

(Aus dem botanischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule Berlin.)

## Die Wärmebildung von Reinkulturen im Hinblick auf die Ätiologie der Selbsterhitzung pflanzlicher Stoffe.

Von

Hugo Mische.

(Eingegangen am 22. November 1929.)

### I. Einleitung.

Die Fähigkeit der Pflanzen, Wärme zu erzeugen, ist aus zwei Anlässen studiert worden, einmal aus einem rein physiologischen, indem die Wärmebildung ein wichtiges Teilproblem des Atmungsvorganges darstellt, und dann aus einem biologischen und praktischen, indem eine in beiden Beziehungen interessante Naturscheinung, nämlich die Selbsterhitzung aufgehäufter pflanzlicher Stoffe zu experimenteller Untersuchung reizte und dann bald zu ganz ähnlichen Fragestellungen wie oben führte. Untersuchungen jener rein stoffwechselphysiologischen Art sind von zahlreichen Autoren, wenn auch mit verschiedenen weit gesteckten Zielen, angestellt worden, es seien nur genannt *Göppert* (1832), *Bonnier* (1880, 1893), *Rodewald* (1887), *Molisch* (1908), *Peirce* (1912), *Rubner* (1913) u. a., indem hinsichtlich ausführlicher Literaturnachweise auf die zusammenfassende Darstellung von *Leick* (1916) sowie auf die Handbücher der Physiologie von *Pfeffer* und *Benecke-Jost* verwiesen sei. Diese Untersuchungen, die sich auf Keimlinge, Blätter, Blüten, Samen, Früchte, Knollen, Moose, Flechten, Hutpilze usw. erstreckten und zum Teil rein statistischer, zum Teil aber auch energetischer Art waren, haben ebenso wie die meisten Studien über den Atmungsgaswechsel derartiger Objekte nur einen bedingten Wert, wenigstens sofern sie irgend etwas über Wärmebildung und Gaswechsel eines bestimmten pflanzlichen Objekts aussagen wollen. Denn alle solche Versuche sind mit einem Gemisch verschiedener Organismen angestellt worden, nicht mit reinen Kulturen. Nur die Untersuchungen *Rubners* über den Energiehaushalt von Bakterien und namentlich der Hefe machen eine Ausnahme, sowie natürlich die Atmungsversuche an Reinkulturen von Mikroorganismen.

Was die Selbsterwärmungsvorgänge anlangt, so sind sie weniger oft Gegenstand experimenteller Untersuchung gewesen. Neben zahlreichen Gelegenheitsangaben über Temperatursteigerungen in diesen und jenen Materialien sowie chemischen Analysen in solchen sich erhaltenden Stoffen, wären an Arbeiten, die der ursächlichen Ergründung dieser Prozesse gewidmet wurden, nur die älteren Publikationen von *F. Cohn* (1889 und 1893),

sowie die Schriften des Verfassers (1907 und 1911) und *Hildebrands* (1927) zu nennen, in welchen letzteren weitere ausführliche Literaturangaben nachzusehen sind.

Doch auch diese biologische Seite des Wärmebildungsproblems ist noch nicht befriedigend aufgeheilt, trotzdem ich mit einem hohen Grade von Wahrscheinlichkeit den Schluß begründen konnte, daß die Selbsterhitzung ausschließlich die Wirkung der Atmungstätigkeit lebender Organismen sei, und *Hildebrand* eine Reihe weiterer Argumente für diese Auffassung beibrachte. Zwar wiegen gewisse Einwände oder abweichende Erklärungsversuche, wie sie z. B. von *Boekhout* und *de Vries*, *Tschirch*, *Schwarz* und *Laupper* u. a. herrühren, nicht sonderlich schwer, da sie zum Teil gar keine, zum Teil nur sehr anfechtbare experimentelle Beweise beizubringen vermögen. Doch habe ich bereits selber (1911) auf eine Lücke hingewiesen, die bis jetzt nicht ausgefüllt werden konnte. Sie betrifft die Frage, welchen Anteil die Pflanzenmasse selber an der Erhitzung hat. Es ist sicher, daß durch Hitzesterilisierung, Behandlung mit sehr verschiedenen antiseptischen Stoffen, Verminderung des Wassergehalts usw. die Selbsterhitzungsfähigkeit pflanzlicher Stoffe völlig aufgehoben wird, ebenso wie sie in hitzesterilen Materialien sofort durch rohe und reine Beimpfung wieder hervorgerufen werden kann, mit anderen Worten, es besteht eine schöne Parallele zwischen den Bedingungen für Selbsterhitzung und denen für organisches Leben überhaupt. Doch haben jene keimtötenden bzw. keimhemmenden Mittel die unerwünschte Eigenschaft, gleichzeitig, entweder sicher oder zum mindesten möglicherweise, die Wirkung von Enzymen aufzuheben, welche in der ehemals lebenden Pflanzenmasse vorhanden waren und vielleicht nach ihrem Absterben ganz oder beschränkt wirksam blieben. Demnach mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß neben einer ja sicher nachgewiesenen Wärmebildung durch lebende Zellen noch eine solche durch Enzyme vorkomme, wie sie tatsächlich von *Tschirch* und namentlich von den Untersuchern der Tabakfermentation, z. B. *O. Loew* (1899) und *Hj. Jensen* (1908) (hier weitere Literatur, sowie bei *Behrens* im Handb. d. techn. Mykologie 5) immer wieder behauptet wird. Hier eine klare Entscheidung zu treffen, stößt auf erhebliche methodische Schwierigkeiten, ist doch dazu nichts mehr und nichts weniger nötig als die Gewinnung einer hinreichenden Menge lebender, völlig bakterien- und pilzfreier Pflanzenmasse, mit anderen Worten, ein Versuch mit Reinkulturen.

Demgemäß war das erste Ziel der folgenden Untersuchung, die Wärmebildung lebender reiner phanerogamer Pflanzenmassen festzustellen. Die Ergebnisse, die wenigstens an einem Objekt erzielt werden konnten, sollen in dem ersten Teil gegeben werden. In einem zweiten soll über eine größere Zahl von Versuchen berichtet werden, welche in Fortsetzung meiner früheren die Aufgabe hatten, die Selbsterwärmung steriler Pflanzenstoffe durch Reinkulturen verschiedener thermophiler und nichtthermophiler Pilze und Bakterien festzustellen. Auch diese Beobachtungen bezweckten, wenn auch auf indirektem Wege, erneut zur Lösung der Hauptfrage nach der Ursache der Selbsterhitzung beizutragen, indem ihnen folgende Überlegung zugrunde gelegt wurde: Ist die Selbsterhitzung die Folge der physiologischen

Tätigkeit lebender Organismen, so müssen die maximalen Erhitzungsgrade, die durch Reinkulturen erzielbar sind, ein annäherndes Abbild der oberen Temperaturgrenzen der betreffenden Mikroorganismen darstellen, zum mindesten sie niemals überschreiten. Damit würde auch schließlich die Frage ihre Erledigung finden, ob etwa auch solche überlebende Enzyme beteiligt sein können, die nicht vom pflanzlichen Substrat selber, sondern von der Mikroflora auf ihr stammen.

Die Untersuchungen beschränken sich auf einfache thermometrische Beobachtungen, ohne in die Einzelheiten des Vorgangs der physiologischen Wärmezeugung selber einzudringen. Doch dürften auch solche Daten als gesicherte Grundlage und notwendige Voraussetzung für jede eingehendere quantitative Untersuchung des Stoff- und Energiehaushaltes der lebenden Pflanze nicht wertlos sein.

Meinem früheren Assistenten, Herrn Dipl.-Landwirt *Eggelhuber*, bin ich für seine geschickte Hilfe bei der Anstellung der mühevollen Versuche zu Dank verpflichtet. Desgleichen gedenke ich gern der sachkundigen Sorgfalt, die der Institutsgehilfe Herr *Hasenjäger* den technischen Vorbereitungen gewidmet hat.

## II. Versuche mit *Helianthus annuus*.

Die Wärmeproduktion keimender Erbsen — ein bekannter physiologischer Versuch — wird nicht ausschließlich durch die Atmungstätigkeit der Erbsenkeimlinge bewirkt, sondern auch durch diejenige von Bakterien und Pilzen, die stets auf ihnen vorkommen. Im *Dewar*-schen Gefäß steigt die Temperatur keimender Erbsen in wenigen Tagen weit über 50°C.

Welcher Anteil an dieser Wärmeentwicklung kommt auf die Atmungstätigkeit der keimenden Samen?

Um diese Frage zu prüfen, ist es notwendig, keimende phanerogame Pflanzen zu gewinnen, die frei von Bakterien und Pilzen sind, und zwar in solcher Menge, daß damit ein *Dewar*-sches Gefäß gefüllt werden kann.

Nach erfolglosen Versuchen mit verschiedenen Samen und Desinfizientien erwiesen sich die Früchte von *Helianthus annuus*, der Sonnenblume, als geeignet. Die verholzte Fruchtschale scheint dem Keimling genügend Schutz auch vor konzentrierten keimtötenden Mitteln zu bieten; außerdem ist er noch in ein dünnes Samenhäutchen eingeschlossen, das ihm gegen etwa durch die poröse Fruchtschale dringende Gifte noch einen weiteren Schutz verleiht.

Zu den Versuchen wurden vollwertige, unbeschädigte Früchte ausgesucht. Früchte, bei denen die Fruchtschale verletzt war, auch solche, die auf Druck zwischen den Fingern aufplatzen, wurden ausgemerzt. Auf diese Weise wurden immer etwa 150 g trockene Früchte ausgesucht.

Es standen zwei Sorten von *Helianthus* zur Verfügung; die eine mit gelblich-weißer Fruchtschale und kleinen dunklen Streifen, eine zweite, kleinfrüchtige, mit blauschwarzer Fruchtschale. Die Keimfähigkeit beider Sorten betrug bei nicht ausgesuchten Früchten etwa 95 %.

Die ausgesuchten Früchte wurden in einem warmen Seifenbade gewaschen. Dabei wurde das Seifenwasser mehrere Male gewechselt und zuletzt durch reines Wasser verdrängt. Die blauschwarze Sorte erwies sich insofern als unangenehm, als der Farbstoff im Seifenwasser sich allmählich löste und der Reinigungsgrad nicht einwandfrei festgestellt werden konnte. Die Früchte wurden zwischen den Händen gerieben, wodurch die Fettschichten der Oberfläche entfernt wurden und sich auch vertrocknete Gewebeteilchen in Fetzen lösten. Schließlich fühlten sie sich glatt an. Nach etwa einhalbstündigem Waschen wurden sie auf Fließpapier zum Trocknen ausgebreitet.

Hierauf wurden sie in einer Flasche mit 3%igem Bromwasser<sup>1</sup> übergossen, so daß sie gut von der Flüssigkeit überdeckt waren, und blieben im Brom 15 Minuten unter dauerndem Schütteln. Nach dieser Zeit wurde das Bromwasser abgossen, worauf die Früchte in einem Dampfkasten, wie er zu sterilen Arbeiten benutzt wird, in eine vorher sterilisierte Flasche gefüllt, abermals mit einer 3%igen Bromwasserlösung übergossen wurden. Dann wurde die Flasche mit steriler Watte verschlossen. Sie wurden dann nochmals 20 Minuten lang durch kräftiges Schütteln in Bewegung gehalten, um möglichst alle Luftblasen von den Früchten zu entfernen und die gesamte Oberfläche der Einwirkung des Bromwassers zugänglich zu machen. Nach dieser Zeit wurde die Bromlösung vorsichtig abgossen und der noch haftende Rest mit vorher sterilisiertem Wasser so lange abgespült, bis das Wasser sich nicht mehr gelb färbte.

Äußerlich waren die Früchte leicht hellbraun gefärbt, die dunklen streifenartigen Flecke waren vorher schon verblaßt und durch die Brombehandlung nun ganz verschwunden. Die Früchte der blauschwarzen Sorte waren in ihrem Aussehen heller geworden.

Die *Helianthus*früchte wurden hierauf im sterilen Raum, nachdem der Flaschenhals und die Watte abgeflammt und die Flasche äußerlich mit Sublimatlösung abgespült wurde, in sterile Doppelkristallschalen geschüttet und mit wenig Wasser — es genügte zumeist der Rest des letzten Spülwassers — im warmen Zimmer aufgestellt.

---

<sup>1</sup> Brom wurde, wenn auch in viel geringerer Konzentration, zuerst von *Nabokich* angewandt. Man vergleiche dazu die letzte inzwischen erschienene ausführliche Abhandlung von *E. Pringsheim* (1928) über Sterilisation von Samen.

Nach etwa 36 Stunden war eine gleichmäßige Keimung der Samen erfolgt. Das Würzelchen war einige Millimeter aus den geöffneten Früchten herausgetreten.

Die Prüfung auf Sterilität erfolgte mit der Lupe und dem bloßen Auge; ein Öffnen der Schalen wurde wegen der Gefahr einer Luftinfektion vermieden. Eine solche Kontrolle erwies sich als genügend genau, wenn sie einige Tage fortgesetzt wurde. Die Erfahrung lehrte nämlich, daß Bakterieninfektion sich immer in der Trübung des Wassers zu erkennen gibt. Sobald das Wasser ganz klar blieb, erwies sich die Kultur auch als steril; trat dagegen eine, wenn auch nur zarte, Opaleszenz ein, so war sie immer mit Bakterien infiziert. Pilzinfektionen müssen sich schließlich in der Entstehung von Mycelien äußern und sind dann kaum zu übersehen. Die Kontrolle muß auf alle Fälle mehrere Tage hindurch erfolgen; denn es können sich Keime innerhalb der Fruchtschale befinden, der Bromwirkung entgehen und erst ganz allmählich zur Entwicklung kommen. Auch ist damit zu rechnen, daß Sporen durch die Brombehandlung vorerst nur gehemmt werden. Dieser Fall ist gar nicht so selten, namentlich wenn die Konzentration des Bromwassers nicht ausreicht. Schließlich müssen sich aber auch diese gehemmten Keime bemerklich machen.

Beim Versuch, ein geeignetes Desinfiziens zu finden, wurden die Samen verschiedener Getreide, ferner Lupinen, Erbsen usw. auf ihr Verhalten zu keimtötenden Mitteln geprüft. Je nach Größe der Samen sind drei bis zehn Stück auf je einem Erlenmeyerkölbchen verteilt worden. Dabei zeigte es sich, daß sich das sterile Wasser, in welchem sich die desinfizierten Samen befanden, oft noch nach einer Woche zu trüben begann. Eine Luftinfektion kam kaum in Frage.

Eine eigenartige Erscheinung verdient noch Erwähnung. Es ist bekannt, daß Samen, die man mit Wasser bedeckt zum Anquellen bringt, im Wasser sehr schlecht auskeimen. Das war auch bei den nichtsterilen Sonnenrosenfrüchten der Fall. Die sterilen keimten und wuchsen jedoch unter Wasser ausgezeichnet. Es geht daraus hervor, daß jene jedem Praktiker bekannte Hemmung auf die Entwicklung von Mikroorganismen zurückgeht, die entweder durch ihren starken Sauerstoffverbrauch oder durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten oder durch beide Momente zusammen die Keimung hemmen.

Die behandelten Samen keimten ausgezeichnet zu fast 100 %. Sie wurden bereits in ein Dewargefäß von 400 ccm Inhalt gefüllt, wenn das Würzelchen erst einige Millimeter weit herausgetreten war. Die spätere Kontrolle nach dem Versuch, sowie Parallelversuche mit sterilisierten Samen, die lange im Wasser blieben, zeigten, daß bei diesem Objekt sich mit 3 %igem Bromwasser eine *absolut sichere* Sterilisierung erreichen ließ.

Das Dewargefäß wurde gründlich gereinigt und gespült und, in Fließpapier gewickelt, im Dampftopf in drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Stunde dem strömenden Dampf von 100° C ausgesetzt. Nach dem Erkalten wurde das Gefäß in den Dampfkasten gebracht und folgendermaßen gefüllt:

Im Dampfraum befindet sich das noch in Papier gehüllte Gefäß, die Kristallisierschalen mit den gekeimten Helianthusfrüchten, ein Gefäß mit steriler Watte und einige vorher sterilisierte Metalllöffel in Papier gewickelt. Der Raum wird nun nochmals mit Wasserdampf beschickt. Um die Sicht durch die Glasscheiben offenzuhalten, wird die betreffende Scheibe mit Alkohol abgerieben. Dann wird das Dewarsche Gefäß in die linke Hand genommen, das Papier so weit entfernt, daß die Öffnung frei wird, ein Löffel ausgewickelt und durch die Flamme gezogen, die Kristallisierschale geöffnet und die Masse der Keimlinge mit dem Löffel in das Gefäß gefüllt, derart, daß jede Berührung der Gefäßränder unterbleibt. Darauf wird ein Maximumthermometer in die Mitte der Pflanzenmasse eingeführt, und zwar so tief, daß gerade das untere Drittel der Füllung erreicht wird. Hierauf wird mit der ausgeglühten Pinzette das Gefäß mit mehreren Lagen steriler Watte geschlossen, wobei zugleich die Keimlinge etwas zusammengedrückt werden, damit nicht allzu große Hohlräume im Innern des Gefäßes bleiben.

Einige Schwierigkeiten machte das Sterilisieren des Thermometers. Es genügte, dasselbe tagelang in einer starken Sublimatlösung zu verwahren, nachdem es vorher gereinigt und entfettet war. Kurz vor dem Einführen wurde das Thermometer mit sterilem Wasser abgespült.

Das gefüllte Dewarsche Gefäß wurde dann bei Zimmertemperatur aufgestellt und beobachtet. Zu gleicher Zeit wurde ein zweites Dewarsches Gefäß mit unbehandelten Helianthusfrüchten von gleichem Entwicklungszustand beschickt. Die weitere Beobachtung beider Gefäße ergab folgende Temperaturveränderungen:

Zeit	I. Nicht steril	II. Steril	
	Gefäßtemperatur ° C	Gefäßtemperatur ° C	Lufttemperatur ° C
1. Tag . . . . .	26 *	26*	21
2. " , vormittags . . . . .	50	22,5	20
3. " , nachmittags . . . . .	57	22	21
4. " . . . . .	58,5	23	23
4. " . . . . .	52	23	20

\* Die höhere Anfangstemperatur in diesem sowie in ähnlichen späteren Versuchen rührt noch von der höheren Temperatur des Dampfkastens her, in welchem die Gefäße gefüllt wurden.

Nachdem beide Gefäße entleert worden waren, wurde folgendes festgestellt:

Die nicht sterilen Früchte zeigten einen starken Befall von *Actinomyces thermophilus*. Sie waren in der charakteristischen Weise weiß gesprenkelt. Die Keimlinge sind anfänglich im Gefäß weiter gewachsen; die meisten Würzelchen aber waren schwarz verfärbt und abgestorben.

Die mit Brom behandelten Früchte haben im Gefäß ihr Wachstum normal fortgesetzt; die Würzelchen sahen gesund aus, eine Infektion durch Bakterien oder durch Pilze war nicht zu finden.

Die sterilen Samen wurden nun mit einer Aufschwemmung von *Actinomyces* aus dem nicht sterilen Gefäß und mit verschimmelten Lupinen übergossen, blieben zum Abtrocknen einige Zeit an der Luft stehen und wurden dann wieder in das Dewarsche Gefäß gefüllt. Der Temperaturverlauf war folgendermaßen:

Zeit	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
1. Tag . . . . .	23,5	20
2. " . . . . .	28	18,5
3. " . . . . .	32	25
Über Nacht . . . . .	41	21
4. Tag . . . . .	44	20

Nach dem Entleeren des Gefäßes fand sich reichlich Entwicklung von Schimmelpilzen sowie Bakterien; der *Actinomyces* kam nicht zur Entwicklung.

Ein weiterer Versuch mit 188 g *Helianthus*früchten (schwarze Sorte) hatte folgendes Ergebnis:

Zeit	I. Nicht steril	II. Steril	
	Gefäßtemperatur °C	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
1. Tag . . . . .	22,5	20	20,5
2. " . . . . .	42	23	20
3. " . . . . .	41,5	<b>23,5</b>	21
	nach weiteren 4 Tagen <b>48,5°</b>		

Am vierten Tage wurden die mit Brom behandelten Samen untersucht. Sie hatten zu 95 % weitergekeimt. Leider wurde eine lokale Infektion mit einem *Mucor* festgestellt. Seine Entwicklung war aber so geringfügig, daß ein wesentlicher Einfluß auf die Wärmebildung im Gefäß kaum in Frage kommt. Bakterien fanden sich nicht.

Die Früchte wurden nun mit Erde infiziert, etwas angefeuchtet und wieder in das Gefäß gepackt. Innerhalb von drei Tagen stieg die Temperatur im Gefäß von 24 auf 43°. Nach der Entleerung des Gefäßes zeigte sich, daß die *Helianthus*früchte von Pilzmycel durchwuchert waren, auch hatten sich die Bakterien reichlich entwickelt. Die Keimlinge waren wie verbrannt.

Ein dritter Versuch mit *Helianthus* (schwarze Sorte) verlief in folgender Weise:

Zeit	I. Nicht steril	II. Steril	
	Gefäßtemperatur °C	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
1. Tag . . . . .	20—31	24 —22,5	20
2. " . . . . .	34—46	21,5—23	19
3. " . . . . .	47—49	22,5	17
4. " . . . . .	56—59		19

In diesem Falle wurden die Keimlinge der nicht sterilen Reihe, nachdem sie innerhalb zweier Tage gekeimt hatten, vor dem Einfüllen in das *Dewarsche* Gefäß in einem Porzellansieb unter der Wasserleitung abgespült und bei Zimmertemperatur auf Fließpapier leicht getrocknet. Damit sollten die Abfallstoffe, die durch das Wachstum von Bakterien und Pilzen gebildet wurden, entfernt werden, da erfahrungsgemäß solche Stoffe hemmend auf das weitere Wachstum von Mikroorganismen wirken. Der Erhitzungsverlauf unterschied sich aber nicht wesentlich von den vorigen.

Nach der Unterbrechung des Versuchs machte sich scharfer Fäulnisgeruch (Ammoniak) bei den nicht sterilen Keimlingen bemerkbar. Die Keimlinge waren abgestorben, verklebt und schleimig; der Pilzbefall war gering.

Die sterilen Keimlinge wurden am vierten Tage aus dem Gefäß entleert. Irgendeine Infektion wurde nicht gefunden. Hierauf wurden sie mit Erdaufschwemmung vermischt und wieder gepackt. Die Temperatur stieg innerhalb 4 Tagen von 18 auf 29°, worauf eine abermalige Infektion mit einer Abspülung von Sonnenblumenfrüchten erfolgte. Dann stieg die Temperatur auf 42,8° innerhalb 2 Tagen.

Die Temperatursteigerung der künstlich infizierten sterilen Früchte war gelegentlich nicht ganz so kräftig wie die der normal infizierten. Dies kann auf einer gewissen Nachwirkung der Bromreste beruhen oder, was wahrscheinlicher ist, darauf, daß die künstliche Impfung nicht immer so günstig ausfällt wie die natürliche. Keinesfalls aber, was besonders betont werde, hatten im Hauptversuch selbst etwa vorhandene Bromreste die Keimlinge gefährdet; denn diese waren ja ausgezeichnet gekeimt und während des Versuchs ganz normal weitergewachsen.

Aus diesen ganz einwandfreien Versuchen, den ersten ihrer Art, geht hervor, daß die allgemein bekannte und oft als Demonstration benutzte *Selbsterwärmung keimender Samen* (wenigstens bei *Helianthus*) zum ganz überwiegenden Teile gar nicht auf der Wärmebildung der Keimlinge selbst beruht, sondern durch die auf ihnen sich entwickelnden



Mikroorganismen veranlaßt wird. Eine gewisse Temperatursteigerung ist zwar vorhanden. Ihr Betrag ist nicht genau anzugeben wegen der Unvollkommenheit des Wärmeschutzes und der Schwankungen der Außentemperatur. Doch sind es nur wenige Grade, die gegenüber der bekannten lebhaften und weitgehenden Temperatursteigerung nicht steriler Keimlinge fast gar nicht ins Gewicht fallen.

Ebenso interessant und überraschend ist der Rückschluß auf die Atmung keimender Samen. Sie wird allgemein als intensiv bezeichnet, doch zeigen die obigen Versuche, daß dies nicht richtig sein kann. Es wird notwendig sein, mit Hilfe unserer Methode die Vorstellungen über die Atmung höherer Pflanzen einer Revision zu unterziehen.

Bei anderen Samen ist bisher eine so sichere Sterilisierung nicht geglückt, wie bei *Helianthus*, wengleich viel Zeit auf ähnliche Versuche verwandt wurde. Aus der großen Zahl solcher erfolglosen Versuche will ich nur einen herausgreifen, der zum Ziel hatte, auf aseptische Weise Samen aus Früchten zu entnehmen. Es gelang dies ziemlich gut mit Melonen, aber merkwürdigerweise nicht mit Kürbissen, obwohl sie nach allen Regeln der Kunst äußerlich desinfiziert, einwandfrei im sterilen Raum geöffnet und mit allen aseptischen Kautelen ihrer Samen beraubt wurden. Trotzdem solche Versuche nicht weniger als viermal ausgeführt wurden, erwiesen sich die Samen als durch Bakterien infiziert. Sie waren es in einem solchen Maße und so regelmäßig, daß dafür keinesfalls Fehler der Methodik verantwortlich gemacht werden können, sondern der Schluß unabweislich ist, daß die Kürbisfrucht von vornherein nicht steril im Innern ist. Berücksichtigt man die Entwicklungsgeschichte der Früchte, so ist dies auch ganz gut denkbar. Eine nähere Untersuchung solcher Bakterien, die sich möglicherweise auch bei anderen Früchten oder innerhalb von Samen regelmäßig finden, wäre von Interesse. Vielleicht stellen sie nur eine gleichgültige und unvermeidliche Infektion dar, vielleicht spielen sie aber auch eine bestimmte Rolle.

### III. Versuche mit Pilzen und Bakterien.

#### *Allgemeine Bemerkungen über die Methodik.*

Als Substrat für die Versuche, die Erhitzungsfähigkeit reiner Kulturen von Pilzen und Bakterien zu prüfen, wäre in erster Linie das Heu in Betracht gekommen. Es stellte sich jedoch bald heraus, daß sich das Medium nicht gut für derartige, mit besonderer Genauigkeit anzustellende Versuche eignet.

Es ist zunächst schwer zu handhaben bei der Füllung der Gefäße und namentlich auch bei der Impfung. Dazu kommt, daß das Heu durch die intensive Erhitzung im Autoklaven ungünstig verändert

wird. So z. B. wuchs der *Bacillus calfactor* sehr schlecht auf solchem Heu, und einer der am meisten charakteristischen Heubewohner, der *Actinomyces thermophilus*, ist gar überhaupt nicht auf ihm zum Wachsen zu bringen. Dieser Übelstand ließ sich allerdings zum Teil beseitigen. Es fand sich nämlich, daß feuchtes Heu, das mit feiner Schlämmkreide bestäubt und dann sterilisiert wurde, einen besseren Nährboden darstellt, auf dem der Strahlenpilz sogar ausgezeichnet wuchs. Auch *Bac. calfactor* wächst besser; ob er aber in einem dergestalt regenerierten Medium ebensogut gedeiht, wie in unverändertem Heu, ist zweifelhaft. Man könnte sich wundern, daß jene Mikroben auf Heu auszug, der ja durch Kochen im Autoklaven gewonnen wurde, so gut wachsen. Doch ist zu bedenken, daß ein solches Medium viel weniger konzentriert ist, als der Saft des feuchten Heues, und dann zeigten ja schon frühere Erfahrungen (*Miehe* 1907, S. 34), daß auch ein solches Dekokt in seiner ursprünglichen tiefdunklen Beschaffenheit kein guter Nährboden ist, sondern erst nach völliger Entfärbung durch Blutkohle gut brauchbar wird. Welches die hemmenden Stoffe sind, die im Druckkocher auftreten, ist nicht ohne weiteres zu sagen; zum Teil scheint starke Säurebildung die Ursache zu sein.

Schließlich stellte es sich heraus (vgl. später die Versuche mit *Thermomyces*), daß trotz fraktionierter Sterilisierung unter Druck Heu in den Mengen, wie sie für einen Versuch nötig sind, überhaupt nicht mit Sicherheit sterilisierbar ist. Es ist immer mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die resistenten Sporen des *Bac. calfactor* selbst diese drastische Erhitzung überstehen.

Alle diese Übelstände machten es notwendig, sich nach einem besseren Substrat umzusehen. Als solches bot sich fein zerriebenes trockenes Weißbrot dar, das als ein grobes Mehl (geriebene Semmel) in beliebigen Mengen beim Bäcker zu kaufen ist. Dies pflanzliche Substrat erwies sich in vielfacher Hinsicht als ausgezeichnet für unsere Versuche. Es ist sehr porös, neigt auch nach dem Befeuchten nicht zur Verklumpung, sondern bleibt locker, läßt sich im Autoklaven ohne auffälligen Nachteil sterilisieren und ist vor allen Dingen bei der Impfung und beim Füllen der Gefäße sauber und leicht zu handhaben. Es hat nur den einen Nachteil, daß merkwürdigerweise Bakterien nicht darauf wachsen, daß es also als Versuchssubstrat für *Bac. calfactor*, *Bac. coli* u. a. ausscheidet.

Das trockene Brotmehl wurde zu etwa 35 % mit Wasser versetzt und eine halbe Stunde bei  $1\frac{1}{2}$  Atm. sterilisiert. Es wurde in der Weise geprüft, daß es steril in ein steriles *Dewarsches* Gefäß gefüllt und mittels sterilen Thermometers auf seine Erhitzungsfähigkeit beobachtet wurde. Es blieb zunächst während eines Zeitraumes von 20 Tagen bei Zimmer-temperatur:

	Gefäß °C	Luft °C
Tiefste Temperatur . . . . .	14,5	16
Höchste „ . . . . .	17,0	20

Es trat also keine Erhitzung ein, vielmehr blieb das Gefäß stets 2 bis 3° unter der Temperatur der Umgebung. Dieses Minus geht auf Rechnung des durch die Verdunstung bewirkten Wärmeverlustes, es zeigte sich in den Versuchen auch immer, wenn Erhitzung nicht oder noch nicht erfolgte, also im Anfang.

Nach dieser Zeit wurde das Gefäß noch in einen Thermostaten von 40° gebracht. Auch hier blieb während einer Beobachtungsdauer von 4 Tagen die Temperatur immer einige Grade unter der Thermostatentemperatur. Mikroskopisch war keine Spur von Pilzen oder Bakterien zu finden.

Damit war seine Brauchbarkeit als an sich untätiges Material einwandfrei erwiesen. Das analoge Verhalten sterilen Heus ist ja bekannt.

Auch im Heißluftsterilisator ließ sich Brot gut bei 140° sterilisieren, Pilze wuchsen ausgezeichnet darauf. Doch mußte nachträglich das Wasser hinzugesetzt werden, und da das Brot außerdem in trockenem Zustande sehr hart war, ließ es sich später auch nach Befeuchtung schlecht wieder in einen lockeren Zustand bringen. Ich habe deshalb das Brot immer nur auf die erste Weise behandelt.

Als Versuchsgefäße wurden versilberte *Dewarsche* Gefäße verwandt. Es zeigte sich, daß solche von 400 oder 500 ccm Inhalt völlig ausreichen. Mit Brot als Füllung trat hier ebenso starke Erhitzung ein als in Gefäßen von 2000 ccm Inhalt. Diese waren jedoch für das Heu besser, da sich Heu nicht so leicht zusammenpressen läßt und deshalb zweckmäßig in größeren Mengen verwendet werden mußte. Gewöhnlich wurden 100 g trockenes Brot genommen, das mit 50 ccm Wasser befeuchtet worden war. Es wurde locker eingefüllt und nahm nur einen Teil des Gefäßes ein. Unten wurde ein ansehnlicher Bausch Watte untergelegt, oben blieb ein breiter Rand, der nachher mit mehreren Lagen Watte ausgefüllt wurde.

Die kleineren *Dewarschen* Gefäße wurden im Autoklaven sterilisiert, nachdem sie in der unteren Kuppe, wie bemerkt, mit Watte ausgefüllt und im übrigen in Fließpapier eingeschlagen wurden. Impfen, Füllen usw. geschah in einem sterilen Raum, einem sogenannten Dampfkasten, wie er für derartige Arbeiten bekannt ist. Die hineinragenden Hände und Arme wurden mit Wasser und Seife und Chinosol desinfiziert und immer feucht gelassen, damit sich von ihnen keine Keime ablösen konnten. Selbst-

verständlich wurde aber nie das Innere der Gefäße berührt. Alle Gegenstände, mit welchen das Substrat in Berührung kommen mußte, wurden sterilisiert. Die Thermometer wurden in einer starken Sublimatlösung aufbewahrt und vor Verwendung mit sterilem Wasser abgespült. Alle diese Maßnahmen, die im einzelnen schwer ausführlich zu beschreiben sind, wurden schließlich mit einer solchen Sicherheit beherrscht, daß nur ausnahmsweise einmal Infektionen vorkamen.

Die großen Dewarschen Gefäße konnten nicht in unserem Autoklaven sterilisiert werden, da er zu klein ist. Sie wurden (einzelnes siehe später) entweder mit Sublimat gefüllt längere Zeit stehengelassen und dann mit sterilem Wasser ausgeschwenkt, wobei dem oberen Rand besondere Sorgfalt gewidmet wurde, oder sie wurden, in Fließpapier eingeschlagen, im Dampfsterilisator mehrere Male sterilisiert.

Die Temperaturablesungen erfolgten so oft wie nur möglich, konnten aber natürlich nicht dauernd stattfinden. Doch kam es in erster Linie auf den erreichten Höchststand an. Dieser wurde immer, falls es nicht von vornherein geschah, durch Maximumthermometer besonders geprüft, damit der Höchststand in Beobachtungspausen keinesfalls übersehen wurde. Auch wurden zur Kontrolle der Thermostaten stets neben das Gefäß Maximumthermometer in Wasser aufgestellt, um jeden Fehler, der durch Unzuverlässigkeit der Thermostaten hervorgerufen wurde, auszuschalten. Bei manchen Versuchen wurde die Außentemperatur durch Überführung des Gefäßes in Thermostaten von höheren Temperaturen gesteigert, um den Wärmeverlust des Gefäßes zu vermeiden. Das konnte leider nur unvollkommen geschehen und ist auch nicht bei allen Versuchen erfolgt. Wie gelegentliche Beobachtungen zeigten, ist auch auf diese Weise keine starke Steigerung zu erzielen (vgl. z. B. die Versuche mit *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*). Es ist aber kein Zweifel, daß unsere Maximalzahlen durchgehends noch etwas höher ausgefallen sein würden, wenn dieser Verlust durch Wärmeausstrahlung noch besser verhindert wäre. Ein ideales Mittel würde sein, die Versuche in einem elektrischen Thermostaten anzustellen, dessen Temperatur automatisch der steigenden Temperatur im Versuchsgefäß folgt. Eine solche Einrichtung, die technisch auszuführen wäre, stand mir aber leider nicht zur Verfügung.

Die im folgenden mitzuteilenden Zahlen stellen nur eine starke Zusammenziehung meiner Protokolle dar. Eine Darstellung in Kurvenform verbot sich wegen der unvermeidlichen Lückenhaftigkeit der Ablesungen. Doch kommt es, wie schon bemerkt, in erster Linie auf die Höchstgrade an.

Ich lasse nun die einzelnen Versuche, geordnet nach den Arten der Mikroorganismen folgen. Dabei werden gleich ihre Beziehungen zur Temperatur angefügt. Namentlich war es natürlich wichtig, die maximalen ertragbaren Temperaturen zu kennen. Soweit nicht zuverlässige Angaben aus der Literatur vorlagen, wurden sie eigens neu bestimmt. Dabei genügte natürlich nicht die sonst übliche Methode, die Temperaturmaxima nach dem Angehen von Impfstrichen auf Agar zu prüfen. Vielmehr kam es darauf an, welche Temperaturen von den Organismen noch eine gewisse Zeit vertragen werden *in rein vegetativem Zustand*.

Als Einheitszeit wurde gewöhnlich willkürlich ein Zeitraum von 4 Stunden gewählt und folgendermaßen verfahren: Die Mikroorganismen wurden auf Agarplatten bei günstiger Wachstumstemperatur zunächst zur Entwicklung gebracht. Die jungen noch sporenfreien Mycelien wurden dann durch einen Tuschestrich auf der Unterfläche der Doppelschale umgrenzt, in verschiedenen hohe Temperaturen gebracht und 4 Stunden darin belassen. Alsdann wurden sie wieder in günstige Wachstumstemperatur gebracht und geprüft, ob ein Weiterwachsen der Mycelien erfolgte. Solche Beobachtungen geben einen für unsere Zwecke hinreichenden Anhalt zur Beurteilung der Frage, welche Temperaturen von den Mikroorganismen auch nach dem Aufhören des Wachstums im vegetativen Zustande noch vertragen werden. Die so ermittelten Werte liegen oft nicht unbeträchtlich höher als die in der Literatur angegebenen, die auf die übliche Weise ermittelt wurden. Daß sie für die Beurteilung der Erhitzung wichtig sind, braucht nicht betont zu werden. Physiologische Wärmebildung ist eben so lange möglich, als noch lebendes Plasma der Erhitzung widersteht; ob es sich noch im Zustande des Wachstums befindet, ist gleichgültig.

a) *Rhizopus nigricans*.

100 g geriebenes Semmelbrot wurde, gut angefeuchtet, eine Stunde bei  $\frac{3}{4}$  Atm. sterilisiert und nach dem Erkalten mit Sporen von *Rhizopus* an der Oberfläche des Brotes geimpft. Die Masse wurde dann im Dampfkasten in ein steriles Dewarsches Gefäß eingefüllt, mit sterilem Thermometer versehen und mit steriler Watte oben abgeschlossen.

Die Temperatursteigerung war folgende:

I. Versuch			II. Versuch		
Zeit	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C	Zeit	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
1. Tag . . . . .	26	21	1. Tag . . . . .	21,8	21
2. " . . . . .	38	23	2. " . . . . .	35	20
3. " . . . . .	34,3	25	3. " . . . . .	31	19
4. " . . . . .	25	21	4. " . . . . .	29,5	19

Beim Auspacken der Gefäße zeigte sich auf der Oberfläche des Brotes weißliches Mycel, das auch an der Außenseite der Brotsäule im oberen Drittel deutlich zu sehen ist. Im Innern des Brotes sind in Hohlräumen Mycelfäden zu finden. Sporangienbildung ist vereinzelt auf der Außenfläche festzustellen.

Die makroskopische Untersuchung ergab keine fremden Schimmelpilze und keine Bakterien.

In den beiden Versuchen ist die erzielte Höchsttemperatur nicht ganz gleich. Es wurden in einem Falle 38°, im anderen 35° erreicht.

Im letzten Falle war aber auch die Außentemperatur tiefer. *Rhizopus* wird in Form junger Mycelien nach 4 Stunden bei 40° abgetötet.

b) *Penicillium glaucum*.

100 g angefeuchtetes Semmelbrot wurde in Doppelschale im Autoklaven sterilisiert, nach dem Erkalten mit Trockensporen einer Reinkultur auf Agar überstäubt und bei Zimmertemperatur 2 Tage stehen gelassen.

Nach dieser Zeit entstand auf der Oberfläche ein dichter Hyphenfilz mit beginnender Sporenbildung. Nachdem das Brot durchgemischt war, wurde es in ein steriles Dewarsches Gefäß gefüllt, mit sterilem Thermometer versehen und mit steriler Watte verschlossen.

Beobachtung bei Zimmertemperatur:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Lufttemperatur ° C
1. bis 2. Tag . . . . .	24	17—20
3. Tag . . . . .	37—40	20—23
4. „ . . . . .	40	19

Dann wurde das Gefäß in einen Thermostaten von 40° gestellt; die Brottemperatur stieg auf 41°, um auf dieser Höhe 3 Tage unverändert zu bleiben. Beim Auspacken hing die Brotmasse, durch die Pilzhyphen gehalten, zusammen. Das Pilzwachstum ist reichlicher als bei anderen Versuchen; namentlich auf der Oberfläche und seitlich in den oberen zwei Dritteln und im Thermometerkanal ist es sehr üppig. Auch ist die Sporenbildung weit lebhafter als bei anderen Beobachtungen. Der Geruch erinnert etwas an Gorgonzola-Käse.

Mikroskopisch wurde keine Infektion von Bakterien und von anderen Pilzen, insbesondere nicht mit *Aspergillus fumigatus*, beobachtet.

Dieser Pilz tritt, wie später ausgeführt wird, sehr leicht als Infektion auf. Mehrere Versuche mit *Penicillium glaucum* verliefen ergebnislos, weil sich der *Aspergillus fumigatus* dazugesellte. Die Temperatur im Gefäß zeigte bei solcher Infektion nach einigem Verweilen auf 40° einen ruckartigen Aufstieg auf 45° und darüber, namentlich wenn, wie hier geschehen, das Dewarsche Gefäß in einen Thermostaten von 40° gestellt wird. Gerade dieser Anstieg war es, der sofort Verdacht auf Infektion erregte, der dann durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt wurde.

Die Höchsttemperatur betrug also 41°.

Die sporenfreien Mycelien von *Penicillium glaucum* widerstanden noch einer vierstündigen Einwirkung von 40°. Bei 45° wird der Pilz abgetötet.

c) *Aspergillus niger*.

100 g Brotkrümel wurden angefeuchtet und in einer Doppelschale im Autoklaven eine Stunde bei  $\frac{3}{4}$  Atm. sterilisiert, nach dem Erkalten mit Sporen von *Aspergillus niger* geimpft und im Brutschrank bei 30° einige Tage gehalten. Nachdem die Sporen gekeimt und das Mycel sich über das Brot ausgebreitet hatte, wurde die Brotmasse im Dampfkasten in ein steriles Dewarsches Gefäß gefüllt, mit sterilem Maximumthermometer versehen und mit steriler Watte verschlossen. Das Gefäß blieb zunächst bei Zimmertemperatur von 20° stehen.

Die Temperatur nahm folgenden Verlauf:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Lufttemperatur ° C
1. Tag . . . . .	21	19
2. " . . . . .	23	20
3. " . . . . .	48	20
4. " . . . . .	49,5	Thermostat von 36

Am dritten Tage wurde das Gefäß in einem Thermostaten von 36° gestellt; die Temperatur erhöhte sich noch um  $1\frac{1}{2}^{\circ} = 49,5^{\circ}$ .

Nach dem Auspacken war die Brotmasse noch verhältnismäßig feucht und zu einer zusammenhängenden Säule durch die Pilzhyphen verfestigt, die freihängend nicht zerriß. Die obere Fläche der Säule zeigte kalkartig weiße Flecken von Mycelfäden und einige schwarze Stellen, die Konidien des Pilzes. Sonst ist mit bloßem Auge keine Verschimmelung zu sehen, insbesondere nicht im Innern der Brotsäule. An den Längswänden zeigten sich gelbliche Flecke, aber keine Konidienbildung; auch im Innern war keine Sporenbildung zu finden.

Mikroskopisch fanden sich durch die ganze Masse hindurch bis ins Innere Mycelfäden, die die Brotkrümel zusammenspinnen. Keine Bakterien! Die feuchte Brotmasse war nicht klebrig verschmiert, sondern ließ sich in größeren Klumpen auseinandernehmen. Die größte Feuchtigkeit war im unteren Drittel des Brotzylinders.

In einem zweiten Versuch wurde im Thermostaten von 36° eine Höchsttemperatur von 53,5° erreicht.

In einem dritten Versuch wurde das Brot unmittelbar nach der Beimpfung mit Sporen bei Zimmertemperatur von 15 bis 19,5° beobachtet. Die Temperatur sank anfangs, stieg dann sehr langsam, da die Mycelien erst allmählich heranwachsen mußten, schnellte schließlich aber am vierten Tage rasch von 20 auf 52° empor. Die erzielten Höchstgrade betragen also 49,5, 52, 53,5°. Im vegetativen Zustande wird *Aspergillus niger* während 4 Stunden bei 55° abgetötet, während er die Temperatur von 50° noch übersteht.

d) *Aspergillus fumigatus*.

Dieser pathogene Schimmelpilz findet sich außerordentlich häufig an erwärmten gärenden Pflanzenstoffen und wächst sehr gerne auf feuchtem Brot, wenn es auf etwa Bluttemperatur erwärmt ist. Bei Erwärmungsversuchen mit anderen Schimmelpilzen auf Brot tritt er gelegentlich als Infektion auf, die sich erst bemerkbar macht, wenn die Temperatur auf die ihm zusagende Höhe von etwa 40° gestiegen ist. Bei Zimmertemperatur kann er sich nicht schnell genug entwickeln und wird von den anderen Schimmelpilzen unterdrückt.

Das Brot wurde, nachdem es angefeuchtet war, in Deckelschalen im Autoklaven bei 1 Atm. eine halbe Stunde erhitzt, ebenso das Dewarsche Gefäß. Die Impfung erfolgte mit trockenen Sporen, indem diese mit der Platinnadel einer Reinkultur auf Agar entnommen, über die Brotmasse verstäubt und mit einem abgeflamten Glasstab durchgemischt wurden.

Nach der Impfung wurde das Brot sogleich im Dampfraum mit einem abgeflamten Metallöffel in das Gefäß gefüllt.

Die Beobachtung des Temperaturanstiegs erfolgte bei Zimmertemperatur und ergab folgendes Bild:

Zeit	Gefäßtemperatur	Lufttemperatur
	°C	°C
1. Tag . . . . .	23	18,5
2. " . . . . .	19	19
3. " . . . . .	20—30	20
4. " . . . . .	40—54	21
5. bis 7. Tag . . . . .	51—52	18—20

Als das Brot aus dem Gefäß entleert war, schien es, insbesondere im unteren Drittel des Gefäßes, feuchter zu sein, als vor seinem Einfüllen. Dieses Mehr an Feuchtigkeit, das auch bei anderen Versuchen auffiel, ohne daß es quantitativ festgestellt wurde, könnte damit erklärt werden, daß bei der Atmung neben CO<sub>2</sub> auch H<sub>2</sub>O gebildet wird. Das obere Drittel war stellenweise von weißem Mycel in Form großer Flecken bedeckt. Im obersten, mehr trockenen Teile war Sporenbildung von grüner bis rauchgrauer Farbe zu sehen. Das Brot war zusammenhängend, aber nicht verklebt. Im Innern des Brotes war makroskopisch wenig Pilzmycel zu finden.

Mikroskopisch gingen die Hyphen in einzelnen Strängen durch die ganze Brotmasse der oberen zwei Drittel. Es fanden sich in der Aufschwemmung keine Bakterien und keine fremden Pilze. Der *Aspergillus fumigatus* ist übrigens an den Endanschwellungen seiner Konidienträger leicht zu erkennen und kann mit anderen Aspergillen nicht verwechselt werden.



Ein zweiter Versuch mit *Aspergillus fumigatus* wurde nach dem üblichen Sterilisieren und Impfen zunächst 2 Tage lang im Thermostaten von 40° gehalten. Während dieser Zeit entwickelte sich der Pilz auf der ganzen Brotoberfläche. Hierauf wurde das Brot im Dampfraum gut durchgemischt und nochmals mit etwas sterilem Wasser angefeuchtet. Die Brotmasse hatte gleichmäßige Krümelung nach dem Einfüllen in das Dewarsche Gefäß. Einführung eines sterilen Maximumthermometers und Watteabschluß. Das Gefäß wurde in einen Thermostaten von 30° und am zweiten Tage in einen solchen von 40° gestellt.

Es ergab sich folgender Temperaturanstieg:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Thermostaten- temperatur ° C
1. Tag . . . . .	29	29
2. „ . . . . .	54—57	30 bzw. 40
3. „ . . . . .	57	41

Die Temperatur ging im Laufe des dritten Tages auf 52,5° herunter; der Versuch wurde daraufhin abgebrochen. Die Brotkrümel sind überall durchwachsen und etwas verfestigt, aber doch so, daß die Masse wieder leicht krümelig auseinanderfällt. Sie ist von feinem, weißlichem Schimmel durchsetzt. Die Sporenbildung ist wenig auffällig, hier und da zeigen sich auf der Oberfläche kleine grünliche Anflüge.

Das Aussehen des Brotes ist im ganzen wenig auffällig verändert.

Mikroskopisch finden sich keine Bakterien und keine Pilze.

*Aspergillus fumigatus* erwärmte also in Reinkultur sein Substrat auf 54 bzw. auf 57°.

Seine Mycelien widerstanden noch einer vierstündigen Erhitzung bei 60°.

#### e) *Mucor corymbifer*.

Diese Mucorinee bildet mit ihrem kurzen pelzartigen braunen Rasen ein häufiges Vorkommen auf heißem Heu. Er wächst bei Zimmertemperatur nur sehr langsam, stark dagegen bei höheren Temperaturen, z. B. 40°, doch hört er bei etwa 50° auf, zu wachsen.

100 g angefeuchtetes Brot wurde in Deckelschalen im Autoklaven sterilisiert und mit den trockenen Sporen des Pilzes geimpft. Nachdem sich nach 2 Tagen ein kräftiger Flaum bei einer Thermostaten-temperatur von 44° entwickelt hatte, wurde das Brot im Dampfkasten gut durchgemischt und in ein steriles Dewarsches Gefäß gefüllt, mit sterilem Thermometer versehen und mit Watte abgeschlossen. Es wurde dann in einen Thermostaten von 30° gestellt.

Die Erwärmung des Gefäßes war folgende:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Thermostaten- temperatur ° C
1. Tag . . . . .	28—39	31
2. " . . . . .	45—50	32
3. " . . . . .	49—50	22—21
4. " . . . . .	<b>56,5</b>	40
5. " . . . . .	51,75	40

Am dritten Tage war der Thermostat unbrauchbar. Da auch die übrigen thermophilen Pilze bei 40° Thermostatentemperatur beobachtet wurden, ist am vierten Tage auch bei diesem Versuch die Temperatur der umgebenden Luft auf 40° erhöht worden. Die Gefäßtemperatur ging auf 56,5° hoch, um dann schnell zu sinken.

Makroskopisch war an der freien Oberfläche ein Anflug von Sporangien zu sehen, an der Zylinderfläche sowie im Thermometerkanal ein zarter Flaum von Schimmel.

Mikroskopisch waren weder Bakterien noch andere Pilze zu finden.

Das vegetative Mycel dieses Pilzes übersteht, allerdings mit deutlicher Schädigung, eine vierstündige Einwirkung von 60°.

f) *Thermoidium sulfureum*.

Der von mir früher gefundene und beschriebene Pilz, ein Fungus imperfectus, tritt zuweilen auf selbsterwärmten Pflanzenmassen bei etwa 40° auf. Sein Minimum ist 25°, bei 53° wächst er noch schwach, er zählt also zu den echten Thermophilen. Durch sein schwefelgelbes Aussehen ist er leicht von anderen Pilzen zu unterscheiden.

Die auf Heudekokt-Agarröhrchen herangezogene Reinkultur wurde samt der Agarschicht mit dem Brot innig vermengt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Versuchen wurde das geimpfte Brot nicht erst im Thermostaten bis zum Anwachsen der Pilze gehalten, sondern kam gleich in das sterile Dewarsche Gefäß. Dieses wurde dann in einen Thermostaten von 35° gestellt.

Die Temperatursteigerung war folgende:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Thermostaten- temperatur ° C
1. Tag . . . . .	15—21	35
2. " . . . . .	30	35
3. " . . . . .	42—50,5	34
4. " . . . . .	55— <b>58</b>	35
5. " . . . . .	58	36
6. " . . . . .	56	35

Nach Abschluß des Versuchs fand sich im oberen Teil weißliches Mycel und stellenweise gelbe Flecken. Das Brot war zusammenhängend und gleichmäßig durchfeuchtet, die oberste Schicht etwas trocken und krümelig. Hier sowie an den Seiten war das Pilzwachstum mit bloßem Auge zu sehen, im übrigen war das Brot wenig verändert.

Der mikroskopische Befund ergab keine Bakterien und keine fremden Pilze.

Der Pilz erhitzte also sein Substrat bis 58°. Junge Mycelien von *Thermoidium sulfureum* werden durch vierstündigen Aufenthalt bei 60° getötet, überstehen aber noch eine entsprechende Einwirkung von 55°.

g) *Thermophiles Penicillium*.

Der ausgeprägt thermophile *Thermoascus aurantiacus*, ein Ascomycet, der von mir (1907, S. 70) seinerzeit aus Heu isoliert und beschrieben wurde, konnte nicht untersucht werden, da die Kulturen eingegangen waren. Bei seinen Versuchen, ihn erneut aufzufinden, isolierte Dr. *Maekkel* einen ähnlich aussehenden Pilz, der in seinem Verhältnis zur Temperatur dem *Thermoascus* sehr nahe stand. Er wuchs etwa zwischen 35 und 60°. Bei näherer Untersuchung erwies er sich als *Penicillium* mit rudimentärer Konidien-, dafür aber um so reichlicherer Bildung von Perithezien. Diese sind rund und orange-gelb und bedecken den Agar mit einer feinen, mehligigen, gelben Schicht. Eine nähere Bearbeitung steht noch aus.

100 g Brot, in der üblichen Weise im Autoklaven sterilisiert, wurde nach dem Erkalten mit trockenen Ascussporen des thermophilen *Penicillium* geimpft und sogleich in das *Dewarsche* Gefäß gefüllt. Die Sporen keimten bei diesem Versuch direkt in dem *Dewarschen* Gefäß, im Gegensatz zu anderen Versuchen, bei welchen die Keimung der Sporen und die erste Mycelentwicklung in den Kristallisierschalen erfolgte. Das Gefäß wurde in einen Thermostaten von 35° gebracht und zeigte folgenden Temperaturanstieg:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Thermostaten- temperatur ° C
1. Tag . . . . .	25	35
2. " . . . . .	34—45	35
3. " . . . . .	37	36
4. " . . . . .	57	35,5
5. " . . . . .	61	35
6. " . . . . .	61	34
7. und 8. Tag . . . . .	60,5	34
9. Tag . . . . .	59	35

Der Versuch blieb noch einige Tage im Thermostaten von 35°; die Temperatur des Gefäßes pendelte zwischen 59 und 61°, um dann auf 58° zu sinken.

Beim Auspacken zeigte sich das übliche Bild: Kurzer, weißer Schimmel auf der oberen Fläche des Brotes, durchsetzt mit gelben Flecken, den Peritheciën des Pilzes. Im Inneren der Brotmasse war wenig Mycel und keine Peritheciënbildung zu finden.

Mikroskopisch zeigten sich weder Bakterien noch fremde Pilze.

Der Temperaturanstieg erfolgte ziemlich langsam, wohl deshalb, weil sich die Mycelien erst aus den Sporen entwickeln mußten. Auffallend ist, daß die hohen Temperaturen des Pilzes sich mehrere Tage mit geringen Schwankungen hielten.

Ein zweiter Versuch, bei dem der Thermostat zu starke Schwankungen zeigte, mußte, obwohl diese nur vorübergehend waren, verworfen werden.

Erreicht wurde also die Temperatur von 61°.

Bei Prüfung der Lebensfähigkeit der jungen Mycelien bei hohen Temperaturen ergab sich, daß diese noch einer vierstündigen Einwirkung von 65° widerstehen.

#### *h) Actinomyces thermophilus.*

Ich gewann früher *Actinomyces*-Kulturen aus selbsterhitztem Heu oder aus frischem erhitzten Grase, in welchen Substraten der Strahlenpilz zu den auffälligsten Bestandteilen der Mikroflora gehört.

Bei den Versuchen mit Sonnenblumenfrüchten zeigte sich öfters ein mehr oder minder starker Befall der Fruchtschalen mit dem Strahlenpilz. Die Früchte waren mit rundlichen, weiß gefärbten Flecken von verschiedener Größe bedeckt, die wie Kalkspritzer aussahen. Auch aus Erde, Schlamm, Torf, Mist, den Exkrementen von Kaninchen, Meerschweinchen usw. lassen sich *Actinomyces*spilze mit thermophilen Eigenschaften isolieren.

So weitverbreitet die thermophilen Strahlenpilze sind, so zeigen sie in Kulturen doch gewisse Schwierigkeiten. Impfungen von *Actinomyces* auf Heu, das vorher im Autoklaven sterilisiert wurde, schlugen fehl. Es zeigte sich, daß autoklaviertes Heu stark sauer reagierte. Im Gegensatz zu den meisten Schimmelpilzen verträgt aber der *Actinomyces* nur einen äußerst geringen Säuregrad (*Lieske* 1921, S. 123). Wurde das Heu mit kohlenurem Calcium eingestäubt, die Säurewirkung also aufgehoben, so wuchsen die Strahlenpilze ausgezeichnet. Die Methode war folgende: Trocken es Heu wurde mit feiner Schlammkreide angestäubt, mit Wasser angefeuchtet und, damit die Feuchtigkeit sich gleichmäßig verteilen konnte, zunächst in einem geschlossenen Blechgefäß mehrere Stunden belassen. Hierauf wurde es im Autoklaven sterilisiert.

Heu, das im Erlenmeyerkölbchen nach dieser Methode behandelt und mit einer Reinkultur von *Actinomyces* beimpft wurde, war bereits nach 24stündigem Aufenthalt im Thermostaten von 45° ganz weiß überpudert von den Sporenhäufchen. Das Heu trocknet in dem Erlenmeyerkölbchen bald aus; die Sporen des *Actinomyces* bleiben aber keimfähig, da sie gegen das Austrocknen äußerst widerstandsfähig sind. Solch ein Heuhälmlchen, mit der ausgeglühten Pinzette aus dem Erlenmeyerkolben genommen, eignet sich sehr bequem zum Weiterimpfen, da die trockenen Sporen äußerst leicht abstäuben. Diese Methode der Impfung hat noch den Vorteil, daß immer Sporenmateriale zur Weiterimpfung vorhanden ist. Denn eine andere Kultureigentümlichkeit von *Actinomyces* ist seine Änderung der Fähigkeit der Sporenbildung. Es ist bekannt, daß auf Agar, besonders auf sehr nährstoffreichem, die Sporenbildung stark zurückgeht, so daß die Beläge aus gelblichen, halbkugeligen Massen bestehen. Auf Heu bildet er aber immer seine charakteristischen Sporen. Auf Brotkrümeln, die im Autoklaven sterilisiert wurden, wuchs der *Actinomyces* ausgezeichnet. Sein dünnes, feinfädiges Mycel ist mit bloßem Auge im Brot überhaupt nicht sichtbar; die wenigen weißen Stellen sind seine Sporenhäufchen.

Heu wie auch Brot, auf denen *Actinomyces* wächst, verbreiten einen mehr oder minder charakteristischen Geruch nach frischer Erde.

#### Versuche mit Heu.

Nachdem das Heu mit Schlämmkreide überstreut und gut angefeuchtet, einige Stunden im geschlossenen Blechgefäß gestanden hatte, wurde es in einen Leinenbeutel gefüllt und fest gepackt. Hierauf wurde es  $\frac{3}{4}$  Stunden bei 1 Atm. sterilisiert und nach geringer Abkühlung im Thermostaten bei 40° 6 Stunden lang stehengelassen, um den etwa noch vorhandenen *Calfactor*-sporen Gelegenheit zum Keimen zu geben. Hierauf kam der Beutel noch einmal  $\frac{3}{4}$  Stunden bei 1 Atm. in den Autoklaven zur Erhitzung und am folgenden Tage noch ein drittes Mal. Das Heu wurde dann mit einer Sporenaufschwemmung von *Actinomyces* mittels einer Injektionsspritze an verschiedenen Stellen des Sackes beimpft, der Sack mit einem Maximumthermometer versehen und in das *Dewarsche* Gefäß geschoben, das oben mit mehreren Lagen Watte abgeschlossen wurde.

Die Temperatur machte folgenden Anstieg:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Thermostaten- temperatur ° C
1. Tag . . . . .	30	49
4. " . . . . .	61,5—62	51
5. " . . . . .	63	50

Als der Versuch abgebrochen wurde, war das Heu in der charakteristischen Weise von weißlichen Flecken des *Actinomyces* durchsetzt.

Leider zeigte sich aber auch im unteren Teile eine Infektion mit *Bac. calfactor*. Es mußte also zweifelhaft bleiben, ob das Maximum von 63° allein durch den Strahlenpilz bewirkt worden war.

Nun wurde ein absichtlicher Kombinationsversuch von *Actinomyces* mit *Bac. calfactor* angestellt.

Zwei Portionen Heu wurden mit Kreide vermischt und im Autoklaven sterilisiert, und zwar:

1. feuchter in drei Deckelschalen,
2. weniger feucht in einem höheren, mit Deckel überdeckten Zylinder.

Die drei Deckelschalen wurden mit einer Reinkultur von *Actinomyces* beimpft und bei 40° im Thermostaten gehalten; der Pilz war am anderen Tage stark auf der Heuoberfläche gewachsen.

Nun wurde das Heu im Zylindergefäß mit einer starken Aufschwemmung von frischen, sporenhaltigen Reinkulturen von *Bac. calfactor* übergossen. Die Flüssigkeit sickerte allmählich durch die Heumasse hindurch. Das Dewarsche Gefäß war vorher mit Sublimat sterilisiert worden, schließlich wurde es mit sterilem Wasser ausgespült. Dann wurde abwechselnd von beiden Heumassen im Dampfkasten das Gefäß gefüllt, mit sterilem Maximumthermometer versehen und mit steriler Watte oben abgeschlossen.

Der Temperaturverlauf war folgender:

Zeit	Gefäßtemperatur °C	Thermostaten- temperatur °C
1. Tag . . . . .	—	40
2. „ . . . . .	52	40
3. „ . . . . .	57,5	39
4. „ . . . . .	54	40

Am zweiten Tage war starker Geruch nach *Actinomyces* wahrnehmbar. Nachdem der Versuch abgebrochen war, wurden mit Lupe und Mikroskop keine fremden Schimmelpilze gefunden. Der sporenbildende Calfactor war sehr gut entwickelt, dagegen war der Strahlenpilz weniger gleichmäßig verteilt.

#### Versuche mit Brot.

100 g gut angefeuchtetes Brot wurde im Autoklaven in einer Doppelschale eine Stunde bei  $\frac{3}{4}$  Atm. sterilisiert und nach Erkalten auf der Oberfläche mit einer Reinkultur von *Actinomyces* geimpft. Das Impfmateriale war bereits auf Brot in sterilem Erlenmeyerkolben herangezogen und wurde auf der Oberfläche der Versuchsmasse verteilt. Die Schalen blieben im Thermostaten von 42° 2 Tage lang. Dann wurde die Brotmasse im Dampfkasten gut durchgemischt und außerdem mit etlichen Heuhalmensehen versehen, die von einer Reinkultur von *Actinomyces* auf Heu (mit Kreide) entnommen waren. Alsdann wurde das Brot in ein steriles Dewarsches Gefäß gepackt, mit sterilem Thermometer versehen, mit steriler Watte verschlossen und in einen Thermostaten von 40° gestellt.

Die Gefäßtemperatur stieg von 28° innerhalb eines Tages auf 60°, um dann am nächsten Tage auf 51° zu sinken. Der Versuch wurde dann abgebrochen. Es machte einen merkwürdigen Eindruck, daß das Brot in seinem Aussehen unverändert war. Es ist nicht zusammengeballt, sondern krümelig wie beim Einfüllen in das Gefäß und zeigt wegen der außerordentlichen Dünnfädigkeit des Mycels keine schimmeligen Stellen. Weiße Sporenflecken sind kaum sichtbar, nur an der Oberfläche zu sehen. Auffallend ist ein starker süßlicher Geruch.

Mikroskopisch fanden sich keine Bakterien; hier und da waren die sehr dünnen Fäden des Strahlenpilzes erkennbar.

Ein zweiter Versuch wurde in ganz ähnlicher Weise in einem vorher angewärmten Gefäß angesetzt und in den Thermostaten gestellt. Die folgende Tabelle zeigt den Verlauf der Wärmeentwicklung.

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Thermostaten- temperatur ° C
1. bis 9. Stunde . . .	35—50	42 —46,5
10. " 22. " . . .	50—60	46,5—45
23. " 38. " . . .	60—63	45 —50,5

Eine weitere Steigerung erfolgte nicht.

Schließlich ergab ein letzter Versuch wieder eine Höchsterhitzung von 63°.

*Actinomyces* vermochte also in Reinkultur die Temperatur seines Substrats auf 60, 63, 63° zu steigern. Eine Prüfung junger Mycelien ergab, daß sie nach vierstündigem Verweilen bei 65° abgestorben waren, dagegen eine entsprechend lange Erhitzung bei 60° überstanden hatten.

i) *Thermomyces lanuginosus*.

Dieser ausgeprägt thermophile Fungus imperfectus mit großen Einzelkonidien ist immer in heißem Heu zu finden. Seine Selbst-erhitzungsfähigkeit wurde in Heu und in Brotkrümeln untersucht.

Feingeschnittenes Rasenheu wurde mit Schlämmkreide bestäubt, mit Wasser reichlich angefeuchtet und einige Stunden in einem geschlossenen Blechkasten liegengelassen, damit die Feuchtigkeit gleichmäßig in das Heu einziehen konnte; hierauf wurde die Heumasse so fest, wie es mit der Hand möglich war, in einen Leinensack gepackt und im Autoklaven eine Stunde bei 1 Atm. erhitzt. Der Sack wurde vorher in doppeltes Fließpapier eingewickelt, damit beim Herausnehmen aus dem Autoklaven der Leinenbeutel nicht infiziert werden konnte. Nach dem Erkalten wurde der Sack in den Dampfraum gebracht, das Papier entfernt und eine Aufschwemmung von *Thermomyces*sporen in sterilem Wasser mittels steriler Spritze injiziert. Im ganzen wurden etwa 40 ccm Flüssigkeit an verschiedenen Stellen durch die Sackwand in das Heu eingespritzt und der Sack dann in ein Dewarsches Gefäß geschoben. Daß Gefäß wurde zuvor mit Sublimat einige Tage stehen-

gelassen und kurz vor seiner Verwendung mit sterilem Wasser einige Male ausgespült. Nachdem noch ein mit Sublimatlösung desinfiziertes und mit sterilem Wasser abgespültes Thermometer in die Mitte des Heuzylinders eingeführt und der obere Teil mit steriler Watte abgeschlossen wurde, kam das Gefäß in einen Thermostaten von 40°.

Das Gefäß zeigte folgende Temperatursteigerung:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Maximaltemperatur des Thermostaten ° C
1. Tag . . . . .	28	40
2. " . . . . .	36,5	40
3. " . . . . .	56	40
5. " . . . . .	65	43
7. " . . . . .	68	51
8. " . . . . .	59	42

Die Thermostatentemperatur wurde zeitweilig absichtlich erhöht. Nachdem die für die Sporenkeimung günstige Temperatur von 35° erreicht war, stieg sie rasch bis 68°, um dann ebenso rasch zu sinken. Beim Auspacken des Heues war eine starke Verschimmelung nur an der Oberfläche sichtbar, wo reichlich die grau-grünlichen Sporen zu sehen waren. Das obere Drittel des Heuzylinders war ziemlich trocken. Der untere Teil des Heues war noch gut feucht, eine wenig auffällige Verschimmelung war nur in den Hohlräumen zu sehen.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß neben Sporen und sehr charakteristischen Hyphenbruchstücken von *Thermomyces* auch massenhaft sporenbildende Stäbchen von *Bac. calfactor* vorhanden waren.

Ein zweiter Versuch mit *Thermomyces* auf Heu wurde insofern anders vorbereitet, als das Heu fraktioniert im Autoklaven erhitzt wurde.

Der Heubutel wurde zunächst eine Stunde bei 1 Atm. gehalten, dann etwas erkalten gelassen und hierauf 5 Stunden in einen Thermostaten von 40° gebracht. Diese Zeit wurde gewählt, weil ich früher fand, daß die Sporen von *Bac. calfactor* bei 50° schon nach 6 Stunden ausgekeimt sind. Nach dieser Zeit kam das Heu abermals in den Autoklaven eine Stunde bei 1 Atm. und blieb dort, bis es vollkommen erkaltet war. Die Impfung erfolgte wieder mittels der *Pravazschen* Spritze. Der Heusack kam in das *Dewarsche* Gefäß, das vorher längere Zeit mit Sublimat gefüllt gewesen war und vor der Verwendung mit sterilem Wasser ausgespült wurde.

Die Temperatur stieg während eines Tages von 26 auf 40°, um dann schnell auf 62° und dann in weiteren 3 Tagen auf 68,1° emporzustiegen. Die Thermostatentemperatur betrug 46 bis 52°.

Beim Auspacken zeigte sich das Heu stark verfärbt; auf seiner Ober- und Außenfläche, sowie in Hohlräumen und auf Blättern war makroskopisch Sporenbildung zu konstatieren. Das Heu hatte einen



Geruch nach Ammoniak. Mikroskopisch fanden sich zahlreiche Bruchstücke von Pilzmycel und wieder eine starke Infektion von Bakterien, die diesmal weniger Sporen gebildet hatten als im vorigen Versuch.

Ein dritter Versuch mit Heu wurde folgendermaßen abgeändert:

Nachdem das Heu mit trockenem Kreidepulver angestäubt und angefeuchtet war, kam es in den Beutel, in dessen Mitte gleich ein Glasrohr, das oben und unten mit Watte abgeschlossen war, eingepackt wurde. Dieses Glasrohr diente zur Aufnahme des Thermometers. Auf diese Weise sollte vermieden werden, daß Thermometer und Heu in direktem Kontakt waren, da möglicherweise eine Infektion vom Thermometer herrühren konnte, das mittels Hitze nicht sterilisierbar war. Auf die obere Heuschicht im Beutel kam eine Lage Watte, durch diese ragte die Glasröhre etwa 3 cm aus dem Beutel heraus, der dann zugebunden und in eine doppelte Lage Fließpapier eingehüllt wurde. Das ganze wurde dann im Autoklaven eine Stunde bei 2 Atm. gehalten, kam dann — nachdem es etwas abgekühlt war — 5 Stunden in den Thermostaten von 45° und hierauf wieder in den Autoklaven, und zwar eine Stunde bei 1 Atm. Das Heu erkaltete dann im Autoklaven und wurde ein drittes Mal erhitzt; auch alle verwendeten Gefäße sowie die Spritze wurden im Autoklaven sterilisiert. Das *Dewarsche* Gefäß wurde 2 Tage mit heißer Sublimatlösung bei 50° im Thermostaten gehalten und dann an drei folgenden Tagen im Dampftopf bei 100° je eine Stunde sterilisiert.

Der Heubeutel wurde zum Zwecke der Impfung in eine vorher sterilisierte Glasschale gestellt und nun mittels steriler Watte festgehalten; ein Berühren mit den bloßen Händen unterblieb. Durch Drehen der Glasschale wurde er auf allen Seiten für die Sporeninjektion zugänglich gemacht.

Das Thermometer, das vorher mehrere Tage in Sublimat war, wurde, ohne abgespült zu werden, direkt in die Glasröhre geschoben, nachdem der obere Wattedropfen mittels ausgeglühter Pinzette entfernt war. Der untere Wattedropfen saugte die abtropfende Sublimatlösung auf. Hierauf wurde der Heubeutel in das *Dewarsche* Gefäß geschoben, dies mit steriler Watte abgeschlossen und in einen Thermostaten von 50° C gebracht. Das Thermometer im Heu zeigte zu Beginn 28°.

Die Temperatursteigerung erfolgte innerhalb 2 Tage auf 54°, dann auf 58° und erhöhte sich auf 65,5° innerhalb 3 Tagen. Die Thermostatentemperatur betrug 51 bis 52°.

Der Versuch wurde dann abgebrochen, da sich der Temperaturanstieg ähnlich den beiden anderen Versuchen verhielt und wieder eine Infektion vermutet wurde. In der Tat wurde wieder das sporenbildende Bakterium gefunden.

Makroskopisch war das Heu sehr stark verfärbt und auch sehr feucht; insbesondere war es im unteren Drittel des Beutels fast schwarz und schmierig, wohl eine Folge der allzu heftigen Autoklavenbehandlung. Oben waren Pilze deutlich zu sehen, ebenso waren in dem Kanal auf der Glasröhre Verschimmelung und teilweise Sporenbildung zu beobachten.

Die mikroskopische Durchsichtung ergab, daß von Pilzen nur *Thermomyces* vorhanden und keine andere Pilzinfektion beteiligt war.

Es war also nicht möglich, Heu zu sterilisieren. Die Temperatursteigerung war demnach die Folge der vereinigten Wirkung von *Thermomyces* und *Bac. calfactor*. Es wurde nicht übersehen, daß in einer feuchten Heumasse, die fest in einen Beutel zusammengepackt ist, die Hitze erst allmählich in das Innere eindringt. Im Dampfsterilisator von 100° wurde z. B. mit dem Maximumthermometer wiederholt gefunden, daß es bis  $\frac{3}{4}$  Stunden dauerte, ehe in der Mitte des Heues die Außendampftemperatur von 100° erreicht wurde. Dabei war die Zeit verschieden, je nach der Größe und namentlich nach der Dichte der Packung des Heuballens. Es wäre daher günstiger, das Heu in lockerem Zustande zu sterilisieren; allein das nachfolgende Zusammen-drücken und Einfüllen des Heues in den Beutel konnte ohne nach-trägliche Infektion nicht durchgeführt werden, da ein Berühren des Heues mit den Händen nach dem Sterilisieren auf alle Fälle unter-bleiben mußte.

Nunmehr wurden Versuche mit Brot ausgeführt.

Das angefeuchtete Brot wurde in Doppelschalen, die schon mit Heißluft keimfrei gemacht waren, gebracht und im Autoklaven sterilisiert. Im Dampfraum wurden nun die Schalen mit *Thermomyces*sporen beimpft, die einfach von einer Agarfläche abgekratzt und auf der Oberfläche des Brotes verteilt wurden. Die Doppelschale wurde dann in einen Thermostaten von 43° gestellt, bis sich nach 2 Tagen dann schimmelartiger Überzug des Pilzes zeigte.

Nun wurde das Brot im Dampfraum gut vermischt, noch mit etwas sterilem Wasser versetzt und dann mit sterilisiertem, abgeflammtem Löffel in das Dewarsche Gefäß gefüllt. Das Gefäß wurde vorher ebenfalls im Dampftopf sterilisiert. In die Mitte der Brotmasse wurde das Thermometer eingeführt, das vorher in Sublimat aufbewahrt worden war und dann mit sterilem Wasser abgespült wurde. Der obere Abschluß bestand aus mehreren Lagen steriler Watte, durch die das Thermometer herausragte. Das Gefäß kam dann in einen Thermostaten von 38 bis 40°.

Der Temperaturverlauf war folgender:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Maximaltemperatur des Thermostaten ° C
1. Tag . . . . .	22	38
3. " . . . . .	35	40
4. " . . . . .	51—56,5	40
5. " . . . . .	61— <del>62,25</del>	40
6. " . . . . .	58,75	40

Nach dem Entleeren des Gefäßes zeigte sich auf der Brotoberfläche weißliche Schimmelbildung. Die Mycelien waren in das Innere gewachsen und hielten die einzelnen Brotklümpchen zusammen, waren aber nicht ohne weiteres sichtbar.

Mikroskopisch fanden sich keine Bakterien; Pilzmycel nur *Thermomyces*, keine fremden Schimmelpilze.

Ein zweiter Versuch mit *Thermomyces* auf Brot wurde in ähnlicher Weise wie der vorige vorbereitet, nur wurde statt des kleinen *Dewarschen* Gefäßes von 500 ccm Inhalt ein größeres von 2000 ccm Inhalt verwendet.

Das angefeuchtete Brot wurde im Autoklaven sterilisiert und nachher, da es etwas verhärtet war, mit sterilem Löffel so gut es ging zerkleinert und nochmals befeuchtet. Nachdem der Pilz gut auf dem Brot angewachsen war, wurde es nach 2 Tagen in das *Dewarsche* Gefäß gefüllt und wie beim vorigen Versuch verfahren. Das Gefäß stand bei 50° im Thermostaten.

Die Temperatur stieg folgendermaßen:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Maximaltemperatur des Thermostaten ° C
1. Tag . . . . .	27	50
2. " . . . . .	60	49
3. " . . . . .	61	49
4. " . . . . .	61	49
5. " . . . . .	59	49

Nach der Unterbrechung des Versuchs war das Brot gut durchfeuchtet, die Klumpen hatten das Wasser aufgenommen und waren mürbe und weich geworden.

Es hatte wieder den Anschein, als ob das Brot feuchter geworden wäre, als es zu Beginn der Zusammenschichtung war. Pilzwachstum war deutlich am äußeren Rande, an der Oberfläche des Zylinders und zwischen den größeren Brotklumpen zu sehen. Sporenbildung war an der Oberfläche nur geringfügig.

Mikroskopisch konnten keine Bakterien gefunden werden, auch keine anderen Pilze. Der Versuch ist also rein geblieben.

Es wurde noch ein dritter Versuch in dem 2000-ccm-Gefäß mit krümeligem Brot angesetzt. Die Durchführung dieses Versuchs war dem vorigen ganz gleich, nur war das Brot dadurch in lockerem Zustande geblieben, daß die Brotmasse auf mehrere Doppelschalen verteilt wurde, die sich von vornherein leichter durchfeuchteten als die größere Menge Brot in einer Schale.

Der Temperaturverlauf war:

Zeit	Gefäßtemperatur ° C	Maximaltemperatur des Thermostaten ° C
1. Tag . . . . .	28	50
2. " . . . . .	61	50
3. " . . . . .	61	50
4. " . . . . .	62,5	50
5. " . . . . .	60	49,5

In allen Fällen hatte das Brot einen angenehmen Geruch, war nicht verklebt, wohl aber blieb der Brotzylinder zusammenhaftend, gehalten durch die ihn durchziehenden vereinzelt Pilzhyphen, die dem unbewaffneten Auge nicht ohne weiteres sichtbar waren. Es war überhaupt merkwürdig, daß das Pilzwachstum nicht sehr auffällig war. Abgesehen von dem oberen Drittel des Brotes, auf dem auch Sporenbildung auftrat, und der Außenfläche des Brotzylinders, abgesehen ferner von kleineren Hohlräumen und dem Kanal des Thermometers, war von einer Mycelbildung wenig zu sehen. Die Feuchtigkeit war im unteren Drittel des Brotes am größten, die höchste Wärme wurde meist in der Mitte der Brotsäule gefunden und nahm nach oben hin ab, soweit das mit einem Normalthermometer gemessen werden konnte.

Es wurden also von *Thermomyces* durch Selbsterhitzung maximale Temperaturen von 61, 62,25 und 62,5<sup>0</sup> erzielt. Wenn mithin in dem Heu 68, 68,1 und 65<sup>0</sup> erreicht wurden, so kann dies Mehr an Wärmebildung nur auf die Wirkung des *Bac. calfactor* zurückgeführt werden, sofern man nicht außerdem etwa eine bessere Eignung des Heues gegenüber dem Brot annehmen will.

Sehr bemerkenswert ist, daß in dem kleinen Gefäß mit 100 g Brot eine ebenso hohe Temperatur erzielbar war als in dem großen mit der vierfachen Menge.

Werden junge Mycelien des *Thermomyces lanuginosus* 4 Stunden bei 65<sup>0</sup> gehalten, so sterben sie ab; sie überleben aber eine vierstündige Erhitzung auf 60<sup>0</sup> noch gut.

#### k) *Bacillus calfactor*.

Der ausgeprägt thermophile *Bacillus* wurde von mir seinerzeit aus erhitztem Heu isoliert, genau beschrieben und auf seine Wärmeansprüche untersucht. Auch sind von mir bereits einige Versuche über seine Erhitzungsfähigkeit (1907, S. 38) angestellt worden, darunter einer mit Reinkultur, doch waren sie methodisch noch unvollkommen. Der *Bacillus* wächst nicht unter 30<sup>0</sup> und hat ein Maximum, das über 70<sup>0</sup> liegt. Seine Sporen sind ganz ungewöhnlich resistent, daher als Infektoren besonders zu fürchten. Es stellte sich dann auch heraus (vgl. S. 103), daß Heu überhaupt nicht mit Sicherheit sterilisiert werden kann, weshalb es als Kultursubstrat für die übrigen Organismen ausscheiden mußte. Da *Bac. calfactor* andererseits leider nicht auf dem Brot wächst, sind die Versuche mit ihm schlecht vergleichbar. Dazu kommt, daß auch für ihn das Heu durch die intensive Sterilisierung als Nährboden verschlechtert wird. Deshalb wurde mit Kreide versetztes genommen. Daß es nicht *calfactor*-steril war, hatte naturgemäß für die Impfversuche mit dem gleichen Keim keine Bedeutung.

Das Heu wurde in der üblichen Weise mit Schlämmkreide durchstäubt, fest in einen Leinensack gepackt und eine halbe Stunde bei 1 Atm. Überdruck „sterilisiert“. Dann wurden in die Masse im Dampfkasten 40 ccm einer wässrigen Aufschwemmung von Sporen an verschiedenen Stellen injiziert. Die Bakterienaufschwemmung wurde gewonnen, indem zwei stark bewachsene Agarröhrchen mit sterilem Wasser abgespült wurden. Der geimpfte Heusack wurde dann in das *Dewarsche* Gefäß geschoben und nach Einführung des Thermometers und Watteverschluß in den Thermostaten von 40° gestellt.

Der Verlauf der Temperatur ergab:

Zeit	Gefäßtemperatur °C	Maximaltemperatur des Thermostaten °C
1. Tag . . . . .	32	39
2. „ . . . . .	45—47	39,5
3. „ . . . . .	50	40
4. „ . . . . .	51	40

Da die Temperatur auf 51° stehen blieb, wurde der Versuch abgebrochen.

Das Heu zeigte makroskopisch weder Pilzfäden noch Flecke von *Actinomyces*, mikroskopisch ausschließlich massenhaft Bakterien und Sporen.

Es wurde ein weiterer Versuch mit sterilem Heu und Kreide genau in derselben Weise wie der vorige angestellt. Das *Dewarsche* Gefäß wurde aber gleich in einen Thermostaten von 50° gebracht und diese Temperatur auf 62° erhöht. Hier zeigte sich:

Zeit	Gefäßtemperatur °C	Maximaltemperatur des Thermostaten °C
1. Tag . . . . .	—	50
2. „ . . . . .	50—53,5	54—62
3. „ . . . . .	67,5	62—63,5
4. „ . . . . .	67,75	62
5. „ . . . . .	67,75	62

Diese Temperatur blieb noch weiter bestehen und sank erst langsam auf 50°. Beim Öffnen des Sackes fand sich in den allerobersten Schichten, die trockener und natürlich auch kühler sind, in schwacher Entwicklung *Actinomyces*. Von da ab nach unten war nur *Bac. calfactor* zu sehen. Andere Pilze fehlten.

Schließlich wurde ein Versuch mit kurzgeschnittenem Heu ohne Kreidezusatz und ohne *Sterilisation* angestellt. Das befeuchtete Heu wurde fest in einen Leinensack gepackt und das *Dewarsche* Gefäß sofort in einen Thermostaten von 60° gebracht. Die ersten 24 Stunden wurden keine Ablesungen gemacht, da das Heu erst die Thermostaten-

temperatur erreichen mußte. Nach dieser Zeit verlief der Temperaturanstieg wie folgt:

Zeit	Gefäßtemperatur °C	Thermostaten- temperatur °C
1. Tag . . . . .	55,5	58
2. " . . . . .	62 — 69	60—62
3. " . . . . .	69,5—70	60—62
4. " . . . . .	74 — 70	62—63,5
5. " . . . . .	71	61

Die Temperatur hielt sich noch einige Zeit auf 71°. Beim Auspacken machte sich starker Geruch nach Ammoniak bemerkbar, mit Salzsäure entstand ein weißer Nebel. In der obersten Schicht des Heus, die ziemlich trocken war, sind die weißen Flecke des *Actinomyces* auf den Heuhalmern zu sehen. Auch außen auf dem Sacke waren Spuren des Strahlenpilzes zu finden. Die ganz überwiegende Masse des Heus zeigte aber weder *Actinomyces* noch irgendwelche andere Pilze. Das Heu war gleichmäßig feucht, dunkel verfärbt, äußerlich war keine Veränderung zu bemerken.

Bei der mikroskopischen Untersuchung einer Heuaufschwemmung war nur die übliche Masse von Stäbchen des *Bac. calfactor* zu sehen, aber verhältnismäßig wenig Sporen.

Von diesen drei Versuchen ist nur einer rein. Er zeigte eine Steigerung der Temperatur von 40 bis 51°, ließ also deutliches Erhitzungsvermögen erkennen. Immerhin blieb die Leistung beträchtlich hinter der zurück, die man nach dem hohen Temperaturmaximum des *Bacillus* hätte erwarten können. Dies liegt nämlich über 70°.

Obwohl die übrigen Versuche nicht rein waren, lassen sie sich doch, zusammen mit den unfreiwilligen Kombinationsversuchen, wie sie die mit *Actinomyces* und *Thermomyces* im Heu darstellen, bei vorsichtiger Kritik verwerten. Es geht aus ihnen hervor, daß durch *Bac. calfactor* auch von 60° an noch ansehnliche Steigerung bewirkt werden kann. Namentlich zeigt dies der letzte Versuch mit natürlichem, d. h. mit nicht sterilisiertem Heu. Die Infektion ist an sich geringfügig und auf die oberste Partie beschränkt. Andererseits liegt die erreichte Temperatur von 74° so bedeutend über der thermischen Lebensgrenze des infizierenden *Actinomyces*, daß man wohl sagen kann, daß diese Leistung ganz überwiegend, im letzten Effekt sicher ausschließlich, auf den *Bac. calfactor* zurückgeht. Ähnlich sind der zweite Versuch sowie die Kombinationsversuche (siehe S. 101) zu beurteilen. Die Höchsttemperaturen liegen immer deutlich über denen, die für die betreffende Pilzart in reinen Versuchen (allerdings auf anderem Sub-

strat!) ermittelt wurden, werden also kaum anders als durch die Wirkung der Bakterien zu erklären sein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß *Bac. calfactor* im Intervall von 40 bis 50°, 60 bis 70° und über 70° Erhitzung bewirken kann. Es ist jedoch auffallend, daß die Steigerung meist geringer war, als sie die Pilze hervorrufen können. Das wird zum Teil, wie ein Vergleich mit dem letzten Versuch zeigt, auf die Ungunst des Substrats zurückzuführen sein, könnte aber auch auf einer primär geringeren Wärme-produktion von Bakterien gegenüber Pilzen beruhen, worauf im Schlußabschnitt noch zurückzukommen ist. Obwohl *Bac. calfactor*, wie es scheint, für sich sein Substrat nur um ein Intervall zu erhitzen vermag, das verglichen mit dem von Pilzen geringer ist, ist doch seine Tätigkeit für den Gesamterhitzungsvorgang der thermophilen Flora bedeutungsvoll und führt ihn bis nahe an seine obere thermische Lebensgrenze heran. Diese liegt sicher über 70°.

#### 1) *Bacillus coli forma foenicola*.

In sich selbst erhitzendem Heu oder frischem Gras findet sich bei etwa 30° ein sehr beweglicher Bacillus der Coligruppe, den ich als *Bac. coli forma foenicola* bezeichnet habe. Zu dem Versuch wurde er aus den gleichen Materialien isoliert und auf sein Gärvermögen im Gärkölbchen geprüft.

Die Heumasse wurde mit Kreide vermischt, angefeuchtet, fest in einen Leinensack gepackt und im Autoklaven eine Stunde bei 1 Atm. sterilisiert. Im Heu war eine Glasröhre verpackt, die den Kanal für das aufzunehmende Thermometer offen hielt. Der Heubeutel war außerdem in Fließpapier gewickelt, um ihn auch von außen vor nachträglichen Infektionen zu schützen. Nach dem Erkalten wurden dann im Dampfraum mittels steriler Spritze 40 cem einer Reinkultur von *Bac. coli* an verschiedenen Stellen des Beutels eingeführt. Die Reinkultur war im Heudecoct mit Traubenzucker während 20 Stunden bei 30° herangezüchtet. Der Beutel wurde sodann in ein großes Dewarsches Gefäß, das mit Sublimat sterilisiert und mit sterilem Wasser ausgespült war, geschoben. Die Glasröhre wurde durch ein steriles Maximumthermometer ersetzt, das Gefäß mit mehreren Lagen steriler Watte abgeschlossen und in einen Thermostaten von 30° gebracht.

Die Temperatur stieg innerhalb eines Tages auf 38°; das Gefäß wurde dann bei Zimmertemperatur von 22° aufgestellt, worauf sich im Innern des Gefäßes die Temperatur auf 28° einstellte. Die Prüfung der Heumasse ergab unter dem Mikroskop massenhaft bewegliche *Coli*-bazillen; sporenbildende Stäbchen wurden nicht gefunden, ebenso keine Pilze. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen und nach den Erfahrungen mit anderem sterilisiertem Heu sogar wahrscheinlich, daß *Bac. calfactor* sich noch entwickelt hätte, wenn die Temperatur der Heumasse längere Zeit auf seinem Höchststand von 38° geblieben

wäre oder die Thermostatentemperatur auf über 40° erhöht worden wäre. Man kann aber wohl annehmen, daß die Erhitzung auf 38° ganz vorwiegend durch den *Colibacillus* bewirkt wurde.

Eine Impfung in Brot blieb erfolglos, ebenso wie auch *Bac. mesentericus*-in Brot keine Temperatursteigerung hervorrief.

Wie ich bereits früher feststellte, hat der *Bac. coli* seine obere Temperaturgrenze etwa bei 40°, was wieder bestätigt wurde.

m) Hefe.

Obwohl die Versuche mit Hefe nur lückenhaft sind, zeigten sie doch manches Bemerkenswerte, so daß sie hier in Kürze noch erwähnt werden mögen.

Zerkrümelt man mit Hilfe einer Reibe die käufliche Preßhefe so fein wie möglich und füllt diese Masse locker in ein Dewarsches Gefäß, so setzt augenblicklich eine Erwärmung ein, dergestalt, daß schon unmittelbar nach dem Einfüllen die Temperatur im Gefäß 3,5° höher ist als außen. Sie steigt dann rasch an, wie die Tabelle zeigt, und zwar hauptsächlich in den ersten 2 Stunden, langsamer in der dritten und noch weniger in den beiden folgenden, nach deren Ablauf, d. h. nach insgesamt 5 Stunden, das Maximum von 45,5° erreicht wurde. Nachdem sich dies eine Stunde gehalten hat, beginnt die Temperatur wieder zu sinken.

Nach Verlauf von Std.	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C	Nach Verlauf von Std.	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
—	26	22,5	4	44,5	23
1	33,5	23,5	5	45,5	23
2	40	23	6	45,5	22,5
3	43	23	7	44	23

Eine ähnlich rasch verlaufende und noch höhere Erhitzung erzielt man, wenn man die Hefe mit Brotkrümeln mischt. 100 g trockene Krümel wurden mit 50 ccm einer 6%igen Traubenzuckerlösung durchmischt, in welcher 15 g Preßhefe aufgeschwemmt waren. Wie die Tabelle zeigt, war der anfängliche Temperaturanstieg nicht ganz so kräftig, er war aber auch noch in der dritte und vierten Stunde stark und führte schließlich nach 6 Stunden zum Maximum von 50,5°. Dann erfolgte auch hier sofortiges Absinken.

Nach Verlauf von Std.	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C	Nach Verlauf von Std.	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
—	23,5	22,5	4	46,5	23
1	28,5	23,5	5	49,5	23
2	35	23	6	50,5	22,5
3	41,5	23	7	49,5	23



Da es entsprechend unserem allgemeinen Arbeitsplan wünschenswert war, den Versuch mit einer Reinkultur anzusetzen, wurde folgendermaßen verfahren: In der üblichen Weise wurden 50 ccm einer sterilen 6 %igen Zuckerlösung mit einer kleinen Menge einer Hefenreinkultur geimpft und mit 100 g trockenen sterilen Brotkrümeln in einer Doppelschale gut gemischt und diese dann etliche Stunden bei 30° behufs Vermehrung der Hefe gehalten. Alsdann wurde ein steriles Dewargefäß damit gefüllt. Das Ergebnis war aber ganz anders. Die Temperatur stieg innerhalb 24 Stunden ganz träge auf 30°, hielt sich hier längere Zeit, um dann wieder zu sinken. Bei dem Entfernen des Wattebausches wurde in den Kanal, in welchem sich das Thermometer befand, ein brennender Span eingeführt. Er erlosch bereits am Eingang; das Gefäß war also ohne Sauerstoff.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß eine starke Erhitzung mit Hefe nur erzielbar ist, wenn von vornherein eine sehr große Menge lebender Hefezellen in inniger Durchmischung mit Luft in das Gefäß gebracht wird. Werden jedoch nur verhältnismäßig wenig Hefezellen eingeführt und müssen diese sich erst während des Versuchs vermehren (was natürlich an sich nicht zu solchen Mengen wie 15 g in dem letzten Versuch führt), so wird aller Sauerstoff aufgebraucht, bevor eine große reagierende, d. h. atmende Masse vorhanden ist. Dazu kommt eine starke Produktion von Kohlensäure durch die Gärung, die natürlich parallel läuft und um so stärker wird, je mehr anaerobe Bedingungen sich herstellen. Es ist also gewissermaßen dasselbe, als wenn Hefe unter anaeroben Bedingungen geprüft wird. Sie erzeugt natürlich auch jetzt noch Wärme, doch ist diese Wärmeproduktion sehr gering. *Rubner* (1913) hat sie kalorimetrisch gemessen, es ist aber bei der völlig anderen Anordnung seiner Versuche schwer (*Rubners* Versuche fanden sämtlich in Flüssigkeit und abgeschlossenen Gefäßen statt, d. h. unter ganz oder weitgehend anaeroben Verhältnissen), aus seinen Daten zu schätzen, welche Wärmegrade unter ähnlichen Bedingungen wie in unserem Versuch erzielt worden wären. Es kann aber nur eine geringe Erwärmung sein. Das geht klar aus dem folgenden Versuch hervor, der genau wie der zweite oben angesetzt wurde, jedoch mit dem Unterschied, daß das Gefäß sofort nach dem Füllen luftdicht abgeschlossen und mit einer Quecksilbersperre versehen wurde.

Nach Verlauf von Std.	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C	Nach Verlauf von Std.	Gefäßtemperatur °C	Lufttemperatur °C
—	26,5	24	10	28,5	22
1/2	28	24	20	24	21
1	30	24	22	23,5	21
2	30	23,5	25	23,5	21
8	29	22	44	21,5	21

Die Gasentwicklung verlief nach einer ganz kurzen, sehr stürmischen Anfangsperiode lebhaft und stetig während der ersten 4 Stunden, um dann abzuflauen und nach insgesamt etwa 8 Stunden aufzuhören.

Das Maximum der Temperatur wurde also nach 1 Stunde mit nur 30° erreicht. Da das 500 ccm fassende Gefäß schätzungsweise 60 ccm Sauerstoff enthalten hatte, ist natürlich ein guter Teil dieser Erhitzungsleistung noch auf den aeroben Stoffwechsel zurückzuführen. Die sehr viel geringere Bedeutung des anaeroben für lebhaftere Erhitzungsvorgänge ist deutlich.

Die Hefe verhält sich also als Wärmeproduzent nicht auffällig anders als andere Mikroorganismen. Sie erzeugt nur unter aeroben Bedingungen energisch Wärme und erhitzt sich hier bis gegen ihre eigene Lebensgrenze. Wo diese ungefähr liegt, wurde auf folgende Weise geprüft. Je eine Aufschwemmung von Hefe in Zuckerlösung wurde auf 44, 48 und 50° erhitzt und 2 Stunden bei dieser Temperatur im Thermostaten gehalten. Dann wurden aus denselben Gefäßen Gärproben in sterilen Gärkölbchen angestellt und außerdem auf Malzagar abgeimpft. Gärung erfolgte bei den Proben von 44 und 48° sofort, bei derjenigen von 50° allmählich. Die Impfstriche der 44°- und 48°-Probe gingen lückenlos an. Die Platte mit der 50°-Probe zeigte zwar Lücken, war aber auch noch stark bewachsen. Es geht daraus hervor, daß die Hefezellen bei einer zweistündigen Erhitzung auf 50° zu einem großen Teile noch lebendig bleiben. Die erzielte Maximaltemperatur von 50° ist also ohne weiteres durch die Atmungstätigkeit lebender Hefezellen erklärbar, zumal in dem einen Versuch 50° überhaupt nicht erreicht wurden, im anderen die Temperatur von 49,5 bis 50,5° nur 1 Stunde lang eingewirkt hatte.

Die stärkere Erhitzung im zweiten Versuch ist wohl dadurch zu erklären, daß die Hefe noch viel feiner verteilt war wie im ersten, also das lebende Hefeplasma mit einer wesentlich größeren Fläche an die Luft grenzt als dort, wo hauptsächlich nur die Oberfläche der Preßhefekrümel in Betracht kam. Außerdem ist der geringe Wassergehalt der Preßhefe, der bei dem feinen Zerkrümelungsverfahren noch vermindert wurde, gewiß nicht ohne Bedeutung.

#### IV. Erörterung der Ergebnisse.

Wie in der Theorie der alkoholischen Gärung die Auffassung des Chemikers *Liebig* der des Biologen *Pasteur* gegenüberstand, so hat sich die Frage der Selbsterwärmung pflanzlicher Stoffe auf die Entscheidung zwischen physiologischer und chemischer Ursache zugespitzt. Die Vertreter der letzten Auffassung, wie z. B. *Tschirch*,

*Boekhout* und *de Vries* u. a. ziehen katalytische oder enzymatische Wirkungen heran, welche von der Substanz der selbsterhitzten Masse selber ausgehen, während die Verfechter der biologischen Auffassung die Selbsterhitzung als den Erfolg der Atmung lebenden Plasmas bezeichnen. Jene betrachten die in solchen Massen gefundene Vegetation als nebensächlich oder nur akzessorisch für die Wärmebildung, diese sehen sie als ihre einzige oder ganz überwiegende Ursache an. Meist hat man sich mit indirekten Überlegungen bei der Verteidigung der enzymatischen Theorie begnügt, seltener wenigstens versucht, sie experimentell zu beweisen. Solche Versuche arbeiten mit antiseptischen Mitteln, um die Mikroorganismen zu hemmen. *Boekhout* und *de Vries* benutzen z. B. in ihrer letzten Publikation (1916) eine 2%ige Kupfersulfatlösung, mit der sie Heu tränken, und untersuchen den Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen Temperaturen. Ihre zahlreichen Gasanalysen zeigen ihnen bald höheren, bald geringeren Sauerstoffverbrauch. Dagegen ist einzuwenden, daß 2%iges Kupfersulfat [vgl. z. B. *Pulst* (1902)] nicht einmal in Flüssigkeit ein sicher wirkendes Antisepticum ist, noch weniger, wenn Heu mit seinen absorptiven Wirkungen in Betracht kommt. Außerdem wird kein Versuch gemacht, die Wärmebildung selbst zu beobachten; es muß also ganz fraglich bleiben, welchen praktischen Anteil solche, an sich ja möglichen, oxydativen Vorgänge an der Erhitzung haben. *Hj. Jensen* (1908, S. 477 ff.) findet, daß Sublimat, Formol und Chloroform die Erhitzung des Tabaks nicht verhindern. Dem stehen meine entgegengesetzten Angaben (1911) für Heu gegenüber. Zudem ist einwandfrei von *Hildebrand* (1927, S. 465) mit einer besseren Methodik, als sie *Jensen* anwandte, gezeigt worden, daß selbst so schonende Antiseptica wie Chloroform und Toluol die Selbsterhitzung völlig verhindern. Auch ist daran zu erinnern, daß in solchen Untersuchungen wie denen *Rubners* (1913, S. 58), wo die energetische Leistung der Zymase oder toluolisierter Hefe kalorimetrisch gemessen wurde, diese ganz zurücktrat gegen die Leistung der Hefezellen selber, die an sich wieder unter anaeroben Verhältnissen bedeutend gegen die starke Wärmeproduktion aerob atmender Hefe zurücksteht. Es würde nach solchen Erfahrungen also von vornherein eine nur bescheidene Wirksamkeit von Enzymen zu erwarten sein. Auch die Versuche *Hildebrands* (S. 483) geben keinen Anhalt für Oxydasewirkungen. Er tränkte steriles Heu mit steril filtriertem, oxydasehaltigem Preßsaft aus Kartoffelkeimen, konnte aber keine Steigerung der Temperatur im *Dewarschen* Gefäß wahrnehmen. Theoretisch läßt sich schließlich gegen die Wirkung pflanzenstoffeigener Enzyme noch einwenden, daß ihre Wirksamkeit bei so hohen Temperaturen wie 50 bis 70° sehr verwunderlich wäre. Denn es wäre doch nicht zu erwarten, daß die Enzyme, die ein Organismus

bildet, eine so viel höhere Temperatur vertragen, als dieser Organismus selber vertragen kann, wenn man nicht mit *Burri* (S. 31) darauf hinweisen will, daß Enzyme in trockenem Zustande höhere Wärmegrade aushalten können. Doch hat andererseits *Hildebrand* gezeigt, daß die Selbsterwärmung in engster Abhängigkeit von der Feuchtigkeit steht. Daß irgendwelche nicht oxydative enzymatische Vorgänge in Betracht kommen können [wie z. B. *Tschirch* (1918) vermutet], ist schon dadurch ausgeschlossen, daß die Erhitzung durchaus vom Sauerstoff abhängig ist.

Immerhin blieb die Frage der Beteiligung von Enzymen offen, da natürlich nicht mit völliger Sicherheit behauptet werden konnte, daß selbst milde Antiseptica die unbekanntenen Enzyme intakt ließen. Sie läßt sich noch insofern schärfer präzisieren, als zunächst einmal entschieden werden muß, ob denn höhere Pflanzen, deren Reste ja das Phänomen der Selbsterhitzung zeigen, im *lebenden* Zustand überhaupt eine ansehnliche Selbsterwärmung zeigen. Man hat das bisher immer als fast selbstverständlich angenommen. Wie jedoch meine Versuche mit sterilen Sonnenrosenkeimlingen ergeben haben, ist diese Auffassung irrig. In solchen Mengen zusammengehäuft, wie sie in normal infiziertem Zustand nach kurzer Zeit 50° und wärmer werden, ließen sie nur eine Temperatursteigerung von wenigen Graden, also eine ganz auffallend geringe Wärmebildung erkennen. Obwohl dies Ergebnis wegen der großen methodischen Schwierigkeiten isoliert dasteht, kann man es wohl auf Keimlinge verallgemeinern, und obwohl wir über einen ähnlich sicheren Anhalt für die Atmung alter ausgewachsener Pflanzenteile noch nicht verfügen, kann man wohl vermuten, daß diese schon wegen des größeren Anteils toter Substanzen eine noch geringere Wärmeezeugung aufweisen werden. Wenn nun demnach nicht einmal junge lebende Pflanzen in ihrem oxydativen Stoffwechsel nennenswerte Wärmemengen bilden können, so kann man wohl als sicher annehmen, daß abgestorbene Reste mittels etwa überlebender Atmungsenzyme noch viel weniger leisten, es sei denn, daß man annähme, es träten beim Absterben und Trocknen neue Agentien von enzymartigem Charakter auf. Mir scheint, daß durch den Ausfall unseres Erwärmungsversuches mit lebenden sterilen Sonnenrosenkeimlingen die Vorstellung von der Selbsterwärmung als eines enzymatischen Vorganges in toten Massen verlassen werden muß, und daß demnach die Masse selber nur als Substrat für die eigentlichen Erhitzer in Betracht kommt.

Dies sind heterotrophe Mikroorganismen, deren starker dissimilativer Stoffwechsel gegenüber dem trägen der autotrophen grünen Organismen ja ohnehin bekannt ist. Ist dies der Fall, so muß der Erhitzungsverlauf ein Spiegelbild des Temperaturverhältnisses der

betreffenden Lebewesen sein. Denn es ist klar, daß physiologische Wärme nur so lange gebildet werden kann, als die physiologischen Vorgänge vorhanden sind, und diese sind ja in Temperaturgrenzen eingeschlossen, vor allem von einer oberen Grenze abhängig. Diese Beziehung durch genaue Versuche mit reinen Kulturen nachzuprüfen, war das zweite Ziel der vorliegenden Untersuchung.

	Höchstgrad der Selbst- erhitzung	Höchste, im vegetativen Zu- stand ertragene Temperatur	Bemerkungen
<i>Rhizopus nigricans</i> . . . . .	a) 38 <sup>0</sup> b) 35	unter 40 <sup>0</sup>	Bei Zimmertemperatur
<i>Penicillium glaucum</i> . . . . .	41	zwischen 40 und 45 <sup>0</sup>	" "
<i>Aspergillus niger</i> . . . . .	a) 49,5 <sup>0</sup> b) 52 c) 53,5	zwischen 50 und 55 <sup>0</sup>	a) Bei Zimmertemperatur
<i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	a) 54 b) 57	über 60 <sup>0</sup>	a) " "
<i>Mucor corymbifer</i> . . . . .	56,5	etwa 60 <sup>0</sup>	
<i>Thermoidium sulfureum</i> . . . . .	58	zwischen 55 und 60 <sup>0</sup>	
<i>Thermophiles Penicillium</i> . . . . .	61	über 65 <sup>0</sup>	
<i>Actinomyces thermophilus</i> . . . . .	a) 60 b) 63 c) 63	zwischen 60 und 65 <sup>0</sup>	
<i>Thermomyces lanuginosus</i> . . . . .	a) 61 b) 62,5	zwischen 60 und 65 <sup>0</sup>	
	a) 51 b) 67,75 <sup>0</sup>		a) Im Heu. Außentemp. 40 <sup>0</sup> b) " " " " 60 <sup>0</sup> Leichte Infektion mit Actinomyces
<i>Bacillus calfactor</i> . . . . .	c) 74 d) 68 e) 68,1	über 70 <sup>0</sup>	c) In unsterilisiertem Heu. Außentemperatur 60 <sup>0</sup> d) Mit Thermomyces. Außentemp. 40—51 <sup>0</sup> e) Mit Thermomyces. Außentemp. 46—52 <sup>0</sup>
<i>Bacillus coli</i> . . . . .	38	40 <sup>0</sup>	
<i>Hefe</i> . . . . .	a) 45,5 b) 50,5	über 50 <sup>0</sup>	a) Fein zerkrümelte Preß- hefe in Substanz b) Aufschwemmung von Preßhefe in Brotkrümeln

Überblicken wir die Ergebnisse an Hand der obenstehenden tabellarischen Übersicht, so sieht man, daß eine ziemlich befriedigende Parallele zwischen den Höchstgraden der Selbsterhitzung der Pilz- und Bakterienkulturen und den annähernden Höchsttemperaturen besteht, welche die betreffenden Organismen im lebensstätigen Zustande eine gewisse Zeit überstehen können. In keinem einzigen Falle wurde eine höhere Temperatur gemessen, als der eingepflichte Keim vertragen konnte, woraus folgt, daß auch keine postmortal wirkenden Pilzenzyme beteiligt sein können. In allen Fällen näherte sich das Erhitzungsmaximum dem Lebensmaximum, es kommt mithin die ver-

schiedene thermische Eigenart der biologisch verschiedenen Mikroorganismen zu einem deutlichen Ausdruck auch in der Selbsterhitzungsleistung, und diese selbst kann demzufolge nichts anderes sein als ein Teil der physiologischen Tätigkeit des lebenden Pilzplasmas selber.

Daß im einzelnen die Annäherung eine verschieden große war, darf nicht wundernehmen. Zunächst sind die Wärmegrenzen für das Leben auch nur Annäherungswerte, die sich bei eingehenderer Prüfung noch wesentlich genauer ermitteln lassen. Vor allem wurden (vgl. oben S. 90) die Maximaltemperaturen nur 4 Stunden lang appliziert. Wenn die Höchstgrade der Selbsterhitzung immer unter den Vitalgrenztemperaturen bleiben, so wird dies zur Hauptsache auf den unvermeidlichen Wärmeverlust durch Ausstrahlung beruhen. Er wird besonders verhängnisvoll gegen die Grenze, weil hier auch die Atmungsvorgänge an Intensität abnehmen werden. Ich habe eingangs angedeutet, wie ein noch wesentlich besserer Schutz gegen den Wärmeverlust möglich wäre. Selbstverständlich bedingt auch die Verdunstung der feuchten Masse einen kleinen Wärmeverlust. Dann ist ferner das Kultursubstrat nicht ohne Einfluß, obwohl es selbst keine unmittelbare Quelle der Wärme ist. Es ist nicht zu erwarten, daß ein und derselbe Nährboden für alle Lebewesen der beste ist. Das zeigt sich besonders auffallend an dem Verhalten der Bakterien gegen die Brotkrümel. Ferner ist der Wassergehalt ein sehr wichtiges Moment. Obwohl er überall einigermaßen übereinstimmt, sind doch Verschiedenheiten unvermeidlich. Damit hängt eng die gute Durchmischung mit Luft, die Porosität, zusammen, die für den Erfolg bedeutungsvoll ist. Auch die Art der Impfung, d. h. die gleichmäßige Verteilung der Keime im Substrat ist wichtig und nicht immer völlig gleich gewesen. Der Idealfall würde sein, ein indifferentes Material von günstigster Porosität, Elastizität und Quellungsfähigkeit als Matrix zu tränken mit der günstigsten Menge einer günstigsten Nährflüssigkeit, welche Keime in gleichmäßiger Verteilung enthält, und solche Kulturen bei einem Minimum von Wärmeverlust durch Ausstrahlung zu verfolgen. *Hildebrandt* (S. 446) hat schon fein zerkleinerten Bimsstein, der mit Nährlösung imbibiert war, als Kultursubstrat angewandt, und zwar mit einem gewissen Erfolg. Die Sauerstoffversorgung in den Gefäßen ist weniger gefährdet. Es findet wider Erwarten ein leichter Gasaustausch zwischen Gefäß und umgebender Luft statt, der — wie der gleiche Autor am Erhitzungserfolg nachwies — auch nicht durch Einführung von CO<sub>2</sub>-absorbierenden Mitteln in das Gefäß oder durch besondere Lüftungsvorrichtungen verbessert werden konnte. Wie überraschend leicht dieser Austausch vor sich geht, zeigte z. B. die Tatsache (*Hildebrandt*, S. 450), daß unter einer 100 Liter fassenden Glocke der gesamte Sauerstoff in kurzem verbraucht war, wenn sich

unter ihr ein mit Watte abgeschlossenes 2 Liter-Dewargefäß mit Heu befand. (Er reichte, nebenbei bemerkt, bei weitem nicht aus für die Erzielung der in solchen Versuchen üblichen Höchsttemperatur.)

Da die Wärmebildung eine Funktion der lebenden Masse ist, hängt schließlich der Temperaturverlauf auch davon ab, mit welcher Geschwindigkeit solche aufgebaut wird, mit anderen Worten vom Wachstum. Diejenigen Organismen werden (auch bei nicht vollkommenem Wärmeschutz) den raschesten und damit weitestgehenden Temperaturanstieg bewirken, die intensivste Dissimilation mit intensivster, zu höchsten Überschüssen an lebendem Plasma führender Assimilation vereinigen können. Diese Wachstumsintensität ist naturgemäß dann für den Erhitzungserfolg entscheidend, wenn sich die atmende Plasmamasse erst aus kleineren Impfmengen entwickeln muß. Das war, wenn auch in verschiedenem Grade, bei allen Versuchen der Fall, mit Ausnahme derjenigen mit Preßhefe, wo von vornherein eine bedeutende Masse lebenden Hefeplasmas in innige Berührung mit dem Sauerstoff der Luft trat. Hier erfolgte denn auch der bei weitem rascheste Temperaturanstieg. Es ist wahrscheinlich, daß auch bei anderen Organismen unter gleichen Versuchsbedingungen eine ähnlich rasche und hohe Steigerung erzielbar wäre. Man darf wohl annehmen, daß sich die verschiedenen Pilze in bezug auf jene oben berührte Produktionsenergie verschieden verhalten. Jedenfalls ist es sehr wahrscheinlich, daß ein Unterschied dieser Art zwischen Pilzen und Bakterien besteht. Es macht durchaus den Eindruck, als ob auf einem gegebenen Quantum von Nährstoffen, die für beide annähernd gleich gut sind, die Pilze eine wesentlich größere „Ernte“ als die Bakterien geben.

Vielleicht beruht hierauf die zunächst auffallende Tatsache, daß der *Bac. calfactor* in bezug auf seine Erhitzungsfähigkeit den Pilzen nachzustehen scheint. Während z. B. *Aspergillus fumigatus* in raschem Anstieg sein Substrat von 20 auf 54° erhitzte, war dies beim *Bac. calfactor* auch bei der für ihn als streng thermophilen Organismus notwendigen höheren Anfangstemperatur nicht der Fall. Von 40° erhitzte er nur auf 51°, obwohl ihm sein Temperaturmaximum eine wesentlich höhere Erhitzung erlaubte. Allerdings sind gerade bei den Versuchen mit dieser Bakterie Zweifel an der optimalen Beschaffenheit seines Nährsubstrats unabweisbar, um so mehr, als er in unsterilisiertem Heu, freilich nicht in exakter Reinkultur, stärkeren Temperaturanstieg, nämlich von 60 bis 74° bewirkte.

Gleichwohl spielt dieser so charakteristische Keim bei dem natürlichen Phänomen der Selbsterhitzung von Heu oder ähnlicher Masse eine wichtige Rolle wegen seiner hohen thermischen Lebensgrenze. Während sehr wahrscheinlich den Pilzen der ganz überwiegende Anteil

an der Erhitzung bis etwa 60° zufällt, bewirkt er gerade an kritischer Stelle den relativ geringeren, aber um so eindrucksvolleren letzten Anstieg auf Temperaturen über 70°, d. h. in den Temperaturbereich hinein, wo bisher nicht näher bekannte, sicher aber rein chemische Vorgänge möglich werden, die bis zur Entflammung der Substanzen fortschreiten können.

Wenn wir zum Schluß an die einleitenden Worte dieser Übersicht unserer Ergebnisse wieder anknüpfen, so darf man wohl sagen, daß ähnlich wie im Streit um die Ätiologie der alkoholischen Gärung auch in dem über die Ursächlichkeit der Selbsterhitzung des Heues (nur von diesen oder ähnlichen Vorgängen ist hier die Rede) die biologische Erklärung heute die einzige ist, die auf einem sicheren Grunde steht.

#### Zusammenfassung.

Es wurde die Selbsterhitzung von Reinkulturen geprüft.

Sterile Keimlinge der Sonnenrose zeigen nur eine sehr schwache Selbsterwärmung.

Reinkulturen von Pilzen erhitzen ihr Substrat rasch bis nahe an die ihnen eigentümliche thermische Lebensgrenze.

Auch Bakterien erhitzen ihr Substrat, doch ist ihre Leistung geringer als die der Pilze.

Aus den mitgeteilten Tatsachen und anderen früher festgestellten wird der Schluß gezogen, daß die Selbsterhitzung feuchter und poröser Pflanzenstoffe, soweit es sich um eine Erhitzung bis etwa 75° handelt, nicht von dem Stoff selbst bewirkt wird, sondern von den Mikroorganismen, die auf ihm wachsen. Dabei spielen bis etwa 65° die Pilze eine größere Rolle als die Bakterien. Doch sind thermophile Bakterien für den letzten bis etwa 75° reichenden Anstieg entscheidend.

#### Literatur.

- 1) *J. Behrens*, Mykologie der Tabakfabrikation, Handb. d. Techn. Mykol. 5, 1905.
- 2) *T. W. J. Boekhout* und *J. J. Ott. de Vries*, Über die Selbsterhitzung des Heues, Zentralbl. f. Bakt. usw., II. Abt., 44, 290, 1916.
- 3) *R. Burri*, Die Selbsterhitzung lagernder Pflanzenmassen usw., Landw. Jahrb. d. Schweiz 33, 23, 1919.
- 4) *F. Hildebrandt*, Beiträge zur Frage der Selbsterwärmung des Heues, Zentralbl. f. Bakt. usw., II. Abt., 71, 1927.
- 5) *Hj. Jensen*, Über die Natur der Tabakfermentation, ebendasselbst 21, 1908.
- 6) *E. Leick*, Über Wärmeproduktion bei keimenden Samen, Beih. z. Bot. Zentralbl., Abt. I, 33, 1916.



- 7) *Lieske*, Morphologie und Biologie der Strahlenpilze. Berlin 1921.
  - 8) *H. Miede*, Die Selbsterhitzung des Heues. Jena 1907.
  - 9) *Derselbe*, Über die Selbsterhitzung des Heues, Arb. d. Deutsch. Landw. Ges., H. 196, 1911 (neue Auflage in Vorbereitung).
  - 10) *C. Pulst*, Widerstandsfähigkeit einiger Schimmelpilze gegen Metallgifte, Jahrb. f. wiss. Bot. **37**, 205, 1902.
  - 11) *E. Pringsheim*, Vergleichende Untersuchungen über Saatgutesinfektion, Angew. Bot. **10**, 208, 1928.
  - 12) *M. Rubner*, Die Ernährungsphysiologie der Hefezelle bei alkoholischer Gärung. Leipzig 1913.
  - 13) *A. Tschirch*, Eine neue Theorie des Heustockbrandes, Schweizer Chem.-Ztg. **2**, 10, 1918.
-