© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

4. Kurt Stern: Untersuchungen über Fluorescenz und Zustand des Chlorophylls in lebenden Zellen.

(Vorläufige Mitteilung[1].)

(Eingegangen am 13. Januar 1920.)

I. Methodik.

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen über die Fluorescenz des Chlorophylls wurde in Anlehnung an ältere Untersuchungen HAGENBACHs[2]) folgende Beobachtungsmethode verwandt: Das weiße Licht einer starken Lichtquelle wird durch ein Blaufilter filtriert und auf die grünen Farblösungen oder Chlorellensuspensionen geworfen, die sich in einem Reagensglas oder einer Cuvette mit planparallelen Spiegelglaswänden befinden. Das von ihnen ausgestrahlte Licht wird spektroskopisch untersucht. Etwa im Spektroskop auftretendes Rot muß Fluorescenzlicht sein. Als Lichtquelle diente eine Metallfadenprojektionslampe von 3000 Kerzen. Sie war in einem Kasten aus Holz und Blech eingebaut, der an der Rückwand einen durch einen Elektromotor betriebenen Ventilator enthielt, der durch den Kasten dauernd einen starken kühlenden Luftstrom saugte, um einem Springen der Glühbirne vorzubeugen. Der Kasten trug vorn eine kreisförmige Öffnung von 3 cm Radius, durch den das Licht nach vorn austrat. Durch eine kreisförmige Blende von 2 cm Radius fiel es durch 2 planconvexe Linsen von 10 und 7,5 cm Durchmesser und 25 bzw. 19 cm Brennweite, die es konzentrierten. Hinter der zweiten Linse stand eine Kuvette mit Kupferoxydammoniak, deren Konzentration so gewählt war, daß sie gerade kein im Spektroskop sichtbares rotes Licht mehr durchließ. In dieses filtrierte Licht wurde das Reagensglas mit der zu untersuchenden Lösung gebracht. Und zwar war hinter der Kupferoxydammoniaklösung aus schwarzem Tuch und Pappe ein lichtdichter Kasten eingerichtet, so daß nur das filtrierte Licht, aber kein Nebenlicht auf die Lösung fallen konnte und ebensowenig in den Spalt des Spektroskops, der in einer Entfernung von

1) Quantitative Angaben und eingehende Diskussion bleiben der ausführlichen Mitteilung vorbehalten.

2) HAGENBACH, E. Fernere Versuche über Fluorescenz. Pogg. Ann. Jubelbd. 1874, p. 303.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

einigen mm oder cm von der Lösung sich befand. Das Spektroskop war ein geradsichtiges Spektroskop der Firma SCHMIDT und HAENSCH, Berlin. Während der Beobachtung war das Zimmer stets verdunkelt und alles Nebenlicht nach Möglichkeit abgeblendet; denn das Auge muß völlig dunkeladaptiert sein, zumal wenn man quantitative Untersuchungen über die relativ schwache Fluorescenz machen will, von der berichtet wird.

Als Versuchsmaterial diente von lebenden Zellen vor allem eine *Chlorella*, die ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. WARBURG verdanke. Sie wurde in KNOPscher Nährlösung in Waschflaschen gezüchtet, durch die dauernd ein langsamer Strom eines 4 % Kohlensäureluftgemisches geschickt wurde. Als Beleuchtungsquelle diente eine 50kerzige Osramlampe.

II. Versuchsergebnisse.

Die Algenlösung zeigt bei meiner Versuchsanordnung bereits dem unbewaffneten Auge eine deutliche rote Fluorescenz, auch in recht verdünnten Lösungen, im Spektroskop einen hellen roten Fluorescenzstreifen.

Vergleicht man nun damit die Fluorescenz einer kolloiden Chlorophylllösung von derselben oder noch tiefergrünen Farbe, die nach den Methoden WILLSTÄTTERs dargestellt wird, so zeigt sie keinerlei rote Fluorescenz. Ebensowenig fluoresciert festes Chlorophyll. Nun ist die heute von der Mehrzahl der Untersucher geteilte Ansicht die, daß das Chlorophyll in den lebenden Zellen in kolloider Lösung enthalten ist (IWANOWSKI[1]), HERLITZKA[2]), WILLSTÄTTER[3])). Wenn diese Ansicht richtig ist, so müßten also die in der Zelle anwesenden Stoffe die kolloide Chlorophylllösung so beeinflussen, daß sie fluoresziert. Ich prüfte also das Verhalten der kolloiden wässrigen Chlorophylllösung nach Zusatz von a) Eiweißstoffen, b) Kohlehydraten, c) fettartigen Substanzen; weder in Eiweiß- noch in Pepton-, noch in Zucker-, Glyzerin-, Stärkelösungen zeigte sich eine Verstärkung der Fluorescenz. Sowie aber eine kleine Menge einer lipoiden Substanz hinzugegeben wurde und durch eine oder einige Minuten langes Schütteln eine Emulsion erzeugt wurde, wobei ein Teil des Chlorophylls in die lipoide Phase übertritt, trat sofort etwa in gleicher Intensität wie bei den

1) IWANOWSKI, Verhalten des leb. Chlorophylls zum Licht. Ber. d. D. B. G., 1918, 31, p. 601.

2) HERLITZKA, Über kolloides Chlorophyll. Kolloid. Zschft. 1912, Bd. 11, p. 171.

3) WILLSTÄTTER u. STOLL, Untersuchungen über das Chlorophyll 1913.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Algen das charakteristische Fluorescenzband im Spektroskop auf. Untersucht wurden u. a. Triolein, Oleinsäure, Lecithin, Cholesterin, Walrat, Leinöl, Rizinusöl. Seife, alle mit positivem Erfolg.

Ich schließe aus diesen Beobachtungen, daß das Chlorophyll in den lebenden Zellen in lipoider Lösung enthalten ist. Es ergab sich nunmehr die Frage: Ist es in kolloider oder in echter Lösung enthalten? Die Untersuchung im Spaltultramikroskop ergab für alle nichtfluorescierenden Lösungen von Chlorophyll in Wasser, Eiweiß, Zucker, Glyzerin usw. zahlreiche Mikronen, also typisch kolloide Lösung. In allen Lipoiden, in denen das Chlorophyll etwa so stark wie in absolutem Alkohol fluoresciert, erhält man einen strahlend roten, optisch leeren Kegel. Es ist also in all den lipoiden Lösungen das Chlorophyll echt, molekulardispers gelöst, also auch in den lebenden Zellen.

Auch die Lösungen des Clorophylls in Alkohol, Äther, Paraffinöl usw. zeigen einen optisch leeren Fluorescenzkegel. Man kann also auch sagen: Das Clorophyll fluoresciert in den Lösungsmitteln, in denen es echt gelöst ist. Da es in der Zelle fluoresciert, muß es in einem solchen Lösungsmittel in der Zelle gelöst sein und von den möglichen Lösungsmitteln kommen unter den Verhältnissen in der lebenden Zelle nur die Lipoide in Betracht.

In flüssigem Paraffin fluoresciert, wie bereits REINKE[1]) festgestellt hat, das Chlorophyll ebenso stark wie in alkoholischer oder öliger Lösung, während beim Erstarren die Fluorescenz sehr schwach wird. Das gilt aber nur für die Beobachtung mit freiem Auge, im Spektroskop ist die Fluorescenz des Chlorophylls im festen Paraffin unmitelbar nach dem Erstarren nur sehr wenig schwächer. Das Verschwinden der Fluorescenz rührt vornehmlich daher, daß das Paraffin beim Erstarren undurchsichtig wird, d. h. sehr viel Licht reflektiert, welches das Fluorescenzlicht für das Auge verdeckt, nicht aber für das Spektroskop, in dem ja die einzelnen Wellenlängen getrennt gesehen werden. Aussagen über die Fluorescenzstärke nach Beobachtung mit freiem Auge haben daher wenig Wert und sind in vielen Fällen völlig irreführend. Auch die von LIEBALDT[2]) festgestellte Verdeckung der Fluorescenz durch Trübungen, z. B. Stärke, Sand usw, in der fluorescierenden Lösung beruht, wie mich spektroskopische Untersuchung lehrte,

1) REINKE, J., Die optischen Eigenschaften der grünen Gewebe. Ber. bot. Ges., 1883, Bd. 1, p. 405.

2) LIEBALDT, E., Wirkung wässr. Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner. Z. f. Bot., 1913, Bd. V.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

vornehmlich auf einer Verdeckung für das Auge, indem sich das Fluorescenzlicht mit dem von den trübenden Teilchen reflektierten Teil des auffallenden Lichtes im Auge in einer mehr oder weniger weißen oder rosa Farbe vereinigt. Eine objektive Schwächung des Fluorescenzlichtes findet freilich auch statt, vornehmlich durch die Schwächung, die sowohl die Intensität des Fluorescenz erregenden, wie die des Fluorescenzlichtes durch Absorption und Reflexion an den trübenden Teilchen erfährt. Im Vergleich zu der Größe der Schwächung, die das fürs freie Auge sichtbare Fluorescenzlicht durch Trübung des Mediums erfährt, ist diese objektive Schwächung jedoch unbeträchtlich. An dieser Stelle sei auch bemerkt, daß sich meine Angaben über die Stärke der Fluorescenz nur auf die bei meiner Versuchsanordnung sichtbare beziehen; bei Verwendung noch stärker anregenden Lichtes, z. B. ultravioletten genügender Intensität, dürften sich möglicherweise die Angaben über den Absolutwert der Fluorescenz ändern, also z. B. auch kolloides oder festes Chlorophyll merklich fluorescieren, die Relativwerte aber, auf die es für meine Schlußfolgerungen allein ankommt, sind natürlich davon völlig unabhängig, wofern man nur überhaupt eine Beleuchtungsstärke verwendet, die deutliche Fluorescenz der lebenden Zellen hervorruft. Auch Blätter der verschiedensten Gattungen zeigten bei meiner Versuchsanordnung einen hellen roten Fluorescenzstreifen im Spektroskop, dagegen im Gegensatz zu den Algenlösungen dem freien Auge keine merkliche Fluorescenz, was nach den obigen Bemerkungen über den Einfluß trüber Medien und reflektierten Lichtes auf die Sichtbarkeit der Fluorescenz leicht verständlich ist.

Daß das Chlorophyll in einer lipoiden Phase in den lebenden Zellen enthalten sei, ist auch von LIEBALDT für wahrscheinlich erachtet worden. Sie fand, daß oberflächenaktive Stoffe eine tropfige Entmischung der Chloroplasten hervorrufen können. Die Tröpfchen können nach ihr als Lipoidtröpfchen gedeutet werden, oder als ein Gemisch der oberflächenaktiven Stoffe mit dem Chlorophyll. Da auch praeexistierende nicht grüne Tröpfchen sich grün färbten, so waren die Versuche auch insofern nicht beweisend, als es sich um eine durch den oberflächenaktiven Stoff bewirkte nachträgliche Mischung von Lipoid und Öl hätte handeln können. Nachdem aber die Fluorescenzbeobachtungen gezeigt haben, daß zweifellos bereits im intakten Chlorophyllkorn das Chlorophyll in lipoider Phase enthalten ist, wird man auch ohne Bedenken die von LIEBALDT beobachtete tropfige Entmischung als Zusammenfließen praeexistierender Lipoid-Chlorophylltröpfchen auffassen

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

können. Ich nehme dabei als wahrscheinlich an, daß die von LIEBALDT erörterte Möglichkeit zutrifft, daß der oberflächenaktive Stoff, der sich ja zunächst in der Grenzfläche zwischen Hydroid- und Lipoidphase anreichern muß, wegen seiner relativ großen Lipoidlöslichkeit eine Vergrößerung und schließlich Zusammenfließen der amikronischen Lipoidtröpfchen zu mikroskopisch sichtbaren veranlaßt.

Die Feststellung, daß im intakten Chloroplasten das Chlorophyll in lipoider Phase gelöst ist, ist von hohem Interesse für das Verständnis einer neuerdings von O. WARBURG[1]) gefundenen Tatsache, daß nämlich, soweit bekannt, von allen Lebensprozessen der Assimilationsprozeß der empfindlichste gegen die Einwirkung oberflächenaktiver Stoffe ist. Bereits Konzentrationen von einigen Millimol pro l. von verschiedenen Urethanderivaten hemmen oder sistieren die Assimilation. Nun folgt aus meinen Beobachtungen, daß der Assimilationsprozeß nicht in einem homogenen Medium sich abspielt, sondern sowohl in einer Lipoid- wie in einer Hydroidphase. Welche Annahmen man darüber im einzelnen machen mag, mindestens die Aufnahme der Ausgangsstoffe und die Abgabe von Zwischen- oder Endprodukten muß durch die Grenzfläche von Lipoid- und Hydroidphase erfolgen. Jede Blockierung dieser Grenzfläche muß folglich assimilationshemmend oder -sistierend wirken. Und die oberflächenaktiven Stoffe sind ja gerade solche, die sich in Grenzflächen ansammeln, und zwar in relativ hohen Konzentrationen, auch wenn sie im Innern der Flüssigkeit nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind. Sie müssen deshalb diese Blockierung bewirken, sei es durch Verdrängung anderer Stoffe aus der Grenzfläche, sei es durch sonstige Veränderung in derselben. Offenbar muß diese Hemmung schon bestehen in Konzentrationen, in denen ein mikroskopisch sichtbarer Effekt noch lange nicht eintritt; daß aber andererseits in höher konzentrierten Lösungen dieser oberflächenaktiven Stoffe sichtbare Entmischung von Hydroid- und Lipoidphase eintritt, ist ein schlagender Beweis dafür, daß die assimilationshemmende Wirkung dieser Stoffe tatsächlich auf ihrer Wirkung an der Grenzfläche zwischen Hydroid- und Lipoidphase zurückzuführen ist.

Eine weitere Reihe von Versuchen beschäftigte sich mit der Frage der Abhängigkeit der Intensität des Fluorescenzlichtes von der Stärke der Assimilation. Bereits von REINKE[2]) und N. J. C.

1) WARBURG, O., Uber die Geschwindigkeit der photochem. Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. Bioch. Zchft., Bd. 100, p. 230, 1919.

2) REINKE, J., l. c.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

MÜLLER[1]) war eine vikariierende Beziehung zwischen diesen beiden Größen angenommen worden. Nach MÜLLER sollte die Energie, die die Zelle im assimilierenden Zustande als chemische Energie umsetzt, im nichtassimilierenden als Fluorescenzlicht ausgestrahlt werden. Zu einem entsprechenden Resultat führen auch die Überlegungen von TSWETT und MOLISCH, die annehmen, daß das Chlorophyll „eine Fabrik roter Strahlen" darstelle, und daß nicht das absorbierte Licht, sondern das Fluorescenzlicht die Kohlensäure reduziere. Diese Anschauung würde natürlich ebenfalls zu der Annahme führen, daß bei Sistierung der Assimilation sich die Fluorescenz verstärken müßte. Schließlich führen unsere gegenwärtigen physikalischen Anschauungen über den Mechanismus der Fluorescenz zu der Annahme einer Reziprozität zwischen Fluorescenz und chemischer Reaktion der Atome. Ohne hier näher auf die Begründung dieser im wesentlichen auf dem RUTHERFORD-BOHRschen Atommodell fußenden Anschauung einzugehen, will ich nur kurz folgendes anführen: Man stellt sich die Atome vor als bestehend aus positiven Kernladungen, die von negativen Elektronen umkreist werden. Bei der Lichtabsorption springen Elektronen aus einer der Kernladung näheren Bahn in eine weitere, bei der Emission aus einer entfernteren in eine dem Kern nähere Bahn. Absorbiert also ein fluorescenzfähiges Atom Licht, so wird bei der Absorption ein Elektronensprung von der Kernladung weg stattfinden. Dieser Zustand ist jedoch instabil und deshalb springt es unter Emission von Fluorescenzlicht wieder in eine Bahn von kleinerem Radius. Hat es jedoch Gelegenheit chemisch zu reagieren, so findet eine Elektronenverschiebung zwischen den reagierenden Atomen statt, und die Fluorescenz erlischt.

Ich bin nun zur experimentellen Prüfung dieser Frage so vorgegangen, daß ich die Intensität des Algenfluorescenzlichtes gleichmachte der einer konstanten Vergleichslösung. Hemmung der Assimilation ließ sichtbare Ungleichheit des Fluorescenzlichtes der beiden Lösungen erwarten. Im einzelnen gestaltete sich die Photometrie des Fluorescenzlichtes folgendermaßen: Vor den Spalt des Spektroskops wird ein total reflektierendes Prisma derart angebracht, daß es die untere Hälfte des Spaltes verdeckt. Die total reflektierende Hypotenusenfläche des Prismas ist außen geschwärzt,

1) MÜLLER, N. J. C., Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption u. Fluorescenz des Chlorophylls der lebenden Blätter. Jahrb. wiss. Bot., Bd. 9, 1873, p. 42.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

so daß von vorn nur Licht in die obere Hälfte des Spaltes fallen kann. Fällt aber Licht von seitwärts, also senkrecht zur Achse des Spektroskopes auf das Prisma, so wird es an der Innenseite der Hypotenusenfläche total reflektiert und parallel dem von vorn kommenden Licht in die untere Hälfte des Spaltes geworfen. Man erhält dadurch im Okular des Spektroskopes zwei Spektren übereinander. Da Bildumkehrung auftritt, entspricht das obere dem seitwärts durch das Prisma eintretenden Licht, das untere dem von vorn eintretenden Licht. Wenn man also in den Lichtkegel eine Algenlösung und rechtwinklig dazu eine alkoholische Chlorophylllösung in je einem Reagensglas stellt und nun das Spektroskop so einstellt, daß das von der Algenlösung ausgestrahlte Licht durch den Spalt, das von der Chlorophylllösung ausgestrahlte durch das Prisma ins Spektroskop fällt, so erhält man die beiden Fluorescenzspektren übereinander, und kann nun die Intensität des Fluorescenzstreifens vergleichen. Es fällt sofort die für das Absorptionsspektrum bereits lange bekannte Verschiebung des Fluorescenzspektrums der Algen gegenüber alkoholischer Chlorophylllösung nach der schwächer brechbaren Seite des Spektrums auf. Diese Verschiebung zeigen auch die chlorophyllhaltigen Lipoidemulsionen oder Chlorophyll-Öllösungen. Sie dürfte, wenigstens zum großen Teil, auf der Verschiedenheit des Brechungscoefficienten von Alkohol (1,36) und Lipoidsubstanz (ca. 1,46) beruhen. Dafür sprechen außer theoretischen Erwägungen (KUNDTsche Regel) auch die Befunde KOHLs[1]) an Carotinlösungen in verschiedenen Lösungsmitteln, die eine wachsende Verschiebung der Absorptionsstreifen nach der schwächer brechbaren Spektralhälfte zeigten, je höher der Brechungsexponent des Mediums liegt und deshalb auch KOHL bereits zur Annahme eines lipoiden Lösungsmittels für die Farbstoffe der Zelle führten.

Bei der Beobachtung stört durch Blendung des Auges etwas das ebenfalls im Spektrum sichtbare grüne und blaue reflektierte Licht. Deshalb habe ich in das Okular eine kreisförmige Metallscheibe mit einem etwa 5 mm langen, 1 mm breiten Spalt eingesetzt, der das rote Fluorescenzlicht aus dem Spektrum ausblendete, so daß man im sonst dunklen Gesichtsfeld nur noch einen roten, rechteckigen, leuchtenden Streifen erblickt. Durch Probieren findet man bei einiger Übung leicht die Stellung von Algen- und Chlorophylllösung, bei der die Fläche in ihrer oberen und unteren Hälfte

---

1) KOHL, F. G. Untersuchungen über das Carotin und seine physiol. Bedeutung. Leipzig 1902.

©Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum.at

gleich hell erscheint. Wird jetzt der Algenlösung ein Narkoticum, z. B. Urethan, zugesetzt, das die Assimilation sistiert, so mußte beim Auftreten des erwarteten Effektes die untere Hälfte des Fluorescenzstreifens, die von der Algenlösung herrührt, heller werden als die obere, die ihr Licht von der unveränderten Chlorophylllösung erhält. Ich habe derartige Versuche bereits sehr zahlreich und unter den verschiedensten Bedingungen angestellt, ohne deutliche Effekte zu erzielen. Da indessen weitere methodische Vervollkommnung dieses Resultat möglicherweise noch modifizieren wird, so möchte ich in eine theoretische Diskussion des Resultates noch nicht eintreten.

Zusammenfassend möchte ich aus den Ergebnissen folgende Punkte hervorheben: Das Chlorophyll fluoresciert nur in echter Lösung, kolloide Chlorophylllösungen und festes Chlorophyll fluorescieren nicht merklich. Die Beobachtung der Fluorescenz trüber Medien mit freien Auge ist durchaus irreführend, nur spektroskopische Untersuchung ergibt die wahre Stärke der Fluorescenz. Das Chlorophyll ist in der intakten Zelle in lipoider, echter und fluorescierender Lösung enthalten. Der Assimilationsprozeß verläuft teils in lipoider, teils in hydroider Phase. Oberflächenaktive Stoffe verändern die Grenzfläche beider Phasen und hemmen oder sistieren dadurch die Assimilation.

Herrn Dr. KNIPPING spreche ich für mannigfache Mithilfe auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

K. W. J. für physikalische Chemie. Berlin-Lichterfelde.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft

Jahr/Year: 1920

Band/Volume: 38

Autor(en)/Author(s): Stern Kurt

Artikel/Article: Untersuchungen über Fluorescenz und Zustand des Chlorophylls in lebenden Zellen. 28-35