

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 19 (1928)

**Heft:** 1

  

**Artikel:** Orientierende Versuche über die antiseptische Wirkung von wasserlöslichen organischen Lebensmittelfarbstoffen

**Autor:** Schweizer, Ch. / Werder, J.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-984262>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 08.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

## LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

## TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE A BERNE

---

ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 10. —; für Mitglieder des Schweiz. Vereins analytischer Chemiker Fr. 5.— per Jahrgang  
Suisse fr. 10. —; pour les membres de la Société suisse des Chimistes analystes fr. 5.— par année  
Preis einzelner Hefte Fr. 1. 80. — Prix des fascicules fr. 1. 80.

---

BAND XIX

1928

HEFT 1

---

### Orientierende Versuche über die antiseptische Wirkung von wasserlöslichen organischen Lebensmittelfarbstoffen.<sup>1)</sup>

Von Dr. CH. SCHWEIZER.

(Aus dem Laboratorium des Eidgenössischen Gesundheitsamtes,  
Vorstand: Dr. J. Werder.)

---

#### 1. Einleitung.

Schon Behring<sup>2)</sup> war die antiseptische Wirkung gewisser Farbstoffe bekannt. Er beobachtete, dass 0,02%ige Lösungen von Methylviolett und Pyoktanin Milzbrand- und Diphteriebakterien abtöten, ebenso Cholera in 0,1%igen und Rotz in 0,75%igen Lösungen. Dahliablau und Cyanin sollen noch wirksamer sein, doch werden ihre Lösungen schnell zersetzt. Malachitgrün, das dagegen von grosser Haltbarkeit ist, besitzt eine ausserordentlich starke Wirksamkeit, da bereits 0,004%ige Lösungen Milzbrandbakterien und Choleravibrionen, 0,0125%ige Lösungen Rotzbakterien und 0,3%ige Lösungen Typhusbazillen zum Absterben bringen.

Von neueren Arbeiten seien nur diejenigen von Churchman<sup>3)</sup> erwähnt, welcher zuerst gezeigt hat, dass Gentianaviolett nur gegen grampositive Bakterien eine antiseptische Wirkung zeigt, nicht aber gegen gramnegative Organismen. In weiteren Versuchen hat dieser Verfasser<sup>4)</sup> auch Farbstoffe gefunden, welche sich gerade umgekehrt verhalten, wie z. B. Säurefuchsin.

---

<sup>1)</sup> Cf. Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft, II. Teil, S. 125 (1927).

<sup>2)</sup> Z. f. H., 9, 395 (1890).

<sup>3)</sup> J. Experimental Med., 16, 221 (1912).

<sup>4)</sup> Chimie und Industrie, 10, 212 (1923).

Es war nun naheliegend, auch die von der neuen Eidgenössischen Lebensmittelverordnung zugelassenen künstlichen organischen Farbstoffe auf ihre antiseptische Wirkung zu prüfen, um zu wissen, ob dieselben gleichzeitig als Konservierungsmittel wirken könnten. Die Liste dieser zulässigen Farbstoffe ist folgende:

Nr.	Handelsbezeichnung	Formel
1	Naphtogelb S	$\text{C}_{10}\text{H}_4 \begin{array}{l} \diagup \text{OH (Na, K)} \\ = (\text{NO}_2)_2 \\ \diagdown \text{SO}_3\text{H (Na, K)} \end{array}$
2	Säuregelb R	$\text{NaO}_3\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_2 \begin{array}{l} \diagup \text{SO}_3\text{Na} \\ -\text{NH}_2 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
3	Chrysoidin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{CH}_3 \begin{array}{l} \diagup \text{NH}_2 (\text{HCl}) \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$
4	Auramin O	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{NH})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$
5	Sudan I	$\text{C}_{10}\text{H}_6 \begin{array}{l} \diagup \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{OH} \end{array}$
6	Sudan G	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$
7	Fettgelb B	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2 ?$
8	Tropaolin 000 Nr. 1	$\text{C}_{10}\text{H}_6 \begin{array}{l} \diagup \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na} \\ \diagdown \text{OH} \end{array}$
9	Tartrazin	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{C}=\text{N} \\   \\ \text{C}-\text{CO} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na} \\ \diagdown \text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na} \end{array}$
10	Orange L	$\text{C}_{10}\text{H}_5 \begin{array}{l} \diagup \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2 \\ -\text{OH} \\ \diagdown \text{SO}_3\text{Na} \end{array}$
11	Fuchsin	$\text{Cl H}_2\text{N}=\text{C}_6\text{H}_4=\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \end{array}$
12	Säurefuchsin	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\   \\ \text{O}_3\text{S} \end{array} \text{C}_6\text{H}_3=\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagup \text{SO}_3\text{Na} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \\ \diagdown \text{C}_6\text{H}_3 \begin{array}{l} \diagup \text{SO}_3\text{Na} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array} \end{array}$

Nr.	Handelsbezeichnung	Formel
13	Roccelin	$\text{C}_{10}\text{H}_6 \begin{cases} \text{N}=\text{N}-\text{C}_{10}\text{H}_6-\text{SO}_3\text{Na} \\ \text{OH} \end{cases}$
14	Bordeaux- und Ponceaurot	$\text{C}_{10}\text{H}_4 \begin{cases} \text{N}=\text{N}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \\ \text{OH} \\ \text{SO}_3\text{Na} \end{cases}$
15	Neucoccin	$\text{C}_{10}\text{H}_4 \begin{cases} \text{N}=\text{N}-\text{C}_{10}\text{H}_6-\text{SO}_3\text{Na} \\ \text{OH} \\ \text{SO}_3\text{Na} \end{cases} \text{ (6,8)}$
16	Ponceau 3 R	$\text{C}_{10}\text{H}_4 \begin{cases} \text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{CH}_3)_3 \\ \text{OH} \\ \text{SO}_3\text{Na} \end{cases}$
17	Amaranth	$\text{C}_{10}\text{H}_4 \begin{cases} \text{N}=\text{N}-\text{C}_{10}\text{H}_6-\text{SO}_3\text{Na} \\ \text{OH} \\ \text{SO}_3\text{Na} \end{cases} \text{ (3,6)}$
18	Erythrosin	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4-\text{COONa} \\   \\ \text{J} \text{---} \text{HC}_6 \text{---} \text{C}=\text{C}_6\text{H}=\text{O} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{NaO} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{J} \\   \\ \text{J} \end{array}$
19	Eosin	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4-\text{COONa} \\   \\ \text{Br} \text{---} \text{HC}_6 \text{---} \text{C}=\text{C}_6\text{H}=\text{O} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{NaO} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{Br} \\   \\ \text{Br} \end{array}$
20	Spritlösliches Eosin	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4-\text{COOC}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{Br} \text{---} \text{HC}_6 \text{---} \text{C}=\text{C}_6\text{H}=\text{O} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{KO} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{Br} \\   \\ \text{Br} \end{array}$
21	Phloxin P	$\begin{array}{c} \text{Cl}_2=\text{C}_6\text{H}_2-\text{COOK} \\   \\ \text{Br} \text{---} \text{HC}_6 \text{---} \text{C}=\text{C}_6\text{H}=\text{O} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{KO} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{Br} \\   \\ \text{Br} \end{array}$
22	Anilinblau	$\text{HCl} \cdot \text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{C}_6\text{H}_4=\text{C} \begin{cases} \text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \text{CH}_3 \end{cases} \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{cases}$
23	Wasserblau	$\text{SO}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}=\text{C}_6\text{H}_4=\text{C} \begin{cases} \text{C}_6\text{H}_3 \begin{cases} \text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na} \\ \text{CH}_3 \end{cases} \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{Na} \end{cases}$
24	Alizarinblau	$\begin{array}{c} \text{CO} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}_6\text{H}_4 \quad \quad \quad \text{C}_6(\text{OH})_2-\text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CO} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH} \\   \\ \text{CH}=\text{CH} \end{array}$



sungen zu speichern vermag (Desinfektion), ist dies mit öliger Lösung nicht mehr der Fall (Fehlen der Desinfektion). Es besteht also auch kaum Aussicht, dass die fettlöslichen Farbstoffe in Fetten gelöst antiseptische Wirkungen haben und so neben dem Farbgeben die Speisefette auch gleichzeitig vor Mikroorganismenwachstum schützen könnten. Damit wäre ja allerdings auch nicht viel erreicht gewesen, denn nach Ritsert<sup>7)</sup> können auch sterile Fette ranzig werden.

Die übrigen Farbstoffe wurden von uns in wässrigen Lösungen 1:1000 oder bei geringerer Löslichkeit in gesättigten Lösungen verwendet. Die meisten waren in Wasser sehr leicht löslich, Nummern 4, 11, 14, 24, 26, 27 und 29 erst nach leichtem Erwärmen im Brutschrank; die Nummern 3, 10 und 13 hinterliessen auch nach dieser Behandlung einen schwachen Bodensatz. Da also bei dieser Konzentration einige der Farbstoffe bereits die Grenze ihrer Löslichkeit erreicht hatten, verzichteten wir vorläufig auch für die anderen auf die Verwendung von höheren Konzentrationen, mit Ausnahme einiger Abtötungsversuche, welche wir ganz am Schluss dieser Arbeit anführen werden.

## 2. Permeabilität.

Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung findet die Desinfektionswirkung im Inneren der Zelle statt, weshalb ein Antiseptikum also vor allem die Zellmembran zu durchdringen vermögen muss.

Nach den bekannten Untersuchungen von Overton<sup>8)</sup> verhalten sich tierische und pflanzliche Zellen beliebiger Herkunft gegenüber der Mehrzahl der organischen Stoffe erstaunlich gleichartig. Man begegnet in der Permeabilität immer wieder folgenden Abstufungen:

1. Rasch dringen ein: einwertige Alkohole, Aldehyde, Ketone, Aldoxime, Ketoxime, Mono-, Di- und Trihalogenkohlenwasserstoffe, Nitrile und Nitroalkyle, die neutralen Ester der organischen und anorganischen Säuren, viele schwache organische Basen und Säuren;

2. Langsamer dringen ein: zweiwertige Alkohole, Amide der einwertigen Säure;

3. Noch langsamer dringen ein: der dreiwertige Alkohol Glyzerin und die zwei Aminogruppen führenden Substanzen Harnstoff und Thioharnstoff;

4. Recht langsam diosmiert der vierwertige Alkohol Erythrit;

5. Am langsamsten diosmieren die sechswertigen Alkohole, die Hexosen, Aminosäuren und viele Neutralsalze der organischen Säuren und Basen, namentlich der Säuren mit kurzer Kohlenstoff-Kette.

<sup>7)</sup> Untersuchungen über das Ranzigwerden der Fette. Dissertation Bern (Professor Tschirch). 1890.

<sup>8)</sup> Pflügers Arch., **92**, 115 (1902).

Mit wachsender Zahl der Hydroxylgruppen verringert sich also offenbar das Eindringungsvermögen; den gleichen Einfluss übt die Anhäufung von Aminogruppen aus. Dagegen befähigt wachsende Halogensubstitution zu immer leichterem Eindringen, ebenso wirken Alkylierung oder Acetylierung an den für das Eindringen hinderlichen Hydroxyl- und Aminogruppen.

Bei den anorganischen Stoffen unterscheidet Overton:

1. Im allgemeinen dringen leicht ein: die nicht oder nur schwach dissoziierten Verbindungen Kohlensäure, Ammoniak, Wasserstoffperoxyd, Borsäure, wohl auch die elementaren Gase;

2. Nicht oder höchst langsam dringen im allgemeinen ein: die starken Elektrolyte, also Neutralsalze, Säuren und Laugen.

Bei den Mikroorganismen hat nun allerdings Alfred Fischer<sup>9)</sup> angenommen, dass die Salze eindringen. Er beobachtete nämlich, dass verschiedene Bakteriensorten in reinen Salzlösungen von bestimmter Konzentration plasmolysieren, dass aber schon innerhalb 20—30 Minuten, manchmal schon nach kürzerer Zeit, Deplasmolyse eintritt. Höber<sup>10)</sup> glaubt aber, dass man dagegen auf Grund der verschiedenen Beobachtungen an Pflanzenzellen einwenden könnte, dass die reinen Salzlösungen schädigen und die Permeabilität der Bakterien in unnatürlicher Weise steigern. Die Mikroorganismen würden sich also ganz wie die Zellen der höheren Pflanzen verhalten. Shearer<sup>11)</sup> hat allerdings festgestellt, dass sie insofern eine Abweichung zeigen, als die anfängliche und vorübergehende Widerstandsteigerung bei Einbettung in Lösungen der reinen Erdalkalichloride nicht zu konstatieren ist.

Bei der Hefe gelangte Paine<sup>12)</sup> zu dem Ergebnis, dass für Salze die Permeabilität nur gering ist, wenn sie nicht sogar bloss durch oberflächliche Adsorption vorgetäuscht ist.

Bei den nitratbildenden Bakterien hatte schon Winogradsky gefunden, dass Ammoniak ein ausgesprochenes Hemmungsmittel für die Atmung ist. Meyerhof<sup>13)</sup> fand sodann, dass dem Ammoniak viele Ammoniakderivate annähernd gleichkommen, nämlich die, welche, nach den Untersuchungen an Pflanzenzellen zu urteilen, in diese eindringen. Ausserdem fand Meyerhof, dass unter einer grösseren Zahl von anorganischen Salzen allein Borax eine stärkere Hemmung auf die Atmung ausübt, was offenbar auf das Eindringen der durch Hydrolyse in Freiheit gesetzten Borsäure, die als allgemein eindringende Substanz bekannt ist, zurückzuführen ist. Endlich entspricht auch das den allgemeinen Permeabilitäts-

<sup>9)</sup> Jahrb. wiss. Bot., 27, 1 (1895).

<sup>10)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 459 (1926).

<sup>11)</sup> Proc. Cambridge Philos. Soc., 19, 263 (1919).

<sup>12)</sup> Proc. Roy. Soc. London, Ser. B., 84, 289 (1912).

<sup>13)</sup> Pflügers Arch., 165, 229 (1916).

regeln, dass die nitrifizierenden Bakterien zur Assimilation von Kohlenstoff nur freie Kohlensäure, nicht Karbonate auszunutzen vermögen.

Wenn man nach Höber<sup>14)</sup> einen Blick zurückwirft auf die bisherigen Erfahrungen über die Permeabilität, so sind die verwandten Züge in der Permeabilität aller Zellen unverkennbar und rechtfertigen nachträglich die Voranstellung sogenannter Permeabilitätsregeln, wie sie zum ersten Male von Overton aufgestellt worden sind. Freilich gibt es auch Tatsachen, welche sich diesen Regeln nicht einfügen und insofern spezielle Eigentümlichkeiten einzelner Zellgattungen offenbaren. Endlich muss nach Höber aus den Versuchen mit anorganischen Salzen auch der Schluss gezogen werden, dass die Permeabilität für sie im grossen und ganzen bei gesunden Zellen gering oder gleich Null ist. Dem scheinen zwar zahlreiche Versuche zu widersprechen, namentlich Versuche an Pflanzenzellen. Aber hier begegnen wir der Salzpermeabilität in der Hauptsache nur bei Verwendung reiner Alkalisalzlösungen, die bei längerem Einfluss tödlich wirken, während die Permeabilität in Mischungen von Salzen, die den natürlichen Lebensbedingungen näher kommen, mindestens sehr viel kleiner ist. Das gleiche scheint für Mikroorganismen zu gelten. Ganz aus dem Rahmen der gewöhnlichen osmotischen Eigenschaften fallen nur die glatten Muskeln, die unbeschränkt durchlässig sein sollen. Regelwidrig ist auch die Durchlässigkeit der Froschniere für Kaliumchlorid.

Aus dem oben gesagten geht hervor, dass namentlich bei Salzen eine Abtötung der Zelle auch dadurch erreicht werden kann, dass die für Salze undurchlässige Membran der lebenden Zelle erst durch Schädigung durch ebendieselben Salze durchlässig gemacht werden kann.

Was nun die **Theorie der Membranpermeabilität** der lebenden Zelle anbetrifft, so können wir von vornherein nach dem Gesagten den Versuch ausschliessen, die Permeabilität auf Grund von chemischen Beziehungen zwischen Protoplasmaoberfläche und den mit ihr in Berührung kommenden gelösten Stoffen zu erklären; denn es vereinigen sich ja in den verschiedenen Gruppen der völligen, der relativen und der mangelnden Durchdringungsfähigkeit die heterogensten Stoffe hinsichtlich der chemischen Konstitution. Deshalb sind denn auch zur Grundlage der bisher aufgestellten Theorien vorwiegend physikalische oder physikochemische Faktoren herangezogen worden.

So hat Traube<sup>15)</sup> seine Niederschlagsmembran als von feinsten Poren durchsetzt gedacht, deren Durchmesser zwar gross genug sei, die Wassermoleküle durchzulassen, aber zu klein, um auch den Molekülen gelöster Stoffe die Passage zu erlauben. Aber schon Pfeffer und neuerdings Tinker haben darauf aufmerksam gemacht, dass neben der Poren-

<sup>14)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 500 (1926).

<sup>15)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., 87 (1867).

weite auch die Molekularkräfte berücksichtigt werden müssen, welche von den Porenwänden ausgeübt werden und sich in positiver oder negativer Absorption äussern können.

Lhermite<sup>16)</sup> hat zuerst den Versuch gemacht, die Durchlässigkeit einer Membran für Wasser und für gelöste Stoffe auf deren Löslichkeit in der Membransubstanz zurückzuführen. Nernst<sup>17)</sup> brachte sodann die Idee, dass die so verschiedene Permeabilität der Zellen für verschiedene Stoffe auf einer auswählenden Lösefähigkeit der Plasmahaut beruhen könnte. Aus dieser Annahme entwickelte Overton<sup>18)</sup> seine Lipoidtheorie, die sich folgendermassen zusammenfassen lässt: Die Zellen verhalten sich hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit für gelöste Stoffe so, als ob sie von einer fettartigen, von einer «lipoiden» Membran eingehüllt wären; «lipoidlösliche» Stoffe dringen darum in die Zellen ein, «lipoidunlösliche» können nicht hinein. Der Grad der Lipoidlöslichkeit bestimmt die Geschwindigkeit des Durchtritts durch die Plasmahaut. Die Diösmose erfolgt um so langsamer, je kleiner der Verteilungsquotient Lipoid:Wasser ist.

Overton hatte sich nämlich die Frage vorgelegt, welche physikalische oder physikochemische Eigenschaft allen Stoffen, die nach seinen zahlreichen Untersuchungen geschwind in die Zellen einzudringen vermögen, gemeinsam ist, und kam zu dem Schluss, dass die relative Löslichkeit in fetten Oelen das wesentlich Entscheidende sein könnte. Allerdings hat er nicht angenommen, dass die Grenzschicht der Protoplasten nach aussen aus Oel bestehe, sondern aus einer ölähnlichen Substanz, «Lipoid», und zwar vor allem, weil das physiologische Verhalten nicht in allen Fällen der relativen Löslichkeit in Oel entsprach, namentlich nicht bei den Farbstoffen. Diese sind nämlich in Oel vielfach unlöslich, obgleich sie «vital» färben. Auf der Suche nach Substanzen, die als Lipoid fungieren könnten, kam dann Overton zu der Annahme, dass die in den Zell-«Stromata» reichlich enthaltenen Lezithine und Cholesterin als Lipoide anzusehen wären, da sie gerade gegenüber den Farbstoffen vielfach den gewünschten Anforderungen entsprachen. Das Lösungsvermögen dieser Lipoide für Farbstoffe wurde von Overton, da Cholesterin und Lezithin in reinem Zustand fest sind, vor allem auf indirektem Wege so untersucht, dass die Lipoide in solchen organischen Lösungsmitteln gelöst wurden, die selber ein möglichst geringes Lösungsvermögen für Farbstoffe besitzen. Als solche Lösungsmittel eignen sich z. B. Benzol, Xylol, Toluol, Chloroform und nach Ruhland<sup>19)</sup> besonders gut Terpentinöl.

<sup>16)</sup> Ann. Chim. Phys. (3), **43**, 420 (1855).

<sup>17)</sup> Ztschr. physik. Chem., **6**, 37 (1890).

<sup>18)</sup> Vierteljahresschr. Naturf. Ges. Zürich, **40**, 1 (1895) u. **44**, 88 (1899).

<sup>19)</sup> Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., **46**, 1 (1908).

Man hat aber die lipoide Plasmahaut auch direkter zu imitieren versucht, indem man künstliche Lipoidmembranen herstellte und ihre Permeabilität mit derjenigen der Zellen verglich. Nach Höber<sup>20)</sup> ist man so nach manchen vergeblichen Versuchen zu Modellen gelangt, die in der Tat die Verhältnisse bei den Zellen widerspiegeln.

Aus den Untersuchungen von Hansteen Cranner<sup>21)</sup> wissen wir jetzt, dass tatsächlich die Zellhäute zahlreicher Zellen mit Lipoiden imprägniert sind. Diesen Schluss lassen auch die Versuche von Grijns<sup>22)</sup> und Hedin<sup>23)</sup> zu. Wenn man nämlich Blutkörperchen in einer isotonischen Kochsalzlösung suspendiert, so verändern sie sich auch dann nicht, wenn man etwas Aethylalkohol, Essigester, Aether oder etwas von einer anderen leicht permeierenden und öllöslichen Verbindung zusetzt. Dies gilt aber nur bis zu einer gewissen Maximalgrenze des Zusatzes; wird diese überschritten, so lösen sich die Blutkörperchen trotz der Kochsalzisotonie auf, es tritt «Hämolyse» ein, die sich im Austritt von Hämoglobin am auffälligsten äussert. Untersucht man in dieser Weise eine grössere Anzahl von organischen Verbindungen auf ihre hämolytische Kraft, so zeigt sich, dass das Hämolysevermögen an und für sich chemisch indifferenten Stoffe um so grösser ist, je grösser ihre Oel- bzw. Lipoidlöslichkeit. Diese Beobachtungen lassen sich wohl am naheliegendsten dadurch erklären, dass man annimmt, dass die hämolytischen Stoffe die lipoide Plasmahaut auflösen und dadurch den Zellinhalt frei diffusibel machen.

Nun kann aber die Plasmahaut keineswegs nur lipoides Lösungsmittel sein, denn ein besonders wichtiger Stoff, für welchen die Plasmahaut der lebenden Zelle permeabel sein muss, ist das Wasser. Dass die Annahme einer reinen Oelhaut den Wasseraustausch völlig ausschliesse, ist selbstverständlich; darüber war sich auch Overton klar. Lezithin aber könnte als hydrophiles Lipoid Quellwasser aufnehmen und von Wasser durchsetzt werden. Nathansohn<sup>24)</sup> hat aber darauf hingewiesen, dass, wenn Lezithin in Wasser quillt, ihm damit gleichzeitig auch die Fähigkeit verloren geht, allein für lipoidlösliche Stoffe durchgängig zu sein; vielmehr erlangt es jetzt auch die Fähigkeit, lipoidunlösliche Substanzen in sich aufzunehmen. Besonders gut soll sich dies mit Farbstoffen nachweisen lassen; nur ganz trockenes Lezithin, in Benzol gelöst, färbt sich allein mit lipoidlöslichen Farben; ist es feucht, so gehen auch wasserlösliche und lipoidunlösliche Farben mehr oder weniger in das Lezithin.

Die Zelle muss aber an ihrer Oberfläche Einrichtungen besitzen, um den Import und Export ihrer Bedarfs- und Abfallstoffe von sich aus

<sup>20)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 513 (1926).

<sup>21)</sup> Jahrb. f. wissenschaftl. Bot., **53**, 536 (1914) u. Ber. deutsche bot. Ges., **37**, 380 (1919).

<sup>22)</sup> Pflügers Arch., **63**, 86 (1896).

<sup>23)</sup> Pflügers Arch., **68**, 229 (1897) u. **70**, 525 (1898).

<sup>24)</sup> Jahrb. wissenschaftl. Bot., **39**, 607 (1904).

zu regulieren. Zur Rettung der Lipoidtheorie kann man sich an die Nathansohn'sche Mosaiktheorie halten, welche neben den lipoiden Elementen protoplasmatische Flächenstücke annimmt, welche das Substrat einer durch das lebende Plasma regulierbaren oder — wie Höber<sup>25)</sup> es nennt — «physiologischen Permeabilität» darstellen, die als Eigenschaft des lebenden Protoplasten zu der rein «physikalischen Permeabilität» infolge auswählender Löslichkeit hinzukommt. Vielleicht könnte man aber auch vermuten, dass die Kohlenstoffnahrung in Form des lipoidlöslichen Aldehyds und Stickstoff als ebenfalls lipoidlösliches Ammoniak in die Zelle eindringt, womit allerdings noch keine Erklärung für die Diösmose des Wasser gegeben wäre.

Verschiedene Beobachtungen an Pflanzenzellen, Mikroorganismen und Wassertieren lehrten, dass die Zellen sich, im Einklang mit der Lipoidtheorie, wie impermeabel gegenüber den Salzen verhalten, aber nur dann, wenn mehrere Salze in bestimmter den natürlichen Verhältnissen nahekommender Weise gemischt sind.

Gegen die reinen Salze weisen die Zellen dagegen eine zwar nicht grosse, aber doch deutliche Permeabilität auf, die von Salz zu Salz charakteristisch verschieden ist. Diese Permeabilität bildet nun aber nach Höber (p. 522) keineswegs einen Widerspruch mit der Lipoidtheorie, da sowohl die unterschiedliche Wirkung der einzelnen Salze wie die Wirkung der Salzgemische am besten darauf zurückgeführt werde, dass die Salze einen bestimmten kolloidalen Zustand in der Plasmahaut bedingen, von dem ihre Durchlässigkeit abhängt. Gerade die vorausgegangenen Erörterungen, die auf die Quellbarkeit des Lecithins als Lipoidkomponente der Plasmahaut und auf die Teilnahme von protoplasmatischen Komponenten (d. h. wohl auch an Eiweiss) am Aufbau der Plasmahaut hinweisen, begünstigen eine Vorstellung, nach der die Plasmahaut eben nicht bloss lipoides Lösungsmittel, sondern auch Kolloidmembran ist.

Traube<sup>26)</sup> hat darauf aufmerksam gemacht, dass es ausser der Lipoidlöslichkeit auch noch andere Eigenschaften der gelösten Stoffe gibt, welche ihrer Fähigkeit, die Zellen zu durchdringen, parallel gehen. In erster Linie führte er den Einfluss der Stoffe auf die Oberflächenspannung von Wasser gegen Luft an. In der Tat sind Verbindungen, welche im allgemeinen nicht merklich in die Zelle eindringen (Hexite, Hexosen, Disaccharide, Aminosäuren), oberflächeninaktiv. Langsam eindringende Substanzen (mehrwertige Alkohole und Säureamide) sind schon etwas aktiver, und die grosse Fähigkeit die Zellen zu durchdringen, die manchen Stoffen (einwertige Alkohole, Aldehyde, Aether, Ester organischer Säuren u. a.) eigen ist, geht Hand in Hand mit starker Oberflächenaktivität. Nehmen wir noch hinzu, dass der Oberflächenanreicherung an

<sup>25)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 521 (1926).

<sup>26)</sup> Pflügers Arch., 105, 541 (1904) u. 123, 419 (1908).

der Grenze zwischen Wasser und Luft oft die Oberflächenanreicherung an der Grenze zwischen Luft und flüssigen oder festen Stoffen, wie Tierkohle, Glaspulver oder Seide entspricht, so wird die Bedeutung von Traubes Hinweis noch einleuchtender. Ein weiterer Einfluss, welchen wasserlösliche Stoffe auf die Eigenschaften ihrer Lösungen ausüben, und welchem nach Traube die Permeabilität bis zu einem gewissen Grade symbar ist, ist die Verringerung der Löslichkeit, welche ein zweiter zugleich in der wässerigen Lösung befindlicher Stoff erfährt.

Traube hat aber für die Erklärung der Zellpermeabilität den Hauptnachdruck auf die Oberflächenaktivität gelegt, oder wie er sagt, auf den Haftdruck der Stoffe. Das Gibbs-Thomson'sche Theorem lehrt ja, dass, je mehr ein Stoff die Oberflächenspannung seiner Lösung erniedrigt, er sich um so mehr in ihrer Oberfläche ansammeln muss; er haftet dann also umsoweniger fest in der Lösung, sein Haftdruck ist um so kleiner. Die Oberflächenspannung der Lösungen gegen Luft, stalagmometrisch oder mit der Methode der kapillaren Steighöhe gemessen, ist nun in vielen Fällen ein brauchbarer Masstab für die Fähigkeit der gelösten Stoffe, die Zelloberfläche zu durchdringen, aber in allen Fällen trifft dies nicht zu.

Wenn also beispielsweise nach Höber<sup>27)</sup> die Aufnahme basischer und saurer Farbstoffe in die lebenden Zellen von ihrer Oberflächenaktivität in bezug auf die Grenzfläche Wasser—Luft ganz unabhängig vor sich geht, so könnte trotzdem die verschiedene Geschwindigkeit, mit der die basischen und sauren Farbstoffe die Zellen durchdringen, auf verschiedener Absorbierbarkeit am Protoplasma beruhen. Ferner üben nach Böeseken und Waterman<sup>28)</sup> die wässerigen Lösungen der drei isomeren Oxybenzoesäuren auf die Grenzflächenspannung gegen Luft keinen Einfluss aus; trotzdem ist die Permeabilität, gemessen an der Giftigkeit gegen Schimmelpilze oder an der von Meyerhof<sup>29)</sup> beobachteten Hemmung der Atmung nitrifizierender Bakterien, für die o-Oxybenzoesäure (Salizylsäure) weit grösser als für die m- und p-Verbindung. Dieser Unterschied kann vom Standpunkt der Lipoidtheorie ohne weiteres erklärt werden, da der Verteilungsfaktor Öl : Wasser nach Böeseken und Waterman bei der o-Verbindung viel grösser ist als bei der m- und p-Verbindung. Um diese Tatsachen auch der Absorptionstheorie der Permeabilität einzufügen, müsste man annehmen, dass auch die Absorbierbarkeit an der Grenzfläche Wasser — Protoplasma sich entsprechend abstuft, wobei sich dann von selbst wiederum die Vorstellung ergäbe, dass die absorbierende Protoplasmaoberfläche ölartige Beschaffenheit hätte. Wir würden also wieder bei einer Lipoidtheorie der Plasmagrenz-

<sup>27)</sup> Bioch. Ztschr., **67**, 420 (1914).

<sup>28)</sup> Versl. Akad. Wetensch. Amsterdam (1912); Kolloidztschr., **11**, 58 (1912).

<sup>29)</sup> Pflügers Arch., **165**, 229 (1916).

fläche landen, nur dass das Lipoid bei dieser Betrachtungsweise nicht als Lösungsmittel, sondern als Absorptionsmittel aufträte. Dazwischen ist aber, wie Höber<sup>30)</sup> auseinandersetzt, nicht leicht zu unterscheiden. Es mangelt indessen in diesem wie in anderen Fällen noch an den nötigen Beweisen für die Absorptionstheorie; der Einfluss auf die Grenzflächen-  
spannung Wasser — Protoplasma ist bisher noch weniger untersucht als die Verteilung zwischen Wasser und Lipoid.

Es gibt aber andere Feststellungen, die der Absorptionstheorie der Permeabilität eine gute Stütze bieten können. So hat Traube<sup>31)</sup> gefunden, dass in homologen Reihen die Oberflächenaktivität im allgemeinen bei gleicher molarer Konzentration im Verhältnis  $1:3:3^2:3^3 \dots$  wächst. Diese Kapillarregel von Traube macht sich auch bei physiologischen Vorgängen bemerkbar, vorausgesetzt, dass es sich bei den beteiligten oberflächen-aktiven Stoffen um solche handelt, die chemisch indifferent sind, d. h. nicht ein besonderes Mass chemischer Affinität gegenüber den Zellbestandteilen äussern.

Nach all dem Gesagten kann also die Absorptionstheorie der Permeabilität wohl mit der Lipoidtheorie konkurrieren; ja man kann nach Höber<sup>32)</sup> nicht einmal von Konkurrenz reden, insofern es auf eine Absorption an einer lipoidhaltigen Protoplasmagrenzschicht ankommt und die Trennungslinie zwischen Absorption und Verteilung schwer zu ziehen ist. Nur wenn man das Verhalten der «lipoidunlöslichen», nicht eindringenden Stoffe betrachtet, so wie es sich nach dem Verlauf der osmotischen Experimente und der chemischen Analyse darstellt, dann erscheint die Lipoidtheorie als die leistungsfähigere. Nach der Absorptionstheorie bildet die Anreicherung in der Protoplasmaoberfläche bloss eine Erleichterung, eine Beschleunigung für das Durchtreten, und dass es auch Stoffe gibt, die nicht durchtreten, ist daher nicht zu erwarten. Aber Zucker, Hexite, Salze und andere Stoffe können ja Pflanzenzellen dauernd plasmolysieren oder Muskeln dauernd zum Schrumpfen bringen, Salze und Säure werden dauernd im Zellsaftraum von lebenden Pflanzenzellen gespeichert, zwischen Blutkörperchen oder Muskelinhalt und dem sie umspülenden Plasma bestehen dauernd Unterschiede im Gehalt an anorganischen Salzen. Die Lipoidlöslichkeit gibt dafür die einfache Erklärung der Unlöslichkeit im lipoiden Lösungsmittel. Die Absorptionstheorie könnte aber auch dieser Gruppe von Erscheinungen gerecht werden, wenn in geeigneten Modellversuchen gezeigt würde, dass, entsprechend der bereits angeführten Pfeffer-Tinker'schen Vorstellung, sich auch bei einem porösen Absorbens die Durchlässigkeit nach der Grenzflächen-  
spannung richtet und dieses Absorbens gegenüber Stoffen, die

<sup>30)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 509 u. 513 (1926).

<sup>31)</sup> Liebigs Ann., 265, 27 (1891).

<sup>32)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 531 (1926).

seine Grenzflächenspannung gegen Wasser vergrössern, sogar die Eigenschaften einer semipermeablen Membran erhält. *Die Porentheorie der Durchlässigkeit würde alsdann mit der Lipoid- und der Absorptionstheorie verschmelzen.*

Ein besonders einladendes Verfahren, sich über die Permeabilität der lebenden Zellen Aufschluss zu verschaffen, ist in der **Vitalfärbung** gegeben. Die besonderen Schwierigkeiten, mit denen man bei der Untersuchung und Deutung der Vitalfärbung zu kämpfen hat, beruhen nach Höber<sup>33)</sup> darauf, dass die organischen Farbstoffe eine sehr komplizierte Struktur haben. Ihr Molekulargewicht ist relativ hoch, so hoch, dass viele Farbstoffe in Lösung hinsichtlich ihrer Diffusibilität, ihrer Fällbarkeit durch Elektrolyte, ihrer Absorbierbarkeit ein ausgesprochen kolloidales Verhalten zeigen, und andere nach Zsigmondys Ausdrucksweise wenigstens Semikolloide darstellen. Insbesondere gehören die Farbstoffe zumeist zur Gruppe der Kolloidelektrolyte und sind als solche mehr oder weniger dissoziiert; sie neigen zum Teil aber auch zu Polymerisation und Tautomerisation und sind zum Teil hydrolysiert. Eine weitere Schwierigkeit soll darin liegen, dass sie zum Teil auch Indikatoreigenschaften haben, ihre Farbe also den Einflüssen der Reaktion in den Zellen und in deren Umgebung unterliegt, dass sie zum Teil durch Reduktion entfärbt oder sonstwie leicht chemisch umgewandelt werden. Ihre färberischen Eigenschaften werden ferner von den Eiweisskörpern mit beeinflusst, wie sich z. B. bei Verwendung gefärbter Indikatoren in deren «Eiweissfehler» äussert; die Farbe mancher Indikatoren kann bei Gegenwart grösserer Eiweissmengen sogar völlig verschwinden. Endlich ist zu beachten, dass die Farbstoffe als Produkte der Technik öfter grosse und für diese Zwecke bedenkliche Beimengungen enthalten, wie namentlich Salze, darunter auch Salze mit mehrwertigem Kation, die nicht bloss als Zellgifte gefährlich sind, sondern in kleinen Mengen die Permeabilität der lebenden Zelle sehr stark verändern, sowohl steigern wie verringern können. Hinzukommt, dass Zusätze mehrwertiger Ionen die Anfärbbarkeit mancher Strukturen durch polare Absorption aktivieren können. Trotz all dieser Misslichkeiten glaubt aber Höber, dass man sich vor den Farbeexperimenten nicht zurückschrecken lassen darf, weil sie den grossen Vorteil bieten, dass man in den meisten Fällen den Eintritt sehr kleiner Stoffmengen ins Zellinnere direkt sehen kann.

Auch bei der Vitalfärbung nimmt die Lipoidtheorie den ersten Platz ein. Overton<sup>34)</sup> hat seine Lipoidtheorie auf die Beobachtung von P. Ehrlich<sup>35)</sup> aufgebaut, dass nämlich Farbbasen ebenso wie ungefärbte organische Basen häufig zugleich «neurotrop» und «lipotrop» sind, und

<sup>33)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 533 (1926).

<sup>34)</sup> Jahrb. wiss. Bot., **43**, 669 (1900).

<sup>35)</sup> Konstitution, Verteilung u. Wirkung chemischer Körper, Leipzig (1893).

dass die Ueberführung der Basen in die entsprechende Sulfosäure die Affinität zur Nervensubstanz, die Neurotropie, ebenso wie die Lipotropie zum Verschwinden bringt. Overton fügt eigentlich nur noch hinzu, dass Lipotropie, d. h. relative Fettlöslichkeit, nicht bloss Neurotropie bedingt, sondern Zytotropie überhaupt, also Eignung zur Vitalfärbung im allgemeinen, und dass man sich den Zusammenhang so erklären könne, dass die Plasmahaut einer fettartigen Haut zu vergleichen sei. Overton erkannte aber bereits, dass keineswegs die lipotropen und zytotropen Farben ohne Ausnahme Farbbasen sind, sondern dass auch einzelne Sulfosäurefarbstoffe diese Eigenschaften besitzen, wie Methylorange, Tropäolin 00 und Tropäolin 000. Den Zusammenhang zwischen Lipotropie und Zytotropie konstatierte er im wesentlichen auf Grund von Prüfungen der absoluten Löslichkeit der Farben in Lipoidgemischen, und darin sind ihm spätere Untersucher meist gefolgt, anstatt die relative Löslichkeit, auf die es allein ankommt, also die Verteilung zwischen lipoider und wässriger Phase zu bestimmen. Dieser Irrtum hat nach Höber bessere Einsichten verzögert; denn man stiess so auf manche Ausnahmen von der Regel, welche in Wirklichkeit keine sind.

Auch bei den Farbstoffen müssen wir nach Höber<sup>36)</sup> zwischen einer «physiologischen» und einer «physikalischen» Permeabilität unterscheiden. Seiner Ansicht nach ist die Farbstoffaufnahme der lipoidunlöslichen Säurefarbstoffe ein ganz anderer Vorgang als die Aufnahme der lipoidlöslichen Farben; letztere erfolgt rein passiv durch Verteilung, erstere ist enger mit dem Stoffwechsel der Zellen verbunden.

Ruhland<sup>37)</sup> wollte auch für die Vitalfärbung eine Porentheorie aufstellen, nach der über die Aufnehmbarkeit lediglich die Grösse der Farbstoffteilchen entscheidet. Küster<sup>38)</sup> hatte nämlich beobachtet, dass sich zahlreiche Pflanzenzellen um so leichter anfärben, je weniger kolloidal der Farbstoff ist, und dass hochkolloidale Farbstoffe, wie z. B. Nigrosin, Trypanrot, Diamingrün, gar nicht aufgenommen werden. Ruhland begründet seine Theorie durch einen Vergleich zwischen dem physiologischen Färbevermögen und dem Dispersitätsgrad der Farbstoffe; den letzteren untersuchte er vor allem durch Bestimmung der Diffusibilität der Farben in 20%igem Gelatinegel. In der Tat erhielt er so einen weitgehenden Parallelismus zwischen der Geschwindigkeit der Anfärbung und der Dispersität. Hochkolloidale Farbstoffe färben nach Ruhland die Zellen im allgemeinen nicht. Dass aber die Dispersität allein nicht ausschlaggebend ist, das beweisen nach Höber<sup>39)</sup> schon die Feststellungen, dass hochkolloidale basische und Säurefarbstoffe, wofern sie lipoidlöslich sind, doch,

<sup>36)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 538 (1926).

<sup>37)</sup> Jahrb. wiss. Bot., 51, 376 (1912).

<sup>38)</sup> Jahrb. wiss. Bot., 50, 261 (1911).

<sup>39)</sup> Physik. Chem. der Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 542 (1926).

wenn auch schwer, in die Zellen eindringen, wenigstens in die tierischen Zellen. Schon aus diesem Grunde kann die Porentheorie der Vitalfärbung nicht die Gültigkeit haben, die Ruhland ihr zuschreibt. Was aber Höber vor allem gegen diese Anschauung einwenden muss, ist das, dass sie alle die zahlreichen Versuche mit nicht gefärbten molekulardispersen Stoffen ausser acht lässt, nach denen die osmotischen Eigenschaften der Zellen doch so beschaffen sind, dass man um die Annahme einer Impermeabilität gar nicht herumkommt. Ferner habe Collander<sup>40)</sup> mit Nachdruck darauf hingewiesen, dass von Ruhlands nur scheinbarer Impermeabilität vieler Pflanzenzellen für Säurefarbstoffe, die vorgetäuscht sei durch allzu geringe Schichtdichte der Zellen, gar nicht die Rede sein könne. Ferner findet Collander, dass im Gegensatz zu Ruhlands Angaben und zu seiner Porentheorie zahlreiche Pflanzenzellen sich auch mit hochdispersen Säurefarbstoffen nicht anfärben, oder richtiger auch nach 24stündigem Verweilen noch 8 bis 160 mal weniger Farbstoff in der Raumeinheit enthalten als ihre Umgebung, und dass es nur — gerade so wie bei den Tieren — ganz bestimmte Zellarten sind, die sich mit der Farbe beladen, nämlich Zellen, welche die Leitbündel umgeben, jugendliche Zellen und Blumenblattzellen. Collander stellt sich nach all dem auf den gleichen Standpunkt wie Höber, dass die besondere Anfärbbarkeit bestimmter Zellen der Ausdruck eines besonderen physiologischen Zustandes, einer «physiologischen Permeabilität» sei. Die Ansicht von Ruhland, dass alle Zellen die höherdispersen Farbstoffe eindringen liessen, ist nach Collander wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Ruhland absterbendes Material untersuchte. Beim Absterben nimmt ja bekanntlich die Permeabilität der Plasmahaut zu und zwar erst für leichtdiffusible, dann für schwerer diffusible, wie schon de Vries wusste. Nach Höber spielen sich dabei in der kolloiden Plasmahaut vielleicht Koagulationsprozesse ab; dabei wird dann Quellungswasser frei, und die Poren, die bis dahin wesentlich absorbiertes Wasser enthielten und dadurch Stoffe ohne Oberflächenaktivität, wie die Säurefarbstoffe es sind, schwer oder nicht passieren liessen, werden jetzt auch für Stoffe mittlerer Dispersität weit genug. Die Auffassung von der besonderen Natur des Imports der lipoidunlöslichen Säurefarbstoffe kann nun aber nach Höber auch durch direkte Versuche gestützt werden: Die physiologische Permeabilität für Farbstoffe lässt sich wegnarkotisieren, die physikalische nicht.

Mit diesen Versuchen scheint der Haupteinwand, der gegen die Lipoidtheorie der Vitalfärbung erhoben worden ist, aus dem Wege geräumt zu sein; die Aufnahme der vielen lipoidunlöslichen Säurefarbstoffe durch gewisse Zellen wäre eben ein Vorgang ganz anderer Art (physiologische Permeabilität) als die Aufnahme der lipoidlöslichen. Im übr-

<sup>40)</sup> Jahrb. wiss. Bot., 60, 354 (1921).

gen gibt Höber zu, dass der Stand der Frage nach dem Zusammenhang von Lipoidlöslichkeit und Vitalfärbung noch keineswegs befriedigend klar ist; man konnte nicht sicher entscheiden, ob es wirklich Farbbasen gibt, die gut färben, obwohl sie lipoidunlöslich sind, und es blieb unklar, warum im Gegensatz zu den tierischen Zellen die Pflanzenzellen von gewissen lipoidlöslichen basischen und Säurefarbstoffen nicht gefärbt werden.

Ein Teil dieser Schwierigkeiten scheint sich aber durch eine Modifikation der Lipoidtheorie beseitigen zu lassen, zu der Nirenstein<sup>41)</sup> gelangte. Wie schon Overton, so konstatierte auch er, dass zahlreiche Farbbasen vital färben, obwohl sie aus wässriger Lösung von Oliven- oder Mandelöl nicht aufgenommen werden. Setzt man dagegen Oelsäure zu dem Oel hinzu, so zeigt sich, dass, wenn man die Grenzkonzentrationen der Anfärbung von Paramäzieren aufsucht und sie mit den Verteilungsquotienten Oelsäure-Oel : Wasser vergleicht, ein vollkommener Parallelismus zwischen Färbevermögen und Verteilung besteht. Auch wir konnten feststellen, dass z. B. Fuchsin sich in Oelsäure löst, nicht aber in reinem Oel. Oelsäure-Oel ist aber nur bei den Farbbasen ein befriedigendes Modell der Zellvorgänge, nicht bei den Säurefarbstoffen; denn Nirenstein fand unter 72 Säurefarbstoffen 21, welche die Paramäzieren anfärbten, aber dabei in dem Oelsäure-Oelgemisch vollkommen unlöslich waren. Fügt man nun aber zu dem Oelsäure-Oelgemisch noch eine organische Base hinzu — Nirenstein verwendete Diamylamin — so gewinnt dieses Gemisch auch für die Säurefarbstoffe Speicherungseigenschaften, ohne dass die Aufnahmefähigkeit für die Farbbasen dadurch irgendwie alteriert wird. Diese Speicherungseigenschaften beziehen sich aber nur auf solche Säurefarbstoffe, welche auch die Paramäzieren vital färben, so dass also das Gemisch aus Oel, Oelsäure und Diamylamin in seiner Anfärbbarkeit aus wässriger Lösung ein vollkommenes Abbild des Paramäzierenzelleibes darstellt. Trotzdem Nirenstein bekannt war, dass käufliches Lezithin infolge teilweiser Zersetzung sowohl freie Fettsäure wie freie Base enthält, hielt er doch damit zurück, das Lezithin geradezu als das lipoide Lösungsmittel der Zellen zu bezeichnen, sondern sprach nur ganz allgemein die Meinung aus, dass die Zellfärbbarkeit von der Anwesenheit der Fettsäure und der fettlöslichen Base abhängt. Wir werden später noch sehen, dass Schumacher<sup>42)</sup> zur Bestimmung der Lipoidlöslichkeit eine Lezithin-Aetherlösung verwendet, dass wir aber keine genaue Uebereinstimmung mit Versuchen an lebender Hefe feststellen konnten.

Höber<sup>43)</sup> wirft nun allerdings die Frage auf, ob man die Theorie von Nirenstein überhaupt noch als Lipoidtheorie bezeichnen könne. In

<sup>41)</sup> Pflügers Arch., 179, 233 (1920).

<sup>42)</sup> Zentralbl. Bakt., I, 98, 71 (1926).

<sup>43)</sup> Physik. Chem. der Zelle und Gewebe, 6. Aufl., S. 547 (1926).

der ursprünglichen Form von Overton spielte das Lipoid die Rolle eines reinen Lösungsmittels. Die Theorie von Nirenstein legt nun zunächst die Vermutung nahe, dass an die Stelle der Lösungsaffinitäten zum Lipoid als Bedingungen für den Eintritt der Stoffe in die lebenden Zellen chemische Affinitäten zu treten haben; Säure würde von Base und Base von Säure angezogen. Aber diese Auffassung kann einerseits nicht für die organischen indifferenten Nichtleiter gelten und andererseits ist zu beachten, dass Oelsäure und Diamylamin ganz unabhängig voneinander ihre Einflüsse auf basische und Säurefarbstoffe ausüben, anstatt dass sie einander in der lipoiden Phase neutralisieren. Höber scheint es daher annehmbar, dass auch sie weniger in echter Lösung chemisch als in kolloidaler Dispersion elektrisch wirken, dass ihr Einfluss auf die Verteilung also polare Absorption ist; die negativen Oelsäureteilchen würden also die positiven Farbkationen, die positiven Basenteilchen die negativen Farbanionen festhalten.

Auch die neben der sehr auffälligen Speicherung der Farbstoffe in Granula häufig auftretende, aber bisher weniger beachtete Diffusfärbung des Protoplasmas soll nach v. Möllendorff<sup>44)</sup> ebenfalls zur relativen Lipoidlöslichkeit in Lezithin-Xylol im allgemeinen parallel gehen. Dies scheint anzudeuten, dass nicht nur für den Einlass lipoidlöslicher Stoffe eine oberflächliche Lipoidhaut erforderlich ist, sondern, dass auch bei Durchdringung des Protoplasmas die Lipoide mitwirken.

Auch die Reaktionstheorie von Bethe<sup>45)</sup> rechnet mit der wesentlichen Mitwirkung von Säure und Base im Innern der Zelle. Dieser Verfasser ist der Ansicht, dass ganz einfach die Innenreaktion der Zellen die Anfärbung mit basischen und Säurefarbstoffen beherrscht. Nach dieser Ansicht wäre die Innenreaktion nicht nur für das Mass von Speicherung der einen oder anderen Farbart verantwortlich, sondern die Innenreaktion würde überhaupt darüber entscheiden, ob merkliche Mengen Farbstoff aufgenommen werden, denn nach Bethe sollen alle Zellen für alle Farbstoffe durchlässig sein (soweit diese nicht allzu grob dispers sind), und eine Farblosigkeit wäre nur durch entsprechend verringerte Anfärbung vorgetäuscht. Besonders anschaulich soll nach Rohde<sup>46)</sup> das Verhalten von Schnitten sein, in deren Zellen teils saure, teils neutrale Reaktion herrscht; hier soll das Aussehen nach der Einwirkung von basischen und Säurefarbstoffen sozusagen spiegelbildlich verschieden sein. Das kolloidchemische Speicherungsprinzip von Bethe scheint also in der Tat wirksam zu sein.

Anders ist dagegen nach Höber's<sup>47)</sup> Erachten Bethe's Ansicht zu beurteilen, dass es für die sichtliche Farbstoffaufnahme überhaupt bloss

<sup>44)</sup> Arch. mikr. Anat., **90**, I, 463 u. 503 (1918).

<sup>45)</sup> Hofmeisters Beitr., **6**, 399 (1905), Biochem. Ztschr., **127**, 18 (1922).

<sup>46)</sup> (unter Bethe) Pflügers Arch., **168**, 411 (1917).

<sup>47)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 550 (1926).

auf Speicherung (in irgendeiner Form) ankomme, insofern als die Zellen an sich für alle (wenigstens feiner dispersen) Farbstoffe durchlässig seien. Wäre diese Ansicht richtig, dann müsste man erwarten, dass bei neutraler Reaktion des Zellinnern auf alle Fälle merkliche Mengen Farbstoff eindringen. Das ist aber nicht der Fall. Einen zweiten Einwand machte Collander, der einige Zellen mit besonders saurem Inhalt (mehr als  $p_H=4$ ) prüfte und fand, dass nach 20—24 Stunden die Konzentration von leicht diffusiblen Säurefarbstoffen im Zellsaft immer noch 64 mal kleiner war als in der Aussenlösung. Den schwerwiegendsten Einwand gegen Bethe's Annahme einer allgemeinen Durchlässigkeit für die Farbstoffe erblickt aber Höber, wie schon bei der Erwähnung der Porentheorie gesagt, in der Gesamtheit der Erfahrungen über die Permeabilität für ungefärbte Verbindungen; es wäre nicht einzusehen, warum Salze, Aminosäuren, und vor allem alle möglichen Nichtleiter, wie Hexosen, Hexite u. a., auf die das Speicherungsprinzip auch gar nicht anzuwenden ist, sich so anders verhalten sollten; denn für sie sind die Zellen ja tatsächlich impermeabel oder mindestens sehr schwer permeabel.

Im Hinblick auf unsere früheren Erörterungen könnte auch für die Vitalfärbung eine Absorptionstheorie in Betracht kommen. Nach Höber<sup>48)</sup> sind aber die Grundlagen hierfür noch nicht gegeben.

Zusammenfassend lässt sich über die Theorie der Vitalfärbung sagen, dass die alte, so viel angefochtene und überwunden geglaubte *Lipoidtheorie von Overton immer wieder ein brauchbarer Wegweiser durch das Labyrinth der Permeabilitäterscheinungen ist. Um sämtlichen Erscheinungen der Permeabilität gerecht zu werden, käme nach Höber vielleicht auch nach den mit den Farbstoffen wieder gemachten Erfahrungen eine Umprägung zu einer Absorptionstheorie in Frage*, ohne dass aber für eine solche Umprägung schon jetzt genügend Material vorliegt. *Deutlich hebt sich auch bei der Vitalfärbung das Höber'sche Postulat der physiologischen Permeabilität heraus.*

Was nun die **Faktoren der Permeabilität** anbetrifft, so verweisen wir wieder auf Höber (S. 556), welcher die Arbeiten zusammenfasst, die gezeigt haben, dass die Permeabilität von Zellen durch mechanischen Reiz, Licht, elektrischen Reiz, Temperaturänderungen, Salze und Nichtelektrolyte verändert werden kann. Bei unseren Versuchen mussten wir namentlich die Fehlerquellen der Lichtreizung und der Temperaturveränderungen ausschalten. Gerade für Akridin- und Flavinderivate hat kürzlich Van der Lingen<sup>49)</sup> gezeigt, dass die antiseptische Wirkung im Lichte stärker ist als in der Dunkelheit. Die Permeabilität kann aber nach Höber auch verschieden sein, je nachdem ob sich die Zelle im Ruhe-

<sup>48)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 555 (1926).

<sup>49)</sup> Zentralbl. Bakt., 91, 509 (1924).

zustand befindet oder nicht, d. h., dass also Wechsel von Funktionszuständen einen Wechsel in der Permeabilität bedeuten könnte.

Wir kommen nun noch zur **Messung der Permeabilität**. Bisher kennt man mikroskopische, osmotische, chemische und elektrische Methoden.

*Mikroskopisch* kann man das Eindringen eines Stoffes manchmal durch eine Niederschlagsbildung im Zellinnern erkennen. Bei Farbstoffen wird, wie wir schon gesagt, haben, die im Innern der Zelle entstehende Färbung auf das Eindringen des Farbstoffes schliessen lassen. Von unseren Farbstoffen stellten wir in destilliertem Wasser Lösungen von 1:1000, oder, wenn die Farbstoffe weniger löslich waren, gesättigte Lösungen her. Je 1 cm<sup>3</sup> dieser Farbstofflösungen, die in vorher sterilisierten Gefässen dargestellt worden waren, wurden nun in sterilen Reagensgläsern mit 1 cm<sup>3</sup> Presshefeaufschlemmung 20:100 gut gemischt und dann im Dunkeln bei 20° C. aufbewahrt. Es war darauf geachtet worden, dass auch die verwendeten Lösungen bereits diese Temperatur hatten. Ferner ist darauf zu achten, dass die verwendete Presshefe keine abgestorbenen Zellen enthält. Sollte dies aber der Fall sein, so würde man besser tun, sich das Zellmaterial selber herzustellen, indem man klare Bierwürze oder einen synthetischen Nährboden mit einer Hefekultur impft, nach 48 Stunden abzentrifugiert, mit isotonischer Kochsalzlösung auswäscht und wieder zentrifugiert. Das Zentrifugat wird noch zwischen sterilem Fliesspapier abgepresst und hat nun etwa den gleichen Wassergehalt wie die Presshefe des Handels, kann also nun an deren Stelle Verwendung finden.

Nach 24stündiger Einwirkung der Farblösungen auf die Hefezellen wurden die Zellen des Bodensatzes unter dem Mikroskop beobachtet und folgende Färbungen festgestellt:

Farbstoff Nr.	Färbung des Zellinhaltes
1—2	Farblos
3	Die meisten Zellen zeigen gelb gefärbten Zellinhalt
4	Die meisten Zellen zeigen schwach gelb gefärbten Zellinhalt
8—10	Farblos
11	Die meisten Zellen zeigen im Innern violett gefärbte Granula
12—21	Farblos
23	Farblos
24	Die meisten Zellen zeigen bläulichen Inhalt
25—26	Farblos
27	Die meisten Zellen zeigen im Innern violett gefärbte Granula
28—29	Farblos

Wir haben schon darauf hingewiesen, dass man bei dieser Methode neben der oft sehr auffälligen Speicherung der Farbstoffe durch Granula auch die Diffusfärbung des Protoplasmas nicht ausser acht lassen darf

und dass infolge zu geringer Schichtdicke der Zelle diese letztere Färbung dem Beobachter leicht entgehen kann. Dies scheint uns z. B. beim Tropäolin 000 Nr. 1 (Nr. 8 unserer Farbstoffe) passiert zu sein, denn wir haben schon früher gesehen, dass nach Overton dieser Farbstoff, trotzdem er zu den Säurefarbstoffen gehört, lipo- und zytotrope Eigenschaften hat. Collander<sup>50)</sup> ist aber der Ansicht, dass von Ruhlands nur scheinbarer Impermeabilität vieler Pflanzenzellen für Säurefarbstoffe, die vorgetäuscht sei durch allzu geringe Schichtdicke der Zellen, gar nicht die Rede sein könne. Er geht von der lange bekannten Beobachtung aus, dass Spirogyren selbst nach tagelangem Verweilen in einer dunkelblauen Cyanollösung farblos bleiben, d. h. sich unter dem Deckglas von dem dunkelblauen Grund ihrer Umgebung blendend weiss abheben. Indem er nun die blaue Aussenlösung mehr und mehr verdünnte, liess sich leicht zeigen, dass auch nach vielfacher Verdünnung die Algenfäden sich immer noch deutlich heller von dem hellblauen Untergrund abheben. Würde also der Plasmahautmantel der Zellen dem Farbstoff kein Diffusionshindernis dargeboten haben, so müssten in den wasserreichen Zellsaft sichtbare Farbstoffmengen eingedrungen sein. Die Farblosigkeit der Zellen soll also nach Collander, wenn auch nicht absolute Undurchlässigkeit, so doch ein sehr geringes Mass von Permeabilität beweisen.

Wenn wir aus der mikro-optischen Methode durch Beobachtung des Bodensatzes eine *makro-optische Methode* machten, so deckten sich die Resultate tatsächlich nicht in allen Fällen. Nach 24stündiger Einwirkung der Farblösung hatte der Bodensatz auch nach zweimaligem Auswaschen mit isotonischer Kochsalzlösung noch folgende Färbung:

Farbstoff Nr.	Farbe des Bodensatzes	Farbstoff Nr.	Farbe des Bodensatzes
1—2	Weiss	18	Schwach rosa
3	Stark orange	19	Schwach violett
4	Schwach gelb	20	Schwach rosa
8—9	Weiss	21	Schwach violett
10	Schwach rot	23	Schwach blau
11	Stark violett	24—26	Weiss
12	Weiss	27	Stark blau violett
13	Schwach braun	28	Weiss
14—17	Weiss	29	Schwach blau

Bei den Farbstoffen 3, 11 und 27 war das zweite Waschwasser ebenso stark gefärbt wie das erste, während dasselbe bei den übrigen Farbstoffen sonst fast ganz farblos war. Diese drei Proben wurden solange weiter behandelt, bis auch bei diesen das Waschwasser beinahe farblos war. Dies war für Nr. 3 nach der sechsten Auswaschung der Fall, wobei auch der zentrifugierte Bodensatz bereits ziemlich stark ent-

<sup>50)</sup> Jahrb. wissenschaftl. Bot., 60, 354 (1921).

färbt war. Nach der sechsten Auswaschung war das Waschwasser von Nr. 11 und 27 immer noch stark gefärbt (allerdings schwächer als die beiden ersten), ebenso der Bodensatz von 11 und 27, trotzdem der Zellinhalt der meisten Zellen wieder farblos war. Ein beinahe farbloses Waschwasser wurde bei diesen beiden Nummern aber nach der achten Auswaschung erzielt. Nun war auch der abzentrifugierte Bodensatz von 3 ziemlich stark entfärbt, während derjenige von 27 noch immer ziemlich intensiv gefärbt war. Diese intensive Färbung des Bodensatzes Nr. 27 war auch nach der zehnten Auswaschung noch nicht verschwunden. Es liess sich kein Unterschied in der Auswaschbarkeit der Farbstoffe mit destilliertem Wasser oder mit isotonischer Kochsalzlösung feststellen. Durch Dialyse waren die Farbstoffe nicht zu entfernen, da sie durch die gewöhnlichen Dialysiermembranen nicht diffundierbar sind.

Es ist selbstverständlich naheliegend, in Fällen wo der Bodensatz schwach gefärbt war, eine Färbung des Zellinhaltes mikroskopisch aber nicht festgestellt werden konnte, auf ein sehr geringes Mass von Permeabilität zu schliessen.

Die Messung der Permeabilität kann auch mit *osmotischen Methoden* erfolgen. Das Studium der osmotischen Eigenschaften führt ja unmittelbar auf das Problem der Stoffaufnahme und Stoffabgabe der Zellen.

Wir können uns z. B. der Plasmolyse bedienen, welche bekanntlich dadurch eintritt, dass ein osmotisches Druckgefälle, das von aussen nach innen in die Zelle gerichtet ist, sich ausgleicht, indem Wasser sich gegen das Druckgefälle von der Zelle durch die allein für Wasser durchlässige, semipermeable Membran in die Lösung herausbewegt. Wenn aber die Plasmahaut für den gelösten Stoff permeabel ist, dann kann an die Stelle der Wasserose die Diffusion des gelösten Stoffes treten, welcher sich entlang dem Druckgefälle in die Zelle hineinbewegt. Dann erleidet aber der Zelleib natürlich keine Volumänderung, wie sie sich sonst in der Loslösung der Protoplasten von der Zellulosewand äusserte. Die Unfähigkeit zu plasmolysieren kann nun nach Overton<sup>51)</sup> die Fähigkeit anzeigen, durch die Plasmahaut hindurchzudringen. Nun kommt es aber auch vor, dass eine Lösung anfangs plasmolysiert, dass aber nach einiger Zeit Deplasmolyse erfolgt. Nach einfachen Ueberlegungen von Overton äussert sich in diesem Phänomen eine relativ geringe Permeabilität. Nun ist nach Höber<sup>52)</sup> freilich auch eine andere Erklärung für den Rückgang einer anfänglichen Plasmolyse in Erwägung zu ziehen. Eine Zelle kann sich nämlich auch gegen die an ihr vorgenommene Turgeszenzverminderung aktiv durch «Anatonose», also durch Produktion von osmotisch wirksamen Stoffen in ihrem Innern, wehren. Trotzdem glaubt Höber, dass man die Deplasmolyse in vielen Fällen als Kri-

<sup>51)</sup> Vierteljahrsschr. naturf. Ges. Zürich, 40, 1 (1895) u. 44, 88 (1899).

<sup>52)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 431 (1926).

terium für das Eindringen des Plasmolytikums in die Zellen betrachten darf. Denn nach Iljin<sup>53)</sup> wird die von ihm beschriebene Anatonose nur von den reinen Lösungen der Alkalisalze ausgelöst, nicht von den Erdalkalien, Zucker und den natürlich vorkommenden Gemischen von Alkali- und Erdalkalisalzen.

Von weiteren osmotischen Verfahren kennt man ferner eine gravimetrische Methode. Dieselbe beruht darauf, dass man die Zellen nach Aufnahme der hineindiffundierten Substanz wiegt und feststellt, ob eine Gewichtsverminderung infolge Plasmolyse eingetreten ist.

An Stelle des Gewichtes kann aber auch die durch Plasmolyse bedingte Volumenverminderung der Zellen gemessen werden. Wir haben diese Methode auf die Farbstoffe anzuwenden versucht, welche nicht schon bei der optischen Methode sich als deutlich diffundierend erwiesen hatten. Als Vergleichsversuch verwendeten wir auch den in letzterem Falle bereits deutlich positiv gewesenen Farbstoff Nr. 11 einerseits, sowie isotonische Kochsalzlösung andererseits. In sterile Präzipitometer wurden je 1 cm<sup>3</sup> Farbstofflösung 1:1000 (oder gesättigt, falls weniger löslich) und 1 cm<sup>3</sup> Hefeaufschlemmung 2:100 abgefüllt. Nach 12stündigem Aufbewahren im Dunkeln bei 20<sup>0</sup> C. wurden alle Röhren einmal durchgeschüttelt. Nach 24 Stunden wurde ein zweites Mal durchgeschüttelt und dann während 10 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wie wir dies schon früher<sup>54)</sup> einmal beschrieben haben. Die abgelesenen Volumina ergaben in Teilstrichen des Präzipitometers:

Farbstoff Nr.	1. Versuch	2. Versuch	Durchschnitt
1	13	13	13
2	13	15	14
8	14	14	14
9	14	14	14
10	13	13	13
11	13,5	14	13,7
12	12	13	12,5
13	13,5	14	13,7 (Mit einer Farbstoffauflage von ca. 1/2 Teilstrich)
14	13	13	13
15	13,5	14	13,7
16	13	13	13
17	15	15	15 (Zentrifugat ganz weiss)
18	13	13	13
19	15	14	14,5
20	13	13,5	13,2
21	14,5	14,5	14,5
23	14	14	14

<sup>53)</sup> Bioch. Ztschr., **132**, 494 (1922); Die Permeabilität des Plasmas und die Anatonose, Prag, 1922.

<sup>54)</sup> Mittl. Lebensmittelunters. Hyg., **11**, 195 (1920).

Farbstoff Nr.	1. Versuch	2. Versuch	Durchschnitt
24	13	13	13
25	12	12	12
26	14	15	14,5
28	13	12	12,5
29	13,5	14	13,7
Isot. NaCl - Lösung	14	13	13,5

Die beobachteten Unterschiede lassen aber keine Schlüsse auf die Permeabilität zu, da auch der positive Farbstoff Nr. 11 kein besonders kleines Volumen ergab. Ob die noch kleineren Volumen auf eine Farbstoffaufnahme mit Entfärbung schliessen lassen dürfen ist fraglich, da diese kleinen Differenzen wohl eher als Beobachtungsfehler gedeutet werden müssen. Auch dass mit der isotonischen Kochsalzlösung nicht das grösste Volumen erhalten wurde, wäre an und für sich ja nicht erstaunlich, denn auch Kochsalz könnte ja schliesslich plasmolysierend wirken. Die Differenz ist aber auch hier zu klein, als dass wir einen Beobachtungsfehler ausschliessen könnten.

Um mit Hilfe einer osmotischen Methode Aufschluss über die Permeabilität für giftige oder schwer lösliche Stoffe zu gewinnen, kann man sich endlich auch noch der «Methode der Partialdrucke» von Overton bedienen. Danach lässt man die zu prüfende Verbindung nicht für sich allein osmotisch wirken, sondern man mischt sie mit einer zweiten, so dass sie nur nach Massgabe ihres Partialdruckes an der osmotischen Wirkung teilnimmt; man setzt also z. B. zu der isotonischen Lösung eines indifferenten und nicht eindringenden Stoffes eine kleine Menge des giftigen oder schwer löslichen Stoffes und sieht zu, ob die jetzt hypertensive Lösung plasmolysiert oder gewicht- oder volumvermindernd wirkt.

Die bisher genannten osmotischen Methoden zeichnen sich durch grosse Einfachheit aus, sind aber indirekte Verfahren. Ein direkter Weg zur Messung der Permeabilität ist die *chemische Analyse*. Man kann z. B. prüfen, ob ein zur Aussenlösung zugesetzter Stoff nach einiger Zeit auch im Innern des Protoplasten nachzuweisen ist. Statt die Zellen selbst zu analysieren, ist es aber oft bequemer, die Verringerung der Konzentration der Aussenlösung festzustellen. Bei den Farbstoffen lassen sich meistens beide Methoden sehr gut kolorimetrisch gleichzeitig ausführen.

Wir haben schon bei den optischen Methoden gesehen, dass sich die Färbung des Zellinnern in den meisten Fällen im Mikroskop oder direkt beobachten lässt. Bedingung ist, dass die Farbstoffe im Innern der Zelle nicht entfärbt oder verfärbt werden. Man kann auch auf die ungefähre Verteilung des Farbstoffs auf das Zellinnere und die umgebende Lösung beobachten; so war z. B. bei Nr. 11 das Zellinnere nach einigen Tagen bedeutend stärker gefärbt, als die umgebende Lösung.

Genauer lässt sich aber die Farbstoffverteilung durch kolorimetrische Analyse der Aussenlösung feststellen. Wir haben zu diesem Zwecke wiederum je 1 cm<sup>3</sup> der Farbstofflösungen 1:1000 (von den schwererlöslichen nur die gesättigten Lösungen ohne Bodensatz) mit einem starken Hefeüberschuss, das heisst je 1 cm<sup>3</sup> Aufschlemmung 20:100, versetzt. Dann wurden die Röhren mit Gummistopfen verschlossen, um Verdunstung und dadurch Veränderung der Konzentration der Farbstofflösung zu verhindern. Nach 24stündigem Aufbewahren im Dunkeln und bei 20° wurde klar zentrifugiert, von der überstehenden Flüssigkeit je 1 cm<sup>3</sup> auf 20 cm<sup>3</sup> verdünnt und kolorimetrisch mit der unbehandelten Farbstofflösung verglichen. Zum Vergleich wurden je 0,5 der unbehandelten Farbstofflösung auf 20 cm<sup>3</sup> verdünnt.

Farbstoff Nr.	Die mit Hefe behandelte Farbstofflösung enthielt noch folgende % der ursprünglichen Farbstoff- lösung	Also waren folgende % des Gehaltes der Farbstofflösungen aufgenommen worden	Farbstoff Nr.	Die mit Hefe behandelte Farbstofflösung enthielt noch folgende % der ursprünglichen Farbstoff- lösung	Also waren folgende % des Gehaltes der Farbstofflösungen aufgenommen worden
1	100	0	17	60	40
2	66	34	18	71	29
3	20	80	19	9	91
4	71	29	20	14	86
8	50	50	21	11	89
9	100	0	23	100	0
10	100	0	24	100	0
11	14	86	25	66	34
12	100	0	26	100	0
13	62	38	27	2	98
14	100	0	28	100	0
15	100	0	29	5	95
16	100	0			

Eine sehr beachtenswerte Fehlerquelle für die chemische Methode der Permeabilitätsmessung ist nun aber nach Höber<sup>55)</sup> in der schwierigen Unterscheidung zwischen Absorption im Zellinnern und Absorption an der Zelloberfläche<sup>56)</sup> zu erblicken. Während z. B. Schuhmacher<sup>57)</sup> bei der Behandlung von Hefezellen mit Fuchsin eine Färbung des Zellinnern bei gleichzeitiger Farblosigkeit der Zellmembranen erzielte, hat Effront<sup>58)</sup> festgestellt, dass der braune Farbstoff der Bierwürze sich gerade in der Membran festsetzt. In letzterem Falle ist die Hefe als ein absorbierendes Kolloid zu betrachten. Ob es sich um Absorption im Zellinnern oder nur an der Oberfläche handelt, kann dadurch entschieden werden, dass man die fraglichen Stoffe in verschiedenen Konzentrationen

<sup>55)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, S. 435 (1926).

<sup>56)</sup> Letztere von den meisten Autoren als Adsorption bezeichnet.

<sup>57)</sup> Zentralbl. Bakt., I, 98, 71 (1926).

<sup>58)</sup> Ann. Soc. Zymologie, 1, 107 (1926).

einwirken lässt und prüft, ob die Absorptionsisotherme (vergl. Höber) gültig ist. In dieser Weise verfahren Morawitz<sup>59)</sup> beim Studium der Sublimataufnahme durch Blutkörperchen, Herzog und Betzel<sup>60)</sup> bei der Aufnahme von Chloroform, Silbernitrat und Formaldehyd durch Hefe. Es ergab sich, dass nur die Bindung von Formaldehyd durch Hefe anders verläuft als eine Oberflächenabsorption, da ein und dasselbe Quantum Hefe aus Lösungen sehr wechselnder Konzentrationen die gleiche Menge Aldehyd aufnimmt. Anders verfahren Rohland und Heyder<sup>61)</sup>, welche mit einer Anzahl Farbstoffen feststellten, dass dieselben von Hefe in der gleichen Reihenfolge absorbiert werden, wie Ton, Kalk, Kaolin und Kieselsäure. Diese Reihenfolge ist folgende:

Methylenblau — Anilinblau — Viktoriablau — Methylviolett — Malachitgrün — Diamantgrün — Anilinrot — Safranin — Orange — Eosin — Metanilgelb — Vesuvin.

Die Absorption dieser Farbstoffe erfolgte am besten bei den blauen und violetten, am schlechtesten bei den gelben und braunen Vertretern. Aus der Uebereinstimmung der Skala für die genannten Kolloide mit derjenigen für die Farbstoffe dürfte wohl auch auf eine Oberflächenabsorption geschlossen werden. Wir haben aber beim Methylviolett gesehen, dass dasselbe auch ins Zellinnere dringt. Natürlich ist auch bei einem den Absorptionsvorgängen entsprechenden Verlauf ein Eindringen ins Zellinnere nicht ausgeschlossen, da ja auch im Zellinnern die Stoffe durch Absorption an den Grenzflächen gebunden werden können. Effront<sup>62)</sup> ist übrigens der Ansicht, dass es schwer hält, zwischen Absorption im Innern und Absorption an der Oberfläche zu unterscheiden und dass man sich besser nur an den Ausdruck Absorption halten sollte, wobei man die Begleitumstände näher definieren könne, anstatt zwischen Ab- und Adsorption zu unterscheiden.

Söhngen und Wieringa<sup>63)</sup> haben die Absorption durch Hefezellen auch quantitativ verfolgt. Von 1 g Hefen, deren Gesamtoberfläche auf 1 m<sup>2</sup> geschätzt werden kann, wurden 0,25 mg Natriumchlorid und 3,2 mg Harnstoff aufgenommen. Effront<sup>64)</sup> hat ähnliche Messungen für Säuren und Alkalien vorgenommen und gefunden, dass 100 g Hefetrockensubstanz 171—360 cm<sup>3</sup>  $\frac{n}{10}$  Natronlauge und 45—186 cm<sup>3</sup>  $\frac{n}{10}$  Salzsäure absorbieren können.

Der Vollständigkeit halber wollen wir auch noch die *elektrischen Methoden* der Permeabilitätsmessung anführen. Die Kat- und Anionen

<sup>59)</sup> Koll. Ztschr., **6**, 259 (1910).

<sup>60)</sup> Ztschr. physiol. Chem., **67**, 309 (1910) u. **74**, 221 (1911).

<sup>61)</sup> Koll. Ztschr., **17**, 139 (1915).

<sup>62)</sup> Ann. Soc. Zymologie, **1**, 55 (1926).

<sup>63)</sup> Verslagen Kon. Akad. van Wetenschn., **34**, 999 (1925).

<sup>64)</sup> Ann. Soc. Zymologie, **1**, 106 (1926).

können sich erstens verschieden auf Zellen und Umgebung verteilen, so dass an den Grenzflächen Potentialdifferenzen entstehen, die potentiometrisch gemessen werden können. Zweitens kann der mechanische Widerstand, der den Innen- und Aussenionen von den Plasmamembranen entgegengestellt wird, verschieden sein; dies kann konduktometrisch gemessen werden.

Wir haben nun die an lebenden Zellen erhaltenen **Resultate** mit der Lipoidlöslichkeit nach Nirenstein<sup>41)</sup> verglichen. Wie Schumacher<sup>65)</sup>, so verwendeten auch wir eine 1/2%ige Lezithin-Aetherlösung, welche wir mit gleichen Teilen der wässrigen Farbstofflösungen 1:1000 (oder bei geringerer Löslichkeit gesättigt) kräftig durchschüttelten und dann die beiden Schichten sich trennen liessen. Der Vergleich mit der bereits angeführten mikrooptischen und makrooptischen Methode ergab folgendes Bild:

Farbstoff Nr.	Löslichkeit in Lezithin- Aether	Mikrooptische Methode: Färbung des Zellinhaltes	Makrooptische Methode: Färbung des Bodensatzes	Farbstoff Nr.	Löslichkeit in Lezithin- Aether	Mikrooptische Methode: Färbung des Zellinhaltes	Makrooptische Methode: Färbung des Bodensatzes
1	—	—	—	17	—	—	—
2	—	—	—	18	+	—	+
3	+	+	++	19	+	—	+
4	++	+	+	20	+	—	+
8	+	—	—	21	+	—	+
9	—	—	—	23	—	—	+
10	+	—	+	24	+	+	—
11	++	++	++	25	—	—	—
12	—	—	—	26	—	—	—
13	++	—	+	27	+	++	++
14	—	—	—	28	—	—	—
15	+	—	—	29	+	—	+
16	—	—	—				

— = negativ; + = schwach positiv; ++ = stark positiv.

Wir konnten also etwa in der Hälfte der Fälle gute Uebereinstimmung zwischen der Lipoidlöslichkeit, der Färbung des Zellinhaltes und der Färbung des Bodensatzes feststellen. Bei dem schon von Overton<sup>34)</sup> als lipotrop bezeichneten Sulfosäurefarbstoff Tropäolin 000 (Nr. 8) bedingte aber die Löslichkeit in Lezithin-Aether nicht auch eine Absorbierbarkeit an die Hefezelle (vergl. quantitative Resultate). In einigen Fällen (Nr. 10, 13, 18—21, 29) blieb die mikrooptische Methode negativ, während die beiden anderen positiv waren. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Schichtdichte der Zellen zurückzuführen. Bei Nr. 22 und 23 konnte nur eine geringe Färbung des ausgewaschenen Bodensatzes beobachtet werden; vielleicht handelte es sich hier nur um zwischen den Zellen zurückgehaltenen Farbstoff. Bei Nr. 24 scheint der Farbstoff an

<sup>65)</sup> Zentralbl. Bakt., I, 98, 71 (1926).

die Zelle nur schwach gebunden zu sein, da er in dem ausgewaschenen Bodensatz nicht mehr zu beobachten war. Es bestätigte sich, dass das hochmolekulare Nigrosin (Nr. 26) von den Zellen nicht aufgenommen wird; es ist aber auch nicht in Lezithin-Aether löslich. Ein Anhaltspunkt für die Porentheorie der Permeabilität ergibt sich also aus dem Verhalten dieses Farbstoffes nicht. Die mit den verschiedenen Methoden in einigen Fällen beobachtete verschiedene Intensität wird wohl auf die verschiedenen Farbnuancen zurückgeführt werden können.

Einen Vergleich mit der osmotischen Methode der Volumenverminderung haben wir nicht vorgenommen, da uns letztere keine deutlichen Resultate ergeben hatte.

Dagegen haben wir noch die mit lebender Hefe festgestellte Verteilung zwischen Zellen und umgebender Lösung verglichen mit derjenigen zwischen Lezithin-Aether und wässriger Lösung. Wir haben schon gesehen, dass es bei der Aufnahme einer Substanz allein auf deren relative Löslichkeit, d. h. das Verhältnis der Konzentrationen, mit denen sich ein Stoff auf zwei Lösungsmittel verteilt, ankommt. Dieses Verhältnis wird als Verteilungsquotient oder Teilungsfaktor bezeichnet. Wir haben nun von denjenigen Farbstoffen, die in den bisherigen Versuchen positive Resultate ergeben hatten, je 1 cm<sup>3</sup> der Lösung 1:1000 (oder gesättigt, wenn weniger löslich) mit 1 cm<sup>3</sup> 1/2%igem Lezithin-Aether gut durchgeschüttelt. Dann wurde die wässrige Schicht im Scheidetrichter abgetrennt und mit der unbehandelten Farbstofflösung im Kolorimeter verglichen (nachdem beide Lösungen 1:20 verdünnt worden waren).

Farbstoff Nr.	Die mit Lezithin-Aether behandelte Lösung enthielt noch vom ursprünglichen Farbstoffgehalt in %	Somit waren im Lezithin-Aether folgende % gelöst worden	Im früheren Versuch waren durch Hefe folgende % des Gehaltes der Farbstofflösungen aufgenommen worden
3	35	65	80
4	95	5	29
8	80	20	50
10	65	35	0
11	80	20	86
13	65	35	38
15	90	10	0
18	60	40	29
19	47,5	52,5	91
20	75	25	86
21	65	35	89
24	75	25	0
27	70	30	98
29	65	35	95

Wir konnten also keine Uebereinstimmung zwischen der Bindung der Farbstoffe an Hefezellen und der Löslichkeit in Lezithin-Aether feststellen. Gerade bei dem für seine antiseptische Wirkung bereits be-

kannten Fuchsin (Nr. 11) wäre zu erwarten gewesen, dass mehr als 50% des Farbstoffes in der Lezithin-Aetherlösung gelöst worden wären, wie dies eben bei der Hefezelle der Fall war; aber auch bei längerer Einwirkung (12 Std.) wurde kein anderes Resultat erzielt.

### 3. Hemmung.

Ist nun eine Substanz ins Innere der Zelle eingedrungen, so kann sie dort Hemmung der Zellfunktionen oder «Narkose» erzeugen. Nach Höber<sup>66)</sup> soll es überhaupt keine einzige leicht permeierende Substanz geben, die nicht auch narkotische Eigenschaften besitze. Wie die soeben beschriebenen Methoden, kann also auch die Hemmung der Zellfunktionen auf das Eindringen eines Stoffes schliessen lassen, so dass in Fällen, in denen Hemmung festgestellt werden kann, sich die Untersuchung auf Permeabilität erübrigt.

Zur **Prüfung der narkotischen Kraft** für eine bestimmte Zellart ist es notwendig dass man stets das gleiche Stadium der Narkose herbeiführe; am besten ist es nach Höber, die kritische narkotische Grenzkonzentration aufzusuchen, d. h. diejenige Narkotikumkonzentration in der die Zellen umspülenden Lösung, bei der eben die jeweils untersuchte Funktion charakteristisch verändert, etwa die Beweglichkeit eben aufgehoben wird. Bei unbeweglichen Mikroorganismen könnte zur Bestimmung des Hemmungswertes die Beobachtung der Bildung von Gärungsprodukten, oder der Vermehrung in Betracht kommen. Bei der Bestimmung des Hemmungswertes von Farbstoffen fand Sartorius<sup>67)</sup> mit einigen Ausnahmen bei der Typhus-Coli-Gruppe folgende abfallende Empfindlichkeitsskala:

Coli — Typhus — Paratyphus A — Paratyphus B.

Auch in der Ruhrgruppe soll sich eine Differenzierung erkennen lassen. Die Untersuchung von Farbstoffen konstitutionell verschiedener Gruppen ergab, dass die Vertreter einer Gruppe im allgemeinen stets dieselbe Wirkungsskala schaffen, dass aber die Substituenten qualitative und quantitative Verschiebungen herbeiführen. Sulfonierung vermindert z. B. die hemmende Wirkung, während Einführung von Halogen und Nitrogruppen dieselbe steigert. Mit den Methylgruppen steigert sich die Wirkung nicht proportional ihrer Anzahl, sondern schwächt sich mit stärkerer Methylierung ab.

Bei unseren orientierenden Versuchen prüften wir nur eine Farbstoffkonzentration, nämlich 0,5:1000. Wir prüften auf Hemmung der Gärung, wie wir<sup>68)</sup> dies schon einmal beschrieben haben, im Köstler'schen Katalasebestimmungsapparat. Da durch Eiweiss Farbstoff gebunden wer-

<sup>66)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, 6. Aufl., S. 572 (1926).

<sup>67)</sup> Zentralbl. Bakt., I, 99, 194 (1926).

<sup>68)</sup> Mittl. Lebensmittelunters. u. Hyg., 11, 197 (1920).

den könnte, brachten wir die Hefe in ein eiweissfreies Milieu, indem wir 0,2 g Presshefe in Laurent'scher Nährlösung<sup>69)</sup> die 10% Saccharose enthielt, aufschlemmten und mit dieser Lösung schliesslich auf 100 cm<sup>3</sup> auffüllten. Im Köstler-Apparat, an dessen Stelle natürlich z. B. auch die Smith'schen Gärkölbchen verwendet werden können, mischten wir in jedem Röhrchen je 5 cm<sup>3</sup> Farbstofflösung 1:1000 (oder gesättigt, wenn weniger löslich) mit 5 cm<sup>3</sup> der soeben besprochenen Presshefeaufschlemmung 0,2:100. Die Temperatur des mit Kohlensäure gesättigten Wassers im Köstler'schen Apparat betrug 20° C., welche Temperatur während des ganzen Versuches beibehalten wurde. In einem Leerversuch wurde an Stelle der Farbstofflösung isotonische Kochsalzlösung verwendet. Die gebildeten Kohlensäureanhydridmengen waren folgende:

Farbstoff Nr.	Beginn der Gärung (CO <sub>2</sub> im Eudiometer) nach ca. Stunden	Gebildete CO <sub>2</sub> -Mengen in cm <sup>3</sup>					
		1 Tag	2 Tagen	3 Tagen	5 Tagen	7 Tagen	10 Tagen
Isotonische NaCl-Lösung )	10	4,3	9,1	14,6	27,6	33,4	36,0
1	10	4,2	9,3	13,2	17,7	18,9	28,4
2	10	5,0	13,8	21,3	36,3	41,9	59,0
3	40	0	0,5	0,5	0,5	1,0	2,0
4	12	3,2	5,3	6,3	7,1	7,6	8,4
8	12	3,8	7,5	9,8	15,3	15,8	15,8
9	10	5,4	12,4	17,7	30,7	34,7	48,0
10	12	1,2	3,5	5,3	6,3	7,5	8,3
11	48	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
12	10	3,9	11,2	20,7	32,2	35,7	37,7
13	12	2,1	6,0	10,3	12,4	12,8	13,8
14	10	3,6	8,1	10,6	11,1	11,1	11,1
15	12	4,3	13,0	20,8	29,8	33,0	36,0
16	10	4,2	11,3	16,3	20,7	21,2	22,0
17	10	3,3	7,8	14,0	23,0	23,3	31,3
18	12	1,9	6,0	11,4	17,4	18,5	29,4
19	18	0,4	—	—	—	—	2,0
20	18	0,5	—	—	—	—	0,9
21	18	—	—	—	—	—	0,8
23	10	3,0	7,8	14,8	21,8	—	35,0
24	10	3,1	7,0	11,8	17,8	—	19,1
25	10	3,6	6,8	11,6	15,8	—	30,8
26	10	4,5	9,3	17,5	27,9	—	41,0
27	48	—	—	—	—	—	0,3
28	10	3,0	7,5	8,4	24,4	—	36,4
29	48	—	—	—	—	—	0,3

Diejenigen Röhrchen, welche starke Hemmung zeigten, wurden noch weiter beobachtet. In Nr. 3 wurde schliesslich ein Gasvolumen von 6,5 cm<sup>3</sup>, in Nr. 11 von 0,8 cm<sup>3</sup> erreicht, bei den übrigen Röhrchen mit starker Hemmung trat auch im weiteren Verlauf keine Gasvolumenzunahme mehr ein.

<sup>69)</sup> Vergl. Guilliermond, Les Levures, S. 217, Paris, 1912.

Wenn wir als deutliche Hemmung eine Kohlensäuremenge annehmen, die nach 10 Tagen 2 cm<sup>3</sup> nicht überschritt, so würden also die Farbstoffe 3, 11, 19, 20, 21, 27 und 29 eine solche Hemmung zeigen. Diese sieben Farbstoffe sind aber diejenigen, welche in unserem bereits erwähnten Versuch von Hefe zu mehr als 50% aufgenommen wurden. Wir haben somit Uebereinstimmung mit der quantitativen Methode der Bestimmung der Permeabilität durch Analyse der Aussenlösung (Verteilung in Hefe und Wasser). Dagegen ist die Uebereinstimmung weniger gut mit der optischen Bestimmung der Permeabilität, der Löslichkeit in Lezithin-Aether und der Verteilung in Lezithin-Aether und Wasser. Also kann die Löslichkeit in Lezithin-Aether und die Aufnahmefähigkeit durch Hefe nicht ohne weiteres als identisch gesetzt werden.

Wir haben auch noch versucht, die Vermehrung der Hefe in der bereits früher beschriebenen Weise<sup>70)</sup> zu verfolgen, nur dass wir im vorliegenden Fall keine Sodalösung vor dem Zentrifugieren zusetzten, da durch dieselbe einzelne Farbstoffe ausgefällt und so ein zu grosses Sediment ergeben würden. Die gebildeten Hefemengen waren aber zu klein, um ein deutliches Resultat zu geben.

Trotzdem wir keine genaue Uebereinstimmung zwischen der Löslichkeit in Lezithin-Aether und der hemmenden Wirkung feststellen konnten, will das noch nicht bedeuten, dass damit die **Lipoidtheorie der Hemmung** ohne weiteres widerlegt sei. Wir haben schon darauf hingewiesen, dass Nirenstein<sup>41)</sup> selber damit zurückhielt, das Lezithin geradezu als das lipoide Lösungsmittel der Zellen zu bezeichnen. Hans Horst Meyer<sup>71)</sup> und Overton<sup>72)</sup> haben aber darauf hingewiesen, dass die typischen Narkotika in der Mehrzahl chemisch inerte Stoffe sind. Dadurch wurde der Gedanke nahegelegt, dass ihre pharmakologische Wirkung auf einem gemeinsamen physikalischen oder physikochemischen Verhalten beruhen könnte. Diese Autoren bemerkten denn auch vor allem, dass die Fähigkeit eines Stoffes zu narkotisieren, seine narkotische Wirkungsstärke, im allgemeinen um so grösser ist, je grösser sein Verteilungsquotient Lipoid:Wasser ist. Lipoidlöslich sind nun aber keineswegs nur chemisch träge Verbindungen, wie die typischen Narkotika, sondern auch manche Säuren, Basen und Salze. Wenn nun auch diese im Sinne der physikalisch-chemischen Theorie der Narkose, wie namentlich durch Overton gezeigt wurde, narkotische Wirkungen entfalten, so gehen doch im Zusammenhang mit der chemischen Aktivität noch andere pharmakologische und toxikologische Wirkungen nebenher, für die die Vorbedingungen aber erst durch ihre Lipoidlöslichkeit beziehungsweise Adsorbierbarkeit geschaffen sind. Aehnliches könnte bei den Farbstoffen der Fall sein (vergl. Speicherung).

<sup>70)</sup> Mittl. Lebensmittelunters. u. Hyg., **11**, 195 (1920).

<sup>71)</sup> Arch. exp. Pathol., **42**, 109 (1899).

<sup>72)</sup> Studien über Narkose, Jena, 1901.

Erwähnen wollen wir noch, dass nach Meyer und Gottlieb<sup>73</sup> trotz der grossen chemischen Unterschiede der von ihnen untersuchten Narkotika die Narkose stets bei ungefähr der gleichen molaren Konzentration im Lipoid zustande kam; die Narkose trat ein, wenn sich das Narkotikum bis etwa 0,06 Mol im Lipoid angereichert hatte.

Aehnlich wie zur Erklärung der Permeabilität ist neben der Lipoidtheorie auch eine Absorptionstheorie der Narkose entwickelt worden. Traube<sup>74</sup>) hat zuerst als den entscheidenden Faktor für die Narkose die Oberflächenaktivität der Narkotika bezeichnet. Er beobachtete, dass isonarkotische Lösungen der Glieder einer homologen Reihe isokapillar sind. Vergleicht man aber Narkotika aus verschiedenen chemischen Gruppen miteinander, so zeigt sich, dass die isonarkotischen Lösungen bei weitem nicht immer isokapillar sind; den vielen Fällen, in denen Wirkungsstärke und Oberflächenaktivität symbar sind, stehen Fälle gegenüber, in denen jeder Zusammenhang vermisst wird.

Nach dem bei der Permeabilität gesagten liegt es nun nahe, an die Stelle der Oberflächenaktivität die Absorbierbarkeit, d. h. die Anreicherung an ein festes oder flüssiges Absorbens statt an Luft, zu setzen und zu prüfen, ob dieser Zusammenhang allgemeiner gültig ist. In der Tat werden nach Traube und Klein<sup>75</sup>) der oberflächenaktive Phenylharnstoff, sowie die Kohlenwasserstoffe und Halogenkohlenwasserstoffe von Tierkohle gut absorbiert. Auch sonst sollen sich feste anorganische Absorbentien gegenüber den Narkotika auffallend ähnlich wie die narkotisierbaren organischen Substanzen verhalten. Warburg<sup>76</sup>) hat nun gefunden, dass, so verschieden auch die isonarkotischen Konzentrationen in den Lösungen sind, die absorbierten Millimole nur zwischen 0,6 und 1,5 schwanken. Meyerhof<sup>77</sup>) konnte die Narkose als Grenzflächenphänomen dadurch charakterisieren, indem er zeigte, dass sich, ebenso wie die anorganischen Katalysatoren Kohle und Platin, auch Hefeinvertase durch Narkotika inaktivieren lässt. Schürmeyer<sup>78</sup>) fand dann, dass diese Narkotisierbarkeit verschwindet, wenn man die Invertase möglichst von anhaftenden kolloidalen Beimengungen befreit. Sobald man aber zu der Invertaselösung wieder Eiweiss hinzufügt, ist die Narkotisierbarkeit wieder hergestellt. Für die Narkose scheint also eine gewisse Mehrphasigkeit des Systems notwendig zu sein. Warburg<sup>79</sup>) hat ferner gezeigt, dass

<sup>73</sup>) Ztschr. physiol. Chem., **112**, 55 (1921) u. Meyer u. Hopff, Ztschr. physiol. Chem., **126**, 281 (1923).

<sup>74</sup>) Pflügers Arch., **132**, 511 (1910), **153**, 276 (1913), **160**, 501 (1915), **161**, 530 (1915).

<sup>75</sup>) Bioch. Ztschr., **120**, 111 (1921).

<sup>76</sup>) Bioch. Ztschr., **119**, 245 (1921).

<sup>77</sup>) Pflügers Arch., **157**, 251 (1914).

<sup>78</sup>) Pflügers Arch., **208**, 595 (1925).

<sup>79</sup>) Bioch. Ztschr., **103**, 188 (1920).

die Assimilation einer chlorophyllführenden Alge durch Phenylurethan entsprechend einer Absorptionsisotherme gehemmt werde.

Andererseits konnte aber Meyerhof<sup>80)</sup> bei der Atmung nitrifizierender Bakterien feststellen, dass das Narkotikum in höheren Konzentrationen nicht nur nicht relativ schwächer als in niedrigen Konzentrationen wirkt, wie es für einen Absorptionsvorgang zu erwarten gewesen wäre, sondern sogar relativ stärker. Ausserdem wird nach Lipschitz und Gottschalk<sup>81)</sup> die Reduktion von Nitrobenzol zu Phenylhydroxylamin durch Muskulatur von den Narkotika annähernd proportional ihrer Konzentration gehemmt. Ob aber diese Befunde durchaus der Absorptionauffassung widersprechen, wird von Höber<sup>82)</sup> bezweifelt, da bei der Absorption an einer gequollenen und eventuell hochdispersen Phase, wie sie bei Zellen in Betracht zu ziehen ist, Nebenwirkungen die typische Absorption verschleiern können.

Für die Erklärung der narkotischen Reaktionshemmungen kann also einerseits die mehr oder weniger umfangreiche Zudeckung der Reaktionsorte durch die oberflächenaktiven Narkotika in Erwägung gezogen werden. Andererseits kann aber auch eine Kolloidflockung durch die Narkotika in Betracht kommen, denn Moore und Roaf<sup>83)</sup>, sowie R. Goldschmidt und Przi Bram<sup>84)</sup> haben beobachtet, dass die kolloidalen Lösungen von Lipoiden durch relativ kleine Konzentrationen von Narkotikum ausgefällt werden können, während grosse sie natürlich lösen. Aber auch nicht lipoide, hydrophile Sole werden in der gleichen Weise verändert. So sahen Warburg und Wiesel<sup>85)</sup> am Hefepresssaft eine an Stärke mit der Hemmung der Gärkraft parallel laufende Fällung zustande kommen. Den entsprechenden Zusammenhang gibt es nach Battelli und Stern<sup>86)</sup> auch bei der narkotischen Lähmung der Oxydationen in Gewebsauszügen einerseits und der Fällung von Nukleoproteiden der Leber andererseits.

Man hat nun auch noch versucht zu einer Vorstellung des Narkosevorganges zu gelangen, die weder von der Existenz der Lipoide noch von irgendwelchen Störungen des Chemismus Notiz zu nehmen braucht. Bei Verwendung relativ niedriger Konzentrationen können die Narkotika nämlich auch im Sinne einer Permeabilitätsverminderung wirken. Dies kann z. B. so gezeigt werden, dass man den Austritt von Stoffen aus dem Zellinnern in Gegenwart und in Abwesenheit von Narkotikum verfolgt. Besonders geeignet sind dafür gefärbte Zellen, wie z. B. Blutkörperchen,

<sup>80)</sup> Pflügers Arch., **165**, 229 (1916).

<sup>81)</sup> Pflügers Arch., **191**, 1 (1921).

<sup>82)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, S 586 (1926).

<sup>83)</sup> Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, **73**, 382 (1904) u. **77**, 76 (1906).

<sup>84)</sup> Ztschr. exp. Path., **6**, 1 (1909).

<sup>85)</sup> Pflügers Arch., **144**, 465 (1912).

<sup>86)</sup> Bioch. Ztschr., **52**, 226 u. 253 (1913).

bei denen Traube<sup>87)</sup> sowie Arrhenius und Bubanovic<sup>88)</sup> zeigen konnten, dass der Austritt von Hämoglobin, etwa in schwach hypotonische Lösungen, durch kleine Narkotikumdosen verzögert, durch grössere freilich beschleunigt werden kann. Andere Versuche behandeln die Aenderung der Durchlässigkeit für Elektrolyte, die besonders mit Hilfe der Leitfähigkeitsmessungen mit grosser Genauigkeit und nach ihrem zeitlichen Verlauf verfolgt werden können. Der Einfluss der Narkose auf die Permeabilität für Elektrolyte wurde ferner auch auf chemischem und osmometrischem Wege geprüft. Aus allen diesen Versuchen ergab sich die Abhängigkeit der Permeabilität von dem Einfluss der Narkotika.

Wenn durch die bisherige Darstellung des Narkoseproblems die Narkose in erster Linie als eine Hemmung chemischer Reaktionen aufgefasst wurde, die sich im heterogenen System der Zellen abspielen und deshalb durch Absorption der oberflächenaktiven Narkotika zu beeinflussen sind, so fragt sich nun Höber<sup>89)</sup>, ob dieser Theorie der Narkose nicht eine Permeabilitätstheorie gleichberechtigt an die Seite gestellt werden kann. Für diesen Fall erhält aber die Feststellung eine besondere Bedeutung, dass die Narkose, die ihrem Wesen nach ein reversibler Vorgang ist, sich sowohl in einer reversiblen Erniedrigung als auch in einer reversiblen Erhöhung der Permeabilität äussern kann.

Wie man sich nun die permeabilitätsvermindernde Wirkung der Narkotika, die durch relativ kleine Dosen hervorgerufen wird, auf die eine oder andere Weise physikochemisch deuten kann, so gelingt es nach Höber auch, sich die permeabilitätssteigernde Wirkung grösserer Dosen modellmässig klar zu machen. Dafür wird erstens in Betracht kommen, dass die Narkotika nicht bloss lipoidlöslich, sondern auch selber Lipoidlösungsmittel sind, so dass sie die Lipide nicht bloss durchtränken und mehr und mehr verflüssigen, sondern durch Herauslösen von Lipoiden aus der Plasmahaut diese quasi durchlöchern können, wie denn auch ein Uebertritt von Lipoiden ins Blut bei tiefer und andauernder Narkose nach Reicher<sup>90)</sup> beobachtet wird. Ein zweiter Faktor der Permeabilitätssteigerung ist vielleicht die Fällungskraft, welche die Narkotika in grösseren Konzentrationen auf die Kolloide ausüben; durch eine Flockung in der Plasmahaut können deren Poren erweitert werden. Namentlich dieser zweite Prozess bei der Narkotisierung der Plasmahaut kann reversibel verlaufen, so dass wir uns auch die reversible Permeabilitätssteigerung durch Narkose modellmässig klar machen können. Jedenfalls ist die Auflockerung durch Quellung aber physikochemisch ganz etwas anderes als die Permeabilitätssteigerung durch Weglösen von Lipoiden oder auch als die Ausflockung der Kolloide, die nur durch übermässige Narkotikumkonzentrationen hervorzurufen sind.

<sup>87)</sup> Bioch. Ztschr., **10**, 371 (1908).

<sup>88)</sup> Meddl. K. Vetensk. Akad. Nobelinst., **2**, Nr. 32 (1913).

<sup>89)</sup> Physik. Chem. Zelle u. Gewebe, S. 602 (1926).

<sup>90)</sup> Ztschr. klin. Med., **65**, 235 (1908).

#### 4. Speicherung.

Wie wir schon bei der Besprechung der Hemmung im vorigen Abschnitt erwähnt haben, gibt es von den absorbierbaren chemisch inerten Stoffen aus zahlreiche Uebergangsstufen zu den absorbierbaren, chemisch aktiven, nämlich basischen und sauren Verbindungen. Danach kann man nach Overton<sup>91)</sup> auch erwarten, dass, als pharmakologische Analogie dazu, auch zahlreiche Uebergänge von den typischen Narkotika zu den Stoffen führen, bei denen die narkotische Wirkung mehr und mehr in den Hintergrund tritt und dafür diejenigen Wirkungen sich mehr und mehr hervorkehren, die von der **chemischen Aktivität**, von der Reaktionsfähigkeit als Base oder Säure herrühren. So lassen Verbindungen wie Anilin, Diphenylamin, Dimethylamin, also die aromatischen Amine, die äusserst schwache Basen sind, von den Nebenwirkungen noch wenig erkennen; sie verursachen etwa bei Froschlarven, typische oder fast typische, ohne weitere Folgen vorübergehende Narkosen; ebenso Pyridin und Chinolin. Anders verhalten sich dagegen deren bekannte Derivate, die Alkaloide, ferner die aliphatischen Amine, die zu einem mit Hilfe von Leitfähigkeitsbestimmungen schon messbaren Bruchteil dissoziiert sind. Schumacher<sup>92)</sup> hat auch bei den schwach basischen Farbstoffen Fuchsin, Gentianaviolett und Rosanilinblau antiseptische Wirkung beobachtet, während dieselbe bei ihren Sulfoderivaten fehlt.

Sobald nun ein dissoziierter Anteil vorliegt, ist Gelegenheit zu chemischer Reaktion mit irgendwelchen Protoplastenbestandteilen gegeben, die sich etwa zu der Base wie eine Säure verhalten. Es wirken demnach die Basen — und Entsprechendes könnte für die Säuren gelten — nicht bloss durch Aenderung des physikalischen Zustandes der Zellgrenzflächen, sondern sie verankern sich ausserdem chemisch mit den Zellbestandteilen. Für die Folgen davon ist dann allerdings die Stärke der Basizität sehr wenig massgebend, denn die Verankerung kann zur Bildung sehr verschiedener Verbindungen Anlass geben. Das macht es vielleicht begreiflich, dass, ganz im Gegensatz zu den indifferenten Narkotika, die basischen selbst auf nahe verwandte Organismen sehr verschieden wirken, und dass der Vergiftungszustand oft auch nicht annähernd so rasch nach Einbringen in ein indifferentes Medium wieder verschwindet, als nach der Absorbierbarkeit oder auch der Lipoidlöslichkeit zu erwarten gewesen wäre.

Wir haben gesehen, dass die Absorbierbarkeit oder speziell die Absorbierbarkeit an die Zellipoide, die Lipoidlöslichkeit, es mit sich bringt, dass die Stoffe ins Innere der Zellen hineingelangen können, und es lässt sich voraussehen, dass Absorbierbarkeit und Giftigkeit bis zu einem gewissen Grade symbat sein werden. Denn bei grosser Absorbierbarkeit wird

<sup>91)</sup> Studien über Narkose, Jena, 1901.

<sup>92)</sup> Zentralbl. Bakt., I, 98, 67 (1926).

das Gift rasch bis an die Reaktionsorte vordringen, während bei geringerer Absorbierbarkeit die kleinen jeweils permeierenden Mengen durch irgendwelche Nebenreaktionen ausgeschaltet sein können, bevor sie ihre «eigentlichen» Wirkungen ausüben. Ein Beispiel dafür bieten Versuche von Boeseken und Waterman<sup>93)</sup> über die Wachstumshemmung von *Penicillium glaucum* durch aromatische Säuren. Von diesen ist anzunehmen, dass sie chemisch in erster Linie durch ihre Wasserstoffionen schädlich sind. Es hat sich aber gezeigt, dass der über das Mass von Giftigkeit entscheidende Faktor nicht die Dissoziation, sondern die Verteilung in Oel und Wasser ist. Der Verteilung dürfte wohl die Absorbierbarkeit weitgehend parallel gehen. Den Vorgang der Vergiftung mit den aromatischen Säuren stellt sich Overton<sup>94)</sup> so vor, dass es die undissoziierten Säuremoleküle sind, welche als die vorzüglich absorbierbaren Bestandteile der Lösung ins Zellinnere vordringen, um dann dort zu dissoziieren und in Reaktion zu treten.

Ein weiteres Beispiel für den Zusammenhang zwischen Absorbierbarkeit und Giftigkeit ist die Beobachtung von Overton<sup>95)</sup>, dass Fische oder Kaulquappen in einer 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub>igen Lösung von Strichninitrat eine Zeit lang am Leben bleiben, dass wenn man aber noch ein wenig Soda hinzufügt, dieselben rasch zu Grunde gehen. Diese Beobachtung ist so zu erklären, dass die Alkaloidbase durch die Alkalisierung aus ihrem Salz frei gemacht wird, und dass sie zufolge ihrer Absorbierbarkeit oder Lipidlöslichkeit im Gegensatz zu ihren Ionen rasch in die Zellen eindringt. Diese Giftigkeitssteigerung bei Alkaloidsalzen durch Zufügung von Alkali ist seither auch von anderen Autoren (Gros, Prziham, Traube, Berczeller) studiert und mit der Aenderung der Oberflächenspannung in Zusammenhang gebracht worden. Man kann nämlich vielfach konstatieren, dass bei denjenigen Lösungen von Alkaloidsalzen, bei denen durch Zusatz von etwas Soda die Giftigkeit stark zunimmt, durch denselben Zusatz die kapillarimetrisch oder stalagmometrisch gemessene Oberflächenspannung stark sinkt.

Ein Zusammenhang zwischen Giftigkeit und Absorbierbarkeit äußert sich auch darin, dass die Zunahme der Giftigkeit mit der Konzentration der Absorptionsisothermen folgt. Ein solches Beispiel ist die von Rona und Bloch<sup>96)</sup> beobachtete Hemmung der Invertasewirkung durch Chinin-HCl. Wenn man bei einem bestimmten  $p_H$ -Wert die Abhängigkeit der Invertasewirkung von der Chininkonzentration untersucht, so ergibt sich, dass die prozentische Hemmung durch das Chinin lang-

<sup>93)</sup> Koninkl. Akad. Wetensch. Amsterdam, 608 (1912) und Zentralbl. Bakt., II, 42, 639 (1914).

<sup>94)</sup> Pflügers Arch., 92, 115 (1902).

<sup>95)</sup> Ztschr. physik. Chem., 22, 189 (1897).

<sup>96)</sup> Bioch. Ztschr., 118, 185 (1921).

samer zunimmt, als die Giftkonzentration. Bei der graphischen Darstellung der erhaltenen Resultate zeigte sich, dass die Konzentrationshemmungskurve einer Absorptionsisotherme entspricht. Ebenso wie Chinin verhalten sich Eukupin, Optochin und Vuzin. Nach Rona<sup>97)</sup> ist aber keineswegs jede Enzymvergiftung Folge einer Absorption. Die Vergiftung mit steigenden Dosen Alkaloid kann aber auch bei Organen oder bei ganzen Organismen entsprechend einer Absorptionsisotherme verlaufen.

Auch die Art, in der die Geschwindigkeit der Giftwirkung von der Konzentration in manchen Fällen abhängig ist, ist als Ausdruck einer primären Absorption des Giftes gedeutet worden. Nach Morawitz<sup>98)</sup> wird Sublimat von Zellen entsprechend der Absorptionsisotherme gebunden. Sublimat ist den sonst hier erwähnten Verbindungen an die Seite zu stellen, als es zu den wenigen anorganischen Stoffen gehört, die lipoidlöslich sind.

Das Stadium der Giftigkeit von Desinfektionsmitteln hat noch in anderer Hinsicht auf den Zusammenhang zwischen Absorption und Giftigkeit hingewiesen. Scheurlen<sup>99)</sup> hat schon darauf aufmerksam gemacht, dass die Wirkung des Phenols durch Kochsalzzusatz gesteigert werden kann. Spiro und Bruns<sup>100)</sup> haben dies sodann als eine Folge einer Aus-salzung des Desinfektionsmittels angesehen, weil die verschiedenen Neutralsalze zu der Giftigkeitsverstärkung nach der Stellung ihrer Ionen in der lyotropen Reihe befähigt sind; die Anionenwirkung steigt in der Reihenfolge:



die der Kationen in der Reihenfolge:



Entsprechend dem verschiedenen Hydratationsbestreben der Ionen wird also das Phenol sozusagen mehr oder weniger aus seiner wässerigen Lösung verdrängt. In Uebereinstimmung damit fand Reichel<sup>101)</sup>, dass der Verteilungsquotient des Phenols für das System Oel:Wasser durch die Salze vergrößert wird. In ähnlicher Weise wird nach Eisenberg und Okolska<sup>102)</sup> auch die Giftigkeit von Alkohol, Azeton, Pyridin, Chloralhydrat u. a. durch Salze verstärkt. Dagegen sind nach Spiro und Bruns Nichtleiter wie Harnstoff, Glycerin, Traubenzucker, Mannit zur Verstärkung ungeeignet. Für die Theorie der Salzwirkung ist aber von Wichtigkeit, dass nicht bloss die Verteilung auf ein lipoides Lösungsmittel wie

<sup>97)</sup> Bioch. Ztschr., **111**, 166 (1920); **118**, 213 (1921) u. **121**, 235 (1921).

<sup>98)</sup> Kolloidztschr., **6**, 259 (1910).

<sup>99)</sup> Arch. exp. Path., **37**, 74 (1896).

<sup>100)</sup> Arch. exp. Path., **41**, 355 (1898).

<sup>101)</sup> Bioch. Ztschr., **22**, 149 (1909).

<sup>102)</sup> Zentralbl. Bakt., **69**, 312 (1913).

Oel, sondern auch die Absorption, wenigstens die Absorption an Luft, durch die Salze verstärkt wird. Berczeller<sup>103)</sup> wies durch Stalagmometrie nach, dass die Oberflächenspannung von Lösungen von Phenol, Thymol, Hydrochinon, Kampfer u. a. bei Salzzusatz sinkt, wobei Na stärker wirkt als K, Cl stärker als J.

In diesem Zusammenhang sei endlich noch an die Möglichkeit erinnert, die Giftigkeit eines absorbierbaren Stoffes dadurch abzuschwächen, dass man ihn mit einem zweiten Absorbens in Konkurrenz bringt. Ausserdem kann man auch einen zweiten stark absorbierbaren Stoff einführen, der das Gift aus den Zellgrenzflächen, von denen aus es wirkt, verdrängt.

Nach all dem gesagten hält Schumacher<sup>104)</sup> die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln dadurch charakterisiert, dass sie erstens wasser- und lipoidlöslich sind und eine grössere Lipoid- als Wasserlöslichkeit haben, damit die Lipoide bzw. Lipoproteide der Bakterien und Hefezelle, kraft ihres Lösungsvermögens für diese Stoffe, diese auch aus hohen Verdünnungen der wässerigen Lösungen elektiv aufzunehmen vermögen. Es muss also zuerst zu einer *elektiven Speicherung* des Desinfektionsmittels in den Kern- und übrigen Zelllipoiden der Mikroorganismen kommen. Alle unseren guten Desinfektionsmittel, wie z. B. Sublimat, Phenol, Salizylsäure, Chinin, sind in Wasser relativ schwer, aber in Lipoiden gut löslich. Die Viktoriablau-Base ist in Wasser sogar nur im Verhältnis 1:1000000 löslich, aber selbst aus dieser Verdünnung entziehen die Mikroorganismen die Base elektiv und färben sich im Tone der Viktoriablau-Base blau, nach 24 Stunden sogar ganz intensiv blau, wenn wir nur durch Zugabe von Viktoriablau-Base dafür sorgen, dass die der wässerigen Lösung durch die Mikroorganismen entzogenen Moleküle der Base aus der im Ueberschuss zugesetzten Substanz wieder in Lösung zu gehen vermögen. Zweitens soll sekundär eine *Salzbildung* zwischen dem von den Zelllipoiden aufgenommenen Desinfektionsmittel und den Zellinhaltsstoffen stattfinden, d. h. das Desinfektionsmittel soll einen dissoziierbaren Anteil haben. Die Salzbildung glaubt Schumacher durch die Tatsache bewiesen zu haben, dass die Hefelipoproteide und diejenigen anderer Mikroorganismen sich mit der rotvioletten Viktoriablau-Base blau färben, was nicht der Fall sein könnte, wenn lediglich eine Absorption der Base vorläge. Auch mit der absolut farblosen Base des Neufuchsins färben sich die Zellen im Tone der Salze dieser Base rot. Der Desinfektionsvorgang wäre also letzten Endes ein chemischer Vorgang. Auffallend ist, dass die Membran der Hefezellen bei diesen Farbstoffaufnahmen farblos bleibt; auch Trypanosomen sollen sich ebenso verhalten und nur eine Anfärbung der Kernsubstanz zeigen. Nach Schu-

<sup>103)</sup> Bioch. Ztschr., **66**, 173 (1914).

<sup>104)</sup> Zentralbl. Bakt., I, **98**, 67 (1926).

macher sollen die Zellmembranen weder Lezithin, noch Zerebroside oder phosphatide irgendwelcher Art enthalten. Trotzdem auch Baumgärtel<sup>105)</sup> sagt, dass die Zellhaut namentlich aus Gluziden besteht, führt er dennoch ein Beispiel an, wonach durch Vitalfärbung der Bakterienzelle mit verdünnter Methylenblaulösung die Zellhaut als zartblaue Linie um den farblosen Zelleib zur Darstellung gebracht werden kann; erst nach längerer Einwirkung wird dieser Farbstoff auch vom Zellinhalt aufgenommen. Weiter vorne haben wir auch gesehen, dass nach Effront<sup>58)</sup> der braune Farbstoff der Bierwürze sich ebenfalls in der Membran der Hefe festsetzt. Wir haben auch angeführt, dass nach den Untersuchungen von Hansteen Cranner<sup>21)</sup> die Zellhäute zahlreicher Zellen mit Lipoiden imprägniert sind. Aehnliche Schlüsse haben wir ferner aus den Versuchen von Grijns<sup>22)</sup> und Hedin<sup>23)</sup> gezogen. Es gibt also sowohl Farbstoffe, die sich besser in der Membran als auch solche, die sich besser im Zellinnern lösen.

Wir haben nun noch an unseren Farbstoffen einen orientierenden Versuch über deren allfällige antiseptische **Wirkung** angestellt. Beim ersten Versuch verwendeten wir Presshefe in einer Konzentration von 10%, indem wir in sterile Reagensgläser je 1 cm<sup>3</sup> Presshefeaufschlemmung 20:100 und 1 cm<sup>3</sup> Farbstofflösung 1:1000 (oder gesättigt, falls weniger löslich) abfüllten und im Dunkeln bei 20° 24 Stunden lang wirken liessen. Dann wurde gut durchgeschüttelt und je eine kleine Oese in 10 cm<sup>3</sup> Bierwürze von 10° Balling geimpft. Selbstverständlich wurde bei dieser Abimpfung darauf geachtet, dass die Wände des Röhrchens nicht berührt wurden, da sich an denselben vom Impfen her noch Hefezellen befinden könnten, die mit der Farbstofflösung nicht in Kontakt waren. Der Beginn der Gärung in der Bierwürze trat nach folgenden Zeiträumen ein:

Farbstoff Nr.	Beginn der Gärung nach Stunden
1—10	15
11	24
12—26	15
27	20
28—29	15

Wir konnten also bei dieser Hefekonzentration nur mit zwei Farbstoffen (Nr. 11 und 27) eine Verzögerung der Gärung beobachten, denn auch bei Ersetzen der Farbstofflösung durch isotonische Kochsalzlösung trat die Gärung nicht vor 15 Stunden ein. Diese beiden Farbstoffe waren auch die einzigen, welche gefärbte Granula zeigten. Ob es sich aber dabei um eine Salzbildung nach Schumacher handelt, ist fraglich, denn durch mehrmaliges Auswaschen der Zellen mit isotonischer Kochsalzlösung

<sup>105)</sup> Grundriss der theoretischen Bakteriologie, Berlin, 1924.

konnten die Granula wieder entfärbt werden. Wahrscheinlich fand auch in den für die Prüfung der Desinfektionswirkung angelegten Bierwürzekulturen eine solche Herauslösung des Farbstoffes statt.

Da also auch mit diesen beiden Farbstoffen keine Desinfektionswirkung festgestellt werden konnte, nahmen wir mit denselben nochmals Abimpfungen nach 2, 4 und 8 Tagen vor, konnten aber auch nach diesen Zeiträumen keine Abtötung feststellen.

Wir verminderten nun die Hefekonzentration auf 1% und prüften vorläufig die Wirkung der beiden die Granula stark färbenden Farbstoffe Nr. 11 und 27, unter gleichzeitiger Mitverwendung von Nr. 12 als Vertreter der nichtfärbenden Farbstoffe. In sterile Reagensgläser wurden je 1 cm<sup>3</sup> Farbstofflösung und 1 cm<sup>3</sup> Presshefeaufschlemmung 2:100 abgefüllt. Nach 24stündiger Einwirkung im Dunkeln bei 20° wurde gut durchgeschüttelt und je eine kleine Oese dieser Hefesuspension-Farbstofflösungen in einer grossen Oese Wasser aufgeschlemmt und die Zellen mikroskopisch beobachtet:

Farbstoff Nr.	Gesamter Zellinhalt
11	Violett gefärbt
12	Ungefärbt
27	Blauviolett gefärbt

Bei Nr. 27 konnten wir gerade noch eine einzige ungefärbte Zelle beobachten.

Ferner wurde je eine kleine Oese gut durchgeschüttelte Hefesuspension-Farbstofflösung in 10 cm<sup>3</sup> Bierwürze geimpft, ebenso nach 2, 4 und 8 Tagen:

Abimpfung nach Tagen	Eintretende Gärung nach Stunden		
	Nr. 11	Nr. 12	Nr. 27
1	36	24	36
2	24	20	28
4	Erst nach 48 Stunden abgelesen: überall Gärung		
8	24	20	26

(Bodensatz nach 24 Stunden: schwach stark sehr schwach)

Den auffallenden Befund, dass Gärung nach der nach einem Tag erfolgten Abimpfung später auftritt als bei der Abimpfung nach 2 Tagen, haben wir noch öfters machen können.

Zuletzt wurde noch eine grosse Oese Hefesuspension-Farbstofflösung unverdünnt unter dem Mikroskop untersucht, um die Farbstoffverteilung auf die Zelle und die umgebende Flüssigkeit feststellen zu können. Bei Nr. 11 war der gesamte Zellinhalt stark violett gefärbt, die Zellen schienen zu Klümpchen zusammengeflockt zu sein; die Aussenlösung war beinahe farblos. Bei Nr. 12 waren die Zellen farblos, allerdings war auch die Aussenlösung unter dem Mikroskop kaum merklich rosa gefärbt. Nr. 27 hatte dagegen wieder einen dunkelvioletten Zellinhalt.

Wir gingen nun noch weiter herunter mit der Hefekonzentration, indem wir wieder in der gleichen Weise verfahren, nur dass wir jetzt zum Abimpfen in Bierwürze je eine grosse Oese der gut durchgeschüttelten Hefesuspension-Farbstofflösung nahmen. Bei einer Hefekonzentration von 0,1% konnten wir nun mit Nr. 27 Abtötung feststellen; die nach 1, 2, 4 und 8 Tagen angelegten Kulturen zeigten auch nach 2 Monaten kein Wachstum.

Mit dieser Hefekonzentration prüften wir dann die sieben Farbstoffe, welche bei unseren früheren Versuchen die stärkste Hemmung gezeigt hatten. Als Kontrollen verwendeten wir Nr. 12 und isotonische Kochsalzlösung. In sterile Reagensgläser wurde wiederum je 1 cm<sup>3</sup> 1%ige oder gesättigte Farbstofflösung (oder isotonische Kochsalzlösung) und 1 cm<sup>3</sup> Presshefeaufschlemmung 0,2:100 abgefüllt. Der Kontrollversuch mit isotonischer Kochsalzlösung zeigte einen p<sub>H</sub> von 5,7. Die Röhren wurden auch wieder im Dunkeln bei 20° aufbewahrt und täglich zweimal durchgeschüttelt. Nach 1, 2, 4, 8 und 16 Tagen wurde je eine grosse Oese der gut durchgeschüttelten Hefesuspension-Farbstofflösung in 10 cm<sup>3</sup> Bierwürze (optimaler Nährboden) von p<sub>H</sub> = ca. 5,7 abgeimpft und bei 25° (Optimaltemperatur) bebrütet. Aus je drei Parallelversuchen ergaben sich folgende Durchschnittsergebnisse:

Abimpfung nach Tagen	Nr. 3	Deutliche Gärung nach Stunden							
		11	19	20	21	27	29	12	NaCl
1	2 <sup>1</sup>	42	24	24	24	60 <sup>4</sup>	36	24	24
2	2 <sup>2</sup>	— <sup>3</sup>	24	24	24	—	72	24	24
4	2 <sup>2</sup>	—	24	24	24	—	— <sup>3</sup>	24	24
8	2 <sup>2</sup>	—	24	24	24	—	—	24	24
16	2 <sup>2</sup>	—	24	24	24	—	—	24	24

<sup>1</sup> In einem von 3 Fällen Gärung nach 3 Tagen, in den beiden anderen Fällen Bakterienwachstum.

<sup>2</sup> Nach 3 Tagen Bakterienwachstum ohne Gärung.

<sup>3</sup> In einem von 3 Fällen Gärung nach 96 Stunden.

<sup>4</sup> In einem von 3 Fällen —.

Die mit — bezeichneten Versuche ergaben auch nach 3 Wochen keine Gärung oder Wachstum. Demnach lässt sich bei einer Hefekonzentration von 0,1% bei Fuchsin, Methylviolett und Malachitgrün eine antiseptische Wirkung feststellen. Für Chrysoidin (Nr. 3), welches in wiederholten Malen keine Gärung mehr zeigte, sondern nur Bakterienwachstum, sollte der Versuch mit Reinhefe wiederholt werden.

Obschon in der vorstehenden Versuchsreihe mit einer Farbstoffkonzentration von 0,05% keine wahrnehmbare Entfärbung der Farbstofflösungen eingetreten war, die auf ungenügende Farbstoffmenge hätte schliessen lassen, haben wir mit den drei keine Abtötung erzielenden Farbstoffen noch eine höhere Farbstoffkonzentration ausprobiert, nämlich

1%. In sterile Reagensgläser wurden diesmal je 1 cm<sup>3</sup> Farbstofflösung 2:100 und 1 cm<sup>3</sup> Presshefeaufschlemmung 0,2:100 abgefüllt und im übrigen wie bei den vorigen Versuchen verfahren:

Abimpfung nach Tagen	Deutliche Gärung nach Stunden			
	Nr. 19	Nr. 20	Nr. 21	NaCl
1	24	24	24	24
2	24	24	24	24
4	24	24	24	24
8	24	24	24	24

Also auch bei dieser Konzentration konnten wir für Erythrosin, Eosin, Spritlösliches Eosin und Phloxin P keine antiseptische Wirkung feststellen, trotzdem der frühere Hemmungsversuch positiv ausgefallen war. Die Gärung ist nach 24 Stunden bei der aus isotonischer Kochsalzlösung abgeimpften Hefe allerdings etwas stärker als bei der mit den Farbstoffen behandelten. Trotzdem bei dieser Farbstoffkonzentration bei der Abimpfung die Bierwürze durch den mit der Oese übertragenen Farbstoff etwas gefärbt wurde, genügte diese Farbstoffmenge nicht, um in den Kulturen eine ausgesprochene Hemmung zu erzeugen.

Noch höhere Farbstoffkonzentrationen auszuprobieren erachteten wir als überflüssig, denn solche Farbstoffmengen dürften wohl in Lebensmitteln nie vorkommen und bedeuten jedenfalls auch einen gewaltigen Ueberschuss im Verhältnis zu der Menge, die von der von uns eingesäten Anzahl Hefezellen aufgenommen werden kann. Die vor der Verdünnung hergestellten 2%igen Lösungen scheinen sich übrigens der Grenze der Löslichkeit zu nähern, wenigstens was Nr. 19 anbetrifft.

### 5. Zusammenfassung.

Die Wirkung von Farbstoffen auf Mikroorganismen ist bekanntlich grundverschieden, je nachdem ob es sich um tote oder lebende Zellen handelt. In ersterem Falle scheint die Permeabilität der Zellmembran ganz bedeutend erhöht zu sein, denn bekanntlich nehmen bei der mikroskopisch-bakteriologischen Diagnostik die Zellen viele Farbstoffe mit Leichtigkeit auf, die bei lebenden Zellen nicht in sie hineinzudringen vermögen. Für die antiseptische Wirkung kommt aber selbstverständlich allein das Eindringungsvermögen der Farbstoffe in die lebende Zelle in Betracht.

Für die *Permeabilität* der Membran lebender Zellen können wir eine physikalische und eine physiologische Permeabilität unterscheiden. Eine vollständig befriedigende Theorie für die physikalische Permeabilität ist noch nicht gefunden worden; es scheint aber, dass sich die Porentheorie in Uebereinstimmung bringen lassen könnte mit der Lipoid- und der Absorptionstheorie. Die physiologische Permeabilität nach Höber scheint mit dem Nahrungsbedürfnis der Zelle zu wechseln, während die physika-

lische Permeabilität unverändert bleibt. Wir können also wohl annehmen, dass wir im Ruhezustand der Zelle nur mit der physikalischen Permeabilität zu tun haben, während bei der Assimilation oder anderen Lebenstätigkeiten der Zelle noch die physiologische Permeabilität dazu kommt. Bei der Hefe ist ja bekannt, dass bei der Gärung Stoffe aufgenommen werden, die beim Ruhezustand der Zellen nicht in dieselben einzudringen vermögen.

Auch für die *Hemmung* der Lebenstätigkeiten ist man sich noch nicht im klaren, ob man der Theorie der Löslichkeit in Lipoiden oder der Absorptionstheorie den Vorzug geben soll. Dazu kommt noch, dass man auch versucht hat, die Hemmungen auf eine Veränderung der Membranpermeabilität zurückzuführen. Für die Absorption könnte einerseits eine Zudeckung der Reaktionsorte durch die oberflächenaktiven Narkotika, andererseits eine Kolloidflockung durch die Narkotika in Betracht kommen.

Für die *antiseptische Wirkung* können wir wohl annehmen, dass ein Antiseptikum dadurch charakterisiert ist, dass es erstens in der Zelle stärker löslich ist als in der Aussenlösung, um auch aus hohen Verdünnungen elektiv aufgenommen zu werden. Man hat bisher angenommen, dass der Verteilungsquotient Wasser:Zelle identisch sei mit dem Verteilungsquotienten Wasser:Lipoid. Unsere Versuche haben dies aber nicht bestätigt; Hemmung und Abtötung stimmten mit dem Verteilungsquotienten Wasser:Zelle überein, nicht aber mit dem Quotienten Wasser:Lipoid. Neben dieser elektiven Speicherung des Antiseptikums soll nach Schumacher in der Zelle sekundär eine Salzbildung mit den Zellinhaltsstoffen stattfinden, d. h. das Desinfektionsmittel soll einen dissoziierbaren Anteil haben. Der Desinfektionsvorgang wäre also letzten Endes ein chemischer Vorgang, während für die Hemmung ein dissoziierbarer Anteil nicht nötig wäre und das blosse Eindringen genügen würde. Mit Farbstoffen scheint die Salzbildung im Zellinnern nur sehr locker zu sein, da wir die erhaltenen Färbungen mit Leichtigkeit wieder auswaschen konnten. Wir haben noch nicht nachgeprüft, ob dadurch auch die Lebenstätigkeit der Zelle zurückkehrt.

Ueber den Ort dieser Farbstoffixierung durch Salzbildung sind wir noch nicht im klaren. Schumacher hat darauf hingewiesen, dass die Farbstoffe meistens das Innere der Zelle anfärben und sich noch ganz besonders in der Kernsubstanz anreichern, während die Membran farblos bleibt. Der braune Farbstoff der Bierwürze sammelt sich aber umgekehrt in der Zellhaut an, ohne ins Zellinnere zu dringen. Ferner färbt z. B. Methylenblau die Zellmembran kräftig an, bevor man auch eine schwache Färbung des Zellinhaltes beobachten kann. Ob in letzteren Fällen aber auch Abtötung eintritt, scheint noch nicht geprüft worden zu sein. Auf jeden Fall können wir aber noch nicht mit Bestimmtheit sagen, ob für die antiseptische Wirkung die physikalische Aufnahme (Absorption) und

die chemische Fixierung (Salzbildung) durch die Zellmembran, das Protoplasma, den Kern oder nur den einen dieser morphologischen Bestandteile in Betracht kommt. Die nachhaltigste Wirkung wird ja wohl erzielt, wenn eine Veränderung der Kernsubstanz eintritt. Bei dieser Art Abtötung denken wir natürlich nicht an jene groben Desinfektionsmittel, welche die Zellhaut einfach zerstören, oder an jene noch gröberen, wie etwa konzentrierte Schwefelsäure, welche überhaupt die ganze Zelle zum Verschwinden bringen.

Die *praktischen Resultate* unserer Versuche bestätigen, dass die basischen Triphenylmethanfarbstoffe Fuchsin, Methylviolett B und Malachitgrün auch auf Hefezellen abtötend wirken können. Diese Eigenschaft scheint auch in geringerem Grade dem basischen Monoazofarbstoff Chrysoidin zuzukommen. Nur Hemmung, aber nicht Abtötung, wurde mit den sauren Pyroninfarbstoffen, Eosin, Spritlösliches Eosin und Phloxin P erzielt.

Aus den theoretischen Erörterungen geht hervor, dass die antiseptisch wirkenden Farbstoffe auch eine schädliche Wirkung auf den tierischen Organismus haben könnten. Es würde sich wohl empfehlen, auch diese Frage nachzuprüfen, trotzdem man in der Literatur verstreute Angaben über die Unschädlichkeit einzelner dieser Farbstoffe finden kann.

## Untersuchungen über das Vorkommen von Jod in der Natur.

XII. Mitteilung.

### Zur Geochemie des Jods III. Der atmophile Charakter des Jods.

Von Dr. Th. von FELLENBURG.

(Aus dem Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes,  
Vorstand: Dr. J. Werder.)

In frühern Publikationen<sup>1)</sup> ist nachgewiesen worden, dass das Element Jod siderophile, chalkophile und lithophile Eigenschaften besitzt, dass es sich bei der Phasenteilung des feuerflüssigen Erdballs in den metallischen Kern, die Sulfidschicht und die Silikathülle verteilt hat. *V. M. Goldschmidt*<sup>2)</sup> nimmt an, dass es wahrscheinlich auch zu den atmophilen Elementen zu rechnen sei, dass es sich bei der Phasenteilung vielleicht grösstenteils in der Dampfhülle angesammelt habe und dann mit dem Wasserdampf in der ältesten Hydrosphäre kondensiert wurde. Diese Annahme erhielt eine starke Stütze durch die Beobachtung von

<sup>1)</sup> *Th. von Fellenberg* und *Gulbrand Lunde*, Diese Mitt., 17, 250, 1926; 18, 161, 1927; *Th. von Fellenberg*, Diese Mitt., 18, 149, 1927.

<sup>2)</sup> Geochemische Verteilungsgesetze der Elemente II, Vid. Selsk, I, Oslo, 1924, Nr. 4.