

# Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle\*

Von HERMANN KÖLBEL

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen und Technischen Hochschule Hannover  
(Z. Naturforschg. 2 b, 382—392 [1947]; eingegangen am 28. April 1947)

Ausgehend von den experimentellen Befunden Struggers (1940) über die Acridinorange-Fluochromierung lebender und toter Zellen wurden die physikalisch-chemischen Grundlagen dieses optisch sehr interessanten Farbstoffes und seiner Speicherung in lebenden und toten Zellen ermittelt. Die qualitativen Angaben Struggers konnten durch quantitative kolorimetrische Messungen voll bestätigt werden. Darüber hinaus wurde gefunden, daß das erhöhte Speichervermögen des toten Protoplasten durch eine Verschiebung des  $IEP_M$  des Protoplasmas verursacht wird. Diese ist der Ausdruck für eine bestimmte strukturelle Änderung des lebenden Substrates, welche beim Absterben eintritt. Kataphoretische Untersuchungen an lebenden und toten Hefezellen bestätigten dieses Ergebnis und zeigten weiterhin, daß der Farbstoff elektrostatisch gebunden wird. Bei dieser Gelegenheit wurde die Methodik kataphoretischer Untersuchungen an einzelnen Zellen verfeinert. Wie qualitative spektroskopische Untersuchungen des Acridinorange in wäßriger Lösung ergaben, wird die unterschiedliche Fluoreszenzfarbe verschieden konzentrierter Lösungen durch selektive Löschung der kurzwelligeren Fluoreszenzbande oder deren Verschiebung in das längerwellige Gebiet hervorgerufen. Die außerordentlich große fluoreszenzmikroskopische Nachweisempfindlichkeit des Acridinorange konnte rechnerisch ermittelt werden. Außerdem konnte die große Affinität des Farbstoffions zu negativ geladenen Gruppen des Plasma-Eiweißes auf Grund einer gegenseitigen morphologischen Abstimmung aufgezeigt werden.

Der basische Fluoreszenz-Farbstoff Acridinorange bietet nach den Untersuchungen Struggers<sup>1</sup> die Möglichkeit, lebende und tote Zellen im angefärbten Zustand fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden. Da totes Cytoplasma erheblich mehr Farbstoff aufnimmt als lebendes, und sich gleichzeitig damit die konzentrationsabhängige Fluoreszenzfarbe des Acridinorange von Grün nach Rot ändert, lassen sich die im mikroskopischen Bild befindlichen Protoplasten durch einen einmaligen Färbungsprozeß eindeutig als lebend bzw. tot ansprechen (vergl. auch Strugger<sup>2</sup>). Der Färbungsvorgang wurde als elektrostatische Kationenadsorption gedeutet und die erhöhte Speicherung der toten Zellen als Folge einer Destruktion des submikroskopischen Aufbaues des Protoplasmas, welche die Voraussetzung für eine größere Adsorption des Farbstoffes schafft. Je nach der elektrischen Ladungsverteilung

(in der Zellmembran und dem Cytoplasma) und den Löslichkeitsverhältnissen (in den Zellsafträumen und den lipoiden Phasen) kommt eine mehr oder minder starke Anfärbung zustande.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Zellen quantitativ zu messen und die physikalisch-chemischen Grundlagen für das Zustandekommen der Speicherung sowie des „Konzentrationseffektes“ zu klären.

Als *Meßmethode* für die Farbstoffspeicherung eignete sich am besten die kolorimetrische Bestimmung der Restlösung. Das zu färbende Substrat wurde zunächst in die mit Phosphat-Puffer auf einen bestimmten  $pH$ -Wert eingestellte Farblösung eingebracht. Nach einer Färbedauer von jeweils 10 Min. wurde zentrifugiert und die Konzentration der überstehenden Restlösung kolorimetrisch bestimmt. Hierzu fand ein Duboscq-Kolorimeter von Leitz Verwendung. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration ( $C_{H^+}$ ) erfolgte mit der Wasserstoff-Elektrode und dem Ionometer von Lautenschläger.

1. Die Aufstellung der *kolorimetrischen Eichkurve* für Acridinorange in Wasser zur Prüfung des Beerschen Gesetzes ergab bis zu einer Kon-

\* Auszug aus der im November 1946 bei der naturwiss. Fakultät der T.H. Hannover eingereichten Diss.  
<sup>1</sup> S. Strugger, Jen. Z. Naturwiss. 73, 97 [1940].  
<sup>2</sup> S. Strugger, Z. Fleisch- u. Milchhygiene 54, 161 [1943/44].

centration von  $c=1,0 \cdot 10^{-3}$  Mol/l den geradlinigen Verlauf dieser Kurve. Bei höheren Konzentrationen bleibt das Produkt aus Schichtdicke und Konzentration nicht mehr konstant. Diese hier auftretende Anomalie steht zweifellos in Zusammenhang mit der Änderung der Fluoreszenzfarbe innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches. Die im folgenden zum Färben verwendeten Farbstofflösungen wurden in einer Konzentration von  $c=0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l hergestellt, welche etwa derjenigen entspricht, die Strugger<sup>1</sup> benutzte (1:10000).

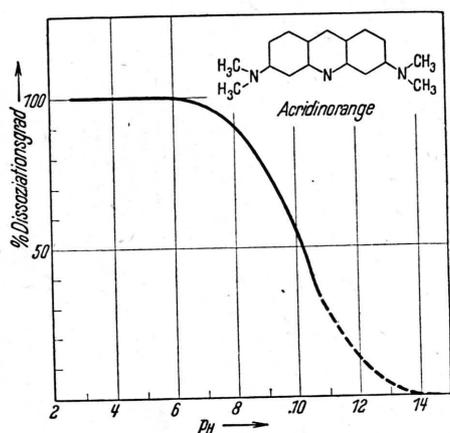


Abb. 1. Dissoziationskurve von Acridinorange in H<sub>2</sub>O, gemessen durch kolorimetrische Bestimmung der Farbtiefe.

2. Zur Klärung der quantitativen Speichervorgänge war es außerdem notwendig, den genauen Verlauf der Dissoziationskurve zu kennen. In der Literatur findet sich lediglich bei Jensen<sup>3</sup> eine Angabe über den „Fluoreszenzindikator Acridinorange“ (Umschlagsbereich:  $p_H$  8,4–10,4; Umschlagsfarben: farblos — gelbgrün). Diese Angaben sind bereits von Strugger<sup>1</sup> einer Kritik unterzogen worden. Die exakte kolorimetrische Bestimmung der Dissoziationskurve des Acridinorange ( $c=0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l) ergab den in Abb. 1 wiedergegebenen Verlauf. Danach ist der Farbstoff bis  $p_H$  6,5 vollständig dissoziiert. Beim Meßpunkt  $p_H$  10,8 war bereits ein kristalliner Niederschlag ausgefallen, so daß von hier ab die Messungen nicht mehr reale Werte ergaben.

3. Die Messung der Farbstoffspeicherung in Modellsubstanzen erschien zunächst grundlegend wichtig für die Beurteilung derjenigen in lebenden

und toten Zellen, da jene chemisch wesentlich definiertere Stoffe darstellen. So wurden als Modelle für die Zellmembran Verbandswatte (Cellu-

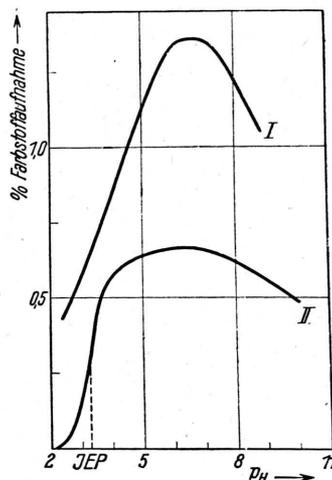


Abb. 2. Farbstoffspeicherung von Acridinorange ( $c=0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l) in Cellulose (I) und Gelatine (II).

lose) und für das Cytoplasma Gelatine (denaturierte Eiweißkörper) verwendet. Abb. 2 zeigt die Speicherkurven für diese beiden Substanzen. Ihr Verlauf wird bestimmt durch die Dissoziationskurve des Farbstoffes und durch die Kurve, welche die Größe der elektrischen Ladung bei veränderlicher  $C_H$  behandelt. Bei der Cellulose (I) würde Abb. 3 diese Verhältnisse schematisch wiedergeben. Der begrenzende Faktor für die Farbstoffaufnahme trotz steigender elektrischer Ladung

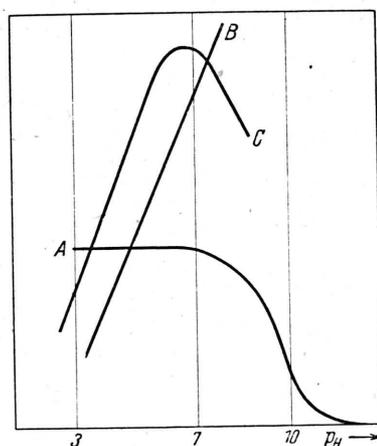


Abb. 3. Schematische Darstellung zum Zustandekommen der Speicherkurve für Cellulose. A: Dissoziation des Farbstoffes. B: Elektro-negative Ladung der Cellulose. C: Speicherkurve.

<sup>3</sup> K. A. Jensen, Z. analyt. Chem. 94, 177 [1933].

mit wachsender  $C_H$  ist somit der Abfall der Dissoziation des Farbstoffes. Das Maximum der Speicherung muß also bei  $p_H$  6,5 liegen. Bei dem gleichen Wert liegt auch das Speicheroptimum für die Gelatine (II). Ein auffälliger Unterschied ergibt sich beim Vergleich dieser Kurven: Entsprechend der stetigen Zunahme der elektro-negativen Ladung der Cellulose nimmt ebenso auch die Farbspeicherung zu; die Speicherung der Gelatine hingegen erfährt in dem Bereich um  $p_H$  3,3 eine fast sprunghafte Erhöhung. Dieser plötzliche Anstieg ist zurückzuführen auf die Überschreitung des isoelektrischen Punktes (IEP) der Gelatine, worauf bereits Pischinger<sup>4</sup> hingewiesen hat. Unterhalb des IEP sind die Eiweißkörper positiv geladen; es kann daher auch keine elektro-adsorptive Bindung mit dem Farbstoffkation erfolgen, doch tritt Imbibition ein, wofür die schwache Grün-Fluoreszenz der im extrem sauren Bereich (unter  $p_H$  3,3) gefärbten Gelatine spricht. Die kolorimetrische Messung der Farbstoffadsorption an Eiweißkörpern, die als Gel vorliegen, gestattet also, ihren IEP zu bestimmen (vergl. Drawert<sup>5</sup>).

4. Für die folgenden Messungen schien Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sehr geeignet, da sie gegen die Änderung der  $C_H$  verhältnismäßig resistent und für die geplanten kataphoretischen Versuche brauchbar ist.

Um den Unterschied der Farbstoffspeicherung zwischen lebenden und toten Zellen festzulegen, wurde eine Hefesuspension (Leitungswasser  $p_H$  7,0–7,2), die 0,1 g Hefe enthielt, mit Farbstofflösung zu 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, so daß die Konzentration des Farbstoffes in der Gesamtlösungsmenge wiederum  $0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l betrug. Die Differenz der Konzentration zwischen der gleichermaßen verdünnten ursprünglichen Farbstofflösung und der Restlösung ergab die aufgenommene Farbstoffmenge, deren prozentuale Angabe sich also auf 100 mg Hefe bezieht. Das Verhältnis von lebenden und toten Zellen wurde durch Auszählung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt, wobei sich ergab, daß frisches Material immer 95–98% lebende Zellen enthielt. Die toten Zellen wurden durch 3 Min. langes Eintauchen des mit der Hefesuspension gefüllten Meßkolbens in ein siedendes Wasserbad erhalten.

Es zeigte sich, daß die Farbstoffspeicherung vornehmlich der lebenden Zellen je nach Herkunft und physiologischem Zustand (Alter) recht unterschiedlich sein kann. So speichert z. B. hungernde, aber noch voll lebensfähige Hefe schon wesent-

lich mehr Farbstoff als frische. Folgende Zahlen mögen hier wiedergegeben werden:

- I a) Frische lebende Hefe speichert:  
0,5% Acridinorange,  
b) die gleiche Hefe, durch Hitze getötet, speichert:  
6,3% Acridinorange.
- II a) Ältere lebende Hefe speichert:  
3,3% Acridinorange,  
b) die gleiche Hefe, durch Hitze getötet, speichert:  
6,4% Acridinorange.

Mit Hilfe dieser Zahlen wurde die fluoreszenzmikroskopische Nachweispfindlichkeit des in Hefezellen adsorbierten Acridinorange bestimmt. In einer Zählkammer (Tiefe: 0,05 mm, ohne Rasterung) wurden die in üblicher Weise aufgeschwemmten und gefärbten Hefezellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Die seitliche Begrenzung des Gesichtsfeldes lieferte ein Ehrlichsches Zählkular, dessen Seitenlänge unter dem Mikroskop geeicht worden war. Durch Auszählung von je 50 Raumeinheiten von 4 Präparaten und Mittelung wurde die Zahl der in dem umgrenzten Raum befindlichen Hefezellen bestimmt. Mit Hilfe der oben angegebenen prozentualen Werte der Speicherung wurden hieraus die in nachfolgender Tabelle mitgeteilten Zahlen errechnet. Um die Reproduzierbarkeit nachzuprüfen, wurden beide Hefen (I u. II) ausgezählt.

		I	II
Anzahl der in einer Raumeinheit befindlichen Zellen		9	12
Gewicht von 1 Hefezelle		$450 \cdot 10^{-10}$ mg	$600 \cdot 10^{-10}$ mg
Speicherung	1 lebende Zelle (a)	$2 \cdot 10^{-10}$ mg	$20 \cdot 10^{-10}$ mg
	1 tote Zelle (b)	$27 \cdot 10^{-10}$ mg	$38 \cdot 10^{-10}$ mg

Aus diesen Werten läßt sich weiterhin die Anzahl der Moleküle berechnen, die eine Zelle aufgenommen hat und die somit ausreicht, um den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis zu ermöglichen. Das sind im Fall:

- I a)  $4,6 \cdot 10^8$  Moleküle Acridinorange,  
b)  $6,4 \cdot 10^9$  Moleküle Acridinorange;  
II a)  $4,5 \cdot 10^9$  Moleküle Acridinorange,  
b)  $8,8 \cdot 10^9$  Moleküle Acridinorange.

Beim Vergleich der Werte von I und II sieht man, daß sie größenordnungsmäßig übereinstimmen. Die wesentlich höhere Farbstoffaufnahme der lebenden Zellen im Fall II gegenüber I a ist auf das verschiedene Zellmaterial zurückzuführen. Diese Zahlen — auch wenn sie nur größenordnungsmäßig zu verstehen sind — veranschau-

<sup>4</sup> A. Pischinger, Z. Zellforschg. 3, 169 [1926].

<sup>5</sup> H. Drawert, Flora 32, 91 [1937].

lichen jedenfalls deutlich die große mikroskopische Nachweisempfindlichkeit eines fluoreszierenden Farbstoffes, ebenso wie den erheblichen Unterschied in der Speicherung von lebenden und toten Zellen, der in der Änderung der Fluoreszenzfarbe des gefärbten Plasmas (lebend: grün, tot: kupferrot) zum Ausdruck kommt. Diese Farbänderung hat ihre Ursache zweifellos, wie Strugger<sup>1</sup> bereits gezeigt hat, in der Anreicherung des Farbstoffes im toten Plasma („Konzentrationseffekt“). Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzmikroskopischen Nachweismethode ist nach den oben errechneten Werten in einer Tabelle von Staudinger<sup>6</sup> etwa

zustande kommt, konnte auch ein *Einfluß des Fixierungsmittels* auf die Höhe der Farbstoffspeicherung ermittelt werden. Folgende Tabelle zeigt die gefundenen Werte:

Fixierungsmittel	Farbstoffspeicherung in %
3 Min. 100° C . . . . .	6,4
96-proz. Alkohol . . . . .	7,9
n/l - HCl . . . . .	8,0
3 Min. 100° C + n/l - HCl . . . . .	8,0
1-proz. Osmiumsäure (OsO <sub>4</sub> ) . . . . .	9,2
3 Min. 100° C + 1-proz. OsO <sub>4</sub> . . . . .	10,0

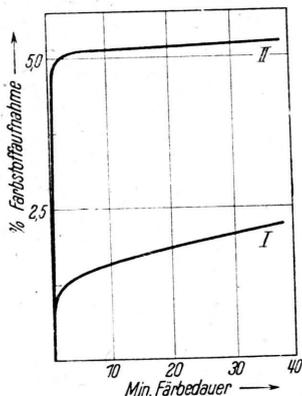


Abb. 4. Die Geschwindigkeit der Farbstoffspeicherung von Acridinorange ( $c = 0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l) in lebenden (I) und toten (II) Hefezellen.

zwischen geruchssinnlicher Wahrnehmbarkeit und der elektroskopischen Nachweismethode der Radioaktivität einzuordnen.

5. Auch die *Geschwindigkeit der Farbstoffaufnahme* bis zur Sättigung ist bei lebenden und toten Zellen, wie Abb. 4 zeigt, verschieden. Die volle Höhe der Speicherung in den abgetöteten Zellen wird schon in wenigen Minuten erreicht und steigt dann nur noch schwach an, während die Farbstoffaufnahme der lebenden allmählicher vonstatten geht. Bei den toten Zellen liegt im Gegensatz zu den lebenden ein offenes System vor, so daß die größere Geschwindigkeit der Farbstoffaufnahme verständlich wird.

6. Entsprechend der Auffassung, daß die erhöhte Speicherung des toten Cytoplasmas durch eine mehr oder minder weitgehende Zerstörung der ursprünglichen („lebenden“) Struktur der zusammengesetzten Eiweißkörper des Plasmas

Die unbehandelte Hefe nahm 4,0 % Farbstoff auf. Im Vergleich hierzu nahm unbehandelte Gelatine 0,7% auf, während die Behandlung mit OsO<sub>4</sub> eine Erhöhung der Speicherung auf 0,9% ergab. Bemerkenswert ist die hohe Farbstoffspeicherung nach Einwirkung des OsO<sub>4</sub>, welches als starkes Zellgift bekannt ist. Es wäre interessant, nachzuweisen, ob die Höhe des Farbstoffaufnahmevermögens in einer gesetzmäßigen Abhängigkeit von der Stärke eines Zellgiftes steht, etwa in der Form, daß starke Giftwirkungen auch eine entsprechend hohe Farbstoffaufnahme zur Folge haben. Die Entscheidung hierüber soll einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

7. In Fortführung der Untersuchungen über die *Abhängigkeit der Speicherung von der C<sub>H</sub> der Farbstofflösung* wurde lebende und abgetötete Hefe in üblicher Weise gefärbt und die Farbstoffaufnahme kolorimetrisch gemessen. Um eine größtmögliche Genauigkeit der Messungen zu erzielen, wurde nach folgendem Arbeitsschema verfahren:

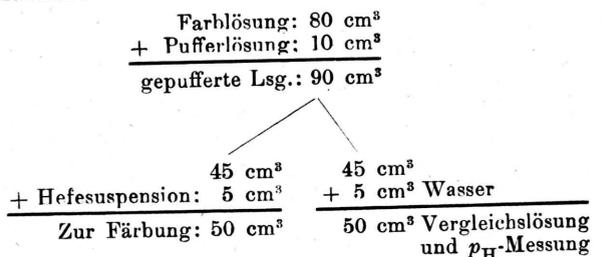


Abb. 5 gibt den Verlauf der beiden Speicherkurven wieder. Die tote Hefe wurde mit Farbstofflösungen gefärbt, die mit gewöhnlichem destilliertem Wasser hergestellt worden waren, während die lebenden nur in solchen ungeschädigt blieben, die mit Leitungswasser angesetzt wurden. Interessant

<sup>6</sup> H. Staudinger, Tabellen, Braun-Verlag, Karlsruhe 1935.

war dabei die Beobachtung, daß mit steigendem  $p_H$  die Giftwirkung („oligodynamische Wirkung“) des in Kupfergefäßen destillierten Wassers ebenfalls zunahm. Ähnlich wie bei der gefundenen Speicherkurve für die Gelatine zeigt sich auch hier ein enger  $p_H$ -Bereich, in welchem die Farbstoffaufnahme eine plötzliche Erhöhung erfährt. Der Mittelwert dieses Bereiches, welcher identisch ist mit dem Mittelwert aller isoelektrischen Punkte ( $IEP_M$ ) der Zelleiweißkörper und damit den Umladungspunkt des Protoplasten darstellt, liegt bei der

lebenden Hefezelle um  $p_H$  6,2 und bei der hitzegetöteten „ um  $p_H$  4,8.

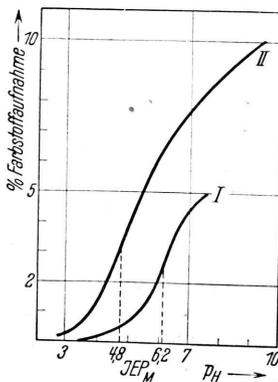


Abb. 5. Farbstoffspeicherung von Acridinorange ( $c = 0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l) in lebenden (I) und toten (II) Hefezellen.

Die Denaturierung des lebenden Protoplasmas hat also eine Verschiebung des  $IEP_M$  in das saure Gebiet hin zur Folge und das unterschiedliche Speichervermögen des lebenden und toten Plasmas findet mit in dieser Tatsache seine Begründung, wie weiter unten noch näher ausgeführt werden wird.

Abweichend von der Speicherkurve für die Gelatine zeigt sich die auch im alkalischen Bereich noch ständig steigende Farbstoffaufnahme der Hefezellen. Der Grund hierfür könnte sein, daß die in der Hefe vorhandenen Lipide die undissoziierten Farbstoffmoleküle aufzunehmen vermögen.

8. Um weiterhin zu beweisen, daß die Farbstoffaufnahme von Hefezellen auf einer *elektrostatichen Bindung des Farbstoffkations* an das negativ geladene Plasma-Eiweiß beruht, wurden Versuche angestellt, die bei Änderung der  $C_H$  nach

erfolgter Färbung auch eine Änderung in der Größe des Farbstoffspeicherungsvermögens zeigen sollten.

Abgetötete Hefe wurde zunächst oberhalb ihres  $IEP_M$  ( $> p_H$  4,8) angefärbt (1. Färbebad), dann in einer Pufferlösung, deren  $p_H$  unterhalb des  $IEP_M$  ( $< p_H$  4,8) lag, ausgewaschen (1. Auswaschbad) und hierauf wiederum in einer Farblösung, mit gleichem  $p_H$  wie die erste, angefärbt (2. Färbebad). Diese neuerdings gefärbte Hefe sollte nun in eine ungefärbte Pufferlösung überführt werden, deren  $p_H$  diesmal aber dem der Farblösung, in der sie gefärbt wurde, entsprach (2. Auswaschbad). Nach jeder Färbung bzw. Auswaschung, die in jedem Fall 10 Min. lang vorgenommen wurde, folgte die Abzentrifugierung der Zellen. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

	$p_H$	0,05 g Hefe haben
1. Färbebad . .	6,8	aufgenommen: 0,0039 g
1. Auswaschbad	2,4	abgegeben: 0,0034 g
2. Färbebad . .	6,8	aufgenommen: 0,0042 g
2. Auswaschbad	6,2	abgegeben: 0,0004 g

Es zeigt sich also, daß der oberhalb des  $IEP_M$  aufgenommene Farbstoff fast quantitativ wieder abgegeben wird, wenn die Auswaschlösung ein  $p_H$  besitzt, das eine Umladung des Adsorbens zur Folge hat. Daß ein geringfügiger Rest in der Zelle verbleibt, war zu erwarten, da ja nicht die gesamte Zellsubstanz als Ampholyt anzusprechen ist und beispielsweise die Anfärbung der Zellmembran auch in diesem extrem sauren Bereich erfolgt. Bei der erneuten Anfärbung ergibt sich, daß die Zelle etwa die gleiche Menge Farbstoff wieder aufnimmt, die sie vorher abgegeben hat. Der 2. Auswaschversuch zeigt, daß der Farbstoff trotz des hohen Konzentrationsgefälles zwischen Zelle und umgebendem Medium fest gebunden bleibt. Die in diesem Falle erfolgte geringe Abgabe des Farbstoffes entspricht ganz dem Unterschied im  $p_H$  zwischen Farb- und Auswaschlösung.

Durch diese Versuche wird eindeutig bewiesen, daß die Art der Bindung des Farbstoffes an das Adsorbens elektrostatischer Natur sein muß. Die Größe der elektrischen Ladung aber ist nicht allein maßgebend für die der Speicherung, wie Vergleichsmessungen mit dem gleichfalls basischen Fluoreszenzfarbstoff *Auramin* ergaben und aus folgendem Protokollauszug hervorgeht:

Hefezellen	Farbstoffaufnahme	
	Auramin Mol.-Gew. 271 in %	Acridinorange Mol.-Gew. 265 in %
lebend . . . . .	1,0	3,1
tot . . . . .	1,5	6,7
vorgefärbt mit Auramin . . . . .	1,0	
nachgefärbt mit Acridinorange . .		4,0

Somit kann die Anfärbung auch nicht eine bloße Absättigung der elektrischen Ladung durch die Farbstoff-Ionen bedeuten, sondern es müssen noch andere Faktoren wirksam sein, die in sterischen oder anderen spezifischen Verhältnissen zu suchen sind. Jedenfalls ist die „Affinität“ des Acridinorange zum Eiweißmolekül eine auffallend große, was auf eine besondere morphologische Abstimmung schließen läßt.

9. Um einen weiteren Einblick in die elektrischen Verhältnisse der lebenden und toten Hefezelle im ungefärbten und gefärbten Zustand zu gewinnen, wurden *Mikro-Kataphorese-Versuche* mit Hefezellen durchgeführt. Sie sollten gleichzeitig eine Bestätigung der bisherigen Versuchsergebnisse erbringen.

Als Kataphorese-Kammer diente nach *Yamamoto* und *Ishii*<sup>7</sup> ein Objektträger, auf den entsprechend geschnittene Deckgläschen aufgeklebt wurden, so daß ein abgeschlossener Trog entstand. Die unpolarisierbaren Elektroden wurden nach *Gicklhorn* und *Umrath*<sup>8</sup> mit folgender Abänderung hergestellt: Die metallischen Zuführungsdrähte wurden zu einer Spirale aufgewickelt und das rechtwinklig gebogene Glasröhrchen nur als Gießform benutzt, aus der die Spirale mit der erstarrten, festhaftenden KCl-Agar-Gallerte vorsichtig herausgezogen wurde. Eine so hergestellte Elektrode erwies sich als sehr geeignet, da die sich bildenden Gasbläschen augenblicklich nach außen traten, ohne die Spitze der Elektrode merklich zu erschüttern. Zur besseren Handhabung der Elektroden wurden diese in die Manipulationsstifte des *Zeißschen* Gleit-Mikromanipulators gesteckt, was eine erhebliche Erleichterung der einzelnen Operationen bedeutete. Um Spannung und Stromstärke entsprechend den günstigsten Bedingungen (85 V — 3 mA) variieren zu können, wurde die Potentiometer-Schaltung verwendet. Da sich bei der mikroskopischen Beobachtung schon die Atemluft auf die Bewegung der suspendierten Teilchen auswirkt,

<sup>7</sup> G. Yamamoto u. T. Ishii, *Protoplasma* **19**, 194 [1933].

<sup>8</sup> J. Gicklhorn u. K. Umrath, *Protoplasma* **4**, 228 [1928].

wurde oberhalb des Objektivs eine Pappe angebracht, die den Tubus umschloß und so den Mikroskopierstich vor Luftströmungen schützte.

Bei den folgenden Versuchen wurden 0,15 g Hefe in 15 cm<sup>3</sup> Leitungswasser suspendiert. Hinzu kamen 10 cm<sup>3</sup> einer Pufferlösung und 25 cm<sup>3</sup> Leitungswasser bei der ungefärbten bzw. 25 cm<sup>3</sup> Farblösung bei der zu färbenden Hefe. Die Konzentration der Farbstoffstammllösung wurde so gewählt, daß den Hefezellen die gleiche Menge Farbstoff geboten wurde wie bei den vorhergehenden Färbversuchen. Beobachtet wurde in  $\frac{1}{5}$  oder  $\frac{2}{5}$  der Kammertiefe unter Berücksichtigung der von *Smoluchowski'schen* Formel:

$$D = d \left( \frac{1}{2} \pm \sqrt{\frac{1}{12}} \right),$$

wobei  $D$  die Kammertiefe ist, in welcher sich die Geschwindigkeit des Suspensionsmittels dem Grenzwert 0 nähert, und  $d$  die Gesamttiefe der Kammer. Doch konnte die Bewegung derjenigen Zellen, die sich an den Grenzflächen Glas-Flüssigkeit befanden, ebenfalls Aufschluß über den elektrischen Zustand der suspendierten Teilchen geben, da deren Wanderungsrichtung sich in jedem Fall als entgegengesetzt erwies, so daß diese zum gleichsinnig geladenen Pol wanderten. Auf diese Beobachtung, die nicht auf einem elektroosmotischen Effekt beruhen kann, wird weiter unten noch eingegangen.

a) Ungefärbte lebende Hefezellen. Die vorher auf ihren Lebenszustand fluoreszenzmikroskopisch untersuchte frische Hefe wurde, wie oben angegeben, in Pufferlösungen von verschiedenem  $p_H$  suspendiert. Die kataphoretische Untersuchung ergab in dem  $p_H$ -Bereich von 2,2—7,0 stets eine anodische Wanderung.

b) Ungefärbte tote Hefezellen. Lebende Hefe wurde 3 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und in Pufferlösungen von abgestuften  $p_H$  eingebracht. Auch hier wurde in dem gesamten  $p_H$ -Bereich von 2,8—6,4 nur eine anodische Wanderung beobachtet.

c) Gefärbte lebende Hefezellen. Lebende Hefezellen wurden in gepufferten Farblösungen angefärbt und der Kataphorese unterworfen. Dabei ergab sich, daß die Zellen unterhalb  $p_H$  6,3 zur Kathode und oberhalb 6,5 zur Anode wanderten. Durch Herstellen einer Pufferlösung, welche die Hefe bei einem  $p_H$  von 6,4 suspendiert enthielten, wurde eine  $C_H$  gefunden, bei welcher sich die Zellen bei Stromschluß nur wenig oder gar nicht bewegten. In diesem Punkt erwiesen sich die Zellen als elektroneutral.

d) Gefärbte tote Hefezellen. Die durch Erhitzen abgetötete Hefe wurde bei verschiedener  $C_H$  angefärbt und zeigte bei der kataphoretischen Untersuchung bis  $p_H$  4,8 kathodische und von  $p_H$  5,0 an anodische Wanderung. Bei  $p_H$  4,9 verhielt sich der größte Teil der Zellen indifferent, so daß keine ausgesprochene Bewegungsrichtung zu erkennen war.

In allen Fällen, in denen zunächst eine kathodische Bewegung oder ein Stillstand der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet worden war, trat in kurzer Zeit ( $\frac{1}{2}$  bis 5 Min.) nach Stromschluß

eine Umkehr der ursprünglichen Bewegungsrichtung bzw. eine allmählich beginnende Bewegung auf, so daß in jedem Falle eine anodische Wanderung resultierte. Beobachtet man nicht nur in  $\frac{1}{5}$  der Kammerhöhe, sondern auch die Bewegung der Zellen, die sich am Boden der Kammer befinden, so sieht man, daß sich diese — soweit sie nicht an der Glaswand fest haften — immer in entgegengesetzter Richtung bewegen (s. o.). Ist die Wanderung in  $\frac{1}{5}$  Kammerhöhe also zunächst eine kathodische, dann ist diejenige auf dem Kammergrund eine anodische; wird nun nach kurzer Zeit die Wanderungsrichtung in den mittleren Schichten, aus noch näher zu diskutierenden Gründen, anodisch, so tritt nach einer geringen Verzögerung auf dem Kammergrund eine kathodische auf. Hieraus geht hervor, daß es sich hier nicht um eine elektroosmotische Flüssigkeitsbewegung handeln kann, welche diejenige der suspendierten Teilchen überlagert. In einem solchen Fall müßte die überlagernde Bewegungsrichtung der Flüssigkeitslamellen, die sich an den beiden Glasgrenzflächen befinden, bei gleicher Stromrichtung erhalten bleiben, was aber im Fall zunächst kathodischer Wanderung nicht zutrifft. Hier scheint es sich vielmehr um Bewegungen zu handeln, deren Richtung in ursächlichem Zusammenhang mit derjenigen der suspendierten Teilchen in den mittleren Schichten steht und schematisch nach Abb. 6 zu verstehen ist.

Das auffallendste Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen ist die Tatsache, daß die ungefärbten Hefezellen keine Abhängigkeit der Wanderungsrichtung von der  $C_H$  des Dispersionsmittels ergeben, während die Wanderung der gefärbten Zellen je nach der  $C_H$  anodischer oder kathodischer Natur sein kann und bei dem  $p_H$ -Wert zum Stillstand kommt, der als  $IEP_M$  der Hefezellen bei den quantitativen Farbstoffspeicherungs-Messungen gefunden wurde. Der besseren Übersicht wegen seien die gefundenen Werte in folgender Tabelle nochmals angeführt:

Bestimmung des $IEP_M$ der Hefezellen	lebend $p_H$	tot $p_H$
Quantitative Farbstoffspeicherungs- messung . . . . .	6,2	4,8
Bestimmung der kataphoret. Wanderung . . .	6,4	4,9

Um eine Erklärung für die hier beobachteten Erscheinungen geben zu können, sei zunächst angenommen, daß für die Wanderung der ungefärbten Hefe allein die negative Ladung der Grenzfläche (Zellmembran) verantwortlich zu machen ist. Diese Ladung ist bei verschiedenem  $p_H$  verschieden groß, sie wechselt aber niemals ihr Vorzeichen und muß deshalb immer eine anodische Wanderung verursachen.

Werden nun lebende oder abgetötete Hefezellen in die gepufferten Farbstofflösungen eingebracht, so wird zunächst die Ladung der Zellmembran mit Farbstoffkationen abgesättigt. Eine Speicherung des Farbstoffes im Cytoplasma kommt nur dann zustande, wenn das  $p_H$  der Pufferlösung

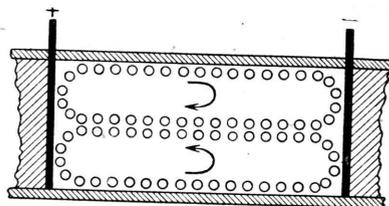


Abb. 6. Kataphorese-Kammer. Schematische Darstellung der verschiedenen Wanderungsrichtung in verschiedenen Tiefen der Kammer.

oberhalb des  $IEP_M$  des Plasmas liegt. Die elektrische Absättigung der Zellwand bedingt, daß nunmehr die freie Ladung des Plasmas zur Geltung kommt und die kataphoretische Wanderung bestimmt.

Wie oben ausgeführt, wurde in allen Fällen einer zunächst kathodischen Wanderung nach kurzer Zeit eine Umkehr der Bewegungsrichtung festgestellt. Diese Beobachtung ist in diesem Zusammenhang so zu verstehen, daß unter der Wirkung des elektrischen Feldes wiederum eine Trennung von Zellmembran und Farbstoffkationen eintritt und beide entgegengesetzt geladenen Anteile auch zu den entgegengesetzten Polen wandern. Jetzt wird also wieder die elektro-negative Ladung der Zellmembran wirksam und als Endzustand ergibt sich in jedem Falle die anodische Wanderung der Zellen.

Während also die vollständige Absättigung der elektrischen Ladung der Cellulosemembran durch die Acridinorange-Kationen möglich ist, muß für das Cytoplasma dagegen angenommen werden, daß die Bindung zwischen negativ geladenem Plasma und positiven Farbstoffionen niemals zu einer elektrischen Neutralität führt. Wäre diese

Absättigung auch in bezug auf das Cytoplasma möglich, so müßten die angefärbten Zellen bis zum  $IEP_M$  eine kathodische Wanderung zeigen — da die positive Ladung nicht abgesättigt werden kann —, bei höherem  $p_H$  dann aber bis zum Abfall der Dissoziation des Farbstoffes (bei  $p_H$  6,5) in Ruhe bleiben. Erst bei noch höherem  $p_H$  im alkalischen Gebiet dürfte eine anodische Bewegungsrichtung beobachtbar sein, da das neutrale Farbstoffmolekül die steigende elektrische Ladung des Plasmas nicht zu kompensieren vermag. In den untersuchten Fällen ist aber niemals ein breites  $p_H$ -Intervall aufgefunden worden, in welchem sich die Zellen unter Einfluß des elektrischen Feldes nicht bewegen.

Zellen	$p_H \sim 2$	$JEP_M$	$p_H \sim 7$
ungefärbt			
gefärbt			

Abb. 7. Schematische Darstellung der elektrischen Ladungsverhältnisse in Membran und Plasma der ungefärbten und gefärbten Zelle bei verschiedener  $C_H$  und im  $IEP_M$ .  $\oplus$  = Farbstoffionen.

Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten der Membran und des Plasmas ist in Verhältnissen zu suchen, die sterisch begründet werden müssen. Das Farbstoffion ist im Vergleich zu den submikroskopischen „Hohlräumen“ des Plasmas zu groß, als daß alle Stellen, die eine freie elektrische Ladung tragen, abgesättigt werden könnten. Das Plasma zeigt also im Gegensatz zur Membran auch im angefärbten Zustand oberhalb des  $IEP_M$  immer noch eine negative Rest-Ladung; das gilt für das lebende wie für das tote Plasma.

Die Bestimmung des  $IEP_M$  der Zellen im angefärbten Zustand kann keine exakten Werte ergeben, da ja bereits in diesem Punkt eine gewisse Farbstoffaufnahme stattgefunden hat (s. Speicherkurve), und zwar durch diejenigen Eiweißkörper, deren  $IEP$  am weitesten im sauren Bereich der isoelektrischen Zone ( $IEZ$ ) liegen. Durch diese geringfügige Absättigung mit Farbstoffionen muß bei der kataphoretischen Bestimmung der Wert für den  $IEP_M$  immer etwas zu hoch erscheinen. Berücksichtigt man diese Ver-

hältnisse, so gelangt man zu einer erstaunlichen Übereinstimmung der gefundenen Werte. — Zur Veranschaulichung der beschriebenen elektrischen Ladungsverhältnisse sind diese zeichnerisch in Abb. 7 dargestellt.

10. Um die oben gegebene Erklärung für das elektrische Verhalten der gefärbten und ungefärbten Hefezellen durch weitere experimentelle Ergebnisse zu stützen, wurden *kataphoretische Versuche mit Membran-Modellsubstanzen* durchgeführt. Für die in diesem Zusammenhang interessierenden Verhältnisse wurde zusammenfassend folgende Deutung gegeben;

- Die elektrische Ladung der Membran wurde verantwortlich gemacht für die anodische Wanderung der ungefärbten Zellen.
- Die von der  $C_H$  abhängige Wanderungsrichtung der gefärbten Hefezellen wurde zurückgeführt auf die elektrische Absättigung der Zellwand durch den Farbstoff, was als Voraussetzung für die Ladungsbestimmung des Plasmas erkannt wurde.
- Die Umkehr der Bewegungsrichtung gefärbter Zellen im Falle zunächst kathodischer Wanderung wurde gedeutet als eine unter der Wirkung des elektrischen Feldes vonstatten gehende Trennung des Farbstoffkations von der Zellmembran, die ihre Elektroneutralität wiederum aufgibt und die schließlich resultierende anodische Wanderung bestimmt.

Es war zunächst geplant, als Modellsubstanz wieder Cellulose zu verwenden. Doch scheiterten diese Versuche, da es nicht gelang, die Fasern (Verbandwatte) mit dem Mikrotom so weitgehend zu zerkleinern, daß sie suspendiert werden konnten. Da nach einer zusammenfassenden Darstellung von Brandt<sup>9</sup> die Zellwand der Pflanzhefe aus einer Polyose besteht, bei deren Abbau *d*-Glucose-Reste erhalten wurden, schien es berechtigt, auch andere Kohlenhydrate als Modellsubstanzen heranzuziehen. Verwendet wurde schließlich *Kartoffelstärke*. Die Stärkekörner sind wegen ihrer Größe zwar auch nicht längere Zeit in Suspension zu halten, doch konnten bei schnellem Arbeiten immer noch einige Körnchen schwimmend beobachtet werden. Außerdem konnten aus dem Verhalten der Stärke, die sich am Boden der Kammer befand, indirekte Schlüsse gezogen werden (vergl. o.).

- Die ungefärbte Stärke zeigte bei extrem saurem  $p_H$  der Pufferlösung eine sehr geringe anodische Wanderung, die mit steigender  $C_H$  und gleichbleibender Feldstärke immer intensiver wurde, was als Beweis für die stetige Zunahme der negativen Ladung zu gelten hat.

<sup>9</sup> K. M. Brandt, *Protoplasma* **36**, 77 [1941].

ad b. Die in verschiedenen Pufferlösungen angefärbte Stärke verhielt sich bei allen  $p_H$ -Werten im allgemeinen indifferent, was für die Absättigung der elektrischen Ladung spricht. In extrem sauren Gebieten bei entsprechend langer Anfärbungsdauer und auch bei höheren Farbstoffkonzentrationen wurde sogar eine geringe Wanderung einzelner Stärkekörner zur Kathode beobachtet. Dieses Verhalten ist auf eine zusätzliche Imbibition des Farbstoffes zurückzuführen und scheint unter Berücksichtigung der angegebenen Bedingungen verständlich.

ad c. Die Trennung des Farbstoffes von dem Stärkekorn unter der Wirkung des elektrischen Feldes konnte direkt fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Die 10–15 Min. lang angefärbte Stärke zeigte zunächst eine gelbrote Fluoreszenzfarbe und war bei angelegter Potentialdifferenz am Boden der Kataphorese-Kammer sedimentiert. Nach wenigen Minuten war unter der Wirkung des elektrischen Feldes ein Hellerwerden der Farbe bis zum Gelbgrün zu sehen, und gleichzeitig begannen die Stärkekörner sich langsam zu bewegen. Diese Bewegung wurde immer stärker mit dem Auftreten einer grünen Fluoreszenzfarbe, die als Ausdruck einer stetigen Abnahme der Farbstoffkonzentration im Stärkekorn zu werten ist, welche wiederum die Zunahme der elektrischen Ladung als Folge hat. Dieser Versuch ist sehr aufschlußreich für die in dieser Arbeit behandelten Probleme. Er zeigt sowohl den „Konzentrationseffekt“ als auch die elektro-adsorptive Natur der Farbstoffbindung, wie ebenfalls das elektrische Verhalten der Stärke als Modells substanz für die Zellwand.

Die Kationen aus den Puffersubstanzen, die außer den Farbstoffkationen in der Farblösung vorhanden sind, können keine Bindung mit dem Adsorbens eingehen, die zu einer Elektroneutralität führt, wie die kataphoretischen Untersuchungen an der ungefärbten Stärke und den gleichfalls ungefärbten Hefezellen ergaben. Die Farbstoffionen hingegen vermögen außer den elektrostatischen Anziehungskräften auch noch van-der-Waalsche Kräfte zu betätigen, worauf ihre größere Affinität beruht. Unter der Wirkung des elektrischen Feldes wird die Farbstoffspeicherung in der Stärke bzw. Zellmembran reversibel; ob dies auch für das Cytoplasma zutrifft, wurde nicht untersucht. Es erscheint jedenfalls wahrscheinlich, daß diese Farbstoffspeicherung physiologisch reversibel ist, da eine irreversible Blockierung der reaktionsfähigen Gruppen des lebenden Protoplasmas naturgemäß eine „Vergiftung“ darstellen würde, welche aber tatsächlich bei der Acridinorange-Fluochromierung nicht erfolgt.

11. Eine tabellarische Zusammenstellung der in der Literatur mitgeteilten Werte für den IEP der Hefezellen geben Yamahara und Ishii<sup>7</sup>. Hier nach stimmen die von Pfeiffer<sup>10</sup> durch Kataphorese bestimmten Werte ( $p_H$  4,6–4,9) recht gut überein mit dem oben angegebenen für tote Hefezellen ( $p_H$  4,8). Die von Pearsall und Ewing<sup>11</sup> mitgeteilten Werte liegen erheblich niedriger ( $p_H$  3,1–3,3). Lepeschkin<sup>12</sup> dagegen gibt in einer anderen Arbeit auf Grund der Messung der Streureflection (Plotnikow-Effekt) den Umladungspunkt der Hefe um  $p_H$  6,8 an, welcher dem für lebende Hefezellen gefundenen nahekommt ( $p_H$  6,2). Keiner der genannten Forscher findet aber einen Unterschied im IEP zwischen lebender und toter Hefe. Dieser steht jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen außer Zweifel.

12. Nach den Versuchsergebnissen und den angestellten Überlegungen ist der Grund für die erhöhte Farbstoffaufnahme des toten Plasmas zurückzuführen auf die Verschiebung des IEP<sub>M</sub> in das saurere Gebiet. Da der „Konzentrationseffekt“ an allen bisher untersuchten Protoplasten experimentell nachgewiesen werden konnte, muß dieser Vorgang beim Zelltod ein allgemeiner sein.

Die verantwortlichen Faktoren, welche die erhöhte Farbstoffspeicherung des toten Plasmas ermöglichen, sind folgende:

- a. Die größere negative Ladung, die sich im Vergleich zum lebenden Plasma bei gleicher  $C_H$  des Mediums ergibt und
  - b. die mit dieser „Negativierung“ einhergehende räumliche Auflockerung des Plasmas.
- ad a. Je größer der Unterschied zwischen dem IEP und dem  $p_H$  der Pufferlösung ist, um so größer ist auch die elektro-positive bzw. -negative Ladung des Eiweißkörpers, deren Erhöhung allerdings ihre Begrenzung durch die Zahl der dissoziierbaren basischen bzw. sauren Gruppen der in Peptidbindungen festliegenden trivalenten Aminosäuren findet.
- ad b. Die Änderung in der Lage des IEP<sub>M</sub> ist der Ausdruck für eine strukturelle Änderung der heterogen zusammengesetzten Plasma-Eiweißkörper, die dahingehend zu verstehen

<sup>10</sup> H. Pfeiffer, *Protoplasma* **15**, 590 [1932].

<sup>11</sup> W. H. Pearsall u. J. Ewing, *Brit. J. exp. Biol.* **2**, 347 [1925].

<sup>12</sup> W. Lepeschkin, *Protoplasma* **36**, 52 [1941].

ist, daß beim „Absterben“ des Plasmas Bindungen gelöst werden. Da diese Verschiebung zum sauren Gebiet hin erfolgt, müssen bei diesem Vorgang saure Gruppen frei werden, die im lebenden Zustand irgendwie festgelegt waren. Dieses Neuauftreten von sauren Gruppen (Ansäuerung absterbender Gewebe!; vergl. hierzu Lepeschkin<sup>13</sup>) läßt zwangsläufig den isoelektrischen Zustand des Plasmas bei einem niedrigeren  $p_H$  erreichen und bedingt gleichzeitig die zur erhöhten Speicherung notwendige Auflockerung des Systems.

Das empirisch gefundene Optimum der  $C_H$  zur Unterscheidungsfluochromierung von lebenden und toten Hefezellen liegt um  $p_H$  6,5. Nach dem oben Gesagten ist dieser Wert zwangsläufig als Optimum gegeben, da dieser Punkt gerade oberhalb des  $IEP_M$  des Plasmas der lebenden Zelle liegt und andererseits noch die vollständige Dissoziation des Farbstoffes ermöglicht. Die negative Ladung des lebenden Plasmas ist hier sehr gering, da der  $IEP_M$  eben überschritten wird, die des toten ist dagegen erheblich größer. Neben den besprochenen — mit diesen parallel gehenden — sterischen Gründen kommt so die unterschiedliche Farbstoffspeicherung zustande.

13. Die von Strugger<sup>1</sup> gegebene Erklärung für die unterschiedliche Fluoreszenzfarbe der mit Acridinorange angefärbten lebenden und toten Zellen ist durch die quantitativen Messungen voll bestätigt worden. Auf Grund der in den Tab. angegebenen Werte läßt sich die Konzentration des Farbstoffes in den Hefezellen berechnen. Es ergibt sich, daß diese in lebenden etwa 1:1900 und in toten 1:130 beträgt. In der Tat lassen sich schon in vitro unter der Quarzlampe — also im nicht adsorbierten Zustand — die gleichermaßen unterschiedlichen Fluoreszenzfarben nachweisen. Durch entsprechende Verdünnungen etwa in dem Bereich 1:100 bis 1:2000 lassen sich alle Übergangsfarbnuancen von grün bis rot beobachten. Diese grün-gelben bzw. gelb-roten Farbtöne der angefärbten Zelle sind charakteristisch für nekrobiotische Erscheinungen des Cytoplasmas, wie

<sup>13</sup> W. W. Lepeschkin, Zell-Nekrobiose und Protoplasma-Tod, Berlin 1937, S. 45 u. 73.

<sup>14</sup> S. Strugger, Flora 37, 73 [1943].

<sup>15</sup> G. Scheibe u. Mitarb., Z. angew. Chem. 49, 563 [1936]; 50, 51, 212 [1937]; 52, 631 [1939]; Kolloid-Z. 82, 1 [1938].

Strugger<sup>14</sup> parallel hierzu mit Hilfe von Mikrokulturversuchen zeigen konnte.

Eine qualitative Untersuchung der Fluoreszenzspektren von Acridinorange in verschiedenen konzentrierten wäßrigen Lösungen zeigt, daß die Schwingungsbanden im Grün und Gelb mit zunehmender Konzentration des Farbstoffes allmählich geschwächt und schließlich ganz gelöscht werden, während die Bande im roten Gebiet des Spektrums erhalten bleibt. Ob es sich hierbei um eine selektive Konzentrationsauslöschung der Fluoreszenz (vergl. Anthracen in Cyclohexan) oder lediglich um eine Verschiebung der Schwingungsbande in das längerwellige Gebiet handelt, müssen nähere Untersuchungen ergeben, die bereits von anderer Seite in Angriff genommen worden sind. Es kann im Zusammenhang mit den Untersuchungen Scheibes<sup>15</sup> vermutet werden, daß es sich hierbei um reversible Farbstoffpolymerisate handelt. Jedenfalls ist die unterschiedliche Fluoreszenzfarbe des angefärbten lebenden und toten Cytoplasmas auf diesen konzentrationsabhängigen Effekt zurückzuführen, welcher der Ausdruck ist für eine zunehmende wechselseitige Beeinflussung der fluoreszenzfähigen Farbstoffmoleküle bzw. -ionen mit der konzentrationsbedingten Verringerung ihres mittleren Abstandes voneinander.

14. Die Bestimmung des  $IEP_M$  des Plasmas eröffnet die Möglichkeit, die bisher im Vordergrund der biologischen Forschung stehende Bestimmung der aktuellen Reaktion zu einander in Beziehung zu setzen. Nimmt man einmal als Beispiel die Giftwirkung von H- oder OH-Ionen auf die lebende Zelle, so ist im obigen Sinne nicht der absolute Wert der  $C_H$  bzw.  $C_{OH^-}$  maßgebend für die tödliche Wirkung, sondern dieser Wert ist immer in Beziehung zum  $IEP_M$  des lebenden Protoplasten zu betrachten. Bleibt bei hohen H<sup>+</sup>- oder OH<sup>-</sup>-Werten der  $IEP_M$  erhalten, so ist zunächst keine Giftwirkung zu erwarten. Je weiter sich aber die aktuelle Reaktion vom  $IEP_M$  entfernt, um so instabiler wird das System des lebenden Eiweiß-Komplexes, und mit dessen struktureller Änderung setzt die Giftwirkung ein<sup>16</sup>.

Es ist wohl auch der Schluß berechtigt, daß alle definierten Lebensvorgänge der Zelle, wie sie z. B.

<sup>16</sup> Vergl. in diesem Zusammenhang eine umfangreiche Arbeit über den Einfluß der H-Ionen auf das Protoplasma von S. Strugger, S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. 135, 453 [1926]; 137, 143 [1928].

Wachstum und Teilung in ihren einzelnen Phasen darstellen, immer bei den gleichen  $p_H$ -Werten vor sich gehen müssen, die in ganz gesetzmäßiger Beziehung zum  $IEP_M$  des Protoplasten stehen. Diese gesetzmäßige Einstellung des aktuellen Aciditätsgrades muß Vorbedingung für den Ablauf eines jeden bestimmten Lebensprozesses sein, da einerseits der IEP als Ausdruck eines bestimmten chemisch-strukturellen Zustandes der Zell-Proteide zu gelten hat und andererseits mit der Änderung der aktuellen Reaktion auch die Änderung anderer physikalischer Eigenschaften parallel geht. Als solche Eigenschaften sind vor-

nehmlich zu verstehen: Elektrische Ladung, Permeabilität, sterische Verhältnisse usw.

Orientierende Versuche zeigten, daß beispielsweise das Optimum der Sproßfähigkeit der Hefe bei  $p_H$ -Werten liegt, die unterhalb ihres  $IEP_M$  zu suchen sind, in einem Bereich also, in welchem das Protoplasma eine überschüssige positive Ladung trägt.

Ähnliche Versuche über die Beziehung der aktuellen Reaktion zum  $IEP_M$  der Plasma-Eiweißkörper könnten zur Klärung komplizierter physiologischer Prozesse (biologische Eiweiß-Synthese) beitragen.

## MITTEILUNGEN

### J. A. Hedvall zum 60. Geburtstag

Am 18. Januar 1948 vollendet der Professor für angewandte Chemie und Direktor der Institute für angewandte Chemie und für Silikatforschung an der Technischen Hochschule Göteborg, Dr. Dr. phil. h. c. Dr.-Ing. e. h. Johan Arvid Hedvall, sein 60. Lebensjahr.

Bereits im Jahr 1911 begann er in seiner schwedischen Heimat mit Arbeiten über Reaktionen in festem Zustand, zu einer Zeit, in der durchweg derartige Reaktionen für unmöglich gehalten wurden, obwohl Tammann und Masing einige Jahre vorher die Reaktionsfähigkeit *fester Metalle* miteinander schon bewiesen hatten.

Die ersten Veröffentlichungen Hedvalls über dieses prinzipiell neue Gebiet fallen in das Jahr 1912 und betreffen die Bildung von Rinmanns Grün, Thénaards Blau und Bleu Céleste.

In dieser Zeit ging Hedvall für einige Zeit an das Laboratorium von Tammann in Göttingen und erwarb sich trotz anfänglicher Skepsis dieses Titanen der physikalischen Chemie gegen Hedvalls Arbeitsgebiet sehr bald nicht nur die wissenschaftliche Anerkennung, sondern auch die lebenslängliche Freundschaft Tammanns, welcher sehr bald die Reaktionen auch nichtmetallischer fester Stoffe für eine Reihe von Jahren in den Mittelpunkt seiner vielseitigen Forschungsarbeiten stellte.

Nach seiner Rückkehr nach Schweden bearbeitete Hedvall das Gebiet der Reaktionen in festem Zu-

stand wissenschaftlich und technisch nach den verschiedensten Richtungen hin weiter. Er schuf nicht nur parallel zu Arbeiten Tammanns exakte wissenschaftliche Beweise dafür, daß tatsächlich die feste Phase und nicht etwa beigemengte flüssige oder gasförmige Phasen reagieren, sondern er entdeckte auch viele neue Effekte, wie z. B. die Abhängigkeit der Reaktionsfähigkeit von der Flächenart des betreffenden Kristalles oder die in die Literatur als *Hedvall-Effekt* eingegangene Erscheinung, daß feste Stoffe dann besonders reaktionsfähig sind, wenn sie gerade irgendwelche Umwandlungen erleiden. Der hier zur Verfügung stehende Raum verbietet es, auf die vielen weiteren Resultate wissenschaftlicher und technischer Art einzugehen, welche Hedvalls sehr stark von Intuition geleitete Forschungsarbeit hervorbrachte.

Über 250 Veröffentlichungen aus der Feder J. A. Hedvalls bezeugen seine große wissenschaftliche Aktivität. Seine sehr erfreuliche geistige und körperliche Rüstigkeit, verbunden mit dem Umstand, daß ihm erst kürzlich ein neues Forschungsinstitut zur Verfügung gestellt wurde, lassen uns noch viele weitere Ergebnisse aus den von ihm geleiteten Arbeitsstätten erwarten.

Dem warmherzigen Idealisten J. A. Hedvall wünscht die Redaktion der Zeitschrift für Naturforschung zu seinem 60. Wiegenfest viel Glück und Erfolg auf seinem weiteren Lebensweg.

### Hundert Jahre Desinfektion

Ein Jahrhundert ist vergangen, seit zum ersten Male ein chemisches Mittel zur Bekämpfung einer ansteckenden Krankheit angewendet wurde. Der Deutsch-Ungar Ignaz Philipp Semmelweis (1818 bis 1865) war es, der im Jahre 1847 in der Geburtshilf-

lichen Klinik in Wien bei dem immer bedrohlicher um sich greifenden Kindbettfieber, dem viele Frauen zum Opfer fielen, auf den Gedanken kam, daß es die Ärzte selber seien, die mit ihren ungenügend gereinigten Händen das todbringende Gift übertrügen. Als