

Anwendung gelangen, nämlich die kontinuierliche Erzeugung von Wassergas aus feuchten Brennstoffen nach dem System Hillebrand. Das Verfahren arbeitet in der Weise, daß die in einem besonderen Vortrockner freigemachte Brennstofffeuchtigkeit hoch überhitzt und kontinuierlich in den Generator eingeblasen wird, wobei auf Kosten der fühlbaren Wärme des Gases die Wassergasreaktion stattfindet. Zur Erhitzung werden Regeneratoren oder Rekuperatoren verwendet. Die Temperatur der eingeblasenen Gase kann genau innegehalten werden, so daß man stets unter dem Schmelzpunkt der Asche des Brennstoffes bleiben kann; ein Verschlacken wird dadurch vollkommen vermieden, so daß die häufigen Betriebsstörungen durch Verschlacken und die damit verbundenen umständlichen Reinigungsarbeiten und Betriebsstörungen restlos vermieden werden. Da die Reaktion im Generator endotherm, also auf Kosten der fühlbaren Wärme des eingeblasenen Gemisches erfolgt, kann dessen Temperatur an keiner Stelle des Brennstoffbettes überschritten werden.

Der Wirkungsgrad einer solchen Anlage ist wesentlich höher als der von Wassergasanlagen nach dem üblichen System. Durch das Wassergas lassen sich auch die hochwertigsten Brennstoffe im vollen Umfange ersetzen.

Im vorstehenden wurde ein Überblick gegeben über die zurzeit bestehenden Verwertungsmöglichkeiten für den Torf. Es wurden dabei insbesondere diejenigen Verfahren ausführlicher behandelt, die in ihren wissenschaftlichen Grundlagen und in ihrer technischen Durchbildung soweit gediehen sind, daß sie als brauchbare Basis für ein weiteres Fortschreiten der Torfverwertung angesehen werden können. Es sei zum Schluß nochmals darauf hingewiesen, daß wenigstens für Deutschland die *Verkokung* unbedingt als das aussichtsreichste Verfahren anzusehen ist. Die Verwendung des *Teeres* ist zurzeit ebenfalls auf Grund neuerer Verfahren, die durch *Hydrierung* die Umsetzung in Leichtbrennstoffe bewirken, gesichert, so daß für alle Produkte der Torfverkokung ein sicherer Absatz besteht. [A. 211.]

## Zur Bewertung der Fungizität eines Stoffes.

Von Dr. E. W. SCHMIDT, Hannover.

(Eingeg. 18.9. 1924.)

Hinsichtlich des Giftwertes einer Substanz unterscheidet man [vgl. Benecke<sup>1</sup>), Reichen<sup>2</sup>)] den Tötungswert oder antiseptischen Wert und den Hemmungswert oder desinfizierenden Wert. Den Hemmungswert unterteilt man noch in absoluten Hemmungswert [mykozider Wert Falcks<sup>3</sup>)] und den relativen Hemmungswert (germizider Wert Falcks). Man könnte auch von Kardinalpunkten der Giftwirkung sprechen und als Minimaldosis eines Giftes das Minimum der Konzentration bezeichnen, bei der die Keimung (Aktion) ausgeschaltet wird, die Keimfähigkeit (Potenz) aber erhalten bleibt; und als maximale Dosis die Konzentration, bei der auch die Keimfähigkeit (Potenz) vernichtet wird. Diese Werte stehen nun für die einzelnen Gifte keineswegs fest, sondern verschieben sich nach oben oder unten,

<sup>1</sup>) Benecke, Giftwirkungen. Lafars Handbuch der Techn. Mykologie 1, 482 [1904].

<sup>2</sup>) Reichen, Entkeimung. Handbuch der mikrobiolog. Technik 1, 437 [1922].

<sup>3</sup>) Falck, Über die Bewertung von Holz- u. Pflanzenschutzmitteln im Laboratorium und über ein neues Spritzmittel für den Pflanzenschutz. Z. ang. Bot. 1, 177 [1919].

je nach der Art der Versuchsanstellung und nach der Natur der gebotenen Nährstoffe. Außerdem fallen die Giftwerte verschieden aus, je nachdem was für ein Organismus zur Prüfung der Giftigkeit eines Stoffes herangezogen wird.

So sind im engeren, je nach der Wahl der Nährstoffe und der Pilzart die Hemmungswerte für Kupferverbindungen verschieden. Ganz besonders trifft dieses zu für die Angaben der Autoren hinsichtlich des Hemmungswertes des Kupfersulfates und des Kupferhydroxydes, selbst für den gleichen Pilz. Um nur ein Beispiel anzuführen: Falck (l. c. S. 239) gibt an, daß Kupferhydroxyd in reinem Agar bei 0,4 % Botrytis absolut hemmt, fügte er aber Ammoniumnitrat hinzu, so wurde eine absolute Hemmung schon bei einem Gehalte von 0,006 % Kupferhydroxyd erzielt. Löste er dagegen Kupferhydroxyd in Bierwürze, so wirkten erst 0,8 % absolut hemmend, alkaliserte er dieses Nährsubstrat mit Calciumhydroxyd, so sank jetzt die zur Erzielung einer absoluten Hemmung benötigte Giftmenge auf 0,00012 %. Für Kupfersulfat in 1%igem Bierwürzeagar liegt nach Falck die Konzentrationsgrenze bei 0,8 %. Schon aus diesen Angaben, die sich aus der überaus umfangreichen Literatur leicht vermehren ließen, ist zu ersehen, wie relativ sämtliche Angaben über den Giftwert von Kupferverbindungen wie im allgemeinen über den Giftwert überhaupt sind. Prüft man aber die Ergebnisse der Autoren auch noch hinsichtlich der Temperatur, bei der die Versuche angestellt wurden, ferner in Rücksicht auf den physikalischen Zustand des Mediums (flüssig oder fest), das zur Verwendung kam, und schließlich als besonders wichtig, in bezug auf die angewandte Menge der Sporen für die einzelnen Versuche, so erhöht sich noch die Relativität all der erzielten Ergebnisse um ein Beträchtliches.

Es ist deshalb notwendig, will man zu vergleichbaren Werten über die Fungizität eines Stoffes kommen, sich zunächst einmal auf bestimmte Methoden und festliegende Normalnährsubstrate zu einigen. Bezuglich der Testobjekte ist es eine Idealforderung, sämtliche in Frage kommenden Organismen, in unserem Falle Pilze, auf ihre Resistenz Giften gegenüber zu prüfen. Ehe diese Arbeit aber geleistet ist, dürfte es immerhin zweckmäßig sein, sich über den Giftwert der zu prüfenden Gifte einem bestimmten Testobjekt gegenüber zu orientieren. Für mykologische Zwecke scheint dazu *Botrytis cinerea* am geeignetsten, sofern es sich um behäutete Sporen handelt. Dieser Pilz ist auch sonst schon für derartige Untersuchungen verwendet worden, so noch letzthin von Falck (l. c.). Der Pilz ist jederzeit leicht zu erhalten, er ist wenig oder gar nicht variabel, gut kultivierbar, bildet reichliche Mengen Sporen, die groß sind, so daß sie mit schwachen Vergrößerungen ausgezählt und hinsichtlich ihrer Keimfähigkeit mikroskopisch verfolgt werden können. Zudem ist *Botrytis cinerea* ein fakultativer Parasit, so daß die ermittelten Giftwerte einer an diesem Pilz gemessenen Substanz auch Rückschlüsse zulassen auf die erst noch im besonderen zu prüfende Möglichkeit einer Verwendung für die Zwecke des Pflanzenschutzes, welche Verwendungsmöglichkeit dieses Pilzes für solche Zwecke von mir in einer besonderen Arbeit niedergelegt ist<sup>4</sup>). Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei, was ja auch, so sollte ich meinen, deutlich aus meiner angezogenen Arbeit hervorgeht, ausdrücklich betont, daß dem gewählten Pilze nicht im geringsten hiermit etwa der Wert eines Standardtestobjektes eingeräumt werden soll. Sondern es soll nur damit hingewiesen werden auf einen für die gewählte Versuchsanordnung recht brauchbaren

<sup>4</sup>) Vgl. Z. ang. Ch. 19, 267 [1924].

### Versuchspilz zur Wegbereitung auf dem Gebiete der Feststellung von Giftwerten.

Als Testobjekt für die Prüfung der Fungizide ist die Pilzspore für exakte Wertbestimmung das gegebene Organ, während Mycelien erst in zweiter Linie kommen. Diese gingen zur Bestimmung des Tötungswertes noch an, wenn auch die Anwendung gleicher Mycelmengen so gut wie undurchführbar ist. Zu Hemmungswertversuchen sind Mycelien aber noch weniger gut zu gebrauchen, da eindeutige und leicht zu handhabende Kriterien zur Feststellung der Größe der Hemmung schwerlich zu finden sind. Die Verwendung der Spore als Testobjekt dagegen ermöglicht besonders auch der unbedingt aufzustellenden Forderung nach Zählung der zu prüfenden Keime gerecht zu werden. Wenn die Zählung auch bei Verwendung von Bakterien als Testobjekte nicht so besonders wichtig zu sein scheint<sup>5)</sup>, so ist für Pilzsporen an der Forderung der Verwendung gezählter Sporenmengen festzuhalten. Die in Frage kommenden Zellenmassen sind bei Pilzsporen doch erheblich größer, als bei der Verwendung von Bakterien, und es ist ein wesentlicher Unterschied, ob ich 10 mg Kupfersulfat auf 100 000 Sporen pro Kubikzentimeter Lösung oder nur auf 100 Sporen zur Wirkung bringe. Im ersten Falle käme theoretisch nur ein Giftquantum von 0,0001 mg, und im anderen dagegen ein solches von 0,1 mg Kupfersulfat auf die einzelne Spore. Es liegt hier allerdings insofern keine gesetzmäßige Abhängigkeit zwischen Sporenanzahl und Giftmenge vor, als man sonst wohl anzunehmen geneigt wäre, daß 0,001 % Kupfersulfat auf 100 Sporen eine gleiche Wirkung hätte wie 1 % auf 100 000 Sporen. Ein derartiger Schluß ist natürlich nicht angängig, sondern es soll nur darauf hingewiesen werden, daß eine starke Verschiedenheit in den Ergebnissen auftreten kann, verwendet man willkürlich einmal sehr viel und einmal nur wenige Sporen bei gleicher Giftmenge. Ein Beispiel möge dies noch erläutern: Sät man in eine Pflaumensaftlösung, die 0,2 % Kupfersulfat enthält, 1000 Botrytissporen pro Kubikzentimeter aus, so erzielt man eine absolute Hemmung; wählt man für denselben Versuch 300 000 Sporen pro Kubikzentimeter, so ist nur eine relative Hemmung zu erreichen.

Die notwendigen Zählungen sind bei der Größe der Botrytissporen leicht vorzunehmen mittels der Thomas-Zeisschen Zählkammer.

Für die Wahl der Giftwertbestimmungsmethoden ist maßgebend, daß sie leicht zu handhaben sind, überall zur Anwendung gelangen können und bei gleicher Anordnung und Durchführung auch zu stets gleichen Resultaten führen.

Der fungizide Wert eines neu zu untersuchenden Stoffes wäre demnach festzulegen durch folgende Versuche:

1. durch den Tötungsversuch,
2. durch den Hemmungsversuch,
- a) absoluter Hemmungswert,
- b) relativer Hemmungswert.

Als Nährsubstrat hat stets ein solches von bekannter Zusammensetzung zu dienen, also nicht Bierwürze, Pflaumenextrakt u. ä., da diese Art Nährböden immer nach Herkunft und Art der Herstellung wechselnden Gehalt an Nährstoffen aufweisen. So machte z. B. Wehmer<sup>6)</sup> bei seinen Versuchen über die hemmende Wirkung von Giften auf Mikroorganismen die Feststellung, daß „selbst Bierwürze gleicher Konzentration und Herkunft, wie sich

besonders an dem Beispiele des Merulius zeigen ließ, je nachdem, ob sie frisch bereitet oder aufgekocht benutzt wurde, ganz verschiedene Resultate lieferte. Wurde sie nicht flüssig, sondern als fester Boden verwendet (Gelatinezusatz), so mußte zur Erzielung der gleichen Wirkung fast die dreifache Menge des Antiseptikums gegeben werden“. Ferner (l. c. S. 89) „auf den Ausfall solcher Versuche ist die genaueste Zusammensetzung des Nährbodens von merklichem Einfluß, die Hemmungszahlen ändern sich bereits, wenn man statt der verwendeten ungekochten Würze eine ältere wiederholt aufgekochte nimmt“.

Ich wählte für meine Untersuchungen einen Normalnährboden von stets gleicher Zusammensetzung, und zwar:

0,01  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
0,01  $\text{CaCl}_2$ ,  
0,03  $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  
0,01  $\text{NaCl}$ ,  
0,001  $\text{FeCl}_3$ ,  
1 Asparagin,  
2 Traubenzucker,  
100 Wasser,  
(1,5 Agar, sofern mit Agarnährböden gearbeitet wurde).

Der exakte Tötungswertversuch verlangt, daß das zu untersuchende Gift voll zur Wirkung kommt, ohne irgendwie abgeschwächt zu werden in der Entfaltung seiner antiseptischen Kraft. Es muß also, um dieser Forderung gerecht zu werden, das zu prüfende Fungizid für die Vornahme des Tötungsversuches in einem für das Gift chemisch und physikalisch indifferenten Lösungsmittel auf den Pilz einwirken, anderseits darf das Testobjekt für das Gift, in unserem Falle die Pilzspore, nicht in ein derartiges Milieu gebracht und dadurch in einen Zustand versetzt werden, der ihre Resistenz erhöht: es darf also das Gift in keinem Nährmedium zur Prüfung kommen. Denn hierdurch würde der Pilz gekräftigt, zum anderen könnte die Lösung möglicherweise noch weitgehend entgiftet werden durch Eingehen chemischer Verbindungen mit dem Nährsubstrat (wie etwa Eiweiß mit Schwermetallsalzen) oder es treten adsorptive Bindungen ein, möglicherweise werden sogar ionenantagonistische Einflüsse ausgeübt usw., wodurch jeweils eine Giftigkeitsherabsetzung hervorgerufen werden kann.

Es kommt demnach für exakte Tötungswertbestimmungen nur destilliertes Wasser in Frage. Um zu vergleichenden Werten und damit zu einer brauchbaren Normierung zu kommen, habe ich folgende Wertigkeitsfestlegung gewählt: Der Tötungswert eines Giftes wird festgestellt bei Verwendung von 10 000 Sporen je Kubikzentimeter Wasser mit einer anfänglichen Konzentration des zu untersuchenden Giftes von demjenigen Prozentsgehalte, der bei optimalen Ernährungsbedingungen des Pilzes eine absolute Hemmung hervorruft und bei einer Temperatur von 24°. Durch die Wahl dieser Anfangskonzentration hat man bei neuen Versuchen stets einen Anhaltspunkt, von welcher Konzentration man ausgehen soll. Gleichzeitig ergibt sich dabei die Differenz zwischen derjenigen Konzentration, die Tötung herbeiführt und der, die absolut hemmend wirkt, als wertvolle Feststellung für die Einschätzung der Giftigkeit einer Substanz; denn je geringer die Differenz zwischen Tötungswert- und Hemmungswertkonzentration, um so giftiger ist gemeinlich die untersuchte Substanz.

Den Tötungswert kann man ziffernmäßig ausdrücken, indem man — und wie hier vorgesehen — die Einwirkungsdauer des Giftes, also die Zeit, unverändert läßt,

<sup>5)</sup> Vgl. Reichelt, l. c. S. 465.

<sup>6)</sup> Wehmer, Versuche über die hemmende Wirkung von Giften auf Mikroorganismen. Ch.-Zig. 1916, 89.

und die Giftkonzentration variiert, oder die Giftkonzentration, z. B. 1 %, unverändert läßt und die Zeit variiert. Im erstenen Falle ist der Tötungswert gleich 10, wenn 1 % des Giftes in einer Stunde die Sporen tötet, gleich 100, wenn 0,1 % Gift in einer Stunde abtötend wirken, und gleich 1, wenn 10 % Gift diesen Effekt erst hervorzubringen vermögen. Variiert man umgekehrt die Zeit bei feststehender Giftkonzentration, z. B. 1 %, so wäre der Tötungswert gleich 100, wenn nach einer Stunde, gleich 1000, wenn nach  $\frac{1}{10}$  Stunden und gleich 1, wenn nach 100 Stunden erst Abtötung der Sporen eintritt.

Die bakteriologischen Methoden des Antrocknens der Testobjekte an Seidenfäden (R. Koch) oder Tariergranaten (Paul und Krönig) sind für unsere Zwecke nicht sonderlich geeignet. Hinzu kommt außerdem der methodische Fehler bei der Benutzung von Seidenfäden, auf den schon Bechhold<sup>7)</sup> aufmerksam machte, und der in der Adsorption eines beträchtlichen Teiles des Giftes durch die Seide begründet liegt.

Durch Verwendung der für die vorliegenden Zwecke sehr geeigneten Membranfilter nach Zsigmondy-Bachmann<sup>8)</sup> ließ sich eine Filtrationsmethode entwickeln, die exaktes und schnelles Arbeiten bei einfacher Handhabung ermöglicht. Es lassen sich zwar die Filtrationen der Pilzsporen mittels gehärteter Filter ebenfalls vornehmen, aber es hat seine Schwierigkeiten, die Sporen von dem Filter abzubekommen, will man nicht das ganze Filter mit den Sporen zusammen in Nährösung übertragen, was wiederum wegen der Unmöglichkeit der dauernden mikroskopischen Verfolgung des Verhaltens der Sporen nicht erwünscht ist. Dagegen sind die Vorteile der Membranfiltration gegenüber der Verwendung von Hartfiltern doch immerhin so große, daß ihre Benutzung vorzuziehen ist.

Neuerdings habe ich neben dieser an sich recht brauchbaren Methode noch eine zweite ausgearbeitet; danach verfahre ich in folgender Weise:

Glasringe von 2 cm lichter Weite und 0,75 cm Höhe und etwa 2 mm Wandstärke werden auf der einen Seite mit einer feinen Collodiummembran überzogen. Die Collodiummembran stellt man sich in der Weise her, daß man auf sauberen Objektträgern etwas Collodium ausgießt und dieses durch schnelles Hin- und Herschwenken auf dem Objektträger sich ausbreiten läßt zu einer Scheibe von etwa 3 cm Durchmesser. Nach Verdunsten des Äthers, was nach wenigen Minuten eingetreten ist, hebt man die fest auf dem Objektträger haftende dünne Collodiumscheibe an einer Seite mit Hilfe eines feinen Spatels oder ähnlichem ein wenig ab, ergreift das abgehobene Stück mit der Pinzette und zieht vorsichtig das dünne Collodiumhäutchen von seiner Unterfläche ab. Die Collodiummembran wird nun sofort mit der noch feuchten Unterseite so auf den Glasring gelegt, daß die Ringform allseitig gleichmäßig von überstehender Collodiumhaut überragt wird. Der überstehende Teil der Collodiumhaut wird an die Außenwand des Glasringes fest angedrückt, wobei gleichzeitig etwa entstandene kleine Fältchen durch vorsichtiges Ziehen an dem Rande der Membran entfernt werden. Auf solche Weise kann man sehr dünne und vollständig faltenlose Überzüge der Glasringe erzielen. Die so fertiggestellten Glasringe werden auf feuchtes Filtrierpapier in eine Petrischale gestellt, die Collodiumhaut dem Papier aufliegend. In den Glasring wird etwas destilliertes Wasser gegossen und auf dem Wasserbade die geschlossene Petrischale der Einwirkung strömenden Dampfes ausgesetzt. Hierbei werden die letzten Spuren Alkohols restlos verdrängt und eine genügende Sterilisation für die vorliegenden Versuchszwecke erreicht. Die Glasringe werden nunmehr in der Petrischale nach Erkalten umgedreht, die Collodiummembran

nach oben, und mit 0,001 ccm einer Sporenaufschwemmung von *Botrytis cinerea* beschickt. Die Sporenaufschwemmung enthält 10 000 Sporen (0,001 ccm gleich einer Platinöse von etwa 2 mm Durchmesser einer Sporenaufschwemmung von 1 Mill. Sporen in 0,1 ccm). Der sporenhaltige Tropfen wird mit der Platinöse gleichmäßig auf dem Membranoberfläche verteilt. Nunmehr wird der so beschickte Glasring mit der Collodiummembran nach unten auf einen offenen Glasring gleicher Größe aufgesetzt und in den oberen Glasring das auf seinen Tötungswert zu prüfende Gift (1 ccm) eingegossen. Der obere Glasring wird schließlich mit einem großen runden Deckglase bedeckt und das Ganze in feuchter Kammer bei 24° entsprechend der gewählten Versuchszeit hingestellt. Hierbei ist Vorsorge zu treffen, daß die Ringe in dampfgesättigter Atmosphäre stehen, damit keine Konzentrationsänderung eintritt.

Nach Ablauf der für den Tötungswert vorgesehenen Versuchszeit wird das Gift, welches während dieser Zeit durch die Collodiummembran hindurch auf die Pilzsporen zur Wirkung kam, durch Ausgießen entfernt, das Innere des Glasringes mit destilliertem Wasser beschickt und mehrmals mit diesem ausgewaschen, bis ein chemischer Nachweis des Giftes in dem Wasser nicht mehr möglich ist. Auch dann wird zur Sicherheit noch mehrere Male ausgewaschen. Die Botrytissporen befinden sich nach wie vor auf der Außenfläche der Collodiumhaut; man hat nur dafür Sorge zu tragen, daß sie bei dem Auswaschen nicht durch Unachtsamkeit von der Membran abgewischt werden. Nunmehr wird Nähragar, der eben noch flüssig ist, in den oberen Glasring eingegossen, nach Erstarren dieser umgedreht und in feuchter Kammer bei 24° zur Nachkultur hingestellt. Diese Anordnung ermöglicht es, fortlaufend die Sporen auf der Collodiummembran unter dem Mikroskop bei schwacher und starker Vergrößerung kontrollieren zu können, ohne daß irgendwelche Abimpfungen und Überführungen wie bei der Filtermethode notwendig sind. Vielmehr verbleiben während der ganzen Dauer des Tötungswertversuches und der Nachkultur die Sporen an einer Stelle.

Zu Zwecken einer Nachkultur bei Tötungswertversuchen mittels der Membranfiltermethode sind die Sporen von der Oberfläche der Membranfilter mit einem Tropfen Wasser aufzunehmen und auf Nähragar in kleinen Petrischalen auszustreichen. Hat man an Stelle der Membranfilter gewöhnliche Hartfilter benutzt, so müssen diese auf der Agaroberfläche mit der von Sporen bedeckten Seite abgedrückt werden, wobei immerhin eine genügende Menge Sporen meistens auf der Agaroberfläche haften bleibt; ist dieses nicht der Fall, so werden solche Filter in toto mit den auf ihnen befindlichen Sporen in Nährösung (Reagensrohr mit 2 ccm Nährflüssigkeit) überführt. Von Tag zu Tag wird, was allerdings nur bei den auf Agar angelegten Kulturen sich durchführen läßt, mikroskopisch überprüft, ob eine Keimung von Sporen noch eintritt oder nicht. Unterbleibt die Keimung selbst innerhalb eines Zeitraumes von 10 Tagen, so kann der Versuch abgebrochen werden, und die Sporen können als durch den Tötungsversuch getötet angesehen werden. Tritt anderseits eine Keimung der Sporen, wenn auch nur zu einem geringen Bruchteil, noch auf, so ist der Versuch negativ ausgefallen, d. h. die zu dem Versuch angesetzte Zeitdauer bei gegebenem Gehalte des Giftes hat noch nicht genügt, um die Sporen zu töten. Es wird daher der Tötungswertversuch durch Verlängerung der Einwirkungsdauer des Giftes solange fortgesetzt, bis der gewünschte Effekt, vollständige Abtötung aller der Giftwirkung ausgesetzten Sporen, erzielt worden ist.

Für den Hemmungswertversuch, und zwar den absoluten sowohl als für den relativen, müssen dem Testobjekt, der Pilzspore, die notwendigen Nährstoffe von vornherein geboten werden; denn es kann schlechterdings von einer Entwicklungsverhinderung = Verhinderung der Keimung nicht gesprochen werden, noch weniger von einer Entwicklungsbehinderung = Hemmung des Wachstums nach der Keimung, wenn nicht alle Voraussetzungen für die Möglichkeit von Keimung und Wachstum gegeben werden.

Mit der Darbietung der notwendigen Nährstoffe ist es aber allein noch nicht getan. Es sind vielmehr auch noch sämtliche Lebensbedingungen so zu gestalten, daß

<sup>7)</sup> Bechhold, Kolloide in Biologie und Medizin, S. 440 (1922).

<sup>8)</sup> Zsigmondy u. Bachmann, Z. anorg. Ch. 103, 119 [1918].

sie als optimale anzusehen sind. Dazu gehören für die auf alle äußeren Einflüsse so überaus fein reagierenden Pilzsporen neben dem Optimum der Temperatur auch noch ein günstiger physikalischer Zustand des Nährsubstrates; hinzu kommt die Sicherung des notwendigen Sauerstoffbedarfes.

Zur Kennzeichnung, wie berechtigt obige Forderungen sind, mögen kurz folgende der von mir angestellten Versuche wiedergegeben werden:

1. Versuche bezüglich des Einflusses der Temperatur. Nährmedium ist 10 ccm Asparaginagar. Temperatur 10° und 24°. Gehalt an Kupfersulfat 0,2—3 %. Bei dieser Versuchsanordnung wurden auf den mit dem Gifte beschickten Agarplatten 100 000 Botrytissporen in 0,1 ccm Wasser aufgeschwemmt und ausgestrichen. Es ergab sich, daß der absolute Hemmungswert des Kupfersulfates bei 24° erst bei 3 % Kupfersulfatgehalt des Nährbodens zu erzielen war, während bei 10° schon 2 % genügten, um denselben Effekt auszulösen. Der relative Hemmungswert wurde bei 24° mit einem Kupfersulfatgehalt von 1 % erzielt, wohingegen aber bei 10° hierfür schon 0,2 % Kupfersulfat ausreichten. Oder mit anderen Worten: Zur Erzielung des relativen Hemmungswertes wird bei 10° nur ein Fünftel der Kupfersulfatmenge benötigt wie bei 24°, und um den absoluten Hemmungswert zu erreichen bei 10° nur zwei Drittel der bei 24° benötigten Menge.

2. Versuche hinsichtlich des physikalischen Zustandes des Nährsubstrates. Botrytissporen keimen auf fester Unterlage wesentlich schneller und besser als im rein flüssigen Medium. Zum Beispiel ist eine Keimung leichter und schneller zu erzielen auf Agar ohne jeglichen Nährzusatz, als in Leitungswasser.

Eine andere Versuchsanordnung war folgende: Wasser mit einem Gehalt von 0,005 % Kupfersulfat wurde in die schon beschriebenen Gläsringe, die mit Collodiumhaut überzogen waren, eingegossen und mit Botrytissporen in der Weise beimpft, daß einmal die Botrytissporen außen auf die Collodiumhaut gebracht wurden, zum anderen aber auf die Wasseroberfläche. Es zeigte sich dann, daß die auf die Collodiumhaut aufgebrachten Sporen überall zur Keimung, wenn auch der Kontrolle gegenüber leicht gehemmt, gelangt sind, während die auf der Wasseroberfläche schwimmenden Sporen nur erst zu 25 % gekeimt waren.

3. Versuche hinsichtlich der Verschiedenheit des Nährsubstrates. Die gleiche Anzahl Botrytissporen wurde unter sonst gleichen Bedingungen bei einem Gehalt von 0,2 % Kupfer in Wasser absolut gehemmt; auf 15 % Agar in destilliertem Wasser ohne jeglichen Nährzusatz trat eine starke relative Hemmung ein, in Nährlösung eine deutlich schwächere relative Hemmung und auf Nähragar eine kaum noch feststellbare.

Die je nach Art der Versuchsanstellung und der dabei dargebotenen Nährstoffe wechselnd ausfallenden Ergebnisse zwingen also dazu, sich für eine bestimmte Versuchsanordnung zu entscheiden. Mir scheint am praktischsten die Benutzung von Agarplatten mit den eingangs aufgeführten, wohl charakterisierten Nährstoffzusätzen. Man erhält allerdings bei Anwendung von Agar infolge von Adsorption eines Teiles des Giftes stets niedrigere Werte, als bei Verwendung flüssiger Medien. Man könnte deshalb ja beide Wege benutzen und einen Mittelwert konstruieren aus den gewonnenen Gesamtergebnissen, das würde aber doch die Versuche zu sehr komplizieren. Da anderseits die Agarplattenmethode beträchtliche Vorteile bietet hinsichtlich der Möglichkeit leichter, fortlaufender mikroskopischer Kontrolle, zugleich man aber weiß, daß man sicher nicht den Giftwert überschätzt, was ja für praktische Schlüssefolgerungen wichtig ist, so dürfte diese Methode doch wohl vorzuziehen sein. Um so mehr, als es sich stets nur um relative Werte handeln kann; und zwar, einmal relativ zu dem gegebenen Nährboden, dann aber auch relativ zu dem gewählten Testobjekt. Dieses muß immer festgehalten werden, will man sich über den Giftwert einer Substanz einigen. Stelle

ich also nach obigen Verfahren den Giftwert einer Substanz fest, so kann und soll das selbstverständlich immer nur heißen: Die Substanz x hat den Tötungswert y, den absoluten Hemmungswert  $y_1$  und den relativen Hemmungswert  $y_2$  gegenüber Botrytissporen auf Asparaginagar kultiviert bei 24°.

Die Versuchsanstellung für die Hemmungswertversuche ist eine einfache. In sterile Petrischalen werden 10 ccm eines Agarnährsubstrates von der genannten Zusammensetzung gegeben. Auf die Agaroberfläche wird nach dem Erstarren 0,1 ccm einer Aufschwemmung von 1 Mill. Sporen in 1 ccm sterilen Wassers mit der Platinöse gut verrieben und die so beschickten Platten in feuchter Kammer bei 24° hingestellt. In gleicher Weise werden die Giftplatten hergestellt, nur daß in dem noch flüssigen Agar zuvor die entsprechende Giftmenge gelöst wird.

Nach 24 Stunden wird die Giftschale erstmalig mikroskopisch untersucht, wobei die Schale nicht geöffnet zu werden braucht, sie wird umgedreht und durch den Boden hindurch werden mit mittleren Vergrößerungen die Sporen auf der Agaroberfläche aufgesucht. Sowie die ersten Keimfänge sichtbar werden, wird die Zeit festgestellt, die diese Sporen in der Keimung hinter denen der Kontrolle zurück sind; tritt nach zehn Tagen immer noch keine Keimung ein, wird der Versuch abgebrochen.

Der absolute Hemmungswert ist erzielt, wenn die Sporen innerhalb einer Beobachtungsdauer von zehn Tagen bei optimalen Bedingungen nicht ausgekeimt sind. Ein Gift hat den Hemmungswert 1, wenn 1 % die Sporenekeimung verhindert, 0,1 hat den absoluten Hemmungswert 10, 0,9 = 1,1, 0,5 = 2 usw.

Der relative Hemmungswert, d. h. der hemmende Wert eines Giftes in Beziehung zur Kontrolle ohne Gift, ist nach 24 Stunden festzustellen. Der relative Hemmungswert ist gleich 1000, wenn 0,001 % die Keimung der Sporen um 24 Stunden verzögern kann, gleich 10, wenn 0,1 und gleich 1, wenn 1 % des Giftes dazu benötigt werden. Geht man umgekehrt von einer bestimmten Giftkonzentration aus, wie ich das aus praktischen Erwägungen für die Ausmittelung von Pflanzenschutzmitteln auch beim Tötungswert vorgeschlagen habe (l. c.), so würden sich folgende Wertziffern ergeben: Giftkonzentration 1 %. Wird die Keimung der Sporen gegenüber der Kontrolle um 10 Tage verzögert, so ergibt sich die Wertziffer 1, 9 Tage die Wertziffer 0,9, 1 Tag die Wertziffer 0,1 usw.

Zusammenfassend ergibt sich also: Der fungizide Wert einer Substanz wird für den Pilz *Botrytis cinerea* mit 10 000 Sporen je Kubikzentimeter festgestellt. Es wird der Tötungswert und der Hemmungswert bestimmt. Als Ausgangskonzentration für den Tötungswertversuch wird diejenige Konzentration des Giftes gewählt, die bei optimalen Bedingungen absolute Hemmung hervorruft. Je näher die zur Sporentötung benötigte Konzentration an die zur Erzielung einer absoluten Hemmung notwendige heranrückt, um so giftiger ist die untersuchte Substanz.

Der absolute Hemmungswertversuch (Verhinderung der Keimung) und der relative Hemmungswertversuch (Behinderung der Entwicklung) werden bei optimalen Lebensbedingungen für den Pilz vorgenommen. Die experimentell erhaltenen Daten werden in Wertziffern festgelegt, womit, im Verein mit dem erhaltenen Tötungswert die Fungizität eines Stoffes gegenüber *Botrytis cinerea* dann genügend bestimmt sein dürfte.