

Über Reduktion basischer Farbstoffe im lebenden Protoplasma.

Von

Cand. med. **Fritz Wankell.**

Zu einem immer wertvolleren Untersuchungsmittel bei den Forschungen über die Struktur des Protoplasmas ist im Laufe der Jahre die Färbung der lebenden Gewebe und Zellen geworden, eine Methode, die sich allmählich zu einem besonderen Zweig der Forschung, herangebildet hat. Schon zu Anfang des 19. Jahrhunderts finden wir vor allem bei den Arbeiten über Untersuchungen der Nahrungsaufnahme bei niederen Tieren Fütterungsversuche mit Farbstoffen verwandt. Aber schon sehr schnell erkannte man, daß die Fütterung mit Farbstoffen noch ganz andere Untersuchungsmöglichkeiten bot, als nur den Weg der Nahrungsstoffe festzustellen. Als erster wies wohl **EHRlich** auf diese wichtigen Befunde hin, und es war so der Anlaß dazu gegeben, zu untersuchen, wie der Farbstoff vom Protoplasma gebunden werde, wie er überhaupt aufgenommen werde. „Ist vitale Färbung ein chemischer Vorgang oder spielen physikalische Gesetze die Hauptrolle?“ Das war eine der viel umstrittenen Fragen. „Oder kann man überhaupt von einer vitalen Färbung sprechen?“

Heutzutage ist man ja nun tatsächlich zu dem Ergebnis gelangt, daß man von einer rein vitalen Färbung sprechen kann, da es unzweifelhaft viele Farbstoffe gibt, die ohne wesentlich schädigende Wirkung auf das Protoplasma in dasselbe eindringen. Es sei dabei nur an die Befunde **ARNOLD's** erinnert, der bei Leukocyten mit intravital gefärbten Granulis feststellte, daß diese Zellen noch Tusche-

körner durch Phagocytose aufnehmen, was als ein deutliches Kennzeichen der Vitalität zu betrachten ist.

Heute wissen wir, daß sowohl basische wie saure Farbstoffe von lebenden Zellen aufgenommen und unter gewissen Bedingungen gespeichert werden. Als wesentliche Eigenschaften, die einen Farbstoff befähigen, in lebende Zellen einzudringen, sah man (E. OVERTON) die Lipoidlöslichkeit und (E. KÜSTER 1911, W. RUHLAND 1912 u. v. a.) die Teilchengröße an.

Nach den neueren Arbeiten (W. VON MOELLENDORFF 1918, E. NIRENSTEIN 1913, 1920) erscheint es als sicher, daß die Lipoidlöslichkeit die Speicherung von Farbstoffen im Cytoplasma begünstigt, dagegen keine Voraussetzung für den Farbeintritt in die Zelle ist. Dieser letztere muß wohl in sehr wesentlichem Maße von der Teilchengröße abhängig sein. Über dies hinaus müssen aber noch andere Faktoren zum vollen Verständnis der Farbstoffwirkung mit herangezogen werden.

Man kann sich nun den Farbeintritt in das Protoplasma folgendermaßen erklären: Der Farbstoff dringt durch Adsorption und darauffolgende Diffusion von allen Seiten gleichmäßig in das Protoplasma ein. PROWAZEK (1903) zeigte dies dadurch, daß er einem *Paramecium* durch Druck das Cytostom heraussprenkte und doch eine normale Granulafärbung mit Neutralrot feststellen konnte. GERLACH (1859) machte bei seinen Knorpeluntersuchungen die Beobachtung, daß der Farbstoff durch Diffusion in gelöster Form durch die Interzellulärsubstanz in die Zellen eindringe.

Beschränken wir uns in der Betrachtung des weiteren Schicksals von Farbstoffen in lebenden Zellen auf das Beispiel der basischen Farbstoffe, mit denen wir unsere unten zu besprechenden Versuche anstellten, so machten E. NIRENSTEIN (1913, 1919) und W. VON MOELLENDORFF (1918) unabhängig voneinander eine scharfe Unterscheidung von vitaler Diffusfärbung und vitaler Granulafärbung. Erstere unterscheidet sich von der Diffusfärbung abgestorbener und absterbender Zellen durch das Freibleiben des Zellkernes und durch den Eintritt in solche Zellen, die noch deutliche Lebensäußerungen erkennen lassen. Auch ist sie unmittelbar abhängig von einer meßbaren Eigenschaft der Farbstoffe, ihrer Löslichkeit in Lecithin und verwandten Lipoidgemischen.

Die Diffusfärbung geschädigter und abgestorbener Zellen ist eine längst beachtete Erscheinung und wird von W. GROSS (1911), MARX (1904), L. MICHAELIS (1900) u. v. a. als wertvolles Mittel, pathologische Prozesse zu unter-

suchen, verwandt. Aber auch vitale Diffusfärbungen sind gelegentlich (A. GARMUS, 1912) beachtet worden. Auch R. HÖBER (1909) legte sich die Frage vor, warum die Phthaleine wie Eosin, Rose bengale u. a. nicht granulär, sondern nur diffus färben. Er glaubt, daß den Granulis die Fähigkeit, diese Farbstoffe zu speichern, abgehe.

Für die Granulafärbung ist hinwiederum nur die Struktur der Granula von Bedeutung. Es ist also ausschlaggebend die Fällungskraft des basischen Farbstoffs mit den Substanzen der präformierten Zellgranula. Für präformiert werden diese Granula von den meisten Autoren gehalten. PROWAZEK (1898) stellt die Granula in Beziehung zur Verdauung, sie dienen zur Speicherung von Reservestoffen. WALLENGREN (1902) sucht so die Entfärbung hungernder, vital gefärbter Tiere in klarem Wasser zu erklären, da diese die Granula als Nahrungsstoffe aufbrauchen, und somit durch den Aufbrauch der Granula eine Zerstörung der Färbung hervorgerufen wird. HIRSCH (1910) stellt die Behauptung auf, daß die Granula vitale Gebilde seien, die aus dem Plasma entstünden. ARNOLD (1914) weist vor - allem überall in seinem großen Werk „Über Plasmastrukturen“ auf die Übereinstimmung der Granula bei vitaler Färbung und der von ihm beobachteten Glykogenspeicherung hin. Jedenfalls haben wir es also bei den Granulis mit präformierten Gebilden zu tun, die nicht als Artefakte, entstanden durch die Farbstoffe, zu bezeichnen sind.

Fällungskraft einerseits, Lipoidlöslichkeit andererseits wirken nun bei der Färbung so zusammen, daß ein Farbstoff, der stark lipoidlöslich ist, aber wenig Fällungskraft besitzt, ein guter Diffusfärber ist, ein Farbstoff hingegen, der wenig lipoidlöslich ist, aber starke Fällungskraft besitzt, ein guter Granulafärber. Bei einer Färbung, wo Granula- und Diffusfärbung eintreten, ist der Umstand bemerkenswert, daß die Diffusfärbung immer später eintritt als die Granulafärbung. Ob sich der Farbstoff infolge der größeren Adsorptionsfähigkeit der Granula in ihnen anhäuft oder ob andere Faktoren das Nachfolgen der Diffusfärbung bestimmen, ist fraglich; wenn die Granula aber übersättigt sind, wird der Farbstoff in dem umgebenden Zelleninneren sichtbar. Inwieweit eine Schädigung der einzelnen Strukturbestandteile dabei stattfindet, muß dahingestellt bleiben. Es müßten aber alle granulärfärbenden Farbstoffe, so fern sie lipoidlöslich sind, in der richtigen Konzentration und in der angemessenen Zeit eine Diffusfärbung ergeben, eine Behauptung, die durch die neuesten Versuche NIRENSTEIN's (1919), der 119 Farb-

stoffe untersuchte, bestätigt wird. Alle granulärfärbenden Farbstoffe weisen in seiner Tabelle auch eine Färbung des lebenden Zellkörpers, also eine Diffusfärbung auf.

Um nun festzustellen, ob den einzelnen Farbstoffen eine spezifische Qualität der Färbung zukommt, ob sie verschieden auf die einzelnen Zellbestandteile wirken, ging man daran, lebende Zellen zugleich mit zwei Farbstoffen, also mit einem Farbstoffgemisch, zu färben. Zu diesen interessanten Beobachtungen wurde nun meistens ein Gemisch zweier basischer Farbstoffe, Neutralrot und Methylenblau, angewandt. Es sind dies beides granulärfärbende Farbstoffe und man hätte eigentlich erwarten müssen, daß bei gleichen Mischungsverhältnissen eine gleichmäßige Färbung der Granula mit violetter Farbtonung eintreten würde. Aber es stellten sich da Befunde heraus, die das eine Übereinstimmende haben, daß Neutralrot im lebenden Protoplasma schneller sichtbar wird als Methylenblau.

So fand RUZICKA (1905) bei seinen Untersuchungen, daß sich das lebende Protoplasma mit Neutralrot färbte, während das tote Protoplasma reine Methylenblaufärbung annahm. Auch STATKEWITSCH beobachtete erst das Auftreten einer Neutralrotfärbung. Allmählich tauchen dann auch Granula auf, die eine reine Methylenblaufärbung zeigen. GARMUS (1912) fand übereinstimmend damit, daß Neutralrot wesentlich schneller in die Drüsenzellen der Nickhaut des Frosches gelangt als Methylenblau. Er ist auch der erste Forscher, der auf die Bedeutung des verschiedenen Zeiteintritts der Färbung bei den von ihm angewandten Farbstoffen hinweist. Bei FISCHEL's Versuchen mit Amphibien (1901) sind es bestimmte Zellen, die immer wieder Methylenblaufärbung annehmen, während Neutralrot nur in den Hautzellen gespeichert wird. MARX (1904) fand bei seinen Untersuchungen Granula, die reine Neutralrotfärbung zeigten, daneben solche, die wiederum nur Methylenblaufärbung annahmen, aber dann auch die Übergangsstufen, also solche, die violett gefärbt waren. Auch in ARNOLD's Werk „Über Plasmastrukturen“ findet man Angaben über violette Granulafarben bei Anwendung eines Gemisches von Methylenblau-Neutralrot z. B. bei den Blutkörperchen.

All diese Befunde haben zu der Erklärungsmöglichkeit geführt, daß die verschiedenen Granula zu den einzelnen Farbstoffen eine mehr oder weniger bestimmte chemische Affinität besitzen. So sollen nach FISCHEL (1901) zwei verschiedene Granulaarten in den

Zellen vorhanden sein, solche, die nur Neutralrot aufnehmen, andere, die hinwiederum nur Methylenblau speichern. Es wäre damit aber noch nicht die violette Mischfärbung erklärt und vor allem nicht die verschiedene Zeit, die die beiden Farbstoffe brauchen, um sichtbar zu werden.

Zur Erklärung des besagten Verhaltens der Zellen gegen Farbstoffgemische bedarf es der eingehenden Beachtung einer Zelleigenschaft, die bisher nicht genügend gewürdigt worden ist.

Vereinzelt findet man allerdings in der Literatur Angaben über die Reduktionsfähigkeit des Protoplasmas auf alle eindringenden Substanzen. So unternahm PROWAZEK (1902) Versuche mit vitaler Färbung an Paramaecien, wobei während eines bestimmten Stadiums des Absterbens der Versuchstiere sich die Entoplasma-körnchen und die peripheren Pellikulakörnchen entfärbten. PROWAZEK führte dies auf Reduktion des Farbstoffes durch irgendwelche Substanzen des Protoplasmas zurück. Es gelang ihm, die Färbung auf einer bestimmten Stufe des Absterbens vollkommen zu regenerieren, und zwar durch bloßes Erheben des Deckglases, ein Beweis dafür, daß es sich um Oxydationsvorgänge in der Zelle selbst handelt. PÉNARD (1905) führt bei Amöben die allmählich eintretende Färbung mit Methylenblau auf die immer mehr sich vermindernde Reduktionskraft des Protoplasmas zurück. Auch HÖBER (1909) weist in seinen Arbeiten auf die leichte Reduzierbarkeit der schlechten bzw. langsam vitalfärbenden Farbstoffe hin.

Daß das Protoplasma tatsächlich eine reduzierende Kraft besitzt, beweisen ja einwandfrei neuere Arbeiten auf diesem Gebiete. So zeigt THUNBERG (1918), daß Methylenblau bei Zusatz von Bernsteinsäure durch Muskelenzym entfärbt d. h. reduziert wird. Leber, Lunge, Pankreas, Herzmuskulatur, Niere, Gehirn entfärben ebenfalls, natürlich mit den entsprechenden Verschiedenheiten. Indigoschwefelsäure wird von den Epithelien der Labyrinthkanäle der Niere reduziert. HEFFTER (1908) lehnt jede Fermentwirkung bei diesem Reduktionsvorgang ab, allein der Sulphydrylwasserstoff ist der wirksame Bestandteil. Bei der reduzierenden Wirkung gewisser Eiweißkörper ist die Ursache der Reduktion in einer cysteinartigen Gruppe zu suchen. Methylenblau, Indigoschwefelsäure werden durch Cystein reduziert, eine Reaktion, die bei Zusatz eines Katalysators beschleunigt wird.

Alle diese Tatsachen führen nun zu dem Schluß, daß bei der vitalen Färbung keinesfalls die Reduktionskraft des Protoplasmas

außer acht gelassen werden darf. Wenn man noch einmal Vorliegendes kurz zusammenfaßt, so gelangt man zu folgender Überlegung: Der Farbstoff dringt diffusiv in das Protoplasma ein, wird hier von den reduzierenden Substanzen des Protoplasmas angegriffen und zerstört. Da von außen immer mehr Farbstoff in die Zelle eindringt, wird einmal der Zeitpunkt eintreten, wo diese reduzierenden Substanzen des Protoplasmas erschöpft sind. Sie haben nicht mehr die Kraft, den Farbstoff zu zerstören, der Farbstoff wird sichtbar. Es liegt nun die Schlußfolgerung nahe, daß ein Farbstoff, der sich chemisch schwerer reduzieren läßt, schneller färben wird als ein solcher, der äußerst leicht reduzierbar ist. Wenn man die Versuchstiere, die vital gefärbt sind, von der Farblösung in klares Wasser überträgt, tritt natürlich eine Entfärbung ein, da die reduzierenden Substanzen, die sich während des Lebens im Protoplasma immer wieder regenerieren, jetzt, wo dem Farbstoffeintritt von außen eine Grenze gesetzt ist, leicht den noch im Protoplasma vorhandenen Farbstoff werden reduzieren können. WALLENGREN (1902) macht, wie schon erwähnt, diese Beobachtungen und führt die Entfärbung der hungernden Tiere in klarem Wasser darauf zurück, daß diese die Granula als Reservekörper für Nahrungsstoffe aufbrauchen. Auch die Entfärbung der Tiere in der Farblösung selbst, die man vielfach in der Literatur, allerdings ohne irgendwelche Erklärung, vorfindet, läßt sich vielleicht auf diese Weise deuten, daß die ganze Farbstofflösung, in der die Tiere sich aufhalten, von dem reduzierenden Bestandteil des Protoplasmas für die Versuchstiere allmählich unwirksam gemacht wird, daß gewissermaßen die ganze Farbstofflösung durch die Versuchstiere hindurch filtrierte wird, da ja das Protoplasma der Süßwasserprotozoen eine höhere osmotische Konzentration als das umgebende Wasser besitzt und infolgedessen ein andauerndes Einströmen von Wasser stattfindet. Wenn man aber die in der Farbstofflösung farblos gewordenen Versuchstiere in eine frische beliebige Farblösung überträgt, färben sie sich wieder normal in der jeweils für den Farbstoff und die Konzentration desselben maßgebenden Zeit.

Vorliegende Untersuchungen versuchen nun den Beweis zu erbringen, daß eine große Parallelität herrscht zwischen zeitlichem Färbeeintritt des Farbstoffs im Protoplasma bei vitaler Färbung einerseits und zwischen chemischer Reduzierbarkeit des Farbstoffs im Reagenzglas andererseits, um damit zu beweisen, daß

die Schnelligkeit des Färbeintritts tatsächlich von der Reduzierbarkeit des Farbstoffs mit abhängt.

Zu diesem Zwecke wurden zwei Versuchsanordnungen getroffen, die erste, die die Resultate vitaler Färbung ermittelte, die zweite, die auf chemischer Grundlage die verschiedene Reduzierbarkeit der angewandten Farbstoffe feststellte.

Für die erste Versuchsreihe war vor allem der Zeitpunkt ausschlaggebend, wo die Farbe im Protoplasma sichtbar wird, da es beim Fortschreiten der Färbung schwerer ist, von einem gleichwertigen Stand der Färbung zu sprechen. Als Material wurde ausnahmslos *Paramaecium caudatum* verwandt, da sich diese Infusorien als am leichtesten zu beobachten erwiesen. Vor allem zeigten sie während der Versuchsdauer eine große Stetigkeit in ihrem Verhalten den Farbstoffen gegenüber. Beobachtungen, die erst auch an Colpidien unternommen wurden, mußten bald aufgegeben werden, da sich bei diesen Infusorien durch die Größe und das Alter bedingte Verschiedenheiten ergaben, die eine Aufstellung genauer Tabellen mit allzu großen Schwierigkeiten verknüpft hätte. Während der ganzen Versuchsdauer, die sich auf 4 Monate erstreckte, wurden nur Versuchstiere aus ein und derselben Kultur verwandt. Es mußten nun vor allem die Verschiedenheiten der Kultur während dieser ganzen Zeit vollauf berücksichtigt werden und dazu dienten tägliche Kontrollversuche.

Die Versuchsanordnung war die denkbar einfachste. Aus der *Paramaecium*-Kultur wurde ein ccm Kulturflüssigkeit mittels einer Pipette in ein Uhrsälchen gebracht und dann jeweils die Menge von etwa 10 ccm Farbstofflösung hinzugefügt. Mit einem Glasstab wurden dann Tierchen aus dieser Lösung auf einen Objektträger gebracht und durch leichtes Anpressen des Deckglases und Absaugen überflüssigen Wassers wurden die Tierchen fast bewegungslos gemacht. Hierbei mußte man sich aber vor allem in acht nehmen, keine Schädigung der Paramaecien durch Druck herbeizuführen. Es konnte aber auf diese Art und Weise der Farbenumschlag in den Nahrungsvakuolen bei Neutralrot von saurer Reaktion zu Anfang der Verdauung, also roter Färbung, bis zur alkalischen Reaktion der Nahrungsvakuole, also stark gelbroter Färbung, bei Fortschritt der Verdauung beobachtet werden, was immerhin die Untersuchung ein und desselben Tieres innerhalb zweier Stunden beansprucht.

Es wurden im ganzen 22 basische Farbstoffe untersucht. Als

günstigste Lösung stellte sich im Verlauf der Versuche eine $n/10.000$ Lösung heraus. Nur bei einigen schwer wasserlöslichen Farbstoffen ergab sich die Notwendigkeit, stärkere Konzentrationen anzuwenden, um Diffusfärbung bzw. Granulafärbung zu erhalten. Es wurde darauf geachtet, daß diese stärker konzentrierten Farblösungen ebenso intensiv gefärbt waren wie die $n/10.000$ Lösung der anderen Farbstoffe. So führten Vesuvin 4 BG, Diamantfuchsin, Rosalilin Base bei $n/10.000$ Lösung nur eine Färbung der Nahrungsvakuolen herbei.

Von den verwandten 22 basischen Farbstoffen lieferte die Aktien-Gesellschaft für Anilin-Fabrikation, Berlin: Kristallviolett 6 B Pulver,

die Badische Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen Rhodamin B extra, S extra, Safranin B extra, Viktoriablauf B, 4 RS,

die Höchster Farbwerke: Auramin konz., Malachitgrün krist. chem. rein, Rhodamin O, Vesuvin 4 BG konz., Methylengrün extra gelbl. O,

die Farbwerke Durand u. Huguenin A.-G., Basel: Chrysoidin R,

die Farbenfabriken vorm. Fr. Bayer, Leverkusen: Capriblau GON, Diamantfuchsin kl. Krist., Methyleneblau BB, Methylviolett 5 B,

die Firma Kalle u. Co., Biebrich a. Rhein: Rosanilin Base.

Den genannten Firmen sei an dieser Stelle mein bester Dank für die bereitwillige Überlassung von Proben dieser Farbstoffe zu meinen Versuchen ausgesprochen.

Außerdem wurden von GRÜBLER in Leipzig bezogen:

Bismarckbraun, Methyleneblau B X, Neutralrot, Nilblausulfat, Toluidinblau.

Zu Anfang der Versuche wurde die Kultur auf das Genaueste in ihrem Verhalten Neutralrot gegenüber geprüft. Es wurden die Neutralrotlösungen in der Konzentration $n/10.000$ — $n/10.000.000$ benutzt und der Färbeeintritt und die verschiedenen Stufen der Färbungen festgestellt. Die Ergebnisse wurden dazu benutzt, um täglich die Paramaecien in ihrem Verhalten gegenüber Neutralrot zu prüfen, um so eine Richtschnur für den Stand der Kultur zu jeder Zeit zu haben. Die Abweichungen, die sich während der ganzen Versuchsdauer herausstellten, waren äußerst gering, so daß der Stand der Kultur in den ganzen 4 Monaten durchweg als ein gleich-

mäßiger bezeichnet werden konnte. ~~Nach~~stehend seien die Kontrollversuche angeführt:

Neutralrot als Kontrollösung.

n/10.000

Erste Spur einer Färbung, d. h. rötlicher Schimmer um die Nahrungsvakuolen nach	2 Minuten
Mittlere Granulafärbung nach	10
Starke " "	24
Stärkste Granulafärbung, schwache Diffusfärbung, Absterben nach .	2 Stunden

n/100.000

Erste Spur einer Färbung nach	10 Minuten
Gute Granulafärbung	35
Starke " "	70
Nach 24 Stunden stärkste Granulafärbung, noch Leben.	
" 48 keine Veränderung.	

n/1.000.000

Erste Spur einer Färbung nach	22 Minuten
Schwache Färbung der Nahrungsvakuolen nach	45
Mittlere " " "	90 "
Nach 24 Stunden keine Veränderung, nur eine Färbung der Nahrungsvakuolen wird erreicht.	
Nach 48 Stunden keine Veränderung.	

n/10.000.000

Nach 24 Stunden ganz zarte Färbung der Nahrungsvakuolen.	
Nach 48 " keine Veränderung.	

n/100.000.000

Nach 24 Stunden schwach rosa Schimmer in den Nahrungsvakuolen.	
Nach 48 keine Veränderung.	

Wie schon oben erwähnt, lag es mir hauptsächlich daran, genau das erste Sichtbarwerden der Farbe im Zelleib der Paramaecien festzustellen, also die erste Spur einer Färbung überhaupt zu beobachten. Diese erste Spur einer Färbung tritt nun vor allem in den Nahrungsvakuolen oder in unmittelbarer Umgebung der Nahrungsvakuolen auf. Maßgebend war ferner auch der Eintritt einer sichtbaren Diffusfärbung bei den Farbstoffen, die nur diffus färben. Für die Granulafärbung wurde im Verlauf der Versuche eine mittlere Färbung als wichtiger Zeitpunkt herausgegriffen, wo bei den Versuchstieren eine reine, gut ausgeprägte, möglichst farbengleichmäßige Granulierung vorhanden war.

Nach Art der Färbung wurden nun die untersuchten Farbstoffe in zwei Gruppen eingestellt. Zu der ersten Gruppe wurden die

127] ÜBER REDUKTION BASISCHER FARBSTOFFE IM LEBENDEN PROTOPLASMA. 10

Farbstoffe gerechnet, die überhaupt Diffusfärbung zeigten, darunter auch solche, die erst Granulafärbung mit darauffolgender Diffusfärbung aufwiesen. In die zweite Gruppe kamen die Farbstoffe, die die Paramaecien rein granulär färbten und sogar meistens nach dem Tode der Versuchstiere nur granulär sichtbar waren. Nilblausulfat, ein Farbstoff, bei dem kurz vor dem Tode der Versuchstiere eine Diffusfärbung des Protoplasmas eintritt, wurde doch zu Gruppe II der reinen Granulafärber gerechnet, da bei diesen Farbstoffen wohl die Diffusfärbung keine vitale Färbung ist, sondern auf tiefgreifende Änderungen in der Struktur des Protoplasmas zurückgeführt werden muß. Nachstehend sei für jede der Gruppen ein Versuch aus dem Protokoll herausgegriffen:

Gruppe I. Methylviolett 5B. 5. 12. 1919.

n/10.000

Ansetzen des Versuchs	3 ⁴⁰ Uhr.
Starke Granulafärbung	3 ⁴¹
Stärkste Granulafärbung, leichte Diffusfärbung	3 ⁵⁵
" " gute "	4 ¹¹
Am 6. 12. nur tote Paramaecien bei stärkster Diffusfärbung.	

Gruppe II. Nilblausulfat. 20. 11. 1919.

n/10.000

Ansetzen des Versuchs	4 ⁵⁷ Uhr.
Erste Spur einer Färbung, blauer Anhauch	4 ⁵⁹
Anschein einer Diffusfärbung	5 ⁰²
Starke Granulafärbung	5 ¹⁰
Leichte Diffusfärbung bei stärkster Granulafärbung	5 ²⁰
Absterben der Tiere	5 ³⁴

Der Tod der Paramaecien wurde an dem Aufhören der Protoplasmaströmung beobachtet, da ja bekanntlich das Flimmern des Flimmerepithels noch zu den postmortalen Erscheinungen gerechnet werden muß.

Bei den granulafärbenden Farbstoffen sei darauf hingewiesen, daß es meistens den Anschein hat, als ginge der Granulafärbung eine leichte Diffusfärbung voraus. Es trifft das mit der Ansicht eines diffusen Eintritts des Farbstoffs ins Protoplasma zusammen, bevor er an die Granula gebunden wird.

Doch darf man in diesen Fällen die der Granulafärbung vorausgehende Diffusfärbung nicht mit der bleibenden Diffusfärbung vergleichen, da die letztere ja, wie erwähnt, immer erst nach der Granulafärbung auftritt.

Die Hauptergebnisse der vitalen Färbeversuche seien nun in folgenden Tabellen zusammengefaßt:

Tabelle I.
Diffusfärber.

Farbstoff n/10.000	Erste Spur einer Färbung	Gute Granulafärb.	Eintritt einer Diffusfärb.	Absterben
1) Auramin	1/2 Min.	fehlt	1 Min.	3 Min.
2) Chrysoidin R	1/2	"	5	25
3) Kristallviolett 6 B	1/2	1 Min.	10	18
4) Rhodamin B extra	1	fehlt	15	—
5) Methylviolett 5 B	1	15 Min.	30	—
6) Rhodamin O	30	fehlt	40	(Entfärb.)
7) Safranin B extra	5	"	60	24 Std.
8) Capriblau GON	45	50 Min.	60	—
9) Diamantfuchsin (n/1.000)	—	fehlt	60	—
10) Rhodamin S extra	5	20 Min.	90 "	—
11) Rosanilin Base (n/100)	—	fehlt	24 Std.	—

Tabelle II.
Reine Granulafärber.

Farbstoff n/10.000	Erste Spur einer Färb.	Gute Granulafärbung	Absterben
1) Malachitgrün	2 Min.	4 Min.	6 Min.
2) Nilblausulfat	2	9	20 "
3) Neutralrot	2	25	2 Std.
4) Viktoriablau 4RS	5	60	ca. 6
5) Viktoriablau B	5	70	—
6) Methylenblau Bx	10	35	—
7) Methylenblau BB	10	60	—
8) Bismarckbraun	15	40	—
9) Methylengrün	15	80	—
10) Toluidinblau	20	180	ca. 4 Std.
11) Vesuvin 4BG (n/1000)	15	50	—

Wie aus vorstehenden Tabellen ersichtlich ist, zeichnet sich vor allem unter den Diffusfärbern Auramin durch seine hohe Giftigkeit gegenüber Paramaecien aus. Man könnte da überhaupt an einer rein vitalen Färbung zweifeln, wenn sich derselbe Farbstoff nicht in schwächeren Konzentrationen, z. B. in n/100.000, für Paramaecien vollkommen unschädlich verhielte. Man kann darin die Paramaecien

tagelang am Leben erhalten, wobei sie eine gut ausgeprägte Diffusfärbung ihres Protoplasmas aufweisen.

Chrysoïdin R ist auch ein reiner Diffusfärber, der allerdings bei der Konzentration $n/10.000$ noch ziemliche Giftwirkungen zeigt. Diese Giftwirkungen kommen bei Paramaecien vor allem in immer mehr zunehmenden Taumel- und Schlingerbewegungen zum Ausdruck, was auf eine einseitige Lähmung des Flimmerbesatzes hindeutet. Dabei übersättigen sich die Tiere immer mehr mit Farbstoff, so daß man gar keine Struktureinheiten mehr unterscheiden kann, bis schließlich jegliches Leben erlischt.

Kristallviolett 6 B zeichnet sich durch seine sehr rasch auftretende Granulafärbung aus. Der Zeitunterschied zwischen Eintritt einer Diffusfärbung und Tod ist auch bei diesem Farbstoff verhältnismäßig gering. Aber es gilt hier dasselbe wie für Auramin; denn wendet man schwächere Konzentrationen an, dann bekommt man eine schöne vitale Diffusfärbung neben der Granulafärbung.

Rhodamin B extra und Rhodamin O färben rein diffus. Bei Rhodamin O war zu beobachten, daß die Paramaecien sich in der Farbstofflösung selbst bei Anwendung einer $n/10.000$ Lösung vollkommen entfärben.

Bei Methylviolett 5 B war die Art der Granulafärbung auffallend. Ganz fein verteilte Granula übersäten das ganze Protoplasma und ließen sich nur mit stärkster Vergrößerung als Granula voneinander unterscheiden. Bemerkenswert ist auch noch der Umstand, daß die Granulafärbung einen stark grünen Anhauch zeigte, was für eine stark saure Reaktion der Granula sprechen würde, da im Reagenzglase Methylviolett bei Zusatz von konzentrierter Salzsäure einen Umschlag des Violett in Grün zeigt.

Safranin B extra zählt wiederum zu den reinen Diffusfärbern. Der Tod der Tiere tritt bei diesem Farbstoff nach 24 Stunden bei stärkster Diffusfärbung ein.

Capriblau GON zeigte neben starker feinverteilter Granulafärbung nur eine leichte Diffusfärbung, die auch nicht zunahm, nachdem die Lebenstätigkeit der Paramaecien aufgehört hatte.

Diamantfuchsin ergab in der Konzentration $n/10.000$ nur eine schwache Färbung der Nahrungsvakuolen, in der Konzentration $n/1.000$ angewandt, zeigte sich innerhalb 5 Minuten eine starke Speicherung des Farbstoffs in den Nahrungsvakuolen und erst in ungefähr 60 Minuten trat daneben eine leichte Diffusfärbung rein vitalen Charakters ein.

Rhodamin S extra ist der einzige Farbstoff unter den Rhodaminen, der bei diesen Versuchen eine gut ausgeprägte Granulafärbung neben der Diffusfärbung zeigte.

Rosanilin Base mußte ebenso wie Diamantfuchsin in stärkerer Konzentration angewandt werden und die Lösung n/100 bewirkte neben stärkster Farbstoffspeicherung in den Nahrungsvakuolen innerhalb 24 Stunden leichte Diffusfärbung.

Was von Methylviolett 5 B gesagt wurde, gilt für Malachitgrün in noch verstärktem Maße. Neben sehr starke Giftigkeit — in 6 Minuten sind schon sämtliche Paramaecien in der Farbstofflösung ohne Leben — tritt hier die Granulafärbung in äußerst fein verteilter Form auf, so daß nur eine Benutzung der Öl — Immersion zeigte, daß man es mit einer rein granulären Färbung zu tun hatte.

Bei Nilblausulfat macht sich der Tod der Paramaecien, wie schon erwähnt, durch eine leichte Diffusfärbung, die neben der Granulafärbung einhergeht, bemerkbar. Daß man es hier mit einer Schädigung des Protoplasmas zu tun hat, das beweist der Befund, daß bei Anwendung einer n/100.000 Lösung selbst nach 48 Stunden keine Diffusfärbung vorhanden war, wohl aber allerstärkste Granulafärbung.

Bei Neutralrot sei nur noch ergänzend erwähnt, daß dieser Farbstoff bei der kleinsten Inanitionserscheinung sofort eine Diffusfärbung hervorruft.

Die Farbstoffe Viktoriablau 4 RS, Viktoriablau B, Methylenblau Bx und Methylenblau BB erwiesen sich als reine Granulafärber. Selbst die toten Paramaecien zeigten nur stärkste Granulafärbung ohne irgendwelche Spur einer Diffusfärbung.

Bismarckbraun, ein reiner Granulafärber, hatte dieselbe Eigenschaft wie Rhodamin O unter den Diffusfärbern. Die Tiere, die in den ersten Tagen in der Farbstofflösung starke Granulafärbung zeigten, entfärbten sich regelmäßig innerhalb 8 Tagen und selbst bei längerem Verweilen in der Farbstofflösung konnte keine Färbung der Paramaecien mehr festgestellt werden.

Methylengrün und Toluidinblau färben rein granulär. Diese beiden Farbstoffe führten eine ganz fein verteilte Granulafärbung des Protoplasmas herbei, die während der Dauer der Färbung immer mehr zunahm, ohne daß irgendwelche Diffusfärbung eintrat.

Bei Vesuvin 4 BG mußte wiederum eine n/1.000 Lösung ange-

gewandt werden, da eine n/10.000 Lösung nur eine Färbung der einzelnen Nahrungsvakuolen herbeiführte.

Es galt nun in einer zweiten Versuchsgruppe festzustellen, wie sich die zu den vitalen Färbungsversuchen verwandten Farbstoffe gegenüber einer reduzierenden, chemischen Substanz verhalten würden. Ganz unabhängig von den vitalen Färbungsversuchen wurden nach deren Abschluß die 22 basischen Farbstoffe auf ihren Unterschied in der Schnelligkeit des Reduktionsvorgangs untersucht. Es wurden an Reduktionsmitteln ausprobiert. Schwefelammon, Natriumsulfit, Natriumbisulfit und Natriumhydrosulfit. Als brauchbar zu den Versuchen erwies sich aber nur Natriumhydrosulfit, da die übrigen Reduktionsmittel sich gegen wenigstens eine Farbstoffgruppe unwirksam verhielten, während Natriumhydrosulfit für alle Farbstoffe Reduktionskraft hatte, ausgenommen die nicht zu reduzierenden, wie Auramin, Rhodamin B extra und Rhodamin O.

Aus konzentriertem Natriumhydrosulfit in Pulverform wurden verschiedene Lösungen von bestimmtem Prozentgehalt hergestellt. Da Natriumhydrosulfit an der Luft sehr schnell seine Reduktionskraft verliert, wurden einige Tropfen Natronlauge hinzugefügt, aber trotzdem wurde zu jeder Versuchsreihe eine frisch hergestellte Lösung benutzt. Von den Farbstoffen wurden wie bei den vitalen Färbungsversuchen Lösungen von n/10.000 genommen.

Um nun überhaupt erst einen Unterschied in der Reduzierbarkeit der Farbstoffe festzustellen, wurden Mengen von 10, 20, 30, 50 und 100 ccm der zu untersuchenden Farbstofflösung genommen und dann festgestellt, wieviel Tropfen einer 5 proz. Natriumhydrosulfitlösung nötig seien, um eine gänzliche Entfärbung der jeweiligen Mengen herbeizuführen. Hierbei stellten sich trotz der Grobheit des Verfahrens schon namhafte Unterschiede heraus. So ließen sich einzelne Gruppen bestimmen von schwer und leicht zu reduzierenden Farbstoffen. Es wurde nun jeweils eine Gruppe von Farbstoffen, die ungefähr das gleiche Verhalten dem Natriumhydrosulfit gegenüber zeigten, zusammengefaßt. Das Reduktionsmittel wurde, um genaue Resultate zu erhalten, auf eine 1 proz. Lösung abgeschwächt und nach Zusatz einer bestimmten Anzahl von Tropfen wurde bei 10 cm Farblösung zeitlich der Wiedereintritt der Färbung festgestellt. Schwierigkeiten bereitet dies Verfahren dadurch, daß bei vielen Farblösungen der alte Farbton nach der Reduzierung nicht in der Intensität und Tönung wiederkehrt, aber mit Hilfe eines Kontrollreagenzglases, das jeweils die gleiche Menge einer unred-

zierten Farbstofflösung enthielt, gelang es doch, mit der größten Sicherheit die Unterschiede in der Reduzierbarkeit der einzelnen Farbstoffe festzustellen. Ein Auszug aus dem Protokoll möge dies veranschaulichen:

I.

Farbstoff n/10.000 10 ccm	Menge der zuge- setzten 1% igen Natriumhydro- sulfittlösung in Tropfen	Zeitpunkt des Ver- suchsbe- ginns	Zeitpunkt der Rück- kehr der Farbe
1) Nilblausulfat	3	11 ⁴⁵	1 ⁵⁰
2) " "	3	2 ³⁵	3 ³⁰
1) Methylviolett 5B	3	11 ⁴⁷	12 ³⁰
2) " "	3	2 ³⁸	3 ¹⁰
1) Capriblau GON	1	11 ⁵⁰	2 ¹⁵
2) " "	3	4 ¹⁹	5 ⁴⁵
1) Chrysoidin R	1	11 ⁴⁹	nach 24 Std. keine Rückkehr d. Farbe.
2) " "	1	2 ³⁵	
1) Kristallviolett 6B	3	11 ⁴⁷	1 ³⁰
2) " "	3	2 ³⁵	3 ⁴⁰
1) Neutralrot	1	11 ⁵⁷	12 ³⁰
2) " "	3	2 ³⁵	3 ³⁵

Die Zahlen 1) und 2) bezeichnen die zusammengehörnde Versuchsreihe.

II.

Ansetzen des Versuchs: 10⁴⁰. Zusatz: 3 Tropfen einer 1% igen Natriumhydro-sulfittlösung.

Farbstoff n/10.000 10 ccm	Zeitpunkt der Rück- kehr der Farbe
1) Viktoriablau 4RS	11 ¹⁵
2) " " B	11 ⁴⁰
3) Malachitgrün	11 ⁵⁰
4) Rosanilin Base	12 ¹⁰
5) Toluidinblau	12 ³⁰

Bei den ganz leicht zu reduzierenden Farbstoffen wurde die Reduktionsflüssigkeit weiter auf 0,5 Proz. abgeschächt, so daß auch hier die Unterschiede besser hervortraten.

Auf Grund der Versuche ließ sich nun folgende Reihe, anfangend mit den schwer zu reduzierenden Farbstoffen, aufstellen:

Gruppe I	{	1) Auramin 2) Rhodamin B extra 3) Rhodamin O	Gruppe III	{	13) Nilblausulfat 14) Methylenblau BB 15) Methylenblau Bx 16) Toluidinblau 17) Rosanilin Base 18) Methylengrün 19) Capriblau GON
Gruppe II	{	4) Rhodamin S extra 5) Safranin B extra 6) Viktoriablau 4RS 7) Neutralrot 8) Viktoriablau B 9) Methylviolett 5B 10) Malachitgrün 11) Diamantfuchsin 12) Kristallviolett 6B	Gruppe IV	{	20) Vesuvin 4BG 21) Bismarckbraun 22) Chrysoidin R

Die ersten drei Farbstoffe Auramin, Rhodamin B extra und Rhodamin O werden selbst durch Zusatz von konzentriertem Natriumhydrosulfit nicht entfärbt.

Rhodamin S extra läßt sich auch kaum reduzieren. Von diesem Farbstoff bis Kristallviolett 6 B reicht die Gruppe der schwer zu reduzierenden Farbstoffe. Eine dritte Gruppe läßt sich von Nilblausulfat bis Cabriblau GON herausgreifen, die Gruppe der leicht zu reduzierenden Farbstoffe, während die letzten drei Farbstoffe wegen ihrer auffallend leichten Reduzierbarkeit wieder gesondert zusammengefaßt werden müssen. Bei Bismarckbraun und Chrysoidin R ließ sich selbst bei Zusatz einer äußerst schwachen Lösung Natriumhydrosulfit nach 48 Stunden ein Wiedereintritt der Farbe nicht feststellen. Vielleicht handelt es sich bei dieser Farbstoffgruppe — die drei Farbstoffe gehören der Gruppe der Azofarbstoffe an — um eine vollkommene Zerstörung des Farbstoffmoleküls durch das Natriumhydrosulfit. Es ist leider nicht gelungen, ein anderes ebenso auf alle zu diesen Versuchen angewandten Farbstoffe gleichartig wirkendes Reduktionsmittel zu finden.

Aus den vitalen Färbungsversuchen einerseits und den chemischen Reduzierversuchen andererseits gilt es nun durch Zusammenstellung der einzelnen Versuchsergebnisse die Richtigkeit der Behauptung zu beweisen, daß tatsächlich zwischen Reduzierbarkeit des Farbstoffs und Zeit des Färbungseintritts bei der vitalen Färbung eine große Übereinstimmung herrscht. Zu berücksichtigen ist dabei noch, wie ja aus der Einleitung hervorgeht, die Lipoidlöslichkeit sowie die Diffusibilität der einzelnen Farbstoffe, um ein eventuelles Abweichen von der Norm erklären zu können. Die Werte der Farbstoffe für Lipoidlöslichkeit und Diffusibilität wurden der Arbeit W. VON MOELLENDORFF'S „Die Bedeutung von sauren

Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in den Zellen“ entnommen. Bei der Aufstellung der Tabellen wurden die Farbstoffe, die nur diffus färben ohne eine Granulafärbung im Protoplasma hervorzurufen, zusammengefaßt gegenüber den Farbstoffen, die reine Granulafärbung einerseits, Granula- und Diffusfärbung andererseits zeigten. Die Farbstoffe sind in der Reihenfolge ihrer chemischen Reduzierbarkeit aufgezählt. Es verstehen sich für den zeitlichen Eintritt der Diffusfärbung bzw. Granulafärbung die Werte einer Lösung von $n/10.000$, ausgenommen die Farbstoffe, bei denen aus den oben angeführten Gründen eine stärkere Konzentration genommen werden mußte. Erst seien die reinen Diffusfärber angeführt:

Tabelle III.
Reine Diffusfärber.

Farbstoffe in der Reihenfolge zunehmender Reduzierbarkeit	Eintritt der Diffusfärbung	Löslichkeit in 2%igem Lecithinxylo. Konzentration bei Adsorption aus wässriger Lösung v. d. Konzentration $n/10.000$	Diffusionsfortschritt in mm nach 5 Tagen
Auramin	1 Min.	$n/20.000$	42
Rhodamin B extra	15	$n/30.000$	35
Rhodamin O	40	$n/10.000$	30
Safranin B extra	60	$n/4.000$	37
Diamantfuchsin	60	$n/15.000$	28
Rosanilin Base	24 Std.	—	23
(Chrysoidin R	5 Min.	$n/17.500$	31)

Die erste Übersicht über Tabelle III zeigt, daß die Resultate der zwei Versuchsgruppen sich vollkommen decken. Auramin, der Farbstoff, der sich überhaupt nicht durch Natriumhydrosulfit reduzieren läßt, steht auch mit der Färbungsdauer an der Spitze der Tabelle. Er färbt in einer Minute, also äußerst schnell, diffus. Es scheint allerdings bei der schnellen Färbung die Giftigkeit des Farbstoffs für die *Paramaecien* ausschlaggebend zu sein. In 2—3 Minuten ist ja in der Farbflüssigkeit kein lebendes *Paramaecium* mehr vorhanden und so ist auch wohl der verhältnismäßig große Zeitunterschied in der Färbungsdauer zu den beiden Rhodaminfarbstoffen, Rhodamin B extra und Rhodamin O, zu erklären.

Rhodamin B extra und Rhodamin O sind ja auch Farbstoffe,

die sich durch Natriumhydrosulfit nicht reduzieren lassen, sie haben aber keine schädigende, giftige Wirkung auf Paramaecien, bei Rhodamin O wurde ja sogar, wie erwähnt, eine Entfärbung der Versuchstiere in der Farblösung beobachtet. Es ist nun selbstverständlich, daß diese Farbstoffe, die keine Schädigung auf das Protoplasma der Paramaecien ausüben können, auch langsamer färben werden, da eben durch die Schädigung des Protoplasmas auch dessen Reduzierkraft vermindert wird. Das lange Ausbleiben der Färbung bei Rhodamin O kann man wohl dadurch erklären, daß eben dieser Farbstoff schon in dieser Konzentration vollkommen unschädlich ist, die Diffusfärbung also als reiner vitaler Vorgang aufzufassen ist, was durch die Entfärbung der Paramaecien in der Farbstofflösung hinreichend bewiesen wird. Wendet man stärkere Konzentrationen an, dann tritt eine Entfärbung der Paramaecien in der Versuchslösung nicht mehr ein; auch findet bei zu starker Konzentration eine Schädigung des Protoplasmas statt, so daß der Charakter einer rein vitalen Färbung verloren geht.

Die beiden nächsten Farbstoffe Safranin B extra und Diamantfuchsin weisen dieselbe Zeitdauer bis zum Eintritt der Diffusfärbung auf, sie gehören auch zu derselben Gruppe von Farbstoffen bei den Reduktionsversuchen, nämlich zu der zweiten Gruppe der schwer zu reduzierenden Farbstoffe.

Rosanilin Base läßt sich sehr leicht reduzieren und somit ist auch die lange Dauer bis zum Färbungseintritt, der durchschnittlich 24 Stunden beansprucht, vollkommen erklärt.

Ein Farbstoff, der ein vollkommen abweichendes Verhalten zeigt, ist Chrysoidin R. Am leichtesten reduzierbar von allen untersuchten Farbstoffen, färbt er doch äußerst schnell. Es sei hier nochmals daran erinnert, daß Chrysoidin R sich bei den Reduktionsversuchen dadurch auszeichnete, daß selbst nach ein paar Tagen die Farbe der reduzierten Farbstoffmenge noch nicht zurückgekehrt war. Es ist darum wohl anzunehmen, daß Chrysoidin R von dem Reduktionsmittel, das im Protoplasma vorhanden ist, ganz anders angegriffen wird, als wie es uns das Natriumhydrosulfit zeigt. Das Protoplasmareduktionsmittel hat auf Chrysoidin R vermutlich lange nicht die starke Reduktionskraft wie das zu den Versuchen angewandte Natriumhydrosulfit, woraus sich die kurze Zeitdauer von 5 Minuten bis zum Eintritt der Färbung erklären würde.

Das Diffusfärbungsvermögen der in Tabelle III angeführten Farbstoffe wird bedingt durch die starke Lopoidlöslichkeit, die diese

Farbstoffe aufweisen, nach dem Satz, daß starke Lipoidlöslichkeit eine gute Diffusfärbung des Protoplasmas bewirkt.

Die Diffusibilität der hier verwandten diffusfärbenden Substanzen kann ebensowenig für sich den großen seitlichen Unterschied des Färbungseintritts erklären. Alle Farbstoffe sind recht gut diffusibel, die relativ geringe Zahl 23 für Rosanilin Base beruht zum größten Teil auf seiner schlechten Wasserlöslichkeit, die nur hellgefärbte und deshalb im Diffusionsversuch schlecht meßbare Lösungen herzustellen gestattet. Die gute Diffusibilität ist also zwar eine Vorbedingung für das Eindringen der Farbstoffe, kann aber für sich nicht als Maß für die Geschwindigkeit des Färbungseintritts genommen werden.

Man ersieht schon aus diesem Beispiele, daß durch diese drei Faktoren Lipoidlöslichkeit, Diffusibilität und Reduzierbarkeit die vitale Färbung zu einem äußerst komplizierten Vorgang wird, den klar zu übersehen erst weiteren Versuchen vorbehalten bleiben muß.

Diese Umstände sind auch bei der nächsten Tabelle IV zu berücksichtigen. Die Tabelle faßt alle Granulafärber zusammen, wiederum in der Reihenfolge ihrer Reduzierbarkeit. Als wichtiger Zeitpunkt wurde der Eintritt einer Granulafärbung herausgegriffen. Dabei ist zu bemerken, daß die erste Spur einer Färbung und Eintritt der Granulafärbung zeitlich so nahe zusammenliegen, daß hier ein Unterschied nicht gemacht werden konnte. Die vier Farbstoffe Rhodamin S extra, Methylviolett 5B, Kristallviolett 6B und Capriblau GON wurden, obwohl sie auch diffus färben, doch mit in dieser Tabelle aufgeführt, da der Diffusfärbung immer erst die Granulafärbung vorangeht.

Die zur Gruppe II unter den chemischen Versuchen gehörenden Farbstoffe von Rhodamin S extra bis Kristallviolett 6B zeigen eine Färbungsdauer von 1—5 Minuten. An der Spitze der Tabelle steht Rhodamin S extra, der Farbstoff, der sich von den Rhodaminen durch geringe Lipoidlöslichkeit auszeichnet. Chemisch betrachtet weicht ja Rhodamin S extra sowieso vollkommen von den anderen Rhodaminen ab. Es bewirkt der Zusatz von Natronlauge zu Rhodamin S extra Entfärbung und Niederschlag der Farbbase, während Natronlauge zu Rhodamin B oder Rhodamin O zugesetzt, keine Veränderung hervorruft. Bei den vitalen Färbungsversuchen zeigt sich das abweichende Verhalten darin, daß mit Rhodamin S extra immer erst eine Granulafärbung des Protoplasmas der Paramaecien erzielt wurde; in der geringen Lipoidlöslichkeit wäre vor

137] ÜBER REDUKTION BASISCHER FARBSTOFFE IM LEBENDEN PROTOPLASMA. 20

allem der Grund zu suchen, daß einer Granulafärbung nichts im Wege steht.

Viktoriablau 4RS und auch Viktoriablau B färben rein granulär. Man muß aber daran denken, daß die Gruppe der Viktoria-blaufarbstoffe sehr grob-dispers ist und daher auch eine sehr schlechte Löslichkeit zeigt, so daß man daraus und aus der relativ geringen Lipoidlöslichkeit das Ausbleiben einer Diffusfärbung erklären kann.

Tabelle IV.

Granulafärber.

Farbstoffe in der Reihenfolge zunehmender Reduzierbarkeit.	Eintritt der Granulafärbung.	Löslichkeit in 2% igem Lecithinxylo. Konzentration bei Adsorption aus wässriger Lösung v. d. Konzentration n/10.000	Diffusionsfortschritt in mm nach 5 Tagen.
Rhodamin S extra	5 Min.	n/40.000	34 (20)
Viktoriablau 4RS	5	n/40.000	7
Neutralrot	2	n/50.000	22 (8)
Viktoriablau B	5	n/ 3.000	3
Methylviolett 5B	5	n/10.000	27
Malachitgrün	2	n/10.000	38 (15)
Kristallviolett 6B	1	n/10.000	25
Nilblausulfat	8—9	n/50.000	17
Methylenblau BB	10	Spur	38 (17)
Methylenblau Bx	10	"	28
Toluidinblau	20	n/25.000	24 (13)
Methylengrün	15	Spur	32
Capriblau GON	45	n/50.000	40
Vesuvium 4BG (n/1.000)	15	n/30.000	—
Bismarckbraun	15	Spur	40 (13)

Anmerkung: Die eingeklammerten Zahlen in Spalte 4 bedeuten die Zone dunkelster Färbung.

Die Reduzierbarkeit ist bei beiden Farbstoffen die gleiche und demnach auch die Zeitdauer, die sie bis zum Eintritt einer Färbung des Protoplasmas benötigen.

Neutralrot paßt sich auch diesen Gesetzen an. Eine Diffusfärbung konnte nur bei Schädigung des Protoplasmas der Paramacien, sei es durch Hunger oder durch Druck des Deckglases hervorgerufen, festgestellt werden.

Methylviolett 5B zeigt neben der Granulafärbung auch eine später eintretende leichte Diffusfärbung, die nach dem Tode der

Paramaecien sehr intensiv wird. In den Rahmen dieser Untersuchungen fügt es sich vollkommen ein.

Die beiden letzten Farbstoffe dieser Gruppe, Malachitgrün und Kristallviolett 6B zeigen durch ihre verhältnismäßig schnelle Färbungszeit ein etwas abweichendes Verhalten, aber die Schnelligkeit der Färbung liegt bei diesen beiden Farbstoffen zweifellos in ihrer Giftigkeit gegenüber Paramaecien begründet. Führt doch Kristallviolett 6B den Tod der Paramaecien schon in 18 Minuten herbei und Malachitgrün sogar in 6 Minuten.

Nilblausulfat, als erster Farbstoff der Gruppe III der chemischen Reduzierversuche, zeigt trotz seiner noch ziemlich giftigen Wirkung — nach 20 Minuten ist kein lebendes *Paramaecium* mehr in der Versuchslösung — eben wegen seiner leichten Reduzierbarkeit eine lange Dauer bis zum Eintritt einer Granulafärbung.

Methylenblau BB und Methylenblau Bx verhalten sich in ihrer Reduzierbarkeit durch Natriumhydrosulfit vollkommen gleich, vollkommen gleich auch in ihrer Färbungszeit. Bei dem weiteren Fortschritt der Färbung zeigt sich allerdings ein namhafter Unterschied. Denn eine gut ausgeprägte Granulafärbung bedarf bei Methylenblau Bx nur einer Zeit von 35 Minuten, während Methylenblau BB fast die doppelte Zeit, nämlich 60 Minuten, beansprucht. Es ist schwer zu sagen, ob hier die etwas geringere Diffusibilität der Methylenblau Bx die Speicherung begünstigt.

Toluidinblau und Methylengrün, Vesuvin 4BG und Bismarckbraun, die am Schluß der Tabelle stehen, sich also sehr leicht reduzieren lassen, zeigen dieselbe Färbungsdauer von 15—20 Minuten.

Worauf die lange Dauer des Eintritts der Färbung bei Capriblau GON zurückzuführen ist, konnte nicht ermittelt werden. Bei den Reduktionsversuchen und auch bei den vitalen Färbungsversuchen steht es in den Tabellen jedenfalls mit an letzter Stelle, und es mag die kleine Abweichung vielleicht an der durch Alter herabgesetzten Färbekraft des zu den Versuchen verwendeten Capriblau gelegen haben.

Zum vollen Verständnis und zu einer Lokalisation der Reduktionswirkung führt nun erst der Vergleich der Ergebnisse mit den Diffusfärbern einer-, den Granulafärbern andererseits. Die Diffusfärbere, Farbstoffe also, die mit den Zellgranulis nicht in Beziehung treten, werden durchschnittlich erst nach erheblich längerer Zeit im Protoplasma sichtbar als die Granulafärbere. Bei letzteren schwanken die Zahlen zwischen 1 Minute und 45 Minuten, trotzdem gerade die

Mehrzahl dieser Farbstoffe sehr leicht reduzierbar ist: Umgekehrt fällt die lange Dauer bis zum Färbungseintritt bei den Diffusfärbem auf, zu denen gerade die sehr schwer oder gar nicht durch Natriumhydrosulfit angreifbaren Farbstoffe gehören. Aus diesen Tatsachen ist der Schluß gerechtfertigt, daß die an sich leicht reduzierbaren „Granulafarbstoffe“ nur im intergranulären Protoplasma einer wesentlichen Reduktionswirkung unterliegen, während sie an den Granulis verankert vor der Zerstörungskraft des Protoplasmas viel besser geschützt sind. Die diffusfärbenden Substanzen dagegen sind der Reduktionskraft des Protoplasmas in allen Teilen ausgesetzt, und es dauert aus diesem Grunde bei ihnen sehr viel länger, bis genügend unreduzierter Farbstoff angereichert ist, um einen sichtbaren Färbungseffekt zu erzeugen. M. a. W.: Die Reduktionskraft ist eine Eigenschaft des intergranulären Cytoplasmas, nicht der Granula.

Vorliegende Versuche zeigen jedenfalls mit Sicherheit, daß tatsächlich die Reduktionskraft des Protoplasmas bei der vitalen Färbung eine große Rolle spielt. Die in das Zellinnere eindringenden Farbstoffe werden also von dieser reduzierenden Substanz des Protoplasmas angegriffen, und dieser Vorgang findet solange statt, bis entweder durch Schädigung des Protoplasmas auch diese Lebensfähigkeit aufhört oder die Menge des eindringenden Farbstoffs zu groß wird, als daß sie in ihrer Gesamtheit reduziert werden könnte. Der Farbstoff wird sichtbar.

Was für die Farbstoffe gilt, dürfte allgemein für jede ins Zellinnere eindringende Substanz gelten, so daß also das lebende Protoplasma in sich einen selbständigen Schutz besitzt, der einmal durch Sauerstoffentziehung aus den eindringenden Substanzen sein Sauerstoffbedürfnis decken kann, ein andermal aber auch infolge seiner allgemeinen Reduktionswirkung zu einem wirklich wirksamen Schutz gegen Gifte, wenigstens bis zu einer gewissen Grenze wird. Unter günstigen Verhältnissen zeigt sich ja diese reduzierende Kraft so groß, und so beständig, daß man von einem Immunwerden des lebenden Protoplasmas gegenüber eindringenden Substanzen sprechen könnte. Es gewöhnen sich so nach den Untersuchungen von NEUSCHLOSS (1920) Paramaecien an Methylenblau, Trypanblau und Fuchsin, denn nach vorsichtiger Behandlung verlieren diese Farbstoffe ihre Giftigkeit bis zu einem gewissen Grade, d. h., die Paramaecien werden resistenter, und diese Resistenz ist nur darauf zurückzuführen, daß die Organismen den Farbstoff in höherem Maße zu zerstören vermögen.

Nach meinen Befunden, die entsprechende Angaben aus der Literatur bestätigen, wird die Resistenz der Paramaecien manchen Farbstoffen gegenüber sogar so groß, daß die Paramaecien sich in der Farbstofflösung selbst vollkommen entfärben. Es wird gewissermaßen die ganze Farbstofflösung durch die Organismen hindurchfiltriert, eine Eigenschaft des Farbstoffs zerstört, die für die Färbung von Wichtigkeit ist, so daß der Farbstoff nicht mehr imstande ist, im Protoplasma sichtbar zu werden. Am deutlichsten zeigte sich dies bei Bismarckbraun. Am 6. Tage nach Ansetzen des Versuchs waren sämtliche Paramaecien in der Farbstofflösung vollkommen farblos, obwohl die Farbstofflösung noch den alten Farbton zeigte, den sie beim Ansetzen des Versuchs gehabt hatte. Es lag nun nahe, die farblos gewordenen Tiere in eine frische Farbstofflösung hineinzubringen. So wurde am 14. Versuchstage ein Teil der Tiere in eine frische Farbstofflösung von Bismarckbraun und ein anderer Teil in eine Neutralrotlösung gebracht. Da zeigte es sich nun, daß man von einer vollkommenen Immunität der Paramaecien Bismarckbraun gegenüber nicht sprechen konnte, da sowohl bei Bismarckbraun als auch bei Neutralrot eine Granulafärbung in der jeweils für den Farbstoff angemessenen Zeit auftrat; nur konnte nebenher noch eine leichte Diffusfärbung des Protoplasmas beobachtet werden, die aber wohl auf den Umstand zurückzuführen ist, daß das Protoplasma wegen des Hungerzustandes der Paramaecien lange nicht mehr so lebenskräftig war und darum schon gewisse Inationerscheinungen zeigte.

Es seien nun noch einige Versuche angeführt, die mit einem Farbgemisch vorgenommen wurden. Sollte die Behauptung zutreffen, daß Reduzierbarkeit und Eintritt einer Färbung in einem festen Abhängigkeitsverhältnis zueinander stehen, dann war es klar, daß dies vor allem sich dann zeigen müßte, wenn man zwei Farbstoffe verschiedener Färbung und verschiedener Reduzierbarkeit, in gleichem Verhältnis gemischt, als Versuchslösung benutzte. Es wurde eine Mischung von Neutralrot und Methylenblau in $n/10.000$. Lösung 1:1 hergestellt und da zeigte sich denn, daß trotz des gleichen Mengenverhältnisses keine violette Mischfärbung auftritt, sondern daß zuerst die Granula eine reine Neutralrotfärbung zeigen. Erst später, zu der Zeit, wo nach Tabelle II Methylenblau im Protoplasma sichtbar wird, tritt eine violette Mischfärbung in manchen Granulis auf. Es kommt dann ein Stadium der Färbung, wo neben rein roten Granulis auch rein blaue vorhanden sind, während mit

dem Absterben der Paramaecien die Methylenblaufärbung immer mehr zunimmt. Die toten Paramaecien sind durchwegs blau gefärbt.

Es ist daraus ersichtlich, daß Neutralrot wegen seiner schlechten Reduzierbarkeit schneller färbt, aber ferner auch, daß mit dem Fortschritt der Färbung das Neutralrot von dem Methylenblau verdrängt wird. Es ist da zu berücksichtigen, das Methylenblau eine größere Fällungskraft besitzt als Neutralrot, und man kann sich die Verdrängung des Neutralrots in manchen Granulis so vorstellen, daß diejenigen Zellgranula, die am wenigsten saure Bestandteile in sich haben, nicht mehr die Kraft haben werden, das Neutralrot in Bindung zu halten. Methylenblau dagegen wird dank seiner stärkeren Fällungskraft noch imstande sein, eine Bindung mit diesen Granulis einzugehen. Da nun die ganzen sauren Bestandteile der Granula durch das Neutralrot in ihrer Bindungskraft allmählich immer mehr geschwächt werden, so ist es klar, daß das Methylenblau, das mit diesen Granula noch eine Bindung eingehen kann, immer das Übergewicht bei der Färbung gewinnen wird.

Weitere Versuche wurden noch mit einem Gemisch von Auramin und Methylenblau 1:1 unternommen. Die Paramaecien starben, wie vorauszusagen war, bei stärkster reiner Auramin-Diffusfärbung innerhalb 2—3 Minuten ab. Die Methylenblaufärbung kam gar nicht zum Ausdruck.

Diese letzten Versuche mit dem Farbstoffgemischen zweier Farben bringen vor allen Dingen einen klaren Beweis dafür, daß tatsächlich die Reduzierbarkeit des Farbstoffes bei dessen Eintritt in das Protoplasma ein Faktor in der vitalen Färbung ist, der bei keinem Versuche unberücksichtigt gelassen werden sollte.

Zum Schluß der Arbeit möchte ich Herrn Prof. von MOELLENDORFF, der mir die Anleitung zu dieser Arbeit gab und somit die Durchführung ermöglichte, und der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, meinen allerbesten aufrichtigsten, Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Das lebende Protoplasma besitzt und bildet in sich chemische Substanzen, die auf alle eindringenden Stoffe reduzierend wirken.
2. Es herrscht eine große Parallelität zwischen zeitlichem Farbeintritt der Farbstoffe im Protoplasma bei vitaler Färbung einerseits und zwischen chemischer Reduzierbarkeit der Farbstoffe im Reagenzglase andererseits.

3. Dadurch wird bewiesen, daß die Schnelligkeit des Farbstoffeintritts in das Protoplasma mit von der chemischen Reduzierbarkeit des Farbstoffes abhängt.
4. Die Reduzierbarkeit des Farbstoffs durch das Protoplasma ist somit ein wichtiger Faktor bei der vitalen Färbung neben Diffusibilität und Lipoidlöslichkeit.

Der Farbstoff dringt diffusiv in das Protoplasma ein und wird dort von den reduzierenden Substanzen des Protoplasmas angegriffen und zerstört. Da nun ein chemisch leicht zu reduzierender Farbstoff auch im Protoplasma leicht entfärbt wird, dauert es bei diesem Farbstoff länger, bis daß er im Protoplasma sichtbar wird, als bei einem solchen, der chemisch schwer zu reduzieren ist. Ein schwer zu reduzierender Farbstoff färbt schnell intravital, ein leicht zu reduzierender dagegen langsam.

5. Die Reduktionskraft ist eine Eigenschaft des intergranulären Cytoplasmas, nicht der Granula.

Dies ergibt sich aus einer Zusammenstellung der Werte für die Zeitdauer bis zum Eintritt einer Färbung bei Diffusfärbern einerseits und Granulafärbern andererseits. Die Diffusfärber beanspruchen eine wesentlich längere Zeit, bis daß sie im Protoplasma sichtbar werden. Die Granulafärber sind in den Granulis von den reduzierenden Substanzen des Protoplasmas geschützt, was bei den Diffusfärbern, die nur im Cytoplasma gespeichert sind, nicht der Fall ist.

6. Durch die Reduktionskraft, die das Protoplasma besitzt, hat es während des Lebens die Möglichkeit:
 - a) sein Sauerstoffbedürfnis teilweise durch die eindringenden Substanzen zu decken.
 - b) einen selbständigen Schutz gegen eindringende Gifte und sonstige schädliche Stoffe auszuüben.
-

Literaturverzeichnis.

- ARNOLD, J., 1914: Über Plasmastrukturen, Jena, G. Fischer.
- , 1900: Weitere Beobachtungen über vitale Granulafärbung. *Anatom. Anzeiger*, Bd. 16.
- BILTZ, W und ARVED. v. VEGESACK, 1909: Über den osmotischen Druck der Kolloide I. *Zeitschrift für physikal. Chemie*, Bd. 68, S. 357—382.
- , 1910: Über den osmotischen Druck der Kolloide II. *Zeitschrift für physikal. Chemie*, Bd. 73, S. 481—512.
- BILTZ, W. u. PFENNIG, F., 1911: Über den osmotischen Druck der Kolloide III. *Zeitschrift für physikal. Chemie*, Bd. 77, S. 91—116.
- EERLICH, P., 1885: *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus*, Berlin, Hirschwald.
- FISCHEL, A., 1901: Untersuchungen über vitale Färbung. *Anatom. Hefte*, Bd. 16. S. 417—519.
- GARMUS, A., 1912: Die Permeabilität und das Scheidevermögen der Drüsenzellen für Farbstoffe und eine neue Methode vitaler Beobachtung. *Zeitschrift f. Biologie* Bd. 58.
- GERLACH, L., 1859: Über die Einwirkung von Farbstoffen auf lebende Gewebe. Erlangen, Habilitationsschrift.
- GROSS, W., 1911: Experimentelle Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen histologischen Veränderungen und Funktionstörungen der Niere. *Ziegler's Beitrag* 51.
- , 1914: Über den Nachweis von Zellveränderungen durch vitale Färbung. *Verhandl. der deutschen Naturf. u. Ärzte.*
- HEFFTER, A., 1908: Die reduzierenden Bestandteile der Zellen. *Mediz. naturwiss. Arch.*, Bd. I, 1908.
- HEIDENHAIN, R., 1874: Mikroskopische Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Niere. *M. Schultzes Arch.*, Bd. 10.
- HIRSCH, C., 1910: Experimentelle anatomische Untersuchungen über die Nierenzelle. *Anatom. Hefte*, Bd. 40.
- HÖBER, R., 1909: Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoffe. *Biochem. Zeitschrift*, Bd. 20.
- LOELE, W., 1913: Histologischer Nachweis u. biologische Bedeutung oxydierender u. reduzierender Substanzen. *Ergebn. der allg. Pathologie Lubarsch u. Ostertag.*
- LÖHNER, L., 1913: Vergleichende Untersuchungen über Erstickung, Wärmelähmung und Narkose mit Protozoen. *Zeitschrift f. allg. Physiologie*, Bd. 15, S. 177—244.
- MARX, H., 1904: Über vitale und supravitale Granulafärbung bei Ätzkeratitis. *Virchows Archiv für pathol. Anatomie u. Physiologie* Bd. 175.
- METSCHNIKOFF, 1889: *Recherches sur la digestion intracellulaire. Annales de l'Institut Pasteur* 3, p. 25—29.
- MEVES, F., 1910: Zur Einigung zwischen Faden- und Granulalehre. *Archiv für mikroskopische Anatomie* Bd. 75.

27 F. WANKELL: ÜBER REDUKTION BAS. FARBST. I. LEB. PROTOPLASMA. [144

MICHAELIS, L., 1900: Die vitale Färbung, eine Darstellung der Zellgranula. Archiv f. mikroskopische Anatomie, Bd. 55.

—, 1905: Ultramikroskopische Untersuchungen. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol., Bd. 179.

v. MOELLENDORFF, W., 1918: Zur Morphologie der vitalen Granulafärbung. Arch. f. mikroskopische Anatomie, Bd. 90.

—, 1918: Die Bedeutung von sauren Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in den Zellen. Arch. f. mikroskopische Anatomie, Bd. 90.

NEUSCHLOSS, S. M., 1920: Untersuchungen über die Gewöhnung an Gifte II. Die Festigkeit der Protozoen gegen Farbstoffe. Pflüg. Arch., 178, S. 61—69.

PROWAZEK, S., 1898: Vitalfärbung mit Neutralrot an Protozoen. Zeitschrift f. wissenschaftliche Zoologie, Bd. 63.

—, 1903: Studien zur Biologie der Zelle. Zeitschrift f. allg. Physiologie, Bd. 2, S. 485—495.

ROSIN u. BIBERGEL, 1905: Das Verhalten der Leukocyten bei der vitalen Färbung. Virchows Archiv, Bd. 178.

RUHLAND, W., 1913: Zur Kritik der Lipoid- und der Ultrafiltertheorie der Plasmahaut nebst Beobachtungen über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloide für ihre Vitalaufnahme. Biochem. Zeitschr., 54.

RUZICKA, V., 1905: Über tinktorielle Differenzen zwischen lebendem und abgestorbenem Protoplasma. Pflüg. Archiv, Bd. 107.

SCHULEMANN, 1912: Beiträge zur Vitalfärbung. Archiv für mikrosk. Anatomie, Bd. 79.

STOLČ, A., 1902: Über das Verhalten des Neutralrots im lebenden Protoplasma. Zeitschrift f. allg. Physiologie, Bd. 1.

THUNBERG, T., 1918: Zur Kenntnis der Einwirkung tierischen Gewebes auf Methylenblau. Archiv f. Physiologie, Bd. 35.

TRAUBE, S. u. KÖHLER, F., 1915: Über Farbstoffe. Internat. Zeitschrift f. physikalisch-chemische Biologie, Bd. 2.

WALLENGREN, H., 1902: Inanitionserscheinungen der Zelle. Zeitschrift für allgem. Physiologie, Bd. 1.

Eingegangen 23. Nov. 1920.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg im Breisgau](#)

Jahr/Year: 1921

Band/Volume: [23](#)

Autor(en)/Author(s): Wankell Fritz

Artikel/Article: [Über Reduktion basischer Farbstoffe im lebenden Protoplasma. 118-144](#)