach den exaktesten Methoden ausgeführt wurden, weiter die Bilanzen des Gaswechsels während der Versuche haben überall dort, wo der in der Nährlösung gefundene Stickstoffzuwachs außerhalb der Fehlergrenzen lag, gezeigt, daß dieser Stickstoffzuwachs in der Kultur seine Quelle in dem freien Stickstoff der die Kultur umgebenden Luft hat. Jede Stickstoffbindung seitens des Azotobaktters zieht stets eine Verminderung der Stickstoffmenge in der umgebenden Luft nach sich.

Dieselben Analysen haben uns auch die Möglichkeit geboten festzustellen, daß während des Atmungsprozesses nur in Rohkulturen Wasserstoff ausgeschieden wird. Die Reinkulturen von Azotobakter dagegen scheiden sogar dann, wenn die Stickstoffbindung sehr intensiv ist, nur reines Kohlendioxyd und niemals Wasserstoff aus. Der Quotient des ausgeschiedenen Kohlendioxyds zum verbrauchten Sauerstoff schwankt in Reinkulturen von Azotobakter stets um die Einheit; bei Zusatz von Glukose ist er etwas größer, bei Mannit etwas kleiner. Zur besseren Orientierung in den Verhältnissen zwischen dem gebundenen Stickstoff und der Menge des verbrauchten Atmungsmaterials sowie zur Feststellung der Abhängigkeit des

Quotienten $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$ von der letzteren stellen wir die Resultate aller 28 Versuche in Tabelle XIX zusammen.

(Siehe Tab. XIX, Seite 996—997).

Um uns nur annähernd einen Begriff davon zu machen, in welchem Verhältnis die Bindung des freien Stickstoffs zum Verbrauch der Kohlensäurequellen steht, wählen wir als Maßstab dieses Verbrauchs die Menge des gebildeten CO_2 und berechnen, wieviel Stickstoff auf 730, bezw. 614 *ccm* gebildeten Kohlendioxyds gebunden wird. Eine solche Kohlensäuremenge müßte nämlich durch vollständige Verbrennung von 1 *g* Glukose, bezw. Mannit gebildet werden. Auf diese Weise sind wir ungefähr imstande festzustellen, wieviel *mg* Stickstoff der Azotobakter bei Verbrauch von 1 *g* dieser Kohlenstoffquellen binden kann.

Diese Zahlen verzeichnen wir in der letzten Kolumne der Tabelle. Aus ihnen ersehen wir, daß bei Gegenwart von Humusstoffen der Verbrauch der Kohlenstoffvorräte seitens des Azotobakters bedeutend ökonomischer ist, als wenn die Nährlösung keine Humusstoffe enthält. Schließlich ist durch die letzten Versuche erhärtet worden, daß der Azotobakter fast keine Fähigkeit zu intramolekularer Atmung besitzt.

IV. Versuche Beijerincks und van Deldens über die Bindung des Stickstoffs seitens des Azotobakters im Lichte obiger Untersuchungen.

Unsere Versuche stellen die Resultate der epochemachenden Versuche von Beijerinck und van Delden (3) über Azotobakter ins rechte Licht. Diese beiden Forscher sind, wie bekannt, schließlich zu dem Ergebnis gekommen, daß nicht der Azotobakter an und für sich, sondern erst in Verbindung mit anderen Bakterien imstande ist, freien Stickstoff zu binden.

Inzwischen hat sich eine ganz andere Anschauung über die Tätigkeit des Azotobakters Bahn gebrochen. Demgegenüber schien das reiche, von Beijerinck und van Delden angesammelte Versuchsmaterial an wissenschaftlicher Bedeutung viel verloren zu haben und nur historisches, wenn auch erstklassiges Interesse zu verdienen.

TABELLE XIX.

Serien der Versuche	Nr. der Versuche	Verwendetes Impfmaterial und Zusammensetzung der Nährlösung	Versuchsdauer in Tagen	Kohlenstoffquelle: Mannit (m) oder Glukose (g)	Kohlensäureausscheidung in <i>ccm</i>	Sauerstoffabsorption in <i>ccm</i>	Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$	Wasserstoffausscheidung in <i>ccm</i>	Stickstoffabsorption aus der Luft in <i>ccm</i> = mg		Stickstoffgewinn in der Nährlösung in mg	N-Gewinn in mg pro 1 g verbrauchte Kohlenstoffquelle
									Stickstoffabsorption aus der Luft in <i>ccm</i>	Stickstoffabsorption aus der Luft in <i>ccm</i>		
I	1	Verwendetes Impfmaterial und Zusammensetzung der Nährlösung	37	m	958.74	888.27	1.08	120.29	12.57	15.71	16.87	10.8
	2		10	m	674.31	682.06	0.99	86.71	10.86	13.58	15.15	13.8
	3		37	m	1224.61	1244.60	0.98	80.46	6.32	7.90	16.24	8.2
II	4	Reinkultur von Azotobakter mit pasteurisierter Erde	20	m	752.24	1077.50	0.70	6.52	4.34	5.43	5.90	4.8
	5		25	m	526.69	429.01	1.23	8.26	8.66	10.83	13.56	15.8
III	6	Kahmhaut in Mannitnährlösung	19	m	216.87	119.33	1.81	44.22	+2.91?	—	2.87	8.1
	7		19	m	364.71	346.80	1.05	3.78	2.25	2.81	4.76	8.0
IV	8	Azotobakter in Reinkultur	69	g	598.43	588.70	1.02	—	1.29	1.61	1.98	2.4
	9		69	g	627.04	612.42	1.02	—	1.20	1.50	1.27	1.5
	10		51	m	908.49	946.07	0.96	—	+0.16?	—	1.07	0.7

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
IV	Azotobakter in Reinkultur		31	g	181.60	179.37	1.01	—	0.07	0.09	0.28	1.1						
	31	m	48	m	151.14	152.93	0.99	—	0.03	0.04	0.03	0.1						
V	Reinkultur von Azotobakter mit sterilisierter Erde		20	m	857.22	1115.25	0.77	—	3.75	4.69	4.70	3.4						
	25	m	25	m	719.31	835.51	0.86	—	6.81	8.51	7.68	6.6						
	14	m	14	m	791.64	1002.31	0.79	—	2.52	3.15	6.93	5.4						
	10	g	10	g	773.56	776.86	1.00	—	5.38	6.83	7.81	7.4						
	9	m	9	m	484.15	492.56	0.94	—	2.36	2.95	6.48	8.2						
VI	Reinkultur von Azotobakter mit Wasserbodenextrakt		14	m	183.12	199.33	0.92	—	+0.44?	—	0.98	3.3						
	10	g	10	g	123.14	164.30	1.07	—	0.10	0.13	0.56	3.4						
VII	Reinkultur von Azotobakter		10	g	664.08	640.98	1.04	—	5.47	6.84	9.77	10.8						
	mit Kaliumhumat		7	m	686.73	756.68	0.91	—	10.24	12.80	11.03	9.9						
	" Natriumhumat		37	m	905.42	968.17	0.94	—	10.50	13.13	16.04	10.9						
	" Ca-Humat		17	g	975.90	953.58	1.02	—	11.14	13.93	12.10	9.1						
	" Humat aus Zucker		37	m	248.83	262.81	0.95	—	0.13	0.16	1.18	2.9						
	" Kaliumhumat		11	g	548.24	524.27	1.04	—	6.47	8.09	7.95	10.6						
	" "		11	m	489.36	530.11	0.92	—	8.56	10.70	8.16	10.3						
	" "		10	g	632.54	589.58	1.07	—	11.56	14.45	12.89	14.9						
		22	g	572.54	547.18	1.04	—	6.39	7.99	9.31	12.0							

Beijerinck hat in der Meinung, daß eine Zugabe kleiner Mengen gebundenen Stickstoffs zu der Nährlösung die Entwicklung des Azotobakters anregt, sehr oft geringe Mengen von Erde derselben als Stickstoffquelle zugesetzt. Diese Erde war sehr humusreich, was man daraus ersehen kann, daß sie 0·56% Stickstoff enthielt. Wir wollen versuchen nachzuweisen, daß gerade die An-, bezw. Abwesenheit dieser Erde das ausschlaggebende Moment für die Versuchsergebnisse in Beijerincks Kulturen war.

Um diese Behauptung zu begründen, will ich die sämtlichen Resultate der Untersuchungen von Beijerinck und van Delden hier zusammenstellen und sie in zwei Hauptgruppen teilen. In der einen will ich diejenigen Versuche zusammenfassen, in denen der Nährlösung Erde zugesetzt wurde, in der zweiten diejenigen mit erdfreien Kulturen. Alsdann will ich, da nur bei Granulobakter (*Clostridium*) und Azotobakter die Fähigkeit zur Stickstoffbindung beobachtet worden ist, diese beiden Gruppen in Serien teilen je nach den Organismen, die in den Kulturen vorhanden waren.

Um das ganze Material zu vereinheitlichen und zu vereinfachen, rechne ich die von Beijerinck erzielten Stickstoffzuwächse auf 100 *ccm* Nährlösung um. (Im Original war es pro Liter). Dabei bezeichne ich einen jeden Versuch mit eigener laufender Nummer und gebe nur die bloßen Stickstoffzuwächse an, ohne die in den Kulturen befindlichen Organismen zu erwähnen.

Auf diese Weise wird die erste Serie nicht die Versuche mit Azotobakter und auch nicht mit Granulobakter umfassen, sondern sich mit den anderen Organismen beschäftigen.

Zur zweiten Serie gehören diejenigen Versuche, bei denen Granulobakter ohne Azotobakter vorhanden war.

Die dritte Serie bilden die Versuche mit Azotobakter allein, bei denen keine Spur von Granulobakter vorhanden war.

Endlich umfaßt die vierte Serie Versuche mit Azotobakter und Granulobakter, die in der Kultur gleichzeitig vorhanden waren, und zwar ohne Rücksicht auf die Anwesenheit von irgend welchen anderen Organismen.

(Siehe Tab. XX, Seite 999).

Ein Blick auf die Tabelle genügt, um einzusehen, daß in derjenigen Versuchsgruppe, in welcher der Nährlösung Erde zugesetzt wurde, die Stickstoffzuwächse im allgemeinen größer sind, als in

TABELLE XX.

Stickstoffgewinne in den Versuchen von Beijerinck und van Delden, pro 100 ccm Nährlösung.

Serien	Azotobakter und Granulobakter in der Nährlösung vorhanden oder nicht	Nährlösung ohne Erde		Nährlösung mit Erde	
		Nr. des Ver- suches	Stickstoffge- winne in mg	Nr. des Ver- suches	Stickstoffge- winne in mg
I	Kein Azotobakter und kein Granu- lobakter	32	0.06	—	—
		33	1.32	—	—
		34	—	—	—
		35	0.13	—	—
II	Nur Granulobakter	20	0.62	22	0.34
		—	—	23	3.21
		—	—	28	3.70
		—	—	29	1.04
III	Azotobakter ohne Granulobakter	31 ^a	0.13	31 ^c	0.27
		31 ^b	—	39	3.49
		31 ^d	0.55	42	7.69
		36	1.18	43	7.97
		37	1.46	44	7.97
		38	0.83	60	0.83
		40	0.06	—	8.30 ¹⁾
		41	0.83	—	—
		46	0.69	—	—
		59	0.62	—	—
		61	1.32	—	—
IV	Azotobakter mit Granulobakter	2	3.01	1	5.20
		3	2.31	4	2.40
		14	1.46	5	1.70
		18	7.62	6	2.59
		19	1.56	7	7.34
		24	2.22	8	8.23
		25	2.26	9	4.55
		26	6.99	10	13.85
		27	0.97	11	13.57
		45	0.55	12	7.13
		51	0.69	13	8.11
		52	2.51	15	11.12
		53	2.58	16	2.23
		55	0.20	17	6.64
		56	2.51	21	9.86
		57	1.25	30	7.27
		58	1.46	47	3.24
		—	—	48	3.01
—	—	49	10.42		
—	—	50	8.18		
—	—	54	3.70		

1) Wechselkultur.

den Versuchen ohne Zusatz von Erde. Doch gehen wir zur Betrachtung der einzelnen Tatsachen über.

Serie I umfaßt einige Versuche mit Organismen, die keinen Stickstoff banden und dabei in einer Nährlösung ohne Erde gezüchtet waren. Hierbei fällt vor allem Versuch No 33 durch die ziemlich deutliche Stickstoffzunahme auf. Dieser Versuch scheint nicht normal verlaufen zu sein, und dafür sprechen auch die Beobachtungen Beijerincks (a. a. O., S. 32 u. 42 unten).

Die in der Serie II zusammengestellten Versuche wurden meistens an Nährlösungen mit Zusatz von Erde ausgeführt. Darum sind auch die Stickstoffzuwächse in ihnen unleugbar.

Äußerst interessant war Serie III. Hier befand sich der Azotobakter vorwiegend zusammen mit anderen Mikroorganismen; der Einfluß des Zusatzes von Erde zur Nährlösung äußert sich sehr stark, weils uns hier elf Kulturen ohne Zusatz von Erde und sieben mit Erde zum Vergleich vorliegen. Die Stickstoffzunahmen in den Kulturen ohne Erde sind minimal, der größte beträgt 1.46 mg; in den mit Erde versetzten Kulturen haben wir zwar zwei kleine Zunahmen zu verzeichnen, doch in den fünf übrigen Versuchen betragen sie durchschnittlich 8 mg Stickstoff, und hier gerade haben wir den Beweis dafür, daß nicht die Anwesenheit des Radiobakters oder anderer Bakterien, sondern nur die Anwesenheit von Humusstoffen der Erde in der Nährlösung diese vermehrte Stickstoffaufnahme seitens des Azotobakters verursacht hat. Leider haben Beijerinck und van Delden nur vier Versuche mit einer reinen Azotobakterkultur in ihren Arbeiten angeführt, und nur bei einem von diesen war der Nährlösung Erde zugesetzt worden. Wären mehr Versuche mit Zusatz von Erde ausgeführt worden, so würde unserer Meinung nach sich herausgestellt haben, daß der Azotobakter fähig ist, Stickstoff selbständig zu binden.

Betrachten wir schließlich die Serie IV, so zeigt sich uns die Anteilnahme an der Stickstoffbindung seitens der anderen Organismen neben dem Azotobakter im richtigen Lichte. Dieser Serie wurde mehr als die Hälfte aller in den Arbeiten von Beijerinck und van Delden verzeichneten Versuche einverleibt. In der Zahl von 17 Versuchen dieser Serie, die ohne Zugabe von Erde ausgeführt worden sind, springen nur zwei (No 18 u. No 26) durch ihre großen Stickstoffzuwächse, die je 7 mg betragen, in die Augen.

In den übrigen 15 schwanken die Stickstoffzuwächse zwischen 0·2 und 3·0 *mg*, im Mittel betragen sie 1·7 *mg*.

Kultur No 18 steht mit ihrer bedeutenden Stickstoffzunahme vereinzelt da; was dagegen Kultur 26 anbelangt, so bemerkt Beijerinck selbst ausdrücklich (S. 28) daß, so oft er sie in neue Nährlösungen überimpfte, er stets nur noch ganz geringe Stickstoffzunahmen beobachten konnte. Angesichts dessen läßt dieser ebenso wie Versuch No 33 der Serie I gewisse Zweifel zu. Entschieden abweichende Resultate können wir bei den 21 Versuchen derselben Serie feststellen, die jedoch bei Nährlösungen mit Erdzusatz ausgeführt worden sind. Hier haben wir in zwei Versuchen Stickstoffzunahmen bis zu 14 *mg*, durchschnittlich betragen sie für alle 21 Versuche 6·6 *mg* und erreichen nur in 4 von ihnen kaum 3 *mg*. Somit werden durch unsere Versuche von Beijerinck und van Delden erzielten Resultate in ihrem vollen Umfange bestätigt.

Ebenso wie in ihren Versuchen zeigt auch in dem unsrigen der Azotobakter und sogar auch der Granulobakter nur überall da eine ausgiebigere Stickstoffbindung, wo in der Nährlösung Humusstoffe vorhanden sind. So können wir denn nun mit dieser Funktion der Humusstoffe eine ganze Reihe von Zweifeln erklären, die sich Beijerinck bei der Betrachtung seiner Versuchsergebnisse aufgedrängt haben.

Beispielsweise weist Beijerinck auf die Versuche No 39—44, vorgenommen an gemischten Kulturen von Azotobakter und Radiobakter, die ihm infolge von einander widersprechenden Resultaten nicht ganz klar erscheinen (S. 37). Nunmehr ist der Sachverhalt ziemlich klar:

Wo der Nährlösung Erde zugesetzt worden ist, war auch die Stickstoffbindung bedeutend (Nr. 39, 42, 43 u. 44). Oder auch: Beijerinck erklärt die großen Differenzen in der Leistungsfähigkeit der gemischten Kulturen von Azotobakter und Granulobakter (Nr. 51 u. 51) damit, daß der Granulobakter seine Fähigkeit, Stickstoff zu binden, infolge seiner Züchtung in freier Luft verloren hat. Ohne die Richtigkeit dieser Auffassung zu bestreiten, wollen wir jedoch darauf aufmerksam machen, daß der Kultur Nr. 50 Erde zugesetzt worden war, der Kultur Nr. 51 dagegen nicht und daß dementsprechend in der ersten mehr an gebundenem Stickstoff gefunden worden ist, als in der anderen.

„Etwas Ähnliches — sagt Beijerinck selbst — läßt sich auch

für Granulobakter reptans konstatieren aus den Versuchen Nr. 54, 53 u. 49^a. Schließlich findet Beijerinck keine Erklärung dafür, warum bei einer Kombination von Azotobakter und zwei anderen Organismen zwecks Erzielung der bei Rohkulturen beobachteten Erscheinungen, sehr oft mit diesen Kombinationen nur sehr mäßige Stickstoffzunahmen erhalten werden, während das von der Haut der Rohkulturen übergeimpfte Material (also eine natürliche Kombination) große Stickstoffzuwächse ergibt. Dies bezieht sich auf die Versuche Nr. 53—61, vorgenommen mit künstlichen Kombinationen, die dennoch kleinere Stickstoffzuwächse ergaben als die natürlichen (die Haut von Rohkulturen) Nr. 1—17. Beijerinck erklärt diese Differenzen durch nicht genügende Anpassung der untersuchten Bakterien an die neuen Ernährungsverhältnisse. Aber bei der Durchsicht aller hier angeführten Versuche überzeugen wir uns, daß fast allen mit Rohkultur infizierten Nährlösungen (Nr. 1—17) Erde zugesetzt war, während die künstlichen Kombinationen von Bakterien (Nr. 53—61) mit geringen Ausnahmen keine Erde in der Nährlösung enthielten. Dadurch wird es uns erklärlich, warum von der ersten der Stickstoff ganz energisch, von den anderen dagegen nur sehr schwach gebunden wurde.

Wir haben etwas länger bei der Arbeit von Beijerinck und van Delden verweilt, um darzutun, daß die von diesen Forschern erzielten Resultate sich an der Hand der von uns erhaltenen Versuchsergebnisse vollständig erklären lassen. Bei der Interpretation bei Beijerincks Versuchen braucht man weder zu der Teilnahme anderer Organismen in dem Prozesse der Stickstoffbindung seitens des Azotobacters Zuflucht zu nehmen, noch der Abnahme der N-Assimilationsfähigkeit derselben in den Kulturen Rechnung zu tragen; es genügt, die Differenzen in der Zusammensetzung der Nährlösung zu berücksichtigen. Man darf auch nicht die negativen Resultate auf das Konto des Alters der verwendeten Azotobakterkultur zu setzen, sondern muß dieselben lediglich dem Mangel an Humusstoffen in der Nährlösung zuschreiben.

Schließlich wollen wir noch hinzufügen, daß sich auf dieselbe Weise auch die Versuchsergebnisse von Heinze (17) leicht erklären lassen, welcher in reinen Azotobakterkulturen Stickstoffzunahmen von durchschnittlich kaum 2·8 mg auf 1 g Glukose, in Kulturen mit Zusatz von sterilisierter Erde dagegen von 10·4 mg und schließlich in Rohkulturen von 14·9 mg gefunden hat.

V. Die Wirkungsweise von Humusstoffen auf den Azotobakter.

Nach Feststellung der großen Bedeutung der Humusstoffe für die Entwicklung des Azotobaktters wäre es eine dankbare Aufgabe, das Wesen ihrer Bedeutung aufzuklären. Wenn Beijerinck den Kulturen Erde zugesetzt hat, so sah er darin eine Quelle von Stickstoff, welche in bestimmten Gaben einen fördernden Einfluß auf die Entwicklung des Azotobaktters ausüben sollte. Die Ansichten über die Humussubstanzen als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen der Erdkrume will ich hier nicht näher erörtern, sondern nur die Beobachtungen von Heinze, die sich auf den Azotobakter beziehen, erwähnen. Dieser Forscher gibt an, daß er eine starke Entwicklung des Azotobaktters auf einer Nährlösung gefunden hat, welche 1% Humussäuren und eine sehr geringe Menge von Glukose (0.02—0.1%) enthielt. An anderer Stelle ist dieser Autor der Meinung, daß der Azotobakter in seiner Verwendung von Humusstoffen als Kohlenstoffquelle durch andere Organismen unterstützt wird, durch welche dieselben in andere, dem Azotobakter zugänglichere Verbindungen umgesetzt werden. Indessen ist durch Reinitzer (25) und Nikitinsky (26) festgestellt worden, daß der Humus, insofern er überhaupt eine Rolle bei der Ernährung der von ihnen beobachteten Organismen spielt, nur als Stickstoffquelle betrachtet werden kann.

Um nun inbezug auf den Azotobakter in dieser Hinsicht etwas Gewisses zu erfahren, haben wir die ganze folgende Reihe von Versuchen angestellt, wobei wir vor allem die Frage zu lösen suchten, in welchem Maße die Entwicklung des Azotobaktters von der Menge der in der Nährlösung enthaltenen Humussubstanzen und anderer Kohlenstoffquellen abhängig ist.

1. Der Einfluß der Humusmenge und der Konzentration der Glukose in der Nährlösung.

Versuch XXIX. Am 23/V. 07. wurden 8 je 850 *ccm* fassende Erlenmeyerkolben mit je 200 *ccm* Nährlösung mit 1½% Glukose und wechselnden Mengen von aus Erde hergestellten humussaurem Kali beschickt. Die Kolben wurden nach Sterilisierung und Infiltrierung mit reiner Azotobakterkultur 11 Tage lang in Zimmertemperatur stehen gelassen. Die in den Kulturen erhaltenen Stickstoffzuwächse gibt Tabelle XXI.

TABELLE XXI.

Stickstoffgewinne bei verschiedenem Gehalt der Nährlösung an Humussubstanzen.

Die Menge der Glukose in der Nährlösung	Die Menge des humussauren Kalis in der Nährlösung	Stickstoffgewinne in mg	
		in der Kultur	im Mittel
3 g	0	1.40	1.65
3 g	0	1.89	
3 g	1 ccm = 23.4 mg	4.03	3.95
3 g	1 ccm = 23.4 mg	3.86	
3 g	5 ccm = 117 mg	10.92	10.50
3 g	5 ccm = 117 mg	10.08	
3 g	10 ccm = 234 mg	12.32	12.88
3 g	10 ccm = 234 mg	13.44	

Versuch XXX. Am 25/XI. 07. wurden 4 Kolben mit einer Nährlösung beschickt, welche 3 g Glukose und wechselnde Mengen aus Erde extrahierten humussauren Natrons enthielt. Diese Kolben verblieben diesmal 15 Tage lang im Thermostaten bei einer Temperatur von 28° C. Am Schluß des Versuches wurden neben den Stickstoffzuwachsen auch die vom Azotobakter verbrauchten Glukosemengen bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde die Nährlösung in Maßkolben gespült und schwach mit H₂SO₄ angesäuert. Die dabei aus der Lösung gefällte Humussäure riß zu dem Niederschlag auf dem Boden der Kolben sämtliche Bakterien mit. Die klare, über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wurde portionsweise zur Bestimmung von Glukose und von Stickstoff abgehebert. Die Bestimmung der letzteren war durchaus notwendig, handelte es sich doch darum zu bestimmen, wieviel davon aus der ganzen Flüssigkeit mit der zur Glukosebestimmung verbrauchten Portion entnommen wurde. Gewöhnlich haben wir daneben zwecks Bestimmung der durch den Azotobakter verbrauchten Glukosemengen ihren Gehalt in sterilisierten, jedoch nicht infizierten Kontrollkolben festgestellt¹⁾. Die Resultate dieses Versuches sind in Tabelle XXII zusammengestellt.

¹⁾ Die in Kulturen gewöhnlich zugesetzte Glukose war in der Regel nicht rein; darum muß überall, wo wir die Konzentration der Nährlösung angeben,

TABELLE XXII.

Stickstoffgewinne pro 1 g verbrauchte Glukose bei verschiedenem Gehalt der Nährlösung an Humus.

Glukosen- gehalt der Nährlösung in g	Die Menge des humus- sauren Natriums in g	Stickstoff- gewinne in mg	Ver- brauchte Glukose in g	Stickstoffge- winne pro 1 g verbrauchte Glukose in mg
3 g	0	2.42	0.72	3.4
3 g	0.1 g	8.70	1.94	4.5
3 g	0.2 g	15.39	2.43	6.3
3 g	0.2 g	13.78	2.25	6.1

Versuch XXXI. In den beiden vorhergehenden Versuchen haben wir den Nährlösungen relativ geringe Mengen von Humusstoffen zugesetzt. Der vorliegende Versuch stellt sich die Aufgabe, den Einfluß größerer Mengen derselben festzustellen. Es wurden 10 Kolben wie gewöhnlich mit je 200 *ccm* Nährlösung beschickt. Die Kolben verblieben 10 Tage lang im Thermostaten bei einer Temp. von 27° C. Die Resultate und die Einzelheiten über die Zusammensetzung der Nährlösung sind in Tabelle XXIII zusammengestellt.

eine gewisse Korrektur eingeführt werden. Das Glukosepräparat ist von Merck und führt in der Preisliste die Bezeichnung „Traubenzucker purissimum, wasserfrei“. Ich habe verschiedene Sendungen dieser Glukose im Februar 1906 und am Ende 1907 analysiert und fand darin:

	1906	1907
Glukose	82.71 %	82.72 %
Dextrin	3.92 „	3.89 „
Stickstoff	0.078 „	0.073 „
Asche	?	0.35 „
Wasser	9.00 „	9.07 „

Es war also sehr richtig, daß Merck in seiner Preisliste von April 1908 die Bezeichnung dieses Präparats von puriss. auf „purum“ umgewandelt hat. Es wäre viel bequemer, zu den Kulturen die Glukose „n. Soxhlet“, welche 99.6% reine Glukose enthält, zu verwenden, wenn der Preis dieses Präparates nicht so hoch wäre.

TABELLE XXIII.

Stickstoffgewinne in *mg* bei verschiedenem Gehalte der Nährlösung an Humus.

Die Menge der Glukose in der Nährlösung in <i>g</i>	Die Menge des humussauren Natriums in der Nährlösung in <i>g</i>	Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	Stickstoffgewinne im Mittel in <i>mg</i>	Bemerkungen
3	1.0	3.83	5.09	In der Nährlösung Glukose noch reichlich vorhanden.
3	1.0	6.35		
2	1.0	6.14	6.46	
2	1.0	6.77		
2.50	0.50	17.73	17.17	In der Nährlösung nur Spuren von Glukose.
2.50	0.50	16.61		
2.75	0.25	19.37		
2.75	0.25	22.17		
3.0	0	2.94	2.42	
3.0	0	1.89		

Nunmehr war zu untersuchen, wie sich die Stickstoffbindung bei konstanten Mengen von Humusstoffen und wechselnden Mengen von Glukose verhält. Die Antwort darauf gibt uns folgender Versuch XXXII. Am 14./VI. 1907 wurden 12 Erlenmeyerkolben mit je 200 *ccm* Nährlösung und 0.1 *g* humussauren Natron beschickt. Der Versuch dauerte 13 Tage. Die Kolben standen im Schatten unter einer Glocke im Glashause. Die in den Kulturen gefundenen Stickstoffzuwächse sowie die näheren Angaben über die Zusammensetzung der Nährlösung enthält Tab. XXIV.

(Siehe Tab. XXIV, Seite 1007).

Versuch XXXIII. Der zweite dasselbe Ziel verfolgende Versuch wurde in 16 Kolben ausgeführt, von denen jeder mit 200 *ccm* Nährlösung beschickt war, welche je 0.2 *g* humussaures Natron = 6.07 *mg* Stickstoff enthielt. In je 4 Kolben war die Konzentration an Glukose verschieden. Die so beschickten Kolben verblieben im Thermostaten bei einer Temperatur von 28° C. Nach Verlauf von 9 Tagen wurde die Hälfte von ihnen zur Analyse genommen, der Rest verblieb im Thermostaten noch 6 Tage lang. In den Kul-

TABELLE XXIV.

Stickstoffgewinne bei verschiedenem Gehalt der Nährlösung an Glukose.

Die Menge der Glukose in der Nährlösung in <i>g</i>	Die Menge des humussauren Natriums in der Nährlösung in <i>g</i>	Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	Stickstoffgewinne im Mittel in <i>mg</i>	Bemerkungen
0	0.1	0.32		
0	0.1	0.18	0.25	
0.5	0.1	5.32		
0.5	0.1	4.59	4.96	} Glukose vollständig verbraucht.
1.0	0.1	6.90		
1.0	0.1	8.16	7.53	
2.0	0.1	13.13		
2.0	0.1	12.64	12.89	} In der Nährlösung nur Spuren von Glukose vorhanden.
3.0	0.1	12.92		
3.0	0.1	14.88	13.90	} In der Nährlösung Glukose noch reichlich vorhanden.
3.0	0	1.12		
3.0	0	1.60	1.36	

turen wurden die Stickstoffzuwächse sowie die vom Azotobakter nicht verbrauchte Glukose bestimmt. Resultate siehe Tabelle XXV.

(Siehe Tab. XXV, Seite 1008).

Betrachten wir nun näher die Resultate dieser 5 Versuche: Die Versuche XXIX und XXX zeigen übereinstimmend, daß je größer die der Nährlösung zugegebene Menge an Humusstoffen, desto energischer auch die Stickstoffbindung ist, ferner daß auch die Stickstoffbindung ganz unbedeutend ist, wo der Humus vollständig fehlt. So wurde beispielsweise bei Gegenwart von 0.02 *g* humussaurem Kali im Mittel 3.95 *mg* Stickstoffzunahme, dabei aber in derselben Zeit bei zehnmal größeren Mengen von Humus an gebundenem Stickstoff 12.88 *mg* gefunden. Dabei ist auch, wie aus Versuch XXX ersichtlich, bei Gegenwart von größeren Humusgaben der Verbrauch von Glukose viel ökonomischer. Sind bei 0.1 *g* humussaurem Natron in der Nährlösung auf 1 *g* verbrauchte Glukose 4.5 *mg* gebundenen Stickstoffs gefunden worden, so beträgt bei einer Humusdosis von 0.2 *g* auf 1 *g* verbrauchte Glukose die Stickstoffzunahme in der

TABELLE XXV.

Stickstoffgewinne bei verschiedener Versuchsdauer und bei verschiedenem Glukosegehalt in der Nahrung.

Die Menge der Glukose in der Nahrung			Versuchsdauer 9 Tage					Versuchsdauer 15 Tage				
Gewicht der Glukose in <i>g</i>	% Gehalt der Glukose	Wirklicher Gehalt der Glukose in <i>g</i>	Stickstoffgewinn in <i>mg</i>	Die Menge der nicht verbrauchten Glukose in <i>g</i>		Stickstoffgewinn pro 1 <i>g</i> verbrauchte Glukose in <i>mg</i>	Stickstoffgewinn in <i>mg</i>	Die Menge der nicht verbrauchten Glukose in <i>g</i>		Stickstoffgewinn pro 1 <i>g</i> verbrauchte Glukose in <i>mg</i>		
				<i>g</i>	%			<i>g</i>	%			
1	0·5	0·83	5·45	0·29	0·54	64·5	10·1	7·28	0·02	0·81	97·1	9·0
1	0·5	0·83	6·96	0·10	0·73	87·7	9·5	7·38	0·02	0·81	96·8	9·2
3	1·5	2·50	8·89	1·36	1·14	45·8	7·8	15·39	0·07	2·43	97·2	6·3
3	1·5	2·50	14·66	0·52	1·98	79·2	7·4	13·78	0·25	2·25	90·1	6·1
5	2·5	4·16	10·18	2·75	1·41	33·9	7·2	18·11	1·32	2·84	68·1	6·4
5	2·5	4·16	10·54	2·71	1·45	34·9	7·2	16·43	1·38	2·78	66·8	6·0
7	3·5	5·83	8·26	4·64	1·19	20·4	7·0	15·27	2·66	3·17	54·4	4·8
7	3·5	5·83	7·85	4·69	1·14	19·6	6·9	16·95	2·69	3·14	53·9	5·4

Nährlösung 6.3 mg. Doch kann die Humuszugabe nicht beliebig gesteigert werden. Wie nämlich aus Versuch XXXI hervorgeht, wird der Stickstoff durch den Azotobakter am energischsten dann gebunden, wenn auf 2.5 — 2.75 g Glukose in 200 ccm Nährlösung 0.25 — 0.5 g humussaures Natron vorhanden ist. Schon eine Steigerung der Humusdosis auf 1.0 g auf 3 oder 2 g Glukose drückt die Fähigkeit der Stickstoffbindung bis auf $\frac{1}{3}$ herab. Diese Tatsache weist darauf hin, daß in der Nährlösung ein bestimmtes Optimum an Humusgehalt besteht, bei welchem die Stickstoffbindung am intensivsten von statten geht.

Andererseits aber besteht ein inniges Abhängigkeitsverhältnis zwischen den Stickstoffzuwachsen in den Azotobakterkulturen und der Menge der in der Nährlösung vorhandenen Glukose. Wie einerseits die Entwicklung des Azotobakters bei Abwesenheit von Humusstoffen sehr schwach ist, so entwickelt er sich bei Gegenwart von Humus ohne Glukose fast gar nicht. Je größer die Menge der Glukose in der Nährlösung, desto größer der Stickstoffzuwachs in der Kultur. Dabei wird jedoch mit der Zunahme der Konzentration der Nährlösung ihr Verbrauch im Verhältnis zur Stickstoffbindung immer weniger ökonomisch. Beispielsweise seien bei Versuch XXXII nur diejenigen Kolben angeführt, in denen die Glukose vollständig aufgezehrt war; alsdann sehen wir, daß auf einen Verbrauch von 1 g Glukose

bei 0.5 g Glukose	9.92 mg	Stickstoffzuwachs
„ 1.0 „	7.53	„
„ 2.0 „	6.45	„

kommen.

Diese Tatsache wird auch durch Versuch XXXIII bestätigt, welcher gleichzeitig feststellt, daß die Schlußfolgerung von Gerlach und Vogel, betreffend den negativen Einfluß einer verstärkten Glukosezugabe (von 1.2% — 1.5%) auf die Stickstoffbindung, durchaus nicht zu verallgemeinern ist. Gerlach u. Vogel haben in diesen Fällen eine Schwächung der Stickstoffbindung bis auf die Hälfte beobachtet. Wir sind viel weiter gegangen, indem wir der Nährlösung bis 2.9% Glukose zugesetzt haben, und doch haben wir im Verhältnis zu denjenigen Resultaten, welche auf einer 1.25%-igen Glukosenährlösung erzielt worden sind, keine Abnahme der Stickstoffbindung feststellen können. Schließlich würde Versuch XXXIII

darauf hinweisen, daß, je länger der Versuch, desto unökonomischer der Verbrauch von Glukose ist, was übrigens noch bestätigt werden müßte.

Die Bestätigung der oben besprochenen Ergebnisse finden wir im Versuch XXXIV: Am 16/X. 1907 wurden gleichzeitig 28 Kolben mit je 200 *ccm* Nährlösung und wechselnden Mengen von Glukose und Humusstoffen beschickt. Je kleiner die Glukosegabe in der Nährlösung war, desto größer wurde gleichzeitig die Humusgabe bemessen. Als Humussubstanz wurde humussaures Natron mit 2.9% Stickstoff verwandt. Dieser Versuch dauerte 10 Tage; während dieser Zeit befanden sich die Kolben im Thermostaten bei 27° C. Die näheren Umstände sowie die Einzelheiten der Resultate sind in Tab. XXVI zusammengestellt.

(Siehe Tab. XXVI, Seite 1011).

Auch hier sehen wir also, ebenso wie in den vorhergehenden Versuchen, daß die Steigerung der Humusmenge in der Nährlösung nur bis zu gewissen Grenzen die Leistungsfähigkeit des Azotobakters hebt. Die letztere läßt nach, sobald die Grenzen für die Maximaldosen von Humusstoffen überschritten werden, schließlich hört dieselbe vollständig auf, trotzdem die Glukose nicht verbraucht worden ist. Die größten Stickstoffzuwächse haben wir bei Anwesenheit von 2.5—2.75 *g* Glukose auf 200 *ccm* Nährlösung verzeichnet, wenn gleichzeitig 0.25—0.5 *g* Humussubstanzen darin enthalten waren. Berechnen wir für diejenigen Kolben, in denen die Glukose vollständig aufgezehrt war (die betr. Ziffern sind mit ¹ versehen) die Stickstoffzuwächse für jedes Gramm verbrauchte Glukose, so sehen wir, daß auch hier der Verbrauch desto ökonomischer ist, je größer die Stickstoffzunahme war (Tab. XXVII).

(Siehe Tab. XXVII, Seite 1012).

Wo also entweder die Menge von Humusstoffen oder auch die Menge von Glukose zu groß ist, dort wird jedesmal der Verbrauch der letzteren sowohl geringer als auch unökonomischer in bezug auf Stickstoffbindung sein. Auch der Humus allein kann für den Azotobakter keine Kohlenstoffquelle bilden¹⁾; für die Bindung von

¹⁾ N. K. Pillai hat versucht, mit Humus die Kohlensäurequelle für den Azotobakter zu ersetzen, jedoch gleichfalls mit negativem Erfolge. Inaug. Dissert. Leipzig 1908.

TABELLE XXVI.

Stickstoffgewinne bei wechselnder Menge der Glukose und des humussauren Natriums in der Nährlösung.

Die Menge des humussauren Natriums in der Nährlösung in g	Die Menge der Glukose in der Nährlösung in g	Stickstoffgehalt in der Nährlösung vor dem Versuche in mg	Stickstoffgehalt in der Nährlösung nach dem Versuche in mg	Stickstoffgewinne in mg
—	3·00	0·84	ungeimpft	
—	3·00	0·84	2·38	1·54
—	3·00	0·84	2·17	1·33
—	3·00	0·84	3·50	2·66
—	3·00	0·84	2·80	1·96
0·15	3·00	4·28	20·93	16·65 ¹⁾
0·15	3·00	4·28	20·30	16·02 ¹⁾
0·25	2·75	6·51	28·28	21·77 ¹⁾
0·25	2·75	6·51	28·00	21·49 ¹⁾
0·50	2·50	12·17	35·28	23·11 ¹⁾
0·50	2·50	12·17	39·98	23·81 ¹⁾
1·00	2·00	23·50	28·28	4·78 ²⁾
1·00	2·00	23·50	35·42	11·92 ¹⁾
1·50	1·50	34·83	33·46	-0·37
1·50	1·50	34·83	35·56	0·75
2·00	1·00	46·16	45·22	-0·94
2·00	1·00	46·16	46·34	0·18
2·50	0·50	57·49	56·44	-1·05
2·50	0·50	57·49	55·72	-1·77
2·75	0·25	63·16	61·76	-1·40
2·75	0·25	63·16	62·16	-1·00
3·00	0·25	68·81	67·83	-0·98
3·00	0·25	68·81	69·35	0·54
3·00	—	68·81	68·88	0·07
3·00	—	68·81	69·44	0·63
3·00	—	68·81	70·28	1·47
3·00	—	68·81	69·02	0·21

TABELLE XXVII.

Die Menge der Glukose in der Nährlösung g	Die Menge des humussauren Natriums in der Nährlösung g	Stickstoffgewinne pro 1 g ver- brauchte Glukose mg
3.00	0.15	5.55
3.00	0.15	5.34
2.75	0.25	7.91
2.75	0.25	7.81
2.50	0.50	9.24
2.50	0.50	9.52
2.00	1.00	5.96

Stickstoff ist stets noch eine andere Kohlenstoffquelle nötig. Welchen Einfluß auf diese Bindung die verschiedenen anderen Kohlenstoffquellen haben können, darauf werden die weiteren Versuche Antwort geben.

2. Der Einfluß der Qualität der Kohlenstoffquelle und der Form der Humusverbindungen.

Zwecks Einschätzung des Wertes verschiedener Kohlenstoffquellen für den Azotobakter wurden einige Versuche mit Glukose, Mannit und Rohrzucker durchgeführt, wobei stets den Kulturen gleiche Mengen von Humus zugesetzt waren.

Versuch XXXV. Die Erlenmeyerkolben wurden mit je 200 *ccm* Nährlösung beschickt, welche mit je 3 (eigentlich 2.5) *g* Glukose oder 2.5 *g* Mannit, sowie mit 0.05% K_2HPO_4 und mit je 0.3 Natronhumat = 6.37 *mg* N_2 versetzt war. Die Kolben verblieben nach der Infizierung der Nährlösung 10 Tage lang in einer Temp. von 28° C. Nach der Beendigung des Versuches wurden folgende Stickstoffzunahmen festgestellt. Tab. XXVIII.

(Siehe Tab. XXVIII, Seite 1013).

Versuch XXXVI. Es wurden 12 Kolben mit einer Nährlösung von je 3.3 *g* Glukose, Rohrzucker oder Mannit beschickt. Ein Teil der Kolben enthielt einen Zusatz von 0.13 *g* Natriumhumat = 5 *mg* N,

TABELLE XXVIII.

Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	
Glukosenährlösung	Mannitnährlösung
23·74	17·43
23·74	21·21
23·85	18·55

der andere war ohne Humuszusatz. Die Kolben standen 10 Tage lang in einer Temp. von 28° C. Die Stickstoffzuwächse waren folgend:

TABELLE XXIX.

Kohlenstoffquelle in der Nährlösung	Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	
	mit Na-Humat	ohne Na-Humat
Glukose	21·11	2·31
	20·88	2·34
Rohrzucker	18·87	1·26
	17·40	0·91
Mannit	16·42	1·40
	15·51	1·40

Beide Versuche weisen darauf hin, daß die Glukose dem Azotobakter als Kohlenstoffquelle am zuträglichsten ist, während Rohrzucker den Mittelplatz zwischen Glukose und Mannit einnimmt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der Versuche von Krainsky (13) nicht überein, welcher in vier Wochen alten Azotobakterkulturen bei 30°C folgende Stickstoffzunahmen gefunden hat:

bei 1%-ger Glukose	bei 1%-gem Rohrzucker	bei 1%-gem Mannit
1·1 <i>mg</i>	0·0 <i>mg</i>	4·6 <i>mg</i>
1·6 „	0·0 „	6·8 „

Um den Einfluß der Form der Humusverbindungen in der Nährlösung zu erforschen, wurde

Versuch XXXVII ausgeführt. Am 5/VII. 1907 wurden 14 Kolben mit je 200 *ccm* Nährlösung mit einem Gehalt von je 3 *g* Glukose beschickt. Diesen Nährlösungen wurden verschiedene Verbindungsformen von natürlichem und aus Zucker bereitetem, künstlichem Humus zugesetzt. Der Versuch dauerte 10 Tage lang, u. z. bei einer Temp. von 28° C. Seine Resultate sind aus Tab. XXX ersichtlich.

TABELLE XXX.

Stickstoffgewinne in *mg* in 200 *ccm* Nährlösung (3 *g* Glukose).

	mit 0.16 <i>g</i> Humussäure	mit 0.16 <i>g</i> humussauren Ca	mit 0.16 <i>g</i> humussauren Na	ohne Humusstoffe
Humusstoffe aus Zucker	0.97 1.53	2.09 2.11	1.27 1.48	1.20 0.99
Humusstoffe aus Erde	8.72 9.35	11.48 10.85	21.88 20.62	

Aus diesem Versuch würde hervorgehen, daß der natürliche Humus in löslicher Form (humussaures Natron) fast zweimal so große Stickstoffzuwächse liefert, als in unlöslicher Form (freie Humussäure, humussaurer Kalk), während der aus Zucker dargestellte Humus überhaupt keinen Wert besitzt.

Mit einem Wort: Die Stickstoffbindung durch Azotobakter kann sowohl von der Form der Kohlehydrate als auch von der Form der Humusverbindungen in der Nährlösung abhängig sein.

3. Der Einfluß der Herkunft und der verschiedenen Behandlung der Humusstoffe auf die Stickstoffbindung durch den Azotobakter.

In unseren Versuchen kann man einen verschiedenartigen Einfluß der Humusstoffe auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter beobachten. Es drängt sich also die Vermutung auf, daß diese Unterschiede entweder durch das ungleichmäßige Verfahren bei der Humusdarstellung oder durch das verschiedene Material, aus dem man den Humus von Zeit zu Zeit erhielt, oder durch beides verursacht wurden. Der Humus wurde portionweise wiederholt hergestellt, und die dazu benutzte Erde war nicht immer dieselbe. Darum haben wir im weiteren Verlauf unserer Arbeit Versuche über den Einfluß

verschiedener und verschiedenartig bereiteter Humusstoffe unter-
nommen. Zunächst haben wir in oben angegebener Weise gleich-
zeitig Humate aus 3 Erdarten dargestellt:

- 1) aus stark humushaltiger Rasenerde des Gärtchens,
- 2) aus ungekalkter Parzelle des Versuchsfeldes,
- 3) aus gekalkter Parzelle desselben Feldes.

Portionen dieser 3 Humate wurden 3 Stunden lang mit schwa-
cher Salzsäure gekocht, die daraus erhaltenen Humussäuren wurden
wieder umgeföhrt in lösliche Humate; die wir neben den ursprüng-
lichen Humaten als Zusätze zu den Nährlösungen des Azotobaktors
im folgenden Versuche verwendeten.

Versuch XXXVIII. Die Kulturen erhielten je 200 *ccm* Nähr-
lösung mit einem Gehalt von je 2% Glukose und 0.05% K_2HPO_4 .
Diesen Nährlösungen wurden Natriumhumate aus verschiedenen
Erdarten, die aus ungekochten oder mit HCl gekochten Humussäu-
ren erhalten waren, zugesetzt, u. z. stets in Mengen, welche je
5 *mg* N_2 enthielten. Zur Kontrolle wurden 2 Kolben ohne Humate
zusammengestellt. Der Versuch dauerte 10 Tage lang, die Kolben
standen während der ganzen Zeit im Thermostaten bei 28° C. Die
erhaltenen Stickstoffzunahmen sind in Tab. XXXI zusammengestellt.

TABELLE XXXI.

	Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	
	In Nährlösung mit Natriumhu- maten aus nicht mit HCl gekoch- ten Humussäuren	In Nährlösung mit Natriumhu- maten aus mit HCl gekochten Humussäuren
Natriumhumat aus Gartenerde	20.86	9.92
	23.24	13.05
	20.22	—
	21.14	—
Natriumhumat aus der Erde der ge- kalkten Parzelle des Versuchsfeldes	48.00	20.42
	47.58	16.22
Natriumhumat aus der Erde der unge- kalkten Parzelle des Versuchsfeldes	53.18	16.50
	53.46	12.58
Nährlösung ohne Humate	2.04	
	2.86	

12*

Die ungewöhnlich großen Stickstoffzuwächse, die in Kulturen mit Humaten, welche der Erde des Versuchsfeldes entstammten, erzielt wurden, waren so überraschend, daß sie sogar Zweifel an der Richtigkeit der Resultate erweckten. Darum wurden auch die Flüssigkeiten aus den Vorlagen zum zweiten Male überdestilliert, jedoch mit demselben Resultat. Um jeden Zweifel auszuschließen, wurde dieser Versuch sofort wiederholt, wobei den Nährlösungen nur solche Humate zugesetzt wurden, die aus Humussäuren, welche mit HCl nicht gekocht wurden, erhalten waren.

Versuch XXXIX. Am 17/IV. 1908 wurden 10 Kolben ebenso wie im vorhergehenden Versuch zusammengestellt und nach 10 Tagen auseinandergenommen, wobei neben dem gebundenen Stickstoff noch die verbrauchte Glukose bestimmt wurde. Die Resultate des Versuches enthält Tab. XXXII.

TABELLE XXXII.

Stickstoffgewinne und Zuckerverbrauch in 200 *ccm* 2% Glukosenährlösungen mit Natriumhumaten verschiedener Herkunft.

	Stickstoff- gewinn in <i>mg</i>	Die Menge der ver- brauchten Glukose in <i>g</i>	Stickstoffge- winn pro 1 <i>g</i> verbrauchte Glukose in <i>mg</i>
Natriumhumat aus der Erde des Versuchsfeldes 0.145 <i>g</i>	55.84	—	—
	54.16	—	—
	54.27	3.070	17.7
	53.97	3.155	17.1
Natriumhumat aus Gartenerde 0.213 <i>g</i>	16.09	1.917	8.4
	20.75	2.063	10.1
Natriumhumat aus Gartenerde 0.145 <i>g</i>	12.92	—	—
	16.33	2.013	8.1
	13.07	1.618	8.1
Nährlösung ohne Humate	2.06	0.238	8.3

Auch hier sind die Resultate dieselben, wie im vorigen Versuch. Es folgt also daraus, daß der Azotobakter in 200 *ccm* Nährlösung mit einem Gehalt von 4 *g* Glukose in stande war, im Verlauf von 10 Tagen bis 56 *mg* N₂ zu binden. Die mit Humaten aus Gar-

tenerde versetzten Kulturen ergaben bedeutend kleinere Stickstoffzuwächse, die um so geringer waren, je weniger davon der Nährlösung zugesetzt wurde. Aus der Bestimmung der verbrauchten Glukose folgt, daß während bei Gegenwart von Humaten aus Gartenerde die Menge des Stickstoffs in der Kultur auf 1 g verbrauchte Glukose 8 mg beträgt, sie bei Gegenwart von Humaten aus dem Versuchsfelde 17 mg ausmacht.

Bedeutend ungünstigere Resultate ergaben diejenigen Kulturen, in denen die Nährlösungen Humate aus Humussäuren, mit Salzsäure gekocht, enthielten. Hier sind durchwegs die Stickstoffzuwächse kleiner und unterscheiden sich voneinander verhältnismäßig wenig. Wenn wir die Mittelzahlen aus 2 Kulturen nehmen (Tab. XXXI), und die Abnahme des gebundenen Stickstoffs, die infolge der Verwendung von gekochten Humaten zur Nährlösung eingetreten ist, im Vergleich mit den N₂-Gewinnen bei Nährlösungen mit ursprünglichen Humaten berechnen, so kommen folgende Resultate heraus:

1) für Humat aus Gartenerde . . .	45.8%
2) " " " gekalkter Parzelle .	61.7 "
3) " " " ungekalkter Parzelle	72.7 "

Um wenigstens teilweise auf die Spur zu kommen, worauf die Unterschiede in der Wirkung von Humaten verschiedener Herkunft auf die Entwicklung des Azotobacters sowie die verminderte Reaktionsfähigkeit von mit HCl gekochten Humaten beruht, wurden folgende Untersuchungen über die Zusammensetzung dieser Stoffe und über die Änderungen, welche sie beim Kochen mit HCl erleiden, vorgenommen.

Vor allem haben wir auf diese Art der Behandlung der Humussubstanzen deswegen unser Augenmerk gerichtet, weil sie schon während ihrer Darstellung von Salzsäure beeinflußt werden können. Die Forschungen von Dojarenko (27) haben gezeigt, daß während des Kochens von Humusstoffen mit HCl in die Lösung bis zu 12% Stickstoff vom Typus der Amide übergehen, während auf Ammoniakstickstoff in den Humusstoffen nur sehr wenig davon entfällt. Nikitinsky (26) hat in den Humusstoffen bedeutend mehr Ammoniakstickstoff, der von den Organismen verbraucht wurde, gefunden, doch wie er sich später überzeugt hat, wurde dieser Ammoniakstickstoff ausschließlich durch die Einwirkung von HCl

auf den Humus gebildet. Hielt er bei seiner Darstellung gewisse Vorsichtsmaßregeln ein, so fand er ähnlich wie Dojarenko kaum Spuren davon; jedoch war die Entwicklung der Organismen auf derart hergestellten Humaten, die als Stickstoffquelle dienen sollten, bedeutend schwächer. Er schließt daraus und erhärtet es mit Zahlen, daß nur der Ammoniakstickstoff der Humusstoffe von den Organismen aufgenommen werden kann Reinitzer (25) ist der Ansicht, daß auch der stärker gebundene Stickstoff der Humusstoffe verwendet werden kann, während der Humus mit diesem stärker gebundenen Stickstoff, wenn er durch Kochen von Humussäure mit HCl erhalten worden ist, nicht mehr als Kohlenstoffquelle für die Organismen dienen kann. Schon aus diesen Tatsachen ist ersichtlich, wie der Wert der Humussubstanzen für die Organismen von ihrer Behandlung abhängt.

Um die Einwirkung der Salzsäure auf die Humussubstanzen fernzuhalten, waren wir nach der Fällung der Humussäuren mit HCl stets bemüht, die Substanzen durch sorgfältigstes Auswaschen möglichst davon zu befreien. Erst nach genauem Auswaschen wurden die Humussäuren auf dem Wasserbade getrocknet und sodann in Natron- oder Kalihydrat gelöst. Die erhaltenen Humate wurden zur Trockene verdampft. Der Gesamtstickstoff wurde darin durch Verbrennen mit H_2SO_4 nach Kjeldahl's Methode, alsdann der Ammoniakstickstoff durch Destillation der Lösungen mit Magnesia und schließlich der Stickstoff der Amide durch Kochen mit Salzsäure und Destillieren mit Magnesia nach vorheriger Neutralisation bestimmt. Die Resultate dieser Bestimmung sowie die Aschengehalte der 3 von uns angewandten Humate verschiedener Herkunft stellen wir in Tab. XXXIII zusammen.

(Siehe Tab. XXXIII, Seite 1019).

Wie wir sehen, nähern sich diese Zahlen den von Dojarenko angegebenen, unterscheiden sich aber untereinander so wenig, daß sie keine Anhaltspunkte zur Aufklärung der verschiedenen Wirkung der aus Gartenerde einerseits und aus der Erde der Versuchsfeldes andererseits extrahierten Humusstoffe auf die Entwicklung des Azotobaktens bieten.

Portionen zu je 5 g der oben besprochenen Humate wurden in Wasser gelöst und in 2%-iger HCl 3 Stunden lang gekocht. In

TABELLE XXXIII.

Stickstoffgehalt in dem humussauren Natrium verschiedener Herkunft.

	Gesamtstickstoff in %	NH ₃ -Stickstoff in %	NH ₃ -Stickstoff in % des Gesamtstickstoffes	Amidstickstoff in %	Amidstickstoff in % des Gesamtstickstoffes	Asche %
Humussaurer Natrium aus Gartenerde	2·35	0·04	1·702	0·20	8·510	39·11
Humussaurer Natrium aus der ungekalkten Parzelle des Versuchsfeldes	3·47	0·08	2·305	0·29	8·357	29·55
Humussaurer Natrium aus der gekalkten Parzelle des Versuchsfeldes	3·44	0·08	2·325	0·27	7·907	31·35

den entstandenen Humussäuren wurde der Stickstoff abermals bestimmt. Die Resultate dieser Versuche zeigt Tab. XXXIV.

TABELLE XXXIV.

Die Art der hydrolysierten Humate	Aus 5 g Natriumhumaten wurde Humussäure hergestellt in g	Stickstoffgehalt in 5 g Natriumhumaten		Stickstoffgehalt der erhaltenen Humussäuren		Von dem Gesamtstickstoff der Humate sind in die Lösung übergegangen	
		%	mg	%	mg	%	mg
Natriumhumat aus Gartenerde	3·605	2·35	117·5	1·67	60·2	48·8	57·3
Natriumhumat aus der gekalkten Parzelle des Versuchsfeldes	2·412	3·47	173·5	2·54	61·3	64·7	112·2
Natriumhumat aus der ungekalkten Parzelle des Versuchsfeldes	2·700	3·44	172·0	2·37	64·0	62·8	108·0

Aus diesen Ziffern erhellt, daß das aus Gartenerde dargestellte Humat während des Kochens mit HCl 48% seines Stickstoffs an

die Lösung abgibt, während die Humate aus der Erde des Versuchsfeldes 64.7, bezw. 62.8 N₂ liefern.

Dieser Versuch scheint demnach auf einen gewissen Parallelismus zwischen der Löslichkeit der Humussäure beim Kochen mit Salzsäure und ihrer physiologischen Wirkung auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter hinzuweisen. Die physiologisch weniger wirksamen Humate aus Gartenerde zeigten sich nämlich weniger löslich beim Kochen mit Salzsäure als die wirksameren Humate aus der Erde des Versuchsfeldes. Auch spalteten die ersteren während dieses Kochens weniger Stickstoff in die Lösung ab als die letzteren. Außerdem scheint die Verminderung der physiologischen Wirksamkeit der Humate durch das Kochen mit Salzsäure der Menge des sich bei diesem Kochen abspaltenden Stickstoffs zu entsprechen. In der Tat ist aus den Zahlen obiger Versuche zu entnehmen, daß das Kochen mit Salzsäure zur Folge gehabt hat:

	Verminderung der physiologischen Wirksamkeit um	Überführung des Stick- stoffs in die Lösung in % des Gesamtstickstoffs
für Humate aus Gartenerde	45.8%	48 %
für Humate aus der gekalkten Parzelle des Versuchsfeldes	61.7%	64.7%
für Humate aus der ungekalkten Parzelle des Versuchsfeldes	72.7%	62.8%

Diesem Parallelismus zwischen der physiologischen Wirksamkeit der Humusstoffe und ihrer Fähigkeit, beim Kochen größere oder kleinere Mengen Stickstoff abzuspalten und sich zu lösen, würde eine hohe theoretische Bedeutung zukommen, falls sich derselbe auch für Humusstoffe anderer Herkunft bestätigen sollte. Es war demnach angezeigt, diese Versuche zu wiederholen und sie auch auf aus anderen Bodenarten extrahierte Humate auszudehnen. Zu diesem Zwecke wurden 6 Monate später von neuem Humate aus derselben Gartenerde, aus der Erde des Versuchsfeldes aber außerdem noch aus drei anderen Erdarten von Zakopane und von Siersza in oben angegebener Weise dargestellt und zu den nächstfolgenden Untersuchungen verwendet. Um zunächst das Verhalten dieser Humate beim Kochen mit Salzsäure kennen zu lernen, wurde in denselben der Stickstoffgehalt bestimmt, dann gleiche Portionen der Humate fünf Stunden lang mit verdünnter Salzsäure am Rückfluß-

kühler gekocht, die Humussäure abfiltriert, getrocknet und gewogen und in derselben der Stickstoffgehalt von neuem bestimmt. Nach diesen Analysen wurde auch die Menge des beim Kochen von Humussäure mit HCl abgespaltenen Stickstoffs berechnet. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

TABELLE XXXV.

Erdarten die zur Darstellung von Na-Humaten verwendet worden waren	Stickstoffgehalt der ursprünglichen Na-Humate in %	Stickstoffgehalt der Na-Humate, die aus mit HCl gekochter Humussäure erhalten wurden, in %	Stickstoffmengen, welche beim Kochen der Humate mit Salzsäure gelöst wurden, in % der ursprünglichen Stickstoffmenge
1. Torf aus Zakopane . . .	2.391	1.353	63.24
2. Bergwiese in Zakopane . .	2.982	1.727	68.54
3. Erde von einem Felde in Siersza	2.877	2.100	74.70
4. Gartenerde	2.954	2.100	49.52
5. Erde vom Versuchsfelde . .	2.891	1.867	61.50

Aus diesen Zahlen ist zu entnehmen, daß durch Kochen mit Salzsäure aus den Humaten, welche aus dem Boden von Zakopane und Siersza gewonnen worden waren, noch mehr Stickstoff in Lösung gebracht wurde, als aus denjenigen, welche aus der Erde des Versuchsfeldes bereitet waren. Am widerstandsfähigsten war auch diesmal die Humussäure aus Gartenerde.

Um nun die physiologische Leistungsfähigkeit dieser Humate bei der Stickstoffbindung durch Azotobakter kennen zu lernen, wurde folgender Versuch ausgeführt.

Versuch XL. 200 ccm einer Nährlösung, welche 2% Glukose u. 0.05% K_2HPO_4 enthielt, wurden mit je 5 mg N_2 in Gestalt von Natriumhumaten versetzt. Nach Sterilisierung u. Infizierung mit Azotobakterkulturen wurden die Kolben 10 Tage lang im Thermostaten bei 28° C stehen gelassen. Nach Abzug des Stickstoffs der Kontrollkolben von dem in den Kulturen gefundenen fand man folgende Zuwächse desselben:

TABELLE XXXVI.

Stickstoffzuwächse in Azotobakterkulturen bei Gegenwart von Humaten verschiedener Herkunft.

Herkunft der Humate	Stickstoffzuwächse in Milligrammen		
	bei Gegenwart von mit HCl nicht gekochten Humaten	bei Gegenwart von mit HCl gekochten Humaten	ohne Zusatz von Humaten
Torf aus Zakopane	13.06	0.60	2.31
	9.35	2.84	2.38
	9.98	2.70	2.10
Bergwiese in Zakopane	21.88	13.20	—
	23.42	17.68	—
	26.92	17.68	—
Erde von einem bestellten Felde in Siersza	31.82	9.42	—
	31.26	9.28	—
	30.42	12.08	—
Gartenerde	34.13	26.08	—
	36.02	24.12	—
	33.36	22.16	—
Erde von dem Versuchsfelde	34.90	10.10	—
	38.54	19.64	—
	31.96	18.99	—
Früher gewonnener Humus aus der Erde des Versuchsfeldes	54.36	—	—
	55.20	—	—
	54.92	—	—

Der Vergleich der Zahlen dieser Tabelle mit denjenigen, welche in der Tabelle XXXV die Prozentmengen des beim Kochen der Humusstoffe mit Salzsäure sich abspaltenden Stickstoffs bezeichnen, läßt sofort erkennen, daß der nach den Versuchen XXXVIII und XXXIX vermutete Parallelismus zwischen der physiologischen Leistungsfähigkeit der Humusstoffe bei der Stickstoffbindung durch Azotobakter und ihrer Befähigung, beim Kochen mit Salzsäure größere oder kleinere Mengen Stickstoff abzuspalten, nicht besteht und daß er also in den obengenannten Versuchen nur ein zufälliger war. Es ist bemerkenswert, daß das zum zweitenmal aus der Erde des Versuchsfeldes dargestellte Na-Humat nicht mehr diese außerordentlich starke physiologische Leistungsfähigkeit besaß wie das erstbereitete und daß es nur eben so stark gewirkt hat wie das Humat aus Gartenerde. Diese Erscheinung muß um so mehr befremden, als die Humate beider Darstellungen sich beim

Kochen mit Salzsäure durchaus gleichartig verhielten und gleiche Stickstoffmengen an die Lösung abgaben.

Die Humate des Torfes aus Zakopane haben sich als physiologisch sehr wenig wirksam erwiesen, obwohl das Kochen in Salzsäure über 60% ihres Stickstoffs in Lösung gebracht hat.

Es ist demnach zur Zeit nicht möglich, aus dem Verhalten der aus verschiedenartigen Erden extrahierten Humusstoffe beim Kochen mit Salzsäure Schlüsse auf ihre physiologische Leistungsfähigkeit bei der Stickstoffbindung durch Azotobakter zu ziehen.

Jedenfalls steht so viel fest, daß verschiedenartige Humusstoffe je nach ihrer Herkunft und Darstellungsweise eine sehr ungleiche Wirkung auf die Entwicklung des Azotobaktors und auf Stickstoffbindung durch denselben ausüben, zur Zeit wissen wir aber noch nicht, worauf diese Verschiedenheit zurückzuführen ist. Da es jedenfalls feststeht, daß das Kochen mit Salzsäure bedeutend die physiologische Wirksamkeit der Humusstoffe herabsetzt, so haben wir noch, und zwar ausschließlich mit Humusstoffen aus Garten-erde, folgende Versuche gemacht.

3 Portionen Natriumhumat zu je 5 g wurden in 300 ccm Wasser gelöst und zu diesen Lösungen je 40 ccm HCl zugesetzt, so dann in Kochflaschen mit Rückflußkühler gekocht. Die eine Portion wurde 5 Stunden, die zweite 15, die dritte 30 Stunden gekocht, die vierte nur mit Säure übergossen, jedoch nicht gekocht. Alsdann wurden die Niederschläge der Humussäuren auf Filtern gesammelt, getrocknet und gewogen. Die Filtrate wurden zusammen mit dem Spülwasser, jedes einzeln gesammelt und auf ein Liter gefüllt. Sowohl in den erhaltenen Humussäuren wie auch in den Filtraten wurde der Stickstoffgehalt bestimmt. Die Resultate dieser Bestimmungen enthalten Tab. XXXVII und XXXVIII.

(Siehe Tab. XXXVII u. XXXVIII, Seite 1024).

Aus obigen Zahlen ist ersichtlich, daß je länger die Humussäure mit HCl gekocht wird, sie in desto größerer Menge in die Lösung übergeht. Die Hauptmengen gehen gleich in den ersten Stunden des Kochens über, obgleich eine 30 Stunden lang gekochte Säure noch um 8% mehr an Gewicht verliert, als eine 5 Stunden lang gekochte. Die dabei erhaltenen Produkte sind an Stickstoff viel ärmer, da die in die Lösung übergehende Substanz stickstoffhaltiger ist als die ursprüngliche Humussäure: sie enthält ge-

Tabelle XXXVII.

Stickstoffgehalt der mit HCl gekochten Humussäuren.

	Die Mengen der Humussäuren aus 5 g Humaten in g	Gewichtsverminderung der Humus-säure beim Kochen mit HCl		Stickstoffgehalt der Humussäuren		In die Lösung übergegangener Stickstoff berechnet	
		g	%	mg	%	mg	in % der gelösten Substanz
Ohne Kochen mit HCl	3.725	—	—	103.3	2.77	—	—
Nach 5-stündigem Kochen mit HCl	2.485	1.240	33.3	53.1	2.14	50.2	4.05
Nach 15-stündigem Kochen mit HCl	2.396	1.329	35.7	48.3	2.04	55.0	4.10
Nach 30-stündigem Kochen mit HCl	2.196	1.529	41.0	40.6	1.85	62.7	4.10

Tabelle XXXVIII.

Stickstoffgehalt der Filtrate von Humussäuren.

	Stickstoffgehalt in mg		Verhältnis von NH ₃ -Stickstoff zu dem Gesamtstickstoff	Stickstoffgehalt der zurückgebliebenen Humussäuren (berechnet in)	
	NH ₃ -Stickstoff	Gesamtstickstoff		mg	%
Ohne Kochen mit HCl	4.03	17.3	0.23	100.2	2.69
Nach 5-stündigem Kochen mit HCl	13.65	68.4	0.20	49.1	1.98
Nach 15-stündigem Kochen mit HCl	16.10	71.6	0.23	45.9	1.92
Nach 30-stündigem Kochen mit HCl	18.38	75.2	0.24	42.3	1.93

gen 4% N. In dieser Lösung ist das Verhältnis des durch Kochen mit Magnesia abspaltbaren Stickstoffs zum Gesamtstickstoff ohne Rücksicht auf die Kochdauer fast konstant und beträgt gegen 0.23.

Um festzustellen, welchen Einfluß ein kürzeres Kochen der Humussäure mit HCl auf die erstere ausübt, wurden neue, je 2 g betragende Portionen von Humat aus Gartenerde in je 150 ccm Wasser gelöst und nach Ansäuerung mit HCl gekocht. Die erste Portion wurde 2 Stunden lang, die zweite 4, die dritte 6 Stunden lang gekocht, die vierte dagegen nur mit HCl gefällt. Nach dem Kochen wurden die Niederschläge mit der Flüssigkeit in 250 ccm fas-

sende Kolben gebracht, diese bis zur Marke aufgefüllt und nach Klärung der Flüssigkeiten wurde in ihnen in je 100 *ccm* Portionen sowohl der Gesamt-, als auch der Ammoniakstickstoff bestimmt, während die Niederschläge der Humussäuren auf Filtern gesammelt, getrocknet und gewogen wurden. Die Resultate dieses Versuches enthält Tab. XXXIX.

Tabelle XXXIX.

	Die Menge der Humussäure aus 2 <i>g</i> Humaten in <i>g</i>	Gewichtsverlust der Humussäure bei dem Kochen mit HCl		In der Lösung mit HCl gefundene Stickstoffmengen		
		<i>g</i>	%	NH ₃ -Stickstoff in <i>mg</i>	Gesamt-Stickstoff in <i>mg</i>	Verhältnis von NH ₃ -Stickstoff zu dem Gesamt-N.
Ohne Kochen mit HCl	1.406	—	—	1.80	7.18	0.24
Nach 2 stündigem Kochen mit HCl	1.010	0.396	28.2	5.25	21.35	0.24
Nach 4-stündigem Kochen mit HCl	0.981	0.425	30.2	5.60	24.50	0.23
Nach 6-stündigem Kochen mit HCl	0.898	0.508	36.1	5.95	24.90	0.24

In Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Versuche ging auch hier beim Kochen in den ersten Stunden die Hauptmenge der Humussäure in die Lösung über, und in der Lösung selbst war das Verhältnis des NH₃ zum Gesamtstickstoff konstant und betrug 0.24. Zieht man den in der Lösung gefundenen Stickstoff von demjenigen ab, der im ursprünglichen Humat vorhanden war, und berechnet daraus theoretisch den Gehalt des Stickstoffes in den erhaltenen Humussäuren, so mußte die nur durch Fällung erhaltene Humus-Säure 2.8%, dagegen die gekochten Säuren 2.5, 2.3, u. 2.4% Stickstoff enthalten.

Auch daraus würde hervorgehen, daß der Gehalt der Humussäuren an Stickstoff am meisten im Verlauf der ersten Stunden des Kochens mit HCl zurückgeht.

Reinitzer hat bekanntlich Humusstoffe mit HCl behandelt, um von ihnen vor allem stickstofffreie Substanzen zu trennen; wir sehen jedoch, daß sich auf diese Weise vorwiegend stickstoffreichere Körper abspalten.

Die während dieser Versuche erhaltenen Humussubstanzen wurden in der Folge für Nährlösungen des Azotobacters verwendet.

Versuch XLI. Am 30. III. 1908 wurden 16 Kulturen zusammengestellt. Jede von ihnen enthielt je 200 *ccm* Nährlösung, welche 2% Glukose und Humussäuren oder ihrer Salze in solcher Menge, daß in ihnen je 5 *mg* N₂ enthalten waren, zugesetzt bekam. Dieser Versuch dauerte 10 Tage, in deren Verlauf die Kulturen im Thermostaten bei 28° C verblieben. Nach Beendigung des Versuches wurden in den Kulturen die Stickstoffgewinne und die verbrauchte Glukose bestimmt. Die Resultate stellen wir in Tab. XL zusammen.

Tabelle XL.

Stickstoffgewinne in 200 *cm*³ 2% Glukosenährlösung mit Humussubstanzen.

Humussäure-Verbindungen in der Nährlösung		Stickstoffgewinn in <i>mg</i>	Die Menge der verbrauchten Glukose in <i>g</i>	Stickstoffgewinn pro 1 <i>g</i> verbrauchte Glukose in <i>mg</i>
Ohne Humusstoffe		2·04 2·86	— —	— —
Humussaures Natrium	0·188 <i>g</i> aus nicht mit HCl gekochter Säure	24·06 22·94	— —	— —
	0·265 <i>g</i> aus 5 Stunden lang mit HCl gekochter Säure	14·40 16·90	— 1·794	— 9·4
	0·275 <i>g</i> aus 15 Stunden lang mit HCl gekochter Säure	12·79 14·01	— 1·425	— 9·8
	0·304 <i>g</i> aus 30 Stunden lang mit HCl gekochter Säure	16·50 14·08	— 1·385	— 10·2
Humussäure	0·198 <i>g</i> , 2 Stunden lang mit HCl gekocht	16·22 17·40	— 2·327	— 7·5
	0·181 <i>g</i> , 4 Stunden lang mit HCl gekocht	14·68 16·56	— 1·959	— 8·4
	0·201 <i>g</i> , 6 Stunden lang mit HCl gekocht	16·08 15·68	— 1·930	— 8·1

Diese Ziffern bestätigen vollkommen die in Versuch XXXVIII erhaltenen Resultate und zeigen in Übereinstimmung mit diesen,

daß die mit HCl gekochten Humussäuren oder die daraus hergestellten Humate einen minder günstigen Einfluß auf die Stickstoffbindung seitens des Azotobaktters ausüben, als die ursprünglichen in der Kälte erhaltenen Humate. Entscheidende Unterschiede zwischen den länger oder kürzer mit HCl gekochten Humussäuren oder ihren Salzen lassen sich nicht beobachten. Überall hat sich die Stickstoffbindung im Vergleich mit dem, was die ungekochten Humate liefern, bis auf $\frac{2}{3}$ vermindert. Alsdann scheint es, den Bestimmungen der verbrauchten Glukose nach zu urteilen, als ob bei Gegenwart von löslichen Humaten der Verbrauch von Glukose in Berechnung auf Stickstoffbindung ökonomischer wäre, als in denjenigen Fällen, wo die Nährlösung unlösliche Humussäuren enthält. Das Gesamtergebnis dieser Untersuchungen läßt als den die Azotobakterentwicklung günstig beeinflussenden Faktor speziell denjenigen Teil der Humussäure vermuten, welcher in den ersten Stunden des Kochens mit HCl in die Lösung übergeht. Aus den besprochenen Versuchen folgt, daß mit diesem Humusteil, welcher sich beim Kochen desselben mit HCl löst, nach 5-stündigem Kochen gleichzeitig 58% des Gesamtstickstoffs, nach 2-stündigem 45% und schon beim bloßen Ansäuern der Lösung der Humate bis 15% in die Lösung übergeht. Jedenfalls halten wir diese Frage für wichtig genug, um sie näher zu untersuchen. Durch solche kombinierte chemische und physiologische Untersuchungen ließe sich vielleicht etwas Licht auf die chemisch-biologische Bedeutung der Humussubstanzen werfen und dabei feststellen, wovon ihr Wert für die Bodenbakterien abhängt.

4. Wirken die Humusstoffe auf die Entwicklung des Azotobaktters als Stickstoffquelle?

Bei der Beurteilung der Bedeutung der Humusstoffe für die Stickstoffbindung durch Azotobakter drängt sich von selbst die Frage auf, ob vielleicht die Humusstoffe gerade durch Lieferung gewisser Mengen von Stickstoff auf die Entwicklung des Azotobaktters wirken. Für eine solche Vermutung würde die bekannte von Winogradsky (28) festgestellte Tatsache sprechen, daß kleine Mengen von Stickstoff in Form von Salpeter oder Ammoniumsalzen eine stärkere Stickstoffbindung in seinen Kulturen von *Clostridium Pasteurianum* verursachten. In Erwartung ei-

ner gleichen Wirkung hat auch Beijerinck den Nährlösungen Erde und Löhnis Erdeextrakt zugesetzt, indem er annahm, daß die dort enthaltenen geringen Stickstoffmengen die Entwicklung des Azotobaktters fördern würden. Doch keiner von den letztgenannten Forschern hat versucht, experimentell zu prüfen, ob tatsächlich geringe Mengen von Stickstoffverbindungen auf die Entwicklung des Azotobaktters anregend wirken.

Bevor man darum die Annahme akzeptieren konnte, daß der günstige Einfluß des Humusstoffes auf die Entwicklung des Azotobaktters darauf beruht, daß der Humus diesem Mikroben Stickstoff zuführt, mußte man sich vorher erst überzeugen, ob tatsächlich die Einführung von geringen Mengen irgend welcher anderen, für gewöhnlich eine gute Stickstoffnahrung für die Bakterien darstellender Stickstoffverbindungen die Entwicklung des Azotobaktters fördert und dessen Stickstoffbindung vermehrt. Der Lösung dieser Aufgabe war der folgende Versuch gewidmet.

Versuch XLII. Zusammengestellt waren 26 Kulturen. Der für jede Kultur bestimmten Nährlösung in einer Menge von 200 *ccm*, die 1½% Glukose enthielt, wurden je 5 *mg* N₂ in verschiedenen Verbindungen, auch Humus¹⁾ miteinbegriffen, zugesetzt.

Die Kolben wurden nach der Infizierung 10 Tage lang im Thermostaten bei 28° C stehen gelassen. Die Versuchsergebnisse gibt Tab. XLI an.

(Siehe Tab. XLI, Seite 1029).

Wie wir sehen, hat keine der uns zur Verfügung stehenden Stickstoffverbindungen den Azotobakter zu einer solchen Entwicklung anzuregen vermocht wie das natürliche Natriumhumat.

Da man vermuten könnte, daß vielleicht erst bei Gegenwart von Humus diese Stickstoffverbindungen durch den Azotobakter aufgenommen werden können, so wurde noch der folgende Versuch ausgeführt.

Versuch XLIII. Am 8/VII. 1907 wurden in derselben Weise wie früher 28 Kolben zusammengestellt, nur mit dem Unterschiede,

¹⁾ In allen Präparaten wurde der Stickstoff besonders bestimmt. Es zeigte sich dabei, daß das Glutaminpräparat kaum die Hälfte der darin vermuteten Stickstoffmenge enthielt. Erst später wurde man gewahr, daß es das sog. „Glutaminchlorhydrat“ aus der Fabrik Gebr. Kunert war.

Tabelle XLI

Stickstoffgewinne in den
5 mg gebundenen Stickstoff
enthaltenden Nährlösungen.

Art der N-Verbindung in der Nährlösung	Stickstoffgewinn in mg
Ohne Stickstoff	1.62 1.41
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	-0.86 -0.44
KNO_2	0.05 —
KNO_3	0.12 —
Glykokoll	1.49 1.21
Harnstoff	0.72 0.93
Asparagin	0.41 1.18
Glutamin	1.54 1.96
Alanin	1.18 1.39
Leucin	1.30 1.65
Tyrosin	0.86 2.38
Pepton	1.59 1.59
Humussaures Natrium aus Erde 0.172 g	21.26 21.82

Bulletin III.

Tabelle XLII.

Stickstoffgewinne in 200 ccm 2% Glukosenährlösung, welche 5 mg Stickstoff und Humate aus Zucker enthält

Art der N-Verbindungen in der Lösung	Stickstoffgewinne in mg
Ohne Stickstoff u. ohne Humate	2.32 —
Ohne Stickstoff, mit Na-Humaten	2.45 2.31
Na-Humate + $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0.81 0.71
„ + KNO_2	0.09 0.23
„ + KNO_3	-0.33 0.23
„ + Glykokoll	1.86 2.35
„ + Harnstoff	1.32 3.26
„ + Asparagin	2.63 1.58
„ + Glutamin	1.95 2.51
„ + Alanin	2.63 2.63
„ + Leucin	2.76 2.48
„ + Tyrosin	2.56 2.56
„ + Pepton	2.63 1.79
Na-Humat aus Erde	20.63 21.52

13

daß außer den Stickstoffverbindungen den Nährlösungen je 0.17 g Natriumhumat, aus Zucker dargestellt, zugesetzt wurden. Die Stickstoffverbindungen wurden überall in Mengen, die je 5 mg N enthielten, verabreicht. Der Versuch dauerte 10 Tage. Die Kolben standen im Thermostaten bei 28° C. Die Versuchsergebnisse zeigt Tab. XLII.

(Siehe Tab. XLII, Seite 1029).

Auch diesmal hat also nur der natürliche Humusstoff einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung des Azotobakters ausgeübt. Angesichts der übereinstimmenden Resultate der beiden beschriebenen Versuche, welche zeigen, daß eine Zufuhr von Stickstoff in irgend welcher Form seiner Verbindungen mit Ausnahme von Humus auf die Entwicklung des Azotobakters überhaupt nicht einzuwirken vermag, bliebe nur eine von den beiden Alternativen übrig, d. h. daß entweder der Humus die einzige Stickstoffverbindung ist, welche dem Azotobakter Stickstoff liefern kann, oder aber daß der Einfluß des Humusstoffes auf die Entwicklung des Azotobakters nicht auf der Versorgung desselben mit Stickstoff, sondern auf irgend einer anderen Wirkung desselben beruht.

In dem folgenden Versuche, welcher in größerem Maßstabe zur näheren Untersuchung des Stoffwechsels während der Entwicklung des Azotobakters ausgeführt wurde, waren wir unter anderem auch bemüht, analytisch festzustellen, ob der den Nährlösungen zugesetzte Humusstoff einen Teil seines Stickstoffs an den Azotobakter abgibt, oder ob wir imstande sind, den mit dem Humusstoff zugesetzten Stickstoff am Ende des Versuches in seiner ganzen Menge in dem Humus selbst wieder aufzufinden.

Versuch XLIV. Am 24/IV. 1908 wurde in 6 großen Erlenmeyer-Kolben eine Reinkultur von Azotobakter infiziert. Jeder Kolben wurde mit 250 ccm Nährlösung beschickt, welche je 5 g Glukose, 0.05% K_2HPO_4 und je 0.181 g Natriumhumat aus Erde vom Versuchsfelde mit 6.25 mg N-Gehalt enthielt. Die Kulturen verblieben 12 Tage lang im Thermostaten bei 28° C. Nach Beendigung des Versuches wurde die Nährlösung vom Azotobakter mittels einer Zentrifuge getrennt, die uns im Veterinär-Institut von Prof. Dr. J. Nowak gütigst zur Verfügung gestellt wurde. Die auf der Zentrifuge mehrmals mit Wasser durchgewaschene Bakterienmasse wurde schließlich in einen 150 ccm fassenden Kolben gesammelt.

Die ganz klare, von den Bakterien befreite Nährlösung wurde in einen 2 l großen Kolben gegossen. Hier wollen wir die Resultate der Versuche über die Bakterienmasse und über die davon getrennte Nährlösung in Kürze angeben:

Die Trockensubstanz der innerhalb von 12 Tagen in den 6 Kolben gezüchteten Bakterien wog 3·9986 g. An Gesamtstickstoff wurde darin 8·9%, an Eiweißstickstoff 8·6% gefunden. Insgesamt waren in den Bakterien 356·48 mg N, in der von ihnen getrennten Nährlösung 100·10 mg N vorhanden.

Die der Nährlösung zugesetzte Glukose enthielt 82·7% eigentliche Glukose, in der Nährlösung verblieben ¹⁾ 0·481 g, somit hatten die Bakterien 24·329 g davon verbraucht; oder mit anderen Worten, der Azotobakter hat zur Bildung von 1 g seiner Trockenmasse in diesem Falle je 6·1 g Glukose verbraucht.

Flüchtige Säuren befanden sich in der Nährlösung nicht. Um sie auf ihren Gehalt von Alkohol zu prüfen, wurde die Hälfte der ganzen abzentrifugierten Nährlösung durch mehrmalige Destillation bis auf ein Volum von wenigen *ccm* reduziert. Diese Flüssigkeit wog zusammen mit dem Pyknometer bei 21° C 54·8733 g, während Wasser unter denselben Bedingungen 54·8732 g wiegt; Alkohol war also in der Nährlösung nicht vorhanden.

Der Rückstand nach der Destillation wurde abermals zur Stickstoffbestimmung verwendet, und es wurden darin 49·35 mg N gefunden, was auf die ganze Nährlösung umgerechnet 98·7 mg N ausmacht. Somit hat diese und die vorige Bestimmung ergeben, daß die Nährlösung im Mittel 99·40 mg N enthält. Die Gesamtsumme des in den Bakterien und in der Nährlösung gefundenen Stickstoffs beträgt 455·88 mg.

Wenn wir nun von der ganzen Summe des in den Kulturen gefundenen Stickstoffs denjenigen abziehen, welcher in die Nährlösung mit Glukose und dem Humus eingeführt wurde, so wird der reine Stickstoffgewinn 401·13 mg ausmachen.

Zur Bindung dieses Stickstoffs wurden 24·329 g Glukose verbraucht. So hat also der Azotobakter beim Verbrauch von 1 g Glukose je 16·49 mg N gebunden, was mit den Resultaten des Versuchs XXXIX übereinstimmt.

¹⁾ Die Glukosebestimmung in der Nährlösung ergab sowohl ohne Abscheidung des Humusstoffes wie auch nach Abscheidung desselben ganz identische Resultate.

Ein Umstand fällt hier besonders auf, u. z. daß wir in der Nährlösung nach der Absonderung der Bakterien 99.40 *mg* N gefunden haben, während in die Nährlösung mit dem Humus und der Glukose nur knapp 54.75 *mg* N eingeführt worden waren. Diese Differenz ist zu groß, als daß man sie irgend welchen unterlaufenen Fehlern zuschreiben könnte. Als wir in der vom Azotobakter getrennten Portion der Nährlösung den Humusstoff mit Säure gefällt haben, betrug die in dem Niederschlag gefundene Stickstoffmenge, auf die ganze Kultur umgerechnet, 31.64 *mg* N, während die Nährlösung allein nach Abscheidung von Humus 67.76 davon enthielt. Die der Nährlösung zugesetzten Humusstoffe enthielten dagegen 37.50 *mg* N. Es könnte also den Anschein haben, als ob sie im Verlauf des Versuches 5.86 *mg* verloren hätten. In Wirklichkeit ist die Erklärung für diese Verluste eine ganz andere. Haben wir doch bei der bloßen Ansäuerung der Humuslösung gesehen, daß in die Flüssigkeit bis 15% des gesamten Humusstickstoffs übergangen; dem Gewichte nach würden also von den zum Versuche verwandten Humussubstanzen in der Lösung 5.6 *mg* Stickstoff verblieben sein.

Wenn wir diese 5.6 *mg* zu den in dem Humusniederschlag gefundenen 31.64 *mg* hinzufügen, so finden wir am Ende des Versuches zusammen 37.24 *mg* Humusstickstoff gegenüber der Anfangsmenge von 37.5 *mg*, d. h. wir finden den ganzen, ursprünglich zugesetzten Humusstickstoff wieder, woraus somit zu folgern wäre, daß der Humusstickstoff zur Ernährung des Azotobakters gar nicht verwendet wurde.

Wenn wir nun die bisher erzielten Resultate zusammenfassen, so kommen wir zu dem Schluß, daß die Humusstoffe nicht als Stickstoffquelle, sondern auf irgend eine andere, vorläufig uns unbekannte Weise den Azotobakter zu einer üppigeren Entfaltung seiner Lebensfunktionen und zu einer energischeren Stickstoffbindung anregen. Wie sich dieser Einfluß tatsächlich äußert, darüber könnte man vorläufig nur hypothetisch urteilen. Es ist möglich, daß hier die Hauptrolle den mineralischen Bestandteilen des Humusstoffes oder vielleicht sogar dessen physikalischen Eigenschaften zufällt.

Wenn wir nunmehr von dem nach der Humusabscheidung in der Lösung verbliebenen Stickstoff sowohl denjenigen Stickstoff, der möglicherweise durch die Humusstoffe (5.6 *mg*) in der Lösung verblieben sein könnte, als auch denjenigen, der in die Nährlösung

durch die Glukose und das Wasser (17.25 mg) gekommen sein könnte, abziehen, so bleiben doch in der Flüssigkeit 44.65 mg N, d. h. 13.13% des gesamten, durch den Azotobakter aus der Luft geschöpften Stickstoffs, und diese sind aus den Zellen des Azotobakters nach außen in die Flüssigkeit gedrungen.

Nun drängt sich die Frage auf, ob diese Diffusion der Stickstoffverbindungen aus den Azotobakterzellen eine normale, schon bei Lebzeiten dieser Mikroben eintretende Erscheinung ist, oder ob sie erst nach deren Absterben stattfinden kann. In biologischer Hinsicht ist diese Frage äußerst wichtig; denn wenn schon der lebende Azotobakter Stickstoffverbindungen, die er aus atmosphärischem Stickstoff gebildet hat, ausscheidet, so kann er auch zu seinen Lebzeiten einen Vermittler bei der Aufnahme von atmosphärischem Stickstoff seitens anderer Pflanzen spielen.

Die Stickstoffzunahme in der vom Azotobakter getrennten Nährlösung haben wir immer dort Gelegenheit zu beobachten gehabt, wo sich die Notwendigkeit der Stickstoffbestimmung in der (durch Fällen mit HCl) von Humusstoffen befreiten Nährlösung deswegen herausstellte, weil wir Portionen dieser Nährlösung dazu benutzten, um in ihr den durch den Azotobakter nicht verbrauchten Zucker zu bestimmen. Diese Beobachtung stimmt allerdings nicht mit den in dieser Angelegenheit von Beijerinck, Gerlach & Vogel wie auch von Stoklasa ausgesprochenen Ansichten überein, sie findet jedoch ihre Bestätigung in anderen Forschungsergebnissen. So hat beispielweise Lipman Stickstoff im Filtrat von Azotobakterkulturen nach einer Fällung mit Phosphorwolframsäure Stickstoff gefunden. In dem ersten wie in dem zweiten Falle wurden die Bakterien durch die zugesetzte Säure abgetötet. Somit zeugt der im Filtrat gefundene Stickstoff durchaus nicht davon, daß die Stickstoffverbindungen durch lebende Azotobakterzellen ausgeschieden worden sind. In dem oben besprochenen Versuche finden wir Stickstoff in einer Nährlösung, auf welche die Säure nicht eingewirkt hat und die von den Bakterien abzentrifugiert war. Doch können wir auch hier nicht mit aller Sicherheit behaupten, daß die Stickstoffverbindungen durch Zellen des Azotobakters während seiner Entwicklung nach außen ausgeschieden worden sind; denn es ist nicht ausgeschlossen, daß sie auf mechanischem Wege durch die Zentrifugalkraft während des Rotierens nach außen ausgepreßt wurden, obgleich andererseits Lipman nicht nur im Filtrat der Nährlösung nach ihrer Fällung mit

Phosphorwolframsäure oder mit Bleiazetat Stickstoff gefunden hat, sondern auch in der direkt von Bakterien abfiltrierten Flüssigkeit. Doch auch angenommen, daß die in der von den Bakterien gesonderten Nährlösung gefundenen Stickstoffverbindungen aus denselben während des Zentrifugierens nicht herausgeschleudert worden sind, so bleibt noch die Frage unentschieden, ob sie in die Nährlösung wirklich aus den lebenden Azotobakterzellen oder vielleicht nur aus einigen bereits abgestorbenen hereingekommen sind. Die Lösung dieser Frage wäre sehr erwünscht.

VI. Die Wirkung einiger Einflüsse auf die Tätigkeit des Azotobaktters.

1. Der Einfluß der Temperatur auf die Stickstoffbindung seitens des Azotobaktters.

Nachdem wir in den Humusstoffen ein vorzügliches Mittel zur Steigerung der Entwicklung des Azotobaktters, mit dessen Hilfe wir binnen kurzer Zeit sehr große Stickstoffzuwächse in den Kulturen erzielen können, gefunden haben, ist uns dadurch möglich geworden, die Einwirkung gewisser äußerer Faktoren, wie der Temperatur, des Alters der Kultur und ihrer Herkunft, sowie den Einfluß anderer Organismen auf die Azotobakterentwicklung zu untersuchen.

Inbetreff des Einflusses der Temperatur besitzen wir ziemlich übereinstimmende Beobachtungsergebnisse, nur die Angaben Freudenreichs über die günstige Entwicklung des Azotobaktters bei 37° C (8) würden eine Bestätigung erheischen. In unseren Versuchen haben wir also unser Augenmerk nicht nur auf die Stickstoffzunahmen, die wir bei verschiedenen Temperaturen erzielt haben, sondern auch gleichzeitig auf den eigentlichen Verbrauch von Glukose gerichtet.

Versuch XLV. Am 21/XI. 1907 wurden 12 Kolben mit je 200 ccm Nährlösung beschickt, die je 3 g (= 2.497 g) Glukose und 0.3 g Na-Humat aus Gartenerde enthielt. Der Versuch dauerte 9 1/2 Tag.

3	Kolben	wurden	im	Keller	bei	9° C,
3	"	"	"	"	bei	Zimmertemperatur
3	"	"	"	im	Thermostaten	bei 28° C,
3	"	"	"	"	"	bei 33° C gehalten

Die Resultate des Versuches folgen in Tab. XLIII.

(Siehe Tab. XLIII, Seite 1036).

Versuch XLVI. Es wurden 12 Kolben ebenso wie beim vorigen Versuch beschickt. 4 von ihnen blieben bei Zimmertemperatur, 4 im Thermostaten bei 20° C und 4 bei 28° C. Nach 10 Tagen wurde der Versuch abgeschlossen; die Resultate folgen in Tab XLIV.

(Siehe Tab. XLIV, Seite 1036).

Bei Vergleich der bei diesen beiden Versuchen bei 28° C und bei Zimmertemperatur erhaltenen Stickstoffzuwächse ersehen wir den günstigen Einfluß der Verlängerung des Versuches um 2 Tage auf die Stickstoffbindung. Außerdem zeigen die Resultate des ersten von ihnen, daß der Azotobakter bei 9° C sich überhaupt nicht entwickelt, — die stärkste Entwicklung erreicht er bei 28° C — während er nur eine schwache Entwicklung bei Zimmertemperatur und bei 33° C zeigt. Aus dem zweiten Versuche kann man folgern, daß die Entwicklung des Azotobakters bei 20° C bedeutend schwächer ist als bei 28° C, während sie hinwiederum bei Zimmertemperatur noch bedeutend schwächer ist als bei 20° C. Es ist daraus leicht ersichtlich, welche Vorsicht bei allen Schlußfolgerungen geboten ist, die aus den zu verschiedenen Zeiten in schwankender Zimmertemperatur vorgenommenen Versuchen mit dem Azotobakter gezogen werden. Betrachten wir nunmehr den Verbrauch an Glukose, so wird es sich zeigen, daß er in Temperaturen unterhalb 20° C im Verhältnis zur Stickstoffbindung unvergleichlich weniger ökonomisch ist, als bei 28° C.

Das Gesamtergebnis unserer Versuche stimmt also mit der allgemein anerkannten Ansicht überein, daß das Optimum der Temperatur für den Azotobakter bei 28° C liegt; es kann sich allerdings auch bis 30° C erstrecken, doch eine Temperatur von 33° C ist für ihn entschieden ungünstig; angesichts dessen lassen die Beobachtungen von Freudenreich in uns gewisse Zweifel an ihrer Richtigkeit aufsteigen. Die Versuche von Löhnis (5) über den Einfluß der Temperatur auf den Azotobakter können nicht als maßgebend gelten, u. zw. wegen der geringen Stickstoffzuwächse, die dabei erzielt wurden: innerhalb 3 Wochen wurden nirgends 2 mg N-Zuwachs erreicht.

TABELLE XLIII.

Stickstoffgewinne in 200 *ccm* 1·5% Glukosenährlösung bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur	Stickstoffgewinn in <i>mg</i>	Die Menge der verbrauchten Glukose in <i>g</i>	Stickstoffgewinn pro 1 <i>g</i> verbrauchte Glukose in <i>mg</i>
9° C	—0·46	—	—
	—0·62	—	—
	—0·59	0·11	—
Zimmertemperatur	1·48	—	—
	0·98	0·22	4·45
	1·73	0·29	6·00
28° C	23·74	—	—
	23·74	2·03	11·7
	23·85	2·09	11·4
33° C	3·09	—	—
	8·10	0·63	12·9
	4·67	0·43	10·8

TABELLE XLIV.

Stickstoffgewinne in 200 *ccm* 1·5% Glukosenährlösung bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur	Stickstoffgewinn in <i>mg</i>	Die Menge der verbrauchten Glukose in <i>g</i>	Stickstoffgewinn pro 1 <i>g</i> verbrauchte Glukose in <i>mg</i>
Zimmertemperatur	7·52	0·95	7·9
	7·88	—	—
	9·56	—	—
	8·16	—	—
20° C	17·34	1·34	12·9
	18·24	—	—
	20·06	—	—
	17·12	—	—
28° C	28·50	2·30	12·4
	27·14	—	—
	27·20	—	—
	27·62	—	—

2. Einfluß des Alters und der Herkunft des Azotobaktters.

Auf Grund der Versuche von Gerlach und Vogel (4) hat sich allgemein die Ansicht gebildet, daß die Fähigkeit des Azotobaktters zur Stickstoffbindung mit dem Alter seiner Kultur abnimmt. Diese Meinung wurde auch von A. Koch (11) und Löhnis unterstützt (5), welche sogar die geringen von Beijerinck und van Delden erhaltenen Stickstoffzuwächse dem Alter der Kultur zuzuschreiben geneigt sind. Die Pillai'schen Untersuchungen (7), die ebenfalls als Stütze für diese Ansicht dienen sollten, bestätigen sie u. E. nach nicht. Zwar findet Pillai, daß der von ihm isolierte Azotobakter innerhalb 3 Wochen bei Zimmertemperatur 1.96 und 1.82 mg N bindet, indessen zeigte ihm eine vor 3 Jahren von Löhnis erhaltene Kultur Stickstoffzuwächse von nur 0.42 u. 0.52 mg, wobei jedoch dieselbe Kultur in Löhnis' Versuchen, die vor 3 Jahren mit dieser Kultur ausgeführt sind, bei 20° C ebenso kleine Stickstoffzuwächse ergeben hat: 0.84 u. 0.00 mg. Solch kleine Zuwächse eignen sich überhaupt nicht dazu, um aus ihnen irgendwelche Schlußfolgerungen inbetreff des Einflusses, welchen das Alter der Kultur des Azotobaktters auf die Stickstoffbindung ausüben kann, zu ziehen.

Doch auch in den Versuchen derjenigen Forscher, die größere Zuwächse beobachtet hatten (Lipman [14]), finden wir keine ausreichenden Beweise für jene vermeintliche Schwächung der Fähigkeit für die Stickstoffbindung in älteren Kulturen. Aus diesem Grunde war es angezeigt, daraufhin die Resultate der Versuche von Gerlach und Vogel zu prüfen.

Im Verlauf unserer Versuche haben wir mehrmals den Azotobakter desselben Erdbodens isoliert und seine Kulturen gesondert gezüchtet. Diese haben uns auch das Material für die folgenden Versuche geliefert.

Versuch XLVII. Am 21/XI 1907 wurden Azotobakterkulturen mit je 200 ccm Nährlösung versetzt, welche 1.5% Glukose mit 0.3 g Na-Humat aus Gartenerde enthielt. Die Nährlösungen wurden mit 14- und 220-tägigem Azotobakter geimpft. Nach 10-tägiger Züchtung bei 28° C wurden folgende Stickstoffgewinne festgestellt:

14-tägiger Azotobakter	220-tägiger Azotobakter
22.41 mg	23.74 mg
23.60 "	23.74 "
—	23.85 "

Versuch XLVII. Am 30/III. 1908 wurden mit ebendenselben, somit bereits um 130 Tage älteren Kulturen und mit der ursprünglichen, von Prof. Beijerinck gelieferten Kultur, inbetreff derer Prof. Beijerinck selbst noch zu Anfang 1907 vermerkt hat, daß es eine alte Kultur sei, und schließlich mit einer sehr jungen Kultur, deren Isolierung viele Schwierigkeiten bereitet hatte und die aus einer ungekalkten Parzelle unseres Versuchsfeldes stammte, Versuche angestellt.

Dieser Versuch, bei 28° C ausgeführt, dauerte 10 Tage und lieferte folgende Stickstoffgewinne:

TABELLE XLV.

Alte Originalkultur Beijerincks	Kultur von der gekalkten Parzelle des Versuchsfeldes		Sehr junge Kultur von der ungekalkten Parzelle des Ver- suchsfeldes
	350-tägige	144-tägige	
9.36 mg	20.20 mg	25.62 mg	14.82 mg
10.55 "	21.12 "	22.73 "	13.42 "

Wir sehen, daß unser Azotobakter sich in diesem Versuche ebenso wie im vorhergehenden verhält.

Wenn wir die mit unserem Azotobakter erhaltenen Stickstoffzuwächse der Reihe nach zusammenstellen, so finden wir keinen Beweis dafür, daß er an seiner Fähigkeit zur Stickstoffbindung infolge seiner ein Jahr andauernden Züchtung etwas eingebüßt hätte.

TABELLE XLVI.

14-tägiger Azotobakter	144-tägiger A.	220-tägiger A.	350-tägiger A.
22.41	25.62	23.74	20.20
23.60	22.73	23.74	21.12
		23.85	

Wir stellen jedoch in diesem letzten Versuche eine geringere Fähigkeit zur Stickstoffbindung desjenigen Azotobakters fest, welcher aus der ungekalkten Parzelle gewonnen worden war, wie auch

bei dem von Prof. Beijerinck erhaltenen ursprünglichen Azotobakter. Was den letzteren anbelangt, so haben wir schon früher die Gelegenheit gehabt, seine geringere Fähigkeit zur Stickstoffbindung zu beobachten. Besonders im Versuch vom 10—19/VII. 1907 fanden wir bei unserem Azotobakter und bei demjenigen des Prof. Beijerinck folgende Stickstoffzuwächse:

TABELLE XLVII.

	Nährlösungen ohne Humusstoffe	Nährlösung mit Humusstoffen
Beijerincks Azotobakter	2·88	7·86
	2·60	11·08
Azotobakter von Krakau	1·48	21·58
	1·48	20·88

Vergleichen wir diese Zahlen mit den oben angeführten für den Original-Azotobakter, so zeigt es sich, daß auch dieser während 9 Monate langer Züchtung bei uns sich überhaupt nicht verändert hat. Mit einem Wort: Beweise für ein Altern der Azotobakterkulturen finden wir im Verlauf von einem Jahr überhaupt nicht.

Jedoch wir haben gesehen, daß der Original-Azotobakter ebenso wie der unsrige von ungekalkter Parzelle bedeutend weniger Stickstoff bindet, als der Azotobakter, mit dem wir ständig unsere Versuche angestellt haben. Dieses abweichende Verhalten des Original-Azotobakters oder auch des von uns aus der ungekalkten Parzelle isolierten wäre eine Bestätigung für die Ansichten von Ashby (16), Lipman (14) u. Perotti (29) über das Vorhandensein gewissermaßen verschiedener physiologischer Rassen des Azotobakters, die zuweilen sogar gewisse morphologische Unterschiede aufweisen. Nehmen wir dagegen an, daß der von uns aus der ungekalkten Parzelle isolierte Azotobakter sich als eine andersartige physiologische Rasse im Verhältnis zu dem in der daneben liegenden Parzelle wachsenden Azotobakter, welche vor dreizehn Jahren gekalkt worden ist, herausstellt, so kann man wohl kaum vermuten, daß noch vor der Kalkung diese beiden Parzellen von verschiedenen Azotobakterrassen schon bewohnt gewesen sein sollten; vielmehr sollte man meinen, daß vor der Kalkzusatzung zu einer der Parzellen, beide von einem Azotobakter mit gleichen Eigenschaften

bewohnt waren, daß dagegen die Ausbildung zweier physiologisch verschiedener Azotobakterrassen lediglich die Folge der Kalkung einer von diesen beiden Parzellen ist.

Die Sache würde demnach analog den Versuchsergebnissen von Nobbe u. Hiltner betreffend das Entstehen von physiologischen Bakterienrassen der Leguminosenknöllchen sein, die sich auch sehr schnell umgestalten können.

Um festzustellen, ob beispielsweise die Durchführung der Bakterien von geringerer Fähigkeit zur Stickstoffbindung durch einen Nährboden mit Humussubstanzen nicht schon ihre physiologischen Eigenschaften dahin abändern könnte, daß ihre Fähigkeit zur Stickstoffbindung gehoben wird, dazu wurde folgender Versuch an- gestellt:

Versuch XLIX. Am 30/X. 1907 wurden Azotobakterkulturen mit 200 *ccm* Nährlösung hergestellt, welche 1·5% Glukose mit oder ohne Zusatz von 0·3 *g* Natriumhumat enthielt. Der Azotobakter wurde zu diesen Nährlösungen aus Kulturen mit und ohne Humuszusatz übergeimpft. Nach 10-tägiger Züchtung bei 28° C erhielt man folgende Stickstoffzuwächse:

TABELLE XLVIII.
Stickstoffgewinne in *mg*

Zusammensetzung der Nährlösung	Azotobakter Original-Kultur von Beijerinck		Azotobakter aus dem Versuchsfeld bei Krakau	
	Impfmateri- al von Glukose- humatagar- platte	Impfmateri- al von Glukose- agarplatte	Impfmateri- al von Glukose- humatagar- platte	Impfmateri- al von Glukose- agarplatte
Glukose	3·50	3·22	2·03	2·94
	2·20	2·94	3·08	1·89
Glukose, Na-Humat	14·49	12·39	27·04	26·39
	—	—	28·07	28·56

Wie aus obigen Ziffern folgt, hat die Verpflanzung des Azotobakters in eine ihn sehr günstig beeinflussende Nährlösung seine Eigenschaft gar nicht geändert. Der Originalazotobakter Beijerinck's

bindet ständig den Stickstoff schwächer als der unsrige, obwohl er dem Einfluß der Humussubstanzen ebenfalls stark unterliegt.

3. Der Einfluß anderer Bakterien auf den Azotobakter.

Zu den Untersuchungen über den Einfluß anderer Bakterien auf die Stickstoffbindung seitens des Azotobakters haben wir Organismen benutzt, die sich in der Nährlösung mit Glukose nach ihrer Infizierung mit pasteurisierter Erde entwickelten, in der Zusammenstellung der Resultate fassen wir diese Organismen unter dem allgemeinen Namen Granulobakter zusammen. Hierauf verwendeten wir den Radiobakter aus der von Prof. Beijerinck stammenden Originalkultur und schließlich die von uns aus Agarplatten isolierten Bakterien: einige von ihnen waren dem Radiobakter ähnlich und bildeten charakteristische, durchsichtige Kolonien auf dem Agar mit Mannit (Bakterien *a*), die anderen bildeten auf dem Agarnährboden ein feines irisierendes Häutchen und gaben mit dem Azotobakter gekräuselte Kolonien (*b* Bakterien).

Diese Versuche werden bis zu einem gewissen Grade eine Wiederholung unserer Versuche in geschlossenen Apparaten sein; wir stellen sie nochmals in offenen Kolben unter einheitlichen und konstanten Bedingungen an.

Versuch L. Am 18/VII. 1907 wurden Versuche in Kolben angestellt, die mit je 100 *ccm* Nährlösung von 1½ *g* Glukosegehalt beschickt wurden. Eine Kolbenserie enthielt Na-Humat (0.1 *g* = 2.9 *mg* N), die anderen waren ohne Humussubstanzen. Da, wo Granulobakter zugegen war, wurde außerdem noch 1% CaCO₃ zugesetzt. Die Kolben verblieben nach der Infizierung im Thermostaten bei 27° C. Wir erhielten dabei folgende Stickstoffzuwächse. Tab. XLIX.

Versuch LI wurde am 30/X. 1907 mit Kolben ausgeführt, die mit 200 *ccm* Nährlösung mit einem Gehalt von 1.5% Glukose beschickt wurden; der einen Hälfte der Kolben wurden Humussubstanzen zugesetzt, der anderen Hälfte dagegen nicht. An Humusstoffen wurden je 0.3 *g* (= 6.37 *mg* N) zugesetzt. Der Versuch dauerte 9 Tage bei 28° C. Die Stickstoffzuwächse sind angeben in Tab. L.

(Siehe Tab. XLIX u. L, Seite 1042).

TABELLE XLIX.

Impfmaterial	Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	
	Nährlösung ohne Na-Humat	Nährlösung mit Na-Humat
Azotobacter	0.74	10.79
	0.74	10.44
Radiobacter inuline	0.18	0.06
	0.04	0.08
Granulobacter	1.93	4.70
	1.51	4.63
Azotobacter + Radiobacter	0.53	9.39
	0.60	10.02
Azotobacter + Granulobacter	1.58	13.24
	1.51	12.19
Azotobacter + Radiobacter + Granulobacter	1.44	12.26
	1.79	12.54

TABELLE L.

Impfmaterial	Stickstoffgewinne in <i>mg</i>	
	Nährlösung ohne Na-Humat	Nährlösung mit Na-Humat
Azotobakter	2.84	26.39
	1.89	28.56
Bakterien <i>a</i> (Radiobakter?)	0.98	0.91
	0.84	1.19
Azotobakter + Bakterien <i>a</i> (Radiobakter?)	2.80	28.35
	2.66	28.21

Versuch LII wurde in geschlossenen Kolben ausgeführt. In einem Apparat wurde am 26/III. 1907 die Nährlösung in einer Menge von 100 *ccm* mit 1·5 *g* Mannit, 0·015 *g* $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und 0·05% K_2HPO_4 -Gehalt mit Azotobakter infiziert, im zweiten mit einer Kombination von Azotobakter und *b*-Bakterien. Nach 30-tägiger Versuchsdauer, während deren die Temperatur zwischen 15·1° und 19·6° C schwankte, fand man in der Azotobakterreinkultur 0·28 *mg* Stickstoffzuwachs, und in der Kultur von Azotobakter mit *b*-Bakterien 0·66 *mg*. Alle diese Versuche ergaben insofern negative Resultate, als weder der Radiobakter noch die *a*- oder *b*-Bakterien irgend welche Fähigkeit zur Stickstoffbindung zeigten. Ebensowenig beeinflussten sie, zum Azotobakter hinzugefügt, dessen Eigenschaften in diesem Sinne.

Der Granulobakter vermag, wenn auch in geringem Maße, den Stickstoff zu binden; ein Zusatz von Humus steigert diese seine Tätigkeit.

Wenn zugleich mit dem Granulobakter auch Azotobakter vorhanden war, so fielen die Stickstoffzuwächse wenigstens am Ende des 10-tägigen Versuches etwas größer aus, als bei Gegenwart von bloßem Azotobakter. Diese Resultate stimmen mit denen aus Beijerincks Versuchen überein.

VII. Zusammenstellung der Hauptergebnisse.

Zum Schluß wollen wir in Kürze die Hauptergebnisse unserer Versuche zusammenfassen.

1. Azotobacter chroococcum vermag in Reinkulturen auf gewöhnlichem, stickstofffreiem Nährboden nur sehr geringe Mengen von Stickstoff zu binden.

2. Erst ein Zusatz von Humus aus Erde zur Nährlösung führt eine namhafte Steigerung der Stickstoffbindung durch den Azotobakter herbei.

3. Dieser günstige Einfluß des Humus auf den Azotobakter tritt ein ohne Rücksicht darauf, ob er in der Nährlösung in Gestalt von freier Säure oder auch von K-, Na- oder Ca-Salzen vorhanden ist.

4. Aus verschiedenen Erden hergestellter Humus gibt nicht die gleichen Resultate.

5. Künstlich aus Zucker durch Kochen mit Säuren erhaltener Humus vermag den natürlichen nicht zu ersetzen.

6. Natürlicher Humus übt einen erheblich geringeren Einfluß auf die Stickstoffbindung seitens des Azotobaktters aus, sobald er mit Salzsäure gekocht worden ist.

7. Aus dem Humus geht während des Kochens mit Salzsäure ein bedeutender Teil der Stickstoffverbindungen in die Lösung über.

8. Der Humus kann dem Azotobakter weder als Kohlenstoff- noch als Stickstoffquelle dienen. Ebensowenig also, wie er dem Azotobakter den Zucker oder den Mannit zu ersetzen vermag, kann er durch verschiedene Stickstoffverbindungen, wie Salpeter, Ammoniumsalze, allerhand Aminosäuren und Amide ersetzt werden.

9. Auf 1 g Glukoseverbrauch kann der Azotobakter bis 17 mg N binden, wobei er zur Bildung von 1 g seiner Trockensubstanz 6 g Glukose verbraucht.

10. Die Ausnutzung der Kohlenstoffquellen zur Azotobakterentwicklung und seiner Stickstoffbindung hängt von ihrer Reichlichkeit und der Humusmenge in der Nährlösung ab.

So besteht sowohl betreffs der Ergiebigkeit der Kohlenstoffquellen als auch der Humusmenge ein gewisses Optimum, dessen Übersteigerung schon ungünstig einwirkt. Sowohl bei Humusmangel als auch bei Überfluß daran wird der Verbrauch von C-Quelle im Verhältnis zur Stickstoffbindung weniger ökonomisch.

11. In den Stoffwechselprodukten des Azotobaktters sind weder Säuren noch Alkohol noch Wasserstoff vorhanden.

12. Das Verhältnis des vom Azotobakter aufgenommenen Sauerstoffs zum ausgeschiedenen Kohlensäureanhydrit nähert sich der Zahl 1; es ist fast gleich der Einheit oder gar noch etwas größer, wenn Glukose die Kohlenstoffquelle ist, dagegen bei Verwendung von Mannit immer etwas kleiner als die Einheit.

13. Der Azotobakter ist ein ausgesprochener Aërob und scheidet in sauerstofffreier Atmosphäre kaum minimale Mengen von CO_2 aus.

14. Das Temperaturoptimum für den Azotobakter liegt um 28°C herum. Bei 33°C nimmt seine Entwicklung schon stark ab, bei 9°C hört sie auf. Bei niedrigeren Temperaturen wird der Glukoseverbrauch im Verhältnis zur Stickstoffbindung weniger ökonomisch.

15. Der Azotobakter verändert, selbst wenn er fast ein Jahr lang auf künstlichem Nährboden gezüchtet wird, seine stickstoffbindenden Eigenschaften nicht.

16. Der Radiobakter und andere Bakterien üben keinen Einfluß auf die Stickstoffbindung seitens des Azotobaktors aus.

17. Die Fähigkeit des Azotobaktors zur Stickstoffbindung hängt, wie es scheint, von seiner Herkunft ab, eine Tatsache, die für das Vorhandensein seiner verschiedenen physiologischen Rassen sprechen würde.

18. In der vom Azotobakter abzentrifugierten Nährlösung befinden sich Stickstoffverbindungen, die uns weder der Herkunft, noch der Zusammensetzung nach näher bekannt sind.

Vorliegende Arbeit ist im Laboratorium für Agrikulturchemie der Jagellonischen Universität in Krakau ausgeführt worden. Es mag mir an dieser Stelle vergönnt sein, dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. E. Godlewski sen., für seine teilnahmevolle Verfolgung des ganzen Untersuchungsverlaufs, für die Erteilung wertvoller Ratschläge und schließlich für die Erweiterung der Laboratoriumseinrichtungen entsprechend dem Bereiche meiner Forschungen, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Aufrichtig dankbar bin ich auch meiner Frau Helene für ihre hingebungsvolle Hülfeleistung bei der Durchführung vieler Untersuchungen.

Krakau, im Juli 1908.

Aus dem Institut für Agrikulturchemie der Jagellonischen Universität.

VIII. Zusammenstellung der Literatur.

- 1) Beijerinck M. W. Über oligonitrophile Mikroben. Centralblatt für Bakteriologie u. Parasitenkunde. Abt. II, B. VII, 1901, S. 561.
- 2) Vogel J. Die Assimilation des freien elementaren Stickstoffes durch Mikroorganismen. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, B. XV' 1906.
- Boullanger E. L'assimilation de l'azote libre par les microbes. Bulletin de l'Institut Pasteur. Tome VI. 1908, S. 1.
- 3) Beijerinck u. van Delden. Über die Assimilation des freien Stickstoffes durch Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, B. IX, 1902.
- 4) Gerlach u. Vogel. N-sammelnde Bakterien. Centralbl. f. Bakt. Abt. II, B. VIII, S. 699; Weitere Versuche mit stickstoffbindenden Bakterien. Centr. f. Bakt., Abt. II, B. IX, 1902, S. 817., Centralbl. f. Bakt., B. X, 1903, 636.
- 5) Löhnis F. Beitrag zur Kenntnis der N-Bakterien. Centralbl. f. Bakt., B. XIV, 1904, S. 584.
- 6) Löhnis F. Ein Beitrag zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung. Centr. f. Bakt., B. XII, S. 454.

- 7) Pillai N. K. Untersuchungen über den Einfluß der Düngung und anderer Faktoren auf die Fähigkeit der Mikroorganismen des Bodens. Inaugural-Dissertation, Leipzig 1908.
- Löhnis und Pillai N. K. Über N-fixierende Bakterien. III. Centralbl. f. Bakt., B. XX, 781.
- 8) Freudenreich E. Über stickstoffbindende Bakterien. Centralbl. f. Bakt., B. X, 1903, S. 514.
- 9) Thiele R. Die Verarbeitung des atmosphärischen Stickstoffes durch Mikroorganismen. Landw. Vers.-St., B. 63, S. 161. 1905.
- 10) Stoklasa J. Über die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des elementaren Stickstoffes durch Azotobakter und Radiobakter. Berichte der deutsch. bot. Ges., B. XXIV, 1906, S. 22 - 32
- 11) Koch A. Lafar. Handbuch der technischen Mykologie. B. III. (1904).
- 12) Fischer H. Verhandlungen des Naturhist. Vereins der Preußischen Rheinlande, Westfalens und des Regierungsbezirkes Osnabrück. Jahrg. 62, 1905. Bonn. 1906. S. 135—145.
- 13) Krainsky Azotobacter chroococcum und seine Wirkung im Boden. Centralbl. f. Bakt., B. XX, 1908, 725.
- 14) Lipman. Report of the Soil Chemist and Bacteriologist. XXVI. Annual Report of the New-Jersey State Agricultural Experiment-Station. New Brunswick. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, B. XIX. 1907, 318.
- 15) Chester. Oligonitrophile Bodenbakterien (Ref). Centralbl. f. Bakt., Abt. II, B. X, 1903.
- 16) Ashby. The Journal of Agric. Science 1907. Einige Beobachtungen über die Assimilation von atmosphärischem Stickstoff durch frei lebende Bodenorganismen (Ref). Jahresbericht über die Fortschritte auf dem Gesamtgebiete der Agrikultur-Chemie. Dritte Folge, IX, 1906, S. 79.
- 17) Heinze B. Landw. Jahrbücher, B. XXXV, 1906. Über die Stickstoffassimilation durch niedere Organismen.
- 18) Heinze B. Einige Beiträge zur mikrobiologischen Bodenkunde. Centralbl. f. Bakt., B. XVI, S. 355. Über die Bildung und Wiederverarbeitung von Glykogen durch niedere pflanzliche Organismen. Centralbl. f. Bakt., B. XII. 1904.
- 19) Krzemieniewski S. Physiologische Untersuchungen über Azotobacter chroococcum. (Vorläufige Mitteilung). Bulletin de l'Acad. des Sciences de Cracovie, Juillet 1907.
- 20) Heinze B. Einige Berichtigungen und weitere Mitteilungen zu der Abhandlung „Über die Bildung etc.“. Centralbl. f. Bakt., B. XIV, 1904, S. 86.
- 21) Keding. Weitere Untersuchungen über N-bindende Bakterien. Wiss. Meeresunters., Abt. Kiel, Neue Folge, B. IX, S. 275.
- 22) Fischer H. Zweiter Beitrag zur Kenntnis der Lebensbedingungen von stickstoffsammelnden Bakterien. Centralbl. f. Bakt., B. XV, 1906, 235.
- 23) Duggeli M. Der Speciesbegriff bei den Bakterien. Verhandlungen der Schweiz. Naturforsch. Ges. in Luzern, 1906.
- 24) Godlewski E. Studya nad oddychaniem roślin. Rozpr. Akad. Um..T. VII. 1883. O nitryfikacyi amoniaku i źródłach węgla podczas żywienia się fermentów nitryfikacyjnych. Rozpr. Akad. Um. 1896.

- 25) Reinitzer Fr. Über die Eignung der Huminsubstanzen zur Ernährung von Pilzen. Bot. Ztg., 1900, S. 59.
- 26) Nikitinsky I. Über die Zersetzung der Huminsäure durch physikalisch-chemische Agentien und durch Mikroorganismen. Jahrb. für wiss. Bot., B. 27, 1902, S. 365.
- 27) Dojarenko. Der Stickstoff des Humus. Landw. Vers.-St. B. 56, 1902, S. 311.
- 28) Winogradsky S. Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. Extrait des Archives des Sciences biologiques. T. III, Nr. 4, 1895, St. Petersbourg.
- 29) Perotti R. Distribuzioni dell'Azotobacterio in Italia (Ref). Centralbl. f. Bakt., B. XVII, 1907, S. 264.

Erläuterung der Figuren der Tafel XXXI.

- Fig. 1, 2 u. 3 in natürlicher Größe, die übrigen in 660 facher Vergrößerung.
- Fig. 1. Natürliche Kolonien, bestehend aus Azotobakter und *b*-Bakterien (Fig. 4).
- Fig. 2. Künstliche Kolonien von Azotobakter, *b*-Bakterien und der Kombination des ersteren mit den letzteren.
- Fig. 3. Sich bräunende Azotobakterkulturen, durch Strichimpfung erhalten.
- Fig. 4. *b*-Bakterien.
- Fig. 5. Sehr junger Azotobakter.
- Fig. 6. Azotobakter mit Gallerthülle in Wasser.
- Fig. 7. Azotobakter mit Gallerthülle in Wasser mit Methylenblau gefärbt.
- Fig. 8. Dauerformen von Azotobakter (Sarzina).
- Fig. 9. Keimprozeß einer Dauerform von Azotobakter.
- Fig. 10, 11, 12. Azotobakter in Form von Fäden. Die einzelnen Zellen unterliegen einer immer weiter vor sich gehenden Spaltung.

IX. Nachtrag.

Nach der in einer vorläufigen Mitteilung erfolgten Veröffentlichung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit — als diese bereits zum Druck vorlag — sind noch drei, dasselbe Thema berührende Abhandlungen erschienen. In einer ¹⁾ derselben finden wir Belege für den günstigen Einfluß der Erdzugabe auf die Entwicklung von anaeroben Organismen. Die zweite ist eine Arbeit von Beijerinck ²⁾. Der Autor weist darin nach, daß der Azotobakter auf

¹⁾ Bredemann. B. d. d. Bot. Ges. 1908. S. 362.

²⁾ Konink. Ak. v. Vet. te Amsterdam Ver. von de gewone Vergadering der Vis en Natuurkundige Afd. von Zoterdag 30 Mei 1908. S. 46.

Nährlösungen mit einem Zusatz von Kohlehydraten erst bei Gegenwart von Organismen, welche die Kohlehydrate zu Säuren umsetzen, gut gedeihen kann. Darum entwickelte sich auch eine Azotobakterkultur, welche in einer mit Salzen organischer Säuren versetzten Nährlösung gezüchtet wurde, bedeutend günstiger und binde den Stickstoff viel energischer als bei Gegenwart bloßer Kohlehydrate.

Ganz abweichende Ansichten finden wir in der Arbeit von Prof. Stoklasa¹⁾, wo neben den bereits früher veröffentlichten Forschungsergebnissen ganz neue, äußerst interessante Mitteilungen gemacht werden. Angesichts der prinzipiellen Frage des Stoffwechsels beim Azotobakter steht jedoch Prof. Stoklasa auf seinem früheren Standpunkt, indem er der Meinung ist, daß der Azotobakter neben CO_2 sehr viel Wasserstoff produziert, wobei er die ihm gelieferten Kohlehydrate zu Säuren und Alkohol umsetzt.

Aus dem Grunde haben wir — als sich unsere Arbeit bereits im Druck befand — nochmalige Untersuchungen vorgenommen, um die etwaigen von Prof. Stoklasa in Azotobakterkulturen aufgefundenen Umwandlungsprodukte festzustellen.

Wir haben den Azotobakter in 4 Kolben zu je 250 *ccm* Nährlösung, welche 2% Glukose, 0.05% K_2HPO_4 und 0.18 *g* Na-Humat enthielten, gezüchtet; mit diesem Humat hat der Azotobakter auf je 1 *g* verbrauchte Glukose 17 *mg* N gebunden. Nach 10 Tagen waren die Flüssigkeiten in den Kolben neutral, jedoch mit Phenolphthalein als Indikator mußten ihnen stets noch einige *ccm* $\frac{1}{10}$ n. NaOH zugesetzt werden, was bei dem bekannten Verhalten von Phenolphthalein zu CO_2 leicht erklärlich ist. Die so neutralisierten Nährlösungen wurden aus zwei Kolben abdestilliert. Beide Destillate wurden zusammengewaschen und nach wiederholter mehrfacher Destillation auf ein Volumen von 30 *ccm* gebracht. Die so konzentrierte Flüssigkeit gab eine sehr unbestimmte Jodoformreaktion auf Alkohol; ihr Gewicht im Pyknometer ergab bei einer Temperatur von 16.6°C — 23.6241 *g*, während Wasser unter denselben Bedingungen 23.6247 *g* wog. Aus der Gewichts Differenz könnte man berechnen, daß in einem Liter Nährlösung kaum 3 *mg* Alkohol enthalten sein konnten.

Der Rest eines dieser Kolbeninhalte wurde nach Abdestillierung

¹⁾ Centralbl. f. Bakt. B. XXI. 1908. H. 15—16 und 20—21.

seines größten Teils zur Alkoholprüfung mit H_2SO_4 angesäuert und weiter destilliert; das Destillat wurde mit $0.8 \text{ ccm } \frac{1}{10} \text{ n. NaOH}$ neutralisiert und abermals mit Weinsäure destilliert. Auch diesmal waren zur Neutralisation des aufgefangenen Destillats nur $0.4 \text{ ccm } \frac{10}{100} \text{ NaOH}$ nötig. In dem zurückgebliebenen Rest wurde eine Stickstoffzunahme von 124.7 mg festgestellt.

Die zweite Portion wurde mit Phosphorsäure angesäuert und mit Wasserdampf überdestilliert. Das Destillat wurde in 4 Fraktionen aufgefangen und zwar derart, daß von jeder Fraktion die ursprüngliche Menge der Flüssigkeit erhalten wurde (0.5 l). Schließlich wurde zur Kontrolle auf dieselbe Weise auch Leitungswasser destilliert. Zur Neutralisation dieser Fraktionen waren bei Gegenwart von Phenolphthalein folgende Mengen von $\frac{1}{10} \text{ n. NaOH}$ nötig:

Fraktionen:	1.	2.	3.	4.
für die Azotobakterkultur:	2.05	0.85	0.66	0.36 ccm
für Leitungswasser:	1.05	0.90	0.50	— „

In dem Rest wurde ein Stickstoffgewinn von 137.0 ccm gefunden.

Wir sehen also, daß trotz der so hohen N-Zuwächse in den Kulturen weder Alkohol noch Säuren in denselben in nachweisbaren Mengen vorhanden sind.

Ein ebenso negatives Resultat ergaben erneuerte Untersuchungen, welche darauf gerichtet waren, Wasserstoff in der Umgebung einer Kultur nachzuweisen, die an 700 ccm Sauerstoff verbraucht hat.

Indessen findet Prof. Stoklasa in 1 l Nährlösung $96 - 532 \text{ mg}$ Alkohol; zur Neutralisation der gebildeten Säuren hat er angeblich 43 bis $340 \frac{1}{10}$ norm. NaOH verwenden müssen und schließlich hat er auf je $5 - 7 \text{ ccm}$ ausgeschiedenen CO_2 1 ccm Wasserstoff gefunden.

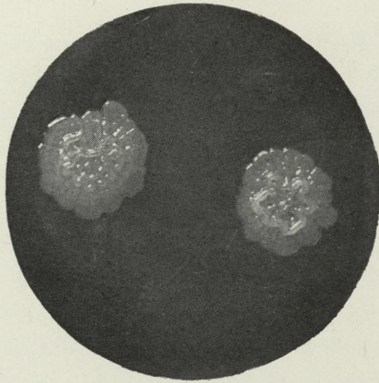
Alle diese Tatsachen legten uns die Vermutung nahe, daß Prof. Stoklasa nicht mit reinen Azotobakterkulturen zu tun gehabt hat, was auch durch die letzte Arbeit Beijerincks bekräftigt würde. Prof. Stoklasa behauptet allerdings, daß seine Kulturen rein waren. Waren sie es aber tatsächlich, was übrigens wenig wahrscheinlich zu sein scheint, so waren es dann jedenfalls Kulturen eines ganz anderen Organismus, als es unser Azotobakter ist. Der reine Azotobakter Prof. Stoklasa's soll auf einer Nährlösung mit Glukose- oder Mannit-zusatz zu einer sehr ergiebigen Stickstoffbindung befähigt sein, wobei er Säuren, Alkohol und Wasserstoff bilden soll, auch soll er sich bis zu einem gewissen Grade, wenn auch nur bei Gegenwart von

Nitraten in einer sauerstofflosen Atmosphäre entwickeln können; unser Azotobakter kann Stickstoff erst dann in erheblicheren Mengen binden, wenn er in seiner Nährlösung neben Glukose oder Mannit noch Humusstoffe besitzt, wobei er abgesehen von CO_2 weder Säuren, noch Alkohol, noch Wasserstoff ausscheidet und ein höchst ausgesprochener Aerob ist.

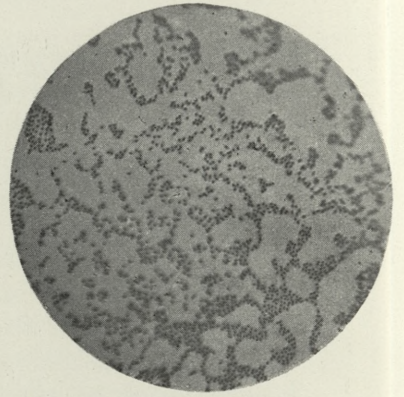
Sehr erwünscht wären vergleichende Untersuchungen über diese beiden Organismen, vor allem aber müßte festgestellt werden, daß die Kulturen des Prof. Stoklasa wirklich rein waren. Das agrikulturchemische Institut der Jagellonischen Universität in Krakau ist stets sehr gern bereit, mit seinen Kulturen zu dienen.

Inhaltsverzeichnis.

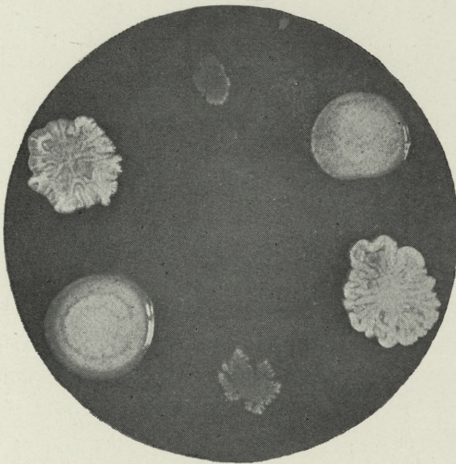
I. Die Ansichten über die Stickstoffassimilation durch Azotobacter chroococcum	929
II. Die Isolierung des Azotobaktors und seine Morphologie	932
III. Die Stickstoffbindung und der Gaswechsel in den Azotobakterkulturen	941
1. Versuche mit Rohkulturen des Azotobaktors	942
2. Versuche mit Reinkulturen bei Gegenwart von pasteurisierter Erde	956
3. Versuche mit Rohkulturen ohne Erdezusatz	959
4. Versuche mit Reinkulturen ohne Erdezusatz	962
5. Versuche mit reinen Azotobakterkulturen in Nährlösungen, die mit sterilisierter Erde versetzt waren	970
6. Versuche mit Azotobakterreinkulturen in Nährlösungen mit wässerigem Bodenauszug	977
7. Versuche mit reinen Azotobakterkulturen in Nährlösungen mit Humussubstanzen	979
8. Intramolekulare Atmung des Azotobaktors	984
9. Zusammenstellung der Versuchsergebnisse	993
IV. Versuche Beijerincks und van Deldens über die Bindung des Stickstoffs seitens des Azotobaktors im Lichte obiger Untersuchungen	995
V. Die Wirkungsweise von Humusstoffen auf den Azotobakter	1003
1. Der Einfluß der Humusmenge und der Konzentration der Glukose in der Nährlösung	1003
2. Der Einfluß der Qualität der C-Quelle und der Form der Humusverbindungen	1012
3. Der Einfluß der Herkunft und der verschiedenen Behandlung der Humusstoffe auf die N-Bindung durch den Azotobakter	1014
4. Wirken die Humusstoffe auf die Entwicklung des Azotobaktors als N-Quelle?	1027



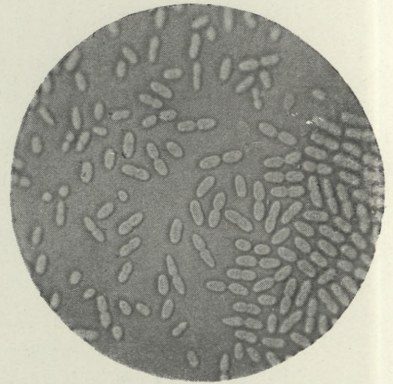
1.



4.



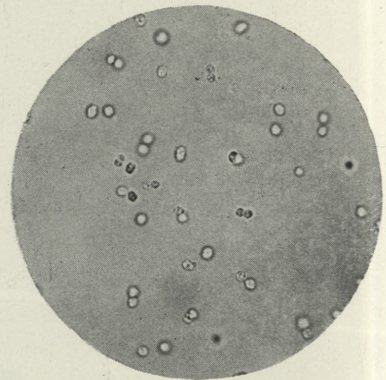
2.



5.



3.



6.

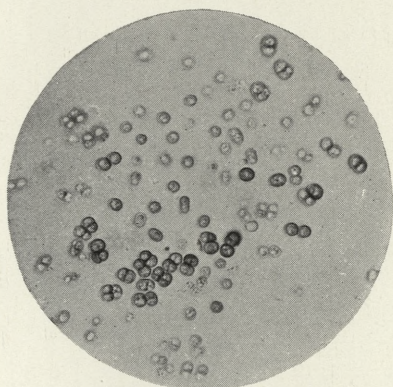
S. Krzemieniewski.



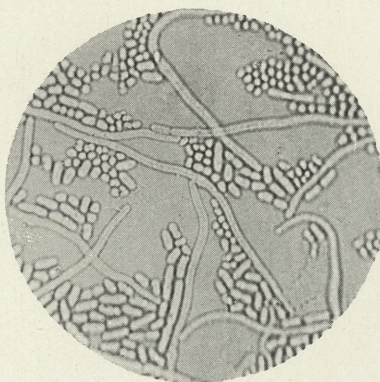
7.



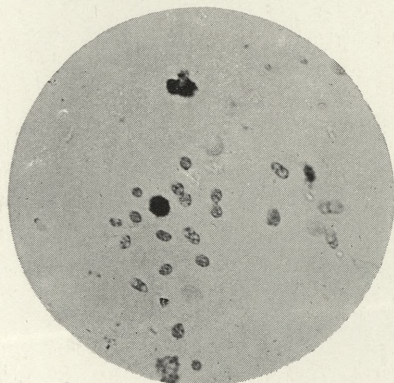
10.



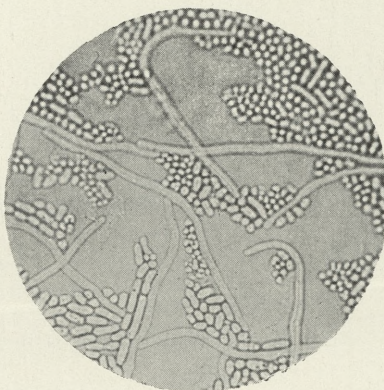
8.



11.



9.



12.



VI. Die Wirkung einiger Einflüsse auf die Tätigkeit des Azotobaktors	1034
1. Der Einfluß der Temperatur auf die N-Bindung seitens des Azotobaktors	1034
2. Einfluß des Alters und der Herkunft des Azotobaktors	1037
3. Einfluß anderer Bakterien auf den Azotobakter	1041
VII. Zusammenstellung der Hauptergebnisse	1043
VIII. Zusammenstellung der Literatur	1045
IX. Nachtrag	1047

Nakładem Akademii Umiejętności.

Pod redakcją

Sekretarza Wydziału matem.-przyrod. Władysława Natansona.

Kraków, 1908. — Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod zarządem J. Filipowskiego.

15 Grudnia 1908.



