

**Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoff-
ausscheidung pflanzlicher und thierischer
Organismen.**

Von

Th. W. Engelmann

in Utrecht.

Die im Folgenden mitzutheilende Methode unterscheidet sich principiell von allen bisher zu gleichem Zwecke eingeschlagenen Verfahren: dem gasanalytischen (Ingenhousz, Th. de Saussure, Boussingault u. a.), der Methode des Blasenählens (Dutrochet, Sachs, Pfeffer u. a.), der Phosphormethode (Boussingault).

Kraft der Art des Reagens, welches sie zum Nachweis des Sauerstoffs benutzt, gestattet sie, jeden beliebigen mikroskopisch kleinen Elementarorganismus, ja jedes mikroskopisch unterscheidbare Theilchen eines solchen (z. B. ein einzelnes Chlorophyllkorn) auf O-ausscheidung zu prüfen und die Grösse der etwaigen Ausscheidung innerhalb gewisser Grenzen zu schätzen.

Die Empfindlichkeit des Reagens ist so gross, dass Sauerstoffmengen von zuverlässig weit weniger als einem Hundertbillionstel Milligramm noch bequem nachgewiesen werden können. Es ist selbst nicht unwahrscheinlich, dass die kleinsten, mit Sicherheit nachweisbaren Sauerstoffmengen innerhalb der Grenzen liegen, welche die theoretische Physik auf verschiedenen Wegen für das Gewicht des einzelnen Sauerstoffmoleküls zu berechnen gestattet.

In Verband hiermit erfolgt die Reaction so schnell, dass plötzliche Aenderungen in der Grösse der O-ausscheidung momentan, ohne merkbaren Zeitverlust, angezeigt werden.

Das Reagens erlaubt in jedem einzelnen Falle, die Abhängigkeit der Sauerstoffausscheidung von verschiedenen physikalischen,

chemischen, morphologischen und physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Nebenbei übt es auf das untersuchte, Sauerstoff aushauchende Object einen günstigen Einfluss aus, indem es demselben reducirbare Substanz, vor Allem Kohlensäure zuführt.

Dies Reagens sind die gewöhnlichen Fäulnissbakterien, namentlich die kleineren Formen (*Bacterium termo* Cohn ¹⁾).

Das ausserordentlich grosse Sauerstoffbedürfniss der beweglichen Zustände dieser Formen, namentlich der frisch gezüchteten, ist bekannt. Sie sammeln sich zunächst immer an der Oberfläche der Flüssigkeit in den dichtesten Schaaren. In einem an beweglichen Bakterien sehr reichen Tropfen, der auf einen Objectträger gebracht und mit einem gewöhnlichen Deckglas bedeckt wird, drängen sie sich alsbald in dichtem Gewimmel an den Rändern des Tropfens zusammen; sind Luftblasen unter dem Deckglas im Tropfen eingeschlossen auch um diese. Nach einiger Zeit — im Allgemeinen desto früher, je mehr Bakterien der Tropfen enthält — erlahmt die Bewegung und hört endlich auf, zuerst in der Regel in der Mitte des Tropfens, später im Umkreis etwaiger Luftblasen — um so früher, je kleiner die Blase —, endlich an der Peripherie, nahe dem Rande des Deckglases; hier jedoch nur, wenn die Bakterien eine aus vielen Lagen dicht an einander gedrängter Individuen bestehende Schicht bilden. Diese lässt dann keinen Sauerstoff nach innen passiren. (Die Bakterien der äusseren und mittleren Lagen bewegen sich nicht, weil sie keinen Platz haben, und die der innersten nicht, weil der Sauerstoff schon verzehrt ist, ehe er bis zu ihnen durchdringen kann.) Lüftet man das Deckglas einen Moment, so tritt wieder für einige Zeit lebhaftere Bewegung ein.

In der Gaskammer einem Strom möglichst reinen Wasser-

1) Auch andere mikroskopische Organismen können als Reagens auf O benutzt werden, viele Infusorien z. B. (*Paramecium aurelia*, *Colpidium colpoda* u. a.). Aber die Vorzüge der Bakterien liegen einmal in ihrer viel geringeren Grösse und Masse (das mittlere Gewicht eines *Bacterium termo* beträgt sicher nicht mehr als ein Tausendmillionstel Milligramm), dann in der relativ viel grösseren Geschwindigkeit ihrer Bewegungen, die dabei viel unmittelbarer an die Anwesenheit von freiem O gebunden sind, endlich vor Allem auch in der bekanntlich nur allzugrossen Bequemlichkeit, mit der sie jederzeit und überall zu haben sind.

stoffs ausgesetzt, nimmt die Bewegung, wie u. a. Grossmann und Mayerhausen im Utrechter Laboratorium zeigten, bald bis zu völligem Stillstand ab. Dieser kann durch atmosphärische Luft sofort wieder aufgehoben werden. Reiner Sauerstoff wirkt oft noch mehr beschleunigend, als gewöhnliche Luft.

Lässt man zu einem, zwischen zwei Gläsern eingeschlossenen Tropfen, in dem alle anfangs schwärmenden Bakterien zur Ruhe gekommen sind, einen Tropfen defibrinirten, durch Schütteln mit Luft sauerstoffreich gewordenen Blutes vom Rande des Deckglases her zufließen, so erwacht die Bewegung an der Grenze beider Flüssigkeiten alsbald wieder. Dies geschieht nicht, oder doch höchstens an ganz vereinzeltten Punkten und auf sehr kurze Zeit, wenn man statt arteriellen Blutes solches nimmt, durch das unmittelbar zuvor Kohlenoxyd in starkem Strom längere Zeit hindurchgeleitet ward.

Bringt man nun in einen an bewegungsfähigen Bakterien reichen Tropfen einige grüne Zellen, z. B. *Euglena*, Stücke von Fadenalgen, oder einige braune Diatomeen (*Navicula* z. B.), bedeckt mit dem Deckglas und stellt eine oder mehrere dieser Zellen im gut erleuchteten Gesichtsfeld des Mikroskops bei etwa 2—300 maliger Vergrößerung ein, so sieht man, wie sich in kurzer Zeit lebhaft schwärmende Bakterien um diese Zellen anhäufen. Dieselben bleiben hier noch in lebhaftester Bewegung, wenn an allen übrigen Stellen im Tropfen bereits völliger Stillstand eingetreten ist.

Verdunkelt man nun plötzlich das Gesichtsfeld so weit, dass die schwärmenden Bakterien nur eben noch deutlich sichtbar sind (oft reicht viel geringere Verdunkelung aus), so stellen letztere alsbald ihre Bewegungen ein und bleiben entweder still am Ort liegen oder zerstreuen sich allmählich durch Molekularbewegung in der umgebenden Flüssigkeit.

Lässt man jetzt wieder volles Licht einfallen, so beginnen augenblicklich die hin und her schiessenden Bewegungen im Umkreis der chlorophyllhaltigen Zelle aufs Neue, bezüglich häufen sich die schwärmenden Bakterien daselbst allmählich wieder an.

Diese Versuche können in kurzer Zeit am nämlichen Object viele Male mit stets gleichem Erfolg wiederholt werden.

Die nächstliegende und, wie genauere Prüfung lehrt, auch die einzig zulässige Erklärung der letztbeschriebenen Erscheinung ist diese: Die chlorophyllhaltigen Zellen scheiden im Lichte

Sauerstoff ab und dieser ist es, der die Bakterien veranlasst sich zu bewegen und an der Sauerstoffquelle sich anzusammeln ¹⁾. Im Dunkeln hört die Sauerstoffausscheidung auf und der infolge des raschen Sauerstoffverbrauchs der Bakterien jetzt eintretende Sauerstoffmangel macht den Bewegungen ein Ende.

In den Bewegungen der Fäulnisbakterien ist demnach ein ebenso einfaches wie äusserst empfindliches Reagens auf freien Sauerstoff gegeben.

Von all den Anwendungen, welche das neue Reagens auf biologischem wie auch auf rein chemischem und physikalischem Gebiet finden kann, wünsche ich hier nicht zu sprechen, denn ich habe bisher wesentlich nur die O-ausscheidung pflanzlicher (und einiger thierischer) Organismen genauer untersucht. Eine nähere Beschreibung und Kritik der Methode, wie die ausführlichere, von Abbildungen begleitete Darstellung der Einzelergebnisse, nebst den daran anzuknüpfenden theoretischen Bemerkungen sollen an einem anderen Orte gegeben werden. Hier seien nur die wesentlichen bisher sichergestellten Resultate kurz mitgetheilt. Sie mögen zugleich Belege für die Brauchbarkeit und Tragweite der Methode liefern ²⁾.

1) Letztere Thatsache scheint mir ebenso, wie die Ansammlung grüner Flagellaten, Zoosporen u. dergl. (*Euglena* z. B.) im Licht nur unter Annahme eines Empfindungsvermögens erklärlich zu sein. Wer die Bewegungen der Bakterien, namentlich bei starker Vergrößerung genau studirt hat, der wird sich nicht verhehlen können, dass sie so entschieden den Schein willkürlicher, intelligenter Bewegungen erwecken, wie nur irgend welche Bewegungen von Mikroorganismen entschieden thierischer Art. Dies zusammengenommen mit dem enormen O-bedürfniss und der starken CO₂-ausscheidung weist den beweglichen Bakterien mit noch grösserer Bestimmtheit einen Platz unter den „beseelten“ thierischen Wesen an, als ihre morphologischen Beziehungen sie den pflanzlichen Organismen zuordnen.

2) Zur Prüfung der folgenden Angaben genügt die Anwendung gewöhnlichen Lampenlichts, das wegen seiner Constanz dem Tages- oder Sonnenlicht im Allgemeinen weit vorzuziehen ist. Es genügt, mittelst Planspiegel und Condensorlinse ein (nach Belieben mehr oder weniger scharfes) Flammenbild in der Ebene des Objects zu erzeugen, um über fast alle erforderlichen Lichtstärken disponiren zu können. Sehr empfiehlt es sich, im dunkeln Mikroskopkasten, der alles auffallende Licht vom Object fernhält, zu arbeiten. (Vgl. über diesen, in Holland schon sehr allgemein verbreiteten Apparat Pflüger's Archiv, Bd. XXIII, p. 577, 1880).

Folgendes sind diese Resultate:

Alle chlorophyllhaltigen Zellen niederer und höherer Pflanzen, welche untersucht wurden, scheiden im Licht Sauerstoff ab. Dies gilt auch von denjenigen niederen Organismen, welche statt der gewöhnlichen grünen eine braune (z. B. Diatomeen), olivengrüne oder spangrüne Farbe (viele Flagellaten, Oscillarien) besitzen. Rothgefärbter (*Haematococcus* z. B.) konnte ich noch nicht habhaft werden.

Auch chlorophyllhaltige Thiere (*Paramecium bursaria*, *Hydra viridis*) entwickeln im Licht Sauerstoff, z. Th. sehr energisch.

Chlorophyllfreie, aber etiolinhaltige Zellen des Blattparenchyms im Dunkeln gekeimter Pflänzchen von *Nasturtium* scheiden (im Gegensatz zur herrschenden Ansicht), in Licht von mässiger Helligkeit gebracht, augenblicklich O ab. Noch nach einstündiger Einwirkung des nämlichen Lichtes (constante Gasflamme) bei gleicher Temperatur (21° C.) war die gelbliche Farbe der Zellen bez. der ganzen Blättchen nicht merkbar verändert.

Die Energie der Sauerstoffausscheidung ist bei verschiedenen Arten von Zellen im Allgemeinen desto grösser, je grösser der Gehalt an Chlorophyll oder anderem, physiologisch diesem entsprechenden Farbstoff, (sehr gross z. B. bei *Euglena viridis*, bei jungen Zellen von *Zygnema*, klein bei *Spirogyra*-zellen mit weit abstehenden schmalen Chlorophyllbändern, bei den Stomazellen der Blattepidermis von *Tradescantia* u. a.)

Zellen mit farblosem Protoplasma scheiden keinen Sauerstoff ab (Monaden, Amöben, Myceliumfäden von Schimmelpilzen, Wurzelhaare von *Hydrocharis*, farblose Zellen des Parenchyms albinotischer Ahorn-Blätter u. s. w., ebenso alle bisher untersuchten chlorophyllfreien thierischen Zellen).

Zellen mit gefärbtem Zellsaft, aber chlorophyllfreiem Protoplasma (Zellen der Staubfädenhaare von *Tradescantia virginica*, Zellen vieler Blumenblätter) entwickeln keinen O im Licht.

In jeder lebenden Zelle hat O-entwicklung nur da — aber auch überall da — statt, wo Chlorophyllkörper liegen. (Bei *Zygnema cruciatum* häufen sich die Bakterien ausschliesslich oder vorzugsweise an den den zwei Chlorophyllkörpern zunächst liegenden Stellen der Zelloberfläche an, bei *Spirogyra* besonders

längs der Chlorophyllbänder, bei *Mesocarpus* da, wo die Chlorophyllplatte der Zellmembran anliegt u. s. w.)

Hat sich der Chlorophyllkörper, mit oder ohne die wandständige Protoplasmaschicht, von der Zellmembran (unter Durchtreten von Zellsaft) zurückgezogen, so kann die O-abscheidung noch energisch fortdauern (sehr deutlich bei *Zygnema*, *Spirogyra*, *Mesocarpus* u. a.) Auch kann das Protoplasma mit den Chlorophylleinschlüssen ausgeflossen, ersteres selbst ganz zerstört sein, ohne dass die O-abscheidung aufhört. Einzelne völlig isolirte Chlorophyllkörper von noch nicht 0.005 mm Durchmesser können noch lange fortfahren im Licht Sauerstoff auszuhauchen (sehr schön nachweisbar bei *Hydra viridis*, aber auch bei vielen Pflanzenzellen).

Auch partiell abgestorbene Chlorophyllkörper können noch mit ihren unzerstörten Resten O ausscheiden (sehr bequem demonstrirbar bei *Mesocarpus*, *Spirogyra*, *Navicula*, *Closterium* u. a.).

Sobald aber die Struktur des Chlorophyllkörpers überall zerstört ist (z. B. durch Quellung, resp. Lösung) hört die Möglichkeit der O-produktion sofort und definitiv auf.¹⁾

Chlorophyllhaltige Zellen mit lebhaft beweglichem Protoplasma (*Euglena*, *Vallisneria*) scheiden Sauerstoff ab, gleichviel ob das Protoplasma ruht oder sich bewegt.

Elektrische Reize (Induktionsströme), welche genügten, um *Euglena* zu maximaler Contraktion (Kugelgestalt) zu veranlassen, brachten, auch bei 1 Minute lang in kurzen Intervallen (1 Sek.) fortgesetzter Einwirkung keine sichtliche Aenderung der Sauerstoffausscheidung dieses Organismus hervor.

In jeder Periode des Wachstums, wie auch in jedem Augenblicke während der Zelltheilung, findet O-abscheidung statt (bei *Zygnemeen*, *Diatomeen*, *Flagellaten* u. dgl. besonders leicht nachweisbar).

1) Die vorstehenden Resultate genügen wohl bereits, um die Richtigkeit der bisherigen Anschauungen der Pflanzenphysiologen über die wesentliche Function des Chlorophyll in der lebenden Pflanze gegenüber den neuerdings von Pringsheim in übrigens höchst bemerkenswerthen Arbeiten entwickelten Ansichten darzuthun.

Der Zellkern scheint keinen Einfluss auf den Vorgang zu haben.

In allen untersuchten Fällen ist die O-abscheidung absolut an Einwirkung von Licht gebunden.

Die Wirkung des Lichts ist eine durchaus örtliche. Wird eine Zelle oder auch ein einzelner Chlorophyllkörper nur partiell beleuchtet, der übrige Theil im Dunkel (oder Halbdunkel) gelassen, so häufen sich die Bakterien nur um den erleuchteten Theil an. (Ein direkter Einfluss des Lichtes auf die Bewegungen der Bakterien, unabhängig also von der Vermittlung lebendigen Chlorophylls, besteht nicht.)

Mit wachsender Intensität des Lichts steigt innerhalb gewisser, ziemlich weiter Grenzen die O-abscheidung.

Die minimale Lichtstärke, bei welcher der Process anfängt deutlich merkbar zu werden, hängt von der Art und dem Zustand der Zelle wie auch der Bakterien ab. Unter den Bedingungen, unter welchen ich untersuchte, schien dies Minimum beinahe immer weit höher zu liegen als das Minimum für die Perception mittelst des Auges.

Das Maximum der O-production wurde in vielen Fällen unzweifelhaft erst bei einer Lichtstärke erreicht, welche für das Auge als ultramaximale bezeichnet werden muss. In anderen schien dies nicht der Fall zu sein.

Licht verschiedener Wellenlänge hat im Allgemeinen einen specifisch verschiedenen Einfluss auf die Energie der Sauerstoffentwicklung. Ultraroth, durch eine Lösung von Jod in Schwefelkohlenstoff von den sichtbaren ziemlich vollständig isolirte Strahlen waren stets inaktiv. Sehr aktiv dagegen war schon Roth zwischen 0.70 und 0.60μ Wellenlänge, Orange und Gelb ebenfalls, vielleicht noch stärker. Grün wirkte fast immer am schwächsten, Blau (unterhalb 0.50μ) oft merklich stärker. (Die verschiedenen Farben waren entweder reine Spektralfarben oder durch absorbirende Flüssigkeiten oder Gläser erhalten, in den letzteren Fällen stets spektroskopisch genau untersucht und möglichst monochromatisch gemacht.)

Zwischen Moment des Lichteinfalls und Beginn der O-entwicklung verläuft keine merkbare Zeit. Ebenso scheint im Moment der Lichtentziehung die O-production still zu stehen. Es

find wenigstens in vielen Fällen die Bewegung der um eine grüne Zelle (*Euglena*, *Navicula* z. B.) oder ein isolirtes Chlorophyllkorn (*Hydra viridis* u. a.) angesammelten und durch kurzdauernde Beschattung völlig zu Ruhe gekommenen Bakterien scheinbar gleichzeitig mit dem Einfallen hellen Lichtes in grosser Lebhaftigkeit wieder an. Und in solchen Fällen stand sie auch nach plötzlicher Beschattung nicht selten augenblicklich oder doch innerhalb kaum einer Sekunde still.

(Aus dem Bonner physiologischen Laboratorium.)

Zweiter kritischer Beitrag zur Titration des Harnstoffs.

(Eine Antwort an das physiologische Laboratorium in München.)

Von

E. Pflüger.

Dr. Max Gruber hat soeben in einer aus Voit's Laboratorium hervorgegangenen Untersuchung ¹⁾ die Grösse der Beobachtungsfehler verschiedener Titrationsmethoden des Harnstoffs verglichen und die Behauptung aufgestellt, dass meine Methode

1) Der Titel ist: „Liebig's Methode der Harnstofftitrirung und ihre Modificationen. (Zur Abwehr gegen die Angriffe von Prof. E. Pflüger in Bonn.)“— Band 17 (1881).— Das betreffende Heft ist hier in Bonn (Pflingsten) noch nicht im Buchhandel. Ich muss deshalb die Paginirung des mir von München geschickten Separatabdrucks bei der Citation benutzen.