

Zur Technik und Kritik der Bakterienmethode.

Von

Th. W. Engelmann.

Das am Schlusse meiner Mittheilung „Ueber Sauerstoffausscheidung von Pflanzenzellen im Mikrospectrum“ (dies Archiv Bd. XXVII. 1882. S. 489) gegebene Versprechen einer ausführlichen Darstellung meiner bisherigen auf Bakterienmethode und Assimilation bezüglichen Untersuchungen habe ich aus gesundheitlichen Gründen leider noch nicht einlösen können. Auch jetzt bin ich zu meinem Bedauern noch nicht im Stande, die beabsichtigte zusammenfassende Darstellung für die nächste Zeit in Aussicht zu stellen. Doch veranlasst mich der soeben erschienene Aufsatz von Pringsheim „Ueber die Sauerstoffabgabe der Pflanzen im Mikrospectrum“ (Berichte d. d. bot. Ges. 1885. III. Heft II und dies Archiv, Bd. XXXVIII, S. 142) wenigstens einige Punkte schon jetzt ausführlicher zu besprechen, welche für die Beurtheilung und Anwendung des von mir eingeführten Verfahrens von besonderem Gewicht sind. Ersehe ich doch aus den thatsächlichen Angaben wie aus den kritischen Bemerkungen des ausgezeichneten Berliner Botanikers, dass das Verständniss und die Technik der Methode grösseren Schwierigkeiten begegnen, als ich voraussetzen zu dürfen glaubte. Indem ich diese Schwierigkeiten zu beseitigen versuche, hoffe ich damit nicht nur weitere Nachuntersuchungen wesentlich zu erleichtern, sondern auch einer weitläufigeren Polemik vorzubeugen, mit welcher der Sache wenig genützt sein möchte.

Pringsheim kommt unter Anwendung der Bakterienmethode zu dem Resultat, dass die von mir behauptete „Coincidenz der Maxima der Sauerstoffabgabe grüner Organismen im Mikrospectrum mit den Maximis der Lichtabsorption im Chlorophyll“ nicht stattfindet. Wie aus den von ihm angeführten Thatsachen hervorgeht, stützt sich dieser Ausspruch wesentlich, wo nicht ausschliesslich, auf Beobachtungen nach der von mir sogenannten Methode der simultanen Beobachtung (dies Archiv, Bd. XXVII. 1882. S. 486).

Ich muss nun zunächst betonen, dass ich diese Methode zur strengen Entscheidung jener fundamentalen Frage nie für hinreichend gehalten, noch zu den hierfür erforderlichen quantitativen Bestimmungen benutzt oder empfohlen habe, aus dem einfachen Grunde, weil sie mit einigen unvermeidlichen Fehlerquellen behaftet ist, welche das Gesetz der Abhängigkeit zwischen Wellenlänge und Sauerstoffausscheidung nicht rein zu Tage treten lassen. Diese Fehlerquellen schienen mir so offen dazuliegen, dass ich sie in meinen bisherigen, möglichst kurz gehaltenen Mittheilungen nicht hervorhob.

Den Hauptwerth des Verfahrens erblicke ich darin, dass es auf höchst einfachem Wege, mit einem Blick, ein annähernd richtiges, sehr anschauliches Bild von der relativen assimilatorischen Wirkung der verschiedenen Spectralregionen zu erhalten gestattet.

Der Hauptgrund, weshalb dies Bild im Allgemeinen kein völlig richtiger Ausdruck der Beziehungen zwischen Wellenlänge und Assimilation sein kann, ist offenbar der, dass die Grösse der Sauerstoffspannung an jedem Punkte der Oberfläche des Objectes nicht nur von der an diesem Punkte stattfindenden Sauerstoffausscheidung, sondern auch von der Sauerstoffentwicklung entfernterer, und zwar in erster Linie der zur Seite gelegenen, von anderen Wellenlängen getroffenen Stellen abhängt. Wechseln, wie thatsächlich der Fall — hierüber herrscht ja Einstimmigkeit — Stellen stärkerer mit Stellen schwächerer Sauerstoffabgabe längs des Spectrums mit einander ab, so muss infolge dieser seitlichen Superposition der Sauerstoffspannungen die Wirksamkeit der schwächer assimilirenden Stellen zu gross erscheinen und umgekehrt.

Dies ist beispielsweise die Ursache, weshalb — auch bei sehr engem Spalt, genügende Lichtstärke vorausgesetzt — Bakterienanhäufung und -Bewegung bis in's Ultraroth hineinreichen, obschon doch letzteres — wiederum nach den übereinstimmenden Erfahrungen aller Untersucher — gar keine assimilatorische Wirksamkeit besitzt. Ebenso ist, da die assimilatorische Wirkung von Roth nach Orange und Gelb hin sehr viel weniger steil als nach dem Ultraroth hin sinkt, es hieraus leicht begreiflich, wenn das Maximum der Anhäufung und die grösste Energie der Bewegung häufig nicht an der Stelle der stärksten Ab-

sorption im Roth, zwischen *B* und *C*, sondern mehr nach dem Orange hin fällt. Letztere von Pringsheim mit Unrecht für besonders wichtig gehaltene Thatsache habe ich, wie die vorige, schon in meiner oben citirten Mittheilung bemerkt, indem ich sagte, dass bei von Null an wachsender Lichtstärke die Bewegung gewöhnlich zwischen *B* und *C* oder doch nahe bei *C* beginne. Mit „nahe bei *C*“ ist natürlich, wie aus dem Gegensatz zwischen „*B* und *C*“ hervorgeht, jenseits *C*, von *B* an gerechnet, gemeint.

Dieser verschiebende Einfluss der seitlichen Superposition der Sauerstoffspannungen wird bis zu einer gewissen Grenze mit der Dicke und dem Chlorophyllgehalt des Objectes wachsen müssen. Letztere beiden Umstände kommen aber auch insofern noch besonders in Betracht, als von ihnen eine verticale Superposition von Sauerstoffspannungen abhängt.

Diese nun unterstützt insofern die von der seitlichen Superposition abhängige Verschiebung der Maxima und Minima, als mit der Dicke der farbigen, assimilirenden Schicht sich der Betrag der Lichtabsorption und damit des assimilatorischen Effectes für verschiedene Wellenlängen in verschiedenem Grade, und zwar, wie ich schon am Schluss meines erwähnten Aufsatzes hervorhob, zu Gunsten der schwächer absorbirten, weniger wirksamen Strahlengattungen ändert.

Hierbei ist aber noch weiter der Umstand zu beachten, dass die Sauerstoff entwickelnden Chromophylltheilchen zur Steigerung der Sauerstoffspannung an der Oberfläche der Zelle *cet. par.* um so weniger beitragen, je weiter sie von derselben entfernt sind. Im Allgemeinen wird ihr Antheil für jeden Punkt proportional dem Quadrat dieser Entfernung von diesem Punkte abnehmen. Nur dann würde dieser Umstand bedeutungslos sein, wenn die Differenzen des Abstandes der zur Wirkung kommenden assimilirenden Theilchen von der Stelle an der Zellenoberfläche, an welcher die Bakterienreaction angestellt wird, gegen diesen Abstand selbst vernachlässigt werden dürften. Dies ist aber im Allgemeinen nicht erlaubt.

Dieser Einfluss ungleicher Entfernung wird sich nun in verschiedener Weise mit dem von der Aenderung der relativen Absorptionsgrösse mit der Dicke herrührenden Einfluss combiniren. Er wird ihm entgegenwirken, wenn die Reaction an der unteren, dem Lichte zugewandten Fläche der Zelle angestellt wird, ihn

unterstützen, wenn man auf die über der Zelle angesammelten Bakterien einstellt. Wie ausserordentlich die Verschiebung im letzteren Falle werden kann, lässt sich aus dem von mir (a. a. O. S. 489) angeführten Beispiel einer *Cladophorazelle* von 0,028 mm Dicke entnehmen, wo das Maximum der Assimilationsenergie über der Zelle im Gelbgrün zwischen *D* und *E*, unter der Zelle im Roth zwischen *B* und *C* gefunden wurde.

Schon die bisher angeführten Umstände genügen, wie ich glaube, völlig, um zu erklären, weshalb das Maximum bei der simultanen Beobachtung grüner Zellen nicht immer an der nämlichen Stelle, speciell nicht an der Stelle des Absorptionsbandes I, sondern meist mehr oder weniger weit nach *C* hin oder selbst jenseits *C* beobachtet wird. Es gibt aber noch verschiedene andere Umstände, welche verschiebend auf die Lage der Maxima und Minima wirken können. Beispielsweise — es gibt aber noch mehr — Ungleichheit in der Vertheilung des Chlorophylls (ursprünglich vorhandene oder während des Versuchs entstandene). Unterschiede in der specifischen Färbung (bei grünen Zellen vermuthlich auf Mischung des grünen und gelben Farbstoffs in verschiedenen Verhältnissen beruhend), partielles Absterben der Zelle, verschiedene Durchsichtigkeit der Zellmembran an der dem Lichte zugekehrten Seite (durch aufsitzende Organismen, Ablagerungen von farbigen oder farblosen Stoffen und dergl.). Aus einigen dieser Umstände wird auch das Vorkommen von Veränderungen in der Lage der Maxima beim nämlichen Object begreiflich, eine Erscheinung, die mir übrigens (abgesehen natürlich von den durch Aenderung der Spaltweite, der Lichtstärke und der Einstellungsebene bedingten) nur ganz ausnahmsweise vorgekommen ist und dann stets aus einem jener Umstände genügend erklärt werden konnte.

Ich muss nach alledem behaupten, dass die Angaben von Pringsheim, soweit sie die Erscheinungen im rothen bis grünen Theil des Mikrospectrums bei grünen Zellen betreffen, nicht das Geringste gegen die von mir behauptete Coincidenz beweisen, noch auch nur, wie Pringsheim meint, mit meinen thatsächlichen Angaben irgendwie in Streit sind.

Dasselbe gilt aus denselben Gründen bezüglich der — allerdings sehr kurz gehaltenen — Bemerkungen Pringsheim's über braune und rothe Algen.

Was dagegen das Verhalten grüner Zellen im blauen Theil

des Spectrums angeht, so muss ich mich in der That wundern, dass Pringsheim, auch wenn er nur nach der Methode der simultanen Beobachtung arbeitete, das von mir beschriebene zweite Maximum, im Blau bei F , nicht zu Gesicht bekommen zu haben scheint. Es tritt allerdings, wie ich sogleich in meiner ersten Mittheilung (a. a. O. S. 488) hervorgehoben, im prismatischen Spectrum nur bei Anwendung von Sonnenlicht, nicht in dem von Gaslicht in die Erscheinung und ist — schon wegen der bei Anwendung meines Apparates bei F fast drei Mal grösseren Dispersion — immer viel weniger auffällig als das im Roth. Vermisst habe ich es aber auch bei Anwendung der simultanen Beobachtungsmethode bei sorgfältiger Anstellung des Versuchs niemals und will es gern jederzeit bei günstigem Licht demonstrieren, wie ich es denn auch verschiedenen Forschern schon zeigte. Gewiss werden sich auch leicht überzeugende photographische Aufnahmen gewinnen lassen, für die mir leider bisher die Vorrichtungen fehlten.

Ich verfare in der Regel so, dass ich erst bei maximaler Spaltweite und genügender Lichtstärke eine sehr starke Bakterienansammlung in der ganzen Länge des Spectrums sich ausbilden lasse. Dann verengere ich allmählich den Spalt — nicht zu langsam, damit die Bakterien nicht Zeit haben, nach dem Roth hin zu wandern — bis die Bewegung im Grün gerade verlöscht: fast ausnahmslos ist sie dann am Anfang der starken „Endabsorption“ im Blau, bei F , noch äusserst deutlich und erhält sich auch hier lange Zeit, wenn nicht weiter verdunkelt wird. Auch kehrt sie, falls der Spalt zu weit zuge dreht war, beim Erweitern hier meist merklich früher zurück als im anstossenden Grün und Gelbgrün.

Es kommt hier begreiflicherweise viel auf vorsichtige Handhabung des Spaltes an, damit man den entscheidenden Punkt nicht verpasse. Auch darf das Spectrum bei nur einigermaassen beträchtlicher Dicke des Objects ja nicht zu klein sein, weil sonst die Bakterien auch bei schnellem Verengern des Spaltes sich leicht noch vom Blau hinüber in's Roth begeben. Objectiv C von Zeiss ist deshalb als Projectionssystem im Allgemeinen nicht anzurathen. Bei Anwendung von System B oder A ist aber der vom Grün eingenommene Raum so breit, dass er nicht leicht von den im Blau befindlichen Bakterien in der Richtung nach Roth hin über-

schritten wird, wenn der Spalt einmal so weit zuge dreht ist, dass die Wirkung im Grün unmerklich wird.

Nicht minder entscheidende Resultate gibt hinsichtlich dieses Punktes die Methode der successiven Beobachtung, welche vor der der simultanen als wichtigsten Vorzug den voraus hat, dass der störende Einfluss der seitlichen Superposition der Sauerstoffspannungen bei ihr in Wegfall gebracht werden kann. In richtiger Weise angewandt, gestattet sie ausserdem brauchbare Zahlenwerthe für die relative Grösse der Sauerstoffausscheidung in den verschiedenen Regionen des Spectrums zu erhalten. Alle meine numerischen Angaben über diese Grösse sind nach dieser Methode gewonnen. Wenn Pringsheim der Bakterienmethode die Brauchbarkeit zu genauen quantitativen Bestimmungen abstreitet, so ist mir dies nur daraus erklärlich, dass er die Methode der successiven Beobachtung nicht in der richtigen Weise handhabte. Es kommen bei derselben sehr viele Umstände in Betracht. Eine hinreichend genaue Beschreibung des Verfahrens ist deshalb nicht kurz zu geben. Aus diesem Grunde beschränkte ich mich in meinen vorläufigen Mittheilungen darauf, einen Maassstab zur Beurtheilung der Zuverlässigkeit der Methode zu gewähren durch Mittheilung mehrerer Zahlenbeispiele und der objectiven Beweise, welche in den auf Grund dieser Methode erhaltenen photometrischen Vergleichen von Sonnen- und Gaslicht zufällig zu Tage traten. Mir scheint auch jetzt noch, dass dies für den beabsichtigten Zweck vollständig genügt und ich bin auf den Versuch, diese Belege zu entkräften, in der That gespannt. Um jedoch für die Zukunft eine genaue Nachprüfung meiner Ergebnisse zu ermöglichen, will ich mein Versuchsverfahren hier genauer, immerhin in möglichster Kürze beschreiben.

Die wesentlichsten Punkte, auf deren Beachtung es ankommt, sind folgende:

Der Tropfen soll nur eine einzige Art von Bakterien enthalten, also einer Reinkultur entstammen. Namentlich dürfen nicht Formen von sehr verschiedenem Sauerstoffbedürfniss, also beispielsweise nicht neben *Bacterium termo* noch gewöhnliche Spirillen vorhanden sein. Die Gründe sind aus meinem Aufsatz „Zur Biologie der Schizomyceten“ (dies Archiv Bd. XXVI. 1881. S. 537) leicht zu entnehmen. Stammt das zu prüfende Object wie gewöhnlich aus einer nicht bakterienfreien Flüssigkeit, so muss es vorher

durch wiederholtes Abspülen mit bakterienfreiem Wasser oder mit einer genügenden Menge der die Versuchsbakterien enthaltenden Flüssigkeit gründlich gereinigt werden.

Am besten nimmt man im Allgemeinen Bakterien von ziemlich hohem Sauerstoffbedürfniss. Die Reaction tritt dann *ceteris paribus* bei grösseren Spaltweiten, also bei grösserer Helligkeit ein, was für die Schärfe der Beobachtung nicht gleichgiltig ist. Nur bei sehr kleinen oder wenig Chromophyll enthaltenden Zellen können empfindlichere Bakterien unter Umständen den Vorzug verdienen.

Die Bakterien sollen weder zu gross noch zu klein sein. Coccen von 1—2 μ Durchmesser oder Stäbchen von 2—3 μ Länge und gegen 1 μ Breite entsprechen den Anforderungen in der Regel am besten. Kleinere werden bei der sehr geringen Helligkeit, bei der oft noch wahrgenommen werden muss, leicht nicht mehr deutlich genug gesehen, um eine scharfe Bestimmung des Momentes, worin die Bewegung aufhört, zu gestatten, namentlich nicht wenn die Messung im Roth geschehen muss. Zu grosse Bakterien reagiren meist nicht schnell und gleichmässig genug.

Die Individuenzahl der Bakterien muss in jedem Falle so gross sein, dass sich rasch mächtige Ansammlungen um die Sauerstoffquellen ausbilden können. Der Tropfen darf dementsprechend bei Betrachtung mit blossem Auge schwach getrübt erscheinen.

Durch sorgfältige Verkittung der Ränder des Deckglases mit Paraffin oder Vaseline muss Verdunstung während der Versuchsdauer völlig ausgeschlossen sein. Obschon hiermit auch der Sauerstoffzutritt von aussen in der Regel genügend aufgehoben ist, empfiehlt es sich doch, das zu prüfende Object möglichst weit vom Rande des Deckglases zu lagern. Auch soll es sich dem Boden des Tropfens so nahe wie möglich befinden, am besten denselben berühren. Liegt es zu hoch, so sinken die Bakterien, wenn sie infolge der Sauerstoffabnahme ihre Bewegungen einstellen, in die Tiefe und sammeln sich dann bei Erweiterung des Spaltes nicht schnell genug wieder um das Object an.

Sorgfältig ist ferner aus leicht ersichtlichem Grunde darauf zu achten, dass das Object so weit isolirt liege, dass bei seiner Verschiebung längs des Spectrums in keinem Falle ein anderer, der Sauerstoffausscheidung im Lichte fähiger Organismus ins Bereich des Mikrospectrums komme. Es dürfen aus demselben Grunde

auch keine frei umher schwimmenden grünen Sporen, Flagellaten u. s. w. im Tropfen vorhanden sein.

Um das Object schnell und sicher in immer gleicher Lage an jeden beliebigen Ort des Spectrums einstellen zu können, muss es durchaus unbeweglich im Tropfen liegen und muss der Objectträger mittelst einer Schraube bewegt werden. Ich benutze zu dem Zweck den von Zeiss construirten, im Preisverzeichniss von 1885 unter Nr. 56 erwähnten, kleinen Apparat. Er wird durch Klemmen auf dem Tisch des Mikroskops festgehalten und auf ihm der Objectträger durch etwas Fett oder Vaseline fixirt. Die Verschiebung muss genau senkrecht zur Richtung der Spaltränder erfolgen, da wegen der unvermeidlichen kleinen Unregelmässigkeiten an den Schneiden (Staubpartikelchen u. dergl.) die Lichtstärke auf verschiedenen Punkten der Höhe des Spectrums bei der nämlichen Wellenlänge ungleich ist, wie besonders anschaulich die kurz vor dem völligen Schluss jedes Spaltes auftretenden bekannten Längsstreifen und Längsbänder zeigen. Der Einfluss dieser Fehlerquelle ist natürlich um so grösser, je enger der Spalt beim Eintritt der Reaction ist, also am grössten bei den wirksamsten Wellenlängen. Hier könnte er, wenn das assimilirende Object sehr klein ist, auch bei grösstmöglicher Sauberkeit der Schneiden, eine sehr merkbare Grösse erreichen.

Welche Eigenschaften das Object selbst haben soll, um scharfe und möglichst weit theoretisch verwertbare Messungen zu gestatten, ergibt sich zum Theil schon aus dem früher Gesagten. Damit der Einfluss der seitlichen Superposition der Sauerstoffspannungen unmerklich werde, muss es wenigstens in der Richtung senkrecht zu den Fraunhofer'schen Streifen sehr schmal sein, um so schmaler natürlich, je ein kleineres Mikrospectrum man verwendet, mit anderen Worten je stärker das zur Projection benutzte Objectivsystem. Die Grösse des Abstandes der Streifen *B* und *C* zu überschreiten, dürfte nicht rathsam sein, falls man sich nicht auf Messungen im stark brechbaren Theil des Spectrums beschränkt. — Ist das Object cylindrisch oder doch länglich, so muss es selbstverständlich mit der Längsachse genau horizontal und parallel den Spalträndern gelagert werden.

Auch sein verticaler Durchmesser soll möglichst gering sein, damit der oben bei der Methode der simultanen Beobachtung bereits besprochene Einfluss ungleicher Entfernung der assimiliren-

den Theilchen von den reagirenden Bakterien sich möglichst wenig geltend mache.

Dabei ist es wünschenswerth, dass die Färbung intensiv, der Gehalt an Chromophyll also möglichst gross sei. Es gelingt sonst nicht leicht, eine zur Anstellung scharfer Reaction genügende Menge von Bakterien um die Zelle zu versammeln. Da schon ein einziges Chlorophyllkorn im Lichte sehr merckliche Wirkungen äussert, braucht die Dicke der wirksamen Schicht einige Tausendstelmillimeter nicht zu überschreiten.

Dass die Lichtquelle während der Versuchsdauer in jeder Beziehung constant sein müsse, bedarf nicht besonderer Hervorhebung. Ebenso wenig, dass das Spectrum möglichst scharf, genau in der horizontalen Durchschnittsebene des Objects entworfen werden soll. Weniger überflüssig dürfte eine die absolute Stärke der Lichtquelle betreffende Bemerkung sein. Diese ist so zu wählen, dass die Spaltweiten, bei welchen die Reaction eintritt, weder ausserordentlich gering, noch sehr gross ausfallen. In nächster Nähe des Nullpunktes — dessen Lage immer vorher genau zu controliren ist — haben schon sehr kleine Fehler grosses Gewicht, gleichviel ob sie von unrichtiger Einstellung, Irrthümern beim Ablesen oder falscher Lage des Nullpunktes herrühren. Auch können, bei Anwendung von Sonnenlicht, die Fraunhofer'schen wie die dazu senkrechten, von Ungleichmässigkeiten der Spaltländer herrührenden Streifen und Bänder stören. Zu grosse Spaltweiten sind andererseits wegen des unten noch näher zu besprechenden Einflusses der Superposition verschieden brechbarer Strahlengattungen zu vermeiden. Sonnenlicht muss in jedem Fall vorher abgeschwächt werden. Ich schalte zu dem Zwecke zwischen Heliostat und Spiegel des Mikroskops unmittelbar vor letzterem eine oder zwei Scheiben von rein weissem matten Glase ein.

Um alles etwa von unten her neben dem Objectiv des Mikrospectralapparates einfallende Licht auszuschliessen, wird unmittelbar unter dem Objecttisch ein nur mit einer centralen Durchbohrung für das projicirende System versehener undurchsichtiger Schirm angebracht.

Durchaus nöthig ist weiter, dass die Beobachtungen in der Dunkelkammer und ausserdem im Dunkelkasten vorgenommen werden. Es wird dann nicht nur eine Störung durch seitlich von oben auf das Object fallendes Licht ausgeschlossen, sondern na-

mentlich auch die Empfindlichkeit des Auges so bedeutend gesteigert, dass noch bei viel geringerer Spaltweite als sonst deutliches Unterscheiden möglich ist.

Aus letzterem Grunde kann es wünschenswerth sein, das Spectrum, mit Ausnahme des schmalen Bezirks, in dem gerade beobachtet wird, abzublenden. Zu dem Zweck habe ich im Ocular, unmittelbar unter dem die Mikrometertheilung tragenden Diaphragma, eine passende Schiebervorrichtung anbringen lassen.

Noch ein anderer Punkt kommt hier in Betracht. Der Eintritt der Reaction ist im Allgemeinen um so schwieriger scharf zu beobachten, je geringer im entscheidenden Augenblicke die physiologische Helligkeit der entsprechenden Spectralpartie. Bei sehr geringer Helligkeit kann deshalb die Bewegung früher aufzuhören scheinen als in der That der Fall ist. Sehr auffällig zeigt sich dieser Einfluss, wenn man durch ein zwischen Auge des Beobachters und Ocular eingeschaltetes farbiges oder Rauch-Glas das Bild plötzlich verdunkelt. Es entsteht dann der Eindruck, als ob die Bakterienbewegung plötzlich abnehme. Umgekehrt wird beim Wegziehen eine Beschleunigung der Bewegung vorgetäuscht. Hierzu kommt noch, dass bei geringer, aber übrigens gleicher Helligkeit die Schärfe der Unterscheidung merklich von der Farbe abhängig, im Roth beispielsweise geringer wie im Grün ist. Es erwächst hieraus einige Gefahr, für die dunkleren, namentlich die rothen Partien des Spectrums zu grosse Spaltweiten einzustellen.

Um zu prüfen, in wie weit etwa hierdurch die Ergebnisse beeinflusst werden könnten, habe ich die Helligkeiten möglichst gleich zu machen gesucht, indem ich für die Messungen im Gelb und Grün blau resp. roth gefärbte Gläser zwischen Auge und Ocular einschaltete und speciell abwechselnd mit und ohne Glas an den nämlichen Stellen des Spectrums beim gleichen Objecte Messungen anstellte. Bei einigermaassen scharfem Beobachten der Bakterien zeigte sich jedoch kein deutlicher Einfluss, wie ich durch viele Zahlenbeispiele belegen könnte.

Wenn nun Alles für den Versuch gehörig vorbereitet ist, schreitet man zu den Messungen. Hierbei verfahre ich folgendermaassen.

Das Object wird zunächst bei maximal erweitertem Spalt im Orange oder Gelb, gewöhnlich bei *D*, eingestellt und hier so

lange stehen gelassen, bis sich eine sehr starke Ansammlung schwärmender Bakterien um dasselbe ausgebildet hat. Hierzu genügen meist wenige Minuten. Man wartet nun weitere 5—10 Minuten, um sich zu überzeugen, ob der Schwarm sich in unveränderter Mächtigkeit und ungeschwächter Bewegung erhält. Ist dies, wie bei gesunden Zellen gewöhnlich, der Fall, so wird der Spalt im Lauf von 1—1½ Minute, erst schnell, dann immer langsamer zuge dreht, bis die Bewegung an den Rändern des Objects völlig aufgehört hat. Jetzt wird rasch der Stand der Mikrometerschraube (Spaltweite) abgelesen, der Spalt sofort wieder maximal erweitert und gewartet, bis sich der frühere Zustand maximaler Anhäufung und Bewegung wieder hergestellt hat, wozu es meist nur 1—2 Minuten bedarf. Dann wird das Object nach einer anderen Stelle des Spectrums verschoben, der Spalt in derselben Weise allmählich verengert, bis Stillstand eingetreten, schnell abgelesen, der Spalt sofort wieder maximal erweitert, das Object in die Anfangsstellung (bei *D*) zurückgebracht, aufs Neue gewartet, bis der stationäre Zustand maximaler Anhäufung sich ausgebildet hat u. s. f. Jedesmal wird also vor Beginn der Versuche ein stationärer Zustand abgewartet und zwischen je zwei Messungen derselbe wieder hergestellt. Hierauf ist das allergrösste Gewicht zu legen.

Verfährt man in der hier beschriebenen Weise, so wird man nach einiger Uebung sich leicht von der Brauchbarkeit der Methode zu quantitativen Bestimmungen überzeugen. Man findet dann häufig selbst bei stundenlang am nämlichen Object fortgesetzten Messungen die Spaltweite, bei welcher die Bewegung aufhört — die kritische Spaltweite —, für jede geprüfte Stelle des Spectrums constant, die Abweichungen vom Mittel wenigstens so gering, dass sie gegen die von der Wellenlänge abhängigen Unterschiede im Allgemeinen nicht in Betracht kommen.

Diese Constanz beweist, dass in solchem Falle die Reaction an allen untersuchten Stellen des Spectrums dann eintritt, wenn die Sauerstoffspannung auf den nämlichen absoluten Werth herabgesunken ist. Da die Sauerstoffspannung am Orte der Reaction, bei Erfüllung der oben mit Rücksicht auf den Einfluss des Abstandes der assimilirenden Theilchen von den Bakterien gestellten Bedingung, in jedem Falle der gesammten vom Object gelieferten Sauerstoffmenge direct proportional ist, darf der relative assimi-

latorische Effect der Lichtarten verschiedener Wellenlänge, die von mir mit A bezeichnete Grösse, dann im Allgemeinen den Spaltweiten umgekehrt proportional gesetzt werden, bei welchen für die betreffenden Wellenlängen die gleiche, also in unserem Falle diejenige Sauerstoffspannung erzeugt wird, bei welcher die Bakterienbewegung eben aufhört. Es ist dies jedoch nur erlaubt, weil die Erweiterung des Spaltes symmetrisch geschieht und weil die absoluten Werthe der kritischen Spaltweiten im Allgemeinen so niedrige sind, dass die von der Uebereinanderlagerung verschiedener und deshalb verschieden wirksamer Wellenlängen herrührende Störung vernachlässigt werden darf. Letzteres gilt streng nur für die Gegenden des Spectrums, an denen die auf die Wellenlängen als Abscisse bezogene Curve der Assimilationsgrösse einen geradlinigen Verlauf zeigt. Bei hinreichend geringer Breite des Objects dürfte der Fehler aber auch an den Stellen stärkster Krümmung der Curve unmerklich werden.

Im Besonderen gilt dies bei Anwendung von Sonnenlicht. Hier liegen die Werthe der kritischen Spaltweiten für meine Versuche durchschnittlich zwischen 0,01 und 0,15 mm. Für Gaslicht rücken die Grenzen natürlich weiter aus einander, schon wegen der grösseren Differenzen der actuellen Energie in den verschiedenen Theilen des sichtbaren Spectrums, speciell wegen des viel steileren Sinkens der lebendigen Kraft des Lichtes nach dem stärker brechbaren Ende hin. Die untere Grenze lag hier durchschnittlich bei 0,015, während die obere (für grüne Zellen) im Blau bei F , im Mittel bei 0,38, im Violett bei noch erheblich grösseren Werthen erreicht ward. Im Blau und Violett sind jedoch wegen der grösseren Dispersion Störungen weniger zu fürchten.

Wenn es nicht darauf ankommt, Zahlenwerthe zu gewinnen, sondern nur auf Entscheidung der Frage, ob die assimilatorische Wirkung an einer bestimmten Stelle des Spectrums stärker als an einer anderen sei, so ist eine Modification der Methode der successiven Beobachtung ausreichend und zugleich sehr anschaulich, welche ich das Verfahren der alternirenden Beobachtung nenne.

Man wolle beispielsweise entscheiden, ob die Wirkung des Blau bei F stärker als die des Grün bei E sei. zu dem Ende wird — immer nach vorhergehender Entwicklung eines statio-

nären Zustandes maximaler Bakterienanhäufung — das Object E eingestellt und nun der Spalt langsam zuge dreht, bis die Bewegung eben erlöscht. Als bald wird das Object nach F hin verschoben, wobei man dann, falls mit Sonnenlicht und an einer chlorophyllgrünen Zelle gearbeitet wird, sofort einen Wiederbeginn der Bewegungen beobachtet. Beim Zurückschrauben nach E tritt Stillstand ein, wieder nach F gebracht, erwachen die Bakterien aufs Neue. Die Erscheinung ist in der Regel so auffällig, dass ein Gedanke an Täuschung gar nicht aufkommen kann.

In derselben Weise überzeugt man sich leicht, dass bei grünen Zellen das Maximum der Wirkung im Roth stets an der Stelle des Absorptionsbandes I, niemals nach dem Orange hin liegt u. s. w.

Es ist jedoch nicht meine Absicht, hier auf specielle Fragen und Versuchsergebnisse näher einzugehen. Ich würde auch wesentlich nur früher Mitgetheiltes zu wiederholen, bezüglich viele neue Zahlenbeispiele beizubringen haben. Dazu aber dürfte diese Zeitschrift nicht der geeignete Ort und überdies um so weniger Grund vorhanden sein, als die bereits in früheren Aufsätzen von mir publicirten Zahlen, wie ich glaube, völlig genügen, um das fundamentale Gesetz der, wenigstens höchst annähernden, Proportionalität zwischen Absorption und assimilatorischer Wirkung des Lichtes streng zu beweisen, und zwar nicht nur für chromophyllgrüne, sondern für alle wie immer gefärbte chromophyllhaltige Zellen und, wie ich auch anderen neueren Autoren gegenüber hervorheben muss, für alle Strahlengattungen des sichtbaren Spectrums. Am allerwenigsten kann dies auf zahlreiche genaue Messungen der Assimilationsgrösse und der Lichtabsorption in lebenden Zellen gegründete Ergebniss durch auf blosser Schätzung nach dem Augenschein beruhende Angaben, wie sie Pringsheim gibt, widerlegt werden.

Es wird auch die Giltigkeit dieses Grundgesetzes nicht dadurch aufgehoben, dass — wie ich leider Pringsheim zugeben muss — die Formel nicht richtig ist, welche ich in meinem letzten Aufsatz (botan. Zeitung 1884. Nr. 7) als Ausdruck der Beziehungen zwischen actuel ler Energie (E), assimilatorischer Wirkung (A) und Absorptionsgrösse (n) des Lichtes in der Voraussetzung aufgestellt habe, dass die gesammte absorbirte Energie des Lichtes zu Assimilationsarbeit benutzt werde. Ich muss für

die bei der Ableitung dieser Formel begangenen, mir heute schwer begreiflichen Versehen, unter Hinweisung auf den im Eingang angedeuteten persönlichen Umstand um Entschuldigung bitten. Den richtigen Ausdruck für jene Beziehungen und seine Begründung gab ich am Schlusse meines Aufsatzes „Farbe und Assimilation“ (Bot. Ztg. 1883. Nr. 2). Hiernach ist für jede Wellenlänge

$$E = \frac{A}{n} \text{ und nicht } E = \sqrt{\frac{A}{n}}.$$

Wie aus der Vergleichung der beiden Formeln unmittelbar ersichtlich, müssen jetzt die Differenzen grösser werden, welche einerseits zwischen den aus meinen Versuchen an verschiedenfarbigen Zellen berechneten zusammengehörigen Werthen von E unter sich, wie andererseits zwischen diesen und den auf rein physikalischem Weg mittelst Thermosäule und Bolometer gefundenen bestehen. Die wesentlichste Uebereinstimmung bleibt jedoch erhalten: denn in allen Fällen erreicht die Energie ihren Maximalwerth sehr nahe bei Fraunhofer's Streif D und sinkt von hier nach beiden Enden des Spectrums hin allmählich ab.

Ich stelle hier die nach der verbesserten Formel aus der Gesamtzahl meiner Versuche für E berechneten Werthe mit denen zusammen, welche sich aus den Versuchen von Lamansky und Langley ergeben haben:

| $\lambda =$ | 680 | 622 | 600 | 589 | 573 | 558 | 522 | 486 | 431 |
|-------------|------|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|
| Lamansky | 88 | 99 | 100 | 99,5 | 98 | 96,5 | 90 | 77 | 66 |
| Langley I | 89,5 | 96,5 | 98 | 99,5 | 100 | 96 | 89 | 78 | 48 |
| II | 86 | 98,5 | 100 | 99 | 98,5 | 97,5 | 92 | 73 | 47,5 |
| Engelmann | 69 | 95 | 99 | 100 | 95 | 90 | 71 | 56 | 29 |

Für die mittleren, helleren Partien des Spectrums, vom Orange bis ins Gelbgrün ist wie man sieht die Uebereinstimmung noch immer eine nahezu vollkommene. Die grösseren Abweichungen, welche sich gegen die Enden hin zeigen, möchten schon in Anbetracht der grösseren Schwierigkeiten, welche sich hier der scharfen Bestimmung von A und n in den Weg stellen, kaum genügen, um die Voraussetzung directer Proportionalität zwischen

absorbirter Energie und Assimilationsarbeit auch nur für diese Spectralregionen unhaltbar erscheinen zu lassen.

Nachschrift.

Vorstehende Zeilen waren gedruckt als mir Pringsheims ausführliche Mittheilung „über die Sauerstoffabgabe der Pflanzen im Mikrospektrum“ (Sitzungsber. d. k. pr. Akad. d. Wiss. zu Berlin. 4. Febr. 1886) zuing, Dieselbe bestätigt meine Befürchtung, dass der verehrte Verfasser die wichtigsten Fehlerquellen nicht erkannte und deshalb nicht vermied, welche einer Verwerthung der Bakterienmethode zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Lichtabsorption und Sauerstoffausscheidung im Wege stehen. Dem, wie oben gezeigt, nur unter ganz bestimmten Bedingungen, mit starken Einschränkungen brauchbaren Verfahren der simultanen Beobachtung wird ein fast blindes Vertrauen geschenkt, die Methode der successiven Beobachtung in einer, der meinigen wesentlich entgegengesetzten, zu quantitativen Bestimmungen, wie ich bestätigen kann, durchaus unbrauchbaren Weise angewendet und dementsprechend verurtheilt. Neue thatsächliche Bemerkungen, die weitere Entgegnung an dieser Stelle erforderten, finden sich nicht. Alle Differenzen erledigen sich, soweit ich sehe, durch den Inhalt meiner vorstehenden Mittheilung. Hervorhebung möchte verdienen, dass Pringsheim das von mir gefundene zweite Maximum der Sauerstoffausscheidung im Blau doch auch „hin und wieder“ bei simultaner Beobachtung grüner Zellen im Sonnenspektrum gesehen hat.
