

# Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung.

Von

C. van Wisselingh, Groningen.

Mit Tafel IV und V.

## Einleitung.

Mehrere Forscher, unter anderen Czapek<sup>1)</sup> in seiner Biochemie der Pflanzen, Dekker<sup>2)</sup> in seiner Botanisch-chemischen Monographie der Tanniden, Noll<sup>3)</sup> in Strasburgers Lehrbuch der Botanik, haben behauptet, daß die vielen Untersuchungen über die Physiologie der Gerbstoffe bis jetzt nur wenige Resultate von Bedeutung geliefert haben und daß es noch gar nicht feststeht, welche Funktion sie in der Pflanze erfüllen.

Zu dem Studium der physiologischen Bedeutung der Gerbstoffe haben die Botaniker bis jetzt nur höhere Pflanzen gewählt. Da die Untersuchung bei diesen Pflanzen so wenig befriedigende Resultate geliefert hat, habe ich erwogen, ob vielleicht bei niederen Pflanzen positivere Angaben für die Lösung des Problems erzielt werden könnten.

Für das Studium der komplizierten Lebensprozesse und der physiologischen Bedeutung der chemischen Bestandteile haben meiner Meinung nach einige niedere Pflanzen gewisse Vorteile vor höheren mit so viel komplizierterer Struktur voraus. Besonders geeignet zu einem derartigen Studium sind die dickeren Arten der Gattung *Spirogyra*, z. B. *Spirogyra maxima* (Hass.) Wittr. (Fig. 1), welche ich für meine Untersuchung benutzt habe.

<sup>1)</sup> Czapek, F., Biochemie der Pflanzen. Bd. II. p. 576.

<sup>2)</sup> Dekker, J., De looistoffen. Bot.-chem. monographie der tanniden. 1908. D. I. p. 197 u. 210.

<sup>3)</sup> Strasburger, Lehrbuch der Botanik. 8. Aufl. 1906. p. 190.

Die Vorteile, welche genannte Alge vor höheren Pflanzen voraus hat, sind folgende: Stückchen der Fäden kann man mikroskopisch untersuchen, ohne sie zu töten oder ihnen zu schaden, und die Veränderungen in den Zellen kann man an der lebenden Pflanze studieren. Sie eignen sich sehr zu allerlei Versuchen. Man kann mit ihnen, weil sie nicht zu klein sind, leicht hantieren, und zu mikroskopischen Untersuchungen sind sie nicht zu dick. Die verschiedenen Bestandteile des Protoplasten lassen sich unter dem Mikroskop leicht beobachten. Wie bei einzelligen Algen ist sehr wahrscheinlich auch bei *Spirogyra* eine Wanderung von Nahrungsstoffen von der einen Zelle in die andere ausgeschlossen. Diesen wichtigen Faktor, den man bei höheren Pflanzen berücksichtigen muß, kann man bei *Spirogyra* meistens außer Betracht lassen.

Durch Zentrifugieren<sup>1)</sup> kann man allerlei Abweichungen erhalten, wie mehrkernige Zellen, kernlose Zellen, Zellen mit viel und wenig Chromatophorenmasse und sogar chromatophorenfreie Zellen. Dadurch ist man unter anderem im Stande, die Assimilation, die Aufnahme von Kohlenstoff mittels der Chromatophoren aus dem Kohlensäureanhydrid der Atmosphäre unter dem Einfluß des Lichts, aus dem Lebensprozeß zu eliminieren. Bei *Spirogyra* hat man Gelegenheit, eine Anzahl vergleichender Versuche anzustellen, die man bei höheren Pflanzen nicht anstellen kann, und da man bei diesen Versuchen bestimmte Faktoren ausschließen oder eliminieren kann, können andere mit besserem Erfolg studiert werden.

Bei der Wahl von *Spirogyra* als Objekt für die Untersuchung über die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes erhob sich die Frage, ob diese Alge in der Tat Gerbstoff enthält. Auf Grund verschiedener mikrochemischer Gerbstoffreaktionen nimmt man das an. Den Stoff, welcher gerbstoffähnlich ist, hat man bei *Spirogyra* jedoch noch nicht aus der Pflanze abgeschieden und deshalb noch nicht makrochemisch untersucht.

Auch muß man berücksichtigen, daß die Ansichten über das, was man unter Gerbstoff verstehen muß, nicht immer miteinander übereinstimmen. Früher wurde alles, was in den Zellen durch Ferrisalze blau oder grün gefärbt wurde, von den Botanikern Gerbstoff genannt.<sup>2)</sup> Dieses hat Veranlassung gegeben zu Verwechslungen mit anderen Stoffen und zu der Ansicht, daß der Gerbstoff ein allgemein verbreiteter Pflanzenbestandteil sei. Im Pflanzenreiche kommen aber Stoffe vor, die verschiedene chemische Reaktionen mit Gerbstoffen gemein haben aber nicht zu der Gruppe der Gerbstoffe gerechnet werden können. Oft sind Stoffe als Gerbstoffe beschrieben worden, während es sich später zeigte, daß keine Gerbstoffe vorlagen, was unter anderen der Fall war mit der von

<sup>1)</sup> van Wisselingh, C., Zur Physiologie der Spirogyrazelle. (Beih. z. Bot. Centralbl. Abt. I. Bd. XXIV. 1908. p. 143 ff.)

<sup>2)</sup> Dekker, J., l. c. D. I. p. 197 u. 210.

Gorter<sup>1)</sup> untersuchten Chlorogensäure, dem sogenannten Kaffeegerbstoff. Dieses mahnt selbstverständlich zur Vorsicht.

Reinitzer<sup>2)</sup> ist auf Grund seiner Untersuchungen zu der Ansicht gekommen, daß der Gerbstoffbegriff ein Unding sei, das aus der Gerberei in die Wissenschaft gekommen ist. Der Name Gerbstoff muß nach ihm aus der Wissenschaft verschwinden. Dieser Vorschlag hat aber keinen Eingang gefunden. Besonders ist Waage<sup>3)</sup> demselben entgegengetreten. Im Zusammenhang mit dieser Frage bemerkt Dekker<sup>4)</sup> mit Recht in seiner botanisch-chemischen Monographie der Tanniden, daß es ganz gewiß Pflanzenstoffe gibt, die durch gemeinschaftliche charakteristische Eigenschaften sich scharf von anderen Kohlenstoffverbindungen unterscheiden, unter anderem durch die Eigenschaft, mit Eiweiß in Wasser unlösliche Verbindungen zu bilden, und dadurch tierische Haut in Leder zu verwandeln, weiterhin durch den herben, zusammenziehenden Geschmack, durch das Vorkommen vieler Phenolhydroxylgruppen im Molekül und durch die Fähigkeit, Alkaloide in wässerigen Lösungen zu präzipitieren. Diese Körper müssen in eine besondere Gruppe vereinigt werden, und so lange ihre chemische Struktur nicht erschöpfend erklärt ist, darf man die Gruppe nicht zerbröckeln.

Einige Forscher, unter anderen Reinitzer<sup>5)</sup> und Braemer<sup>6)</sup>, behaupten, daß man eine Gruppe von Pflanzenstoffen physiologisch nicht studieren kann, so lange die chemische Kenntnis noch unvollständig ist. Waage<sup>7)</sup> ist, nach meiner Meinung mit Recht, damit nicht einverstanden. Es versteht sich, daß man, wenn man Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der Gerbstoffe anstellt, jedenfalls mit allen zu Diensten stehenden Hilfsmitteln feststellen muß, ob die benutzten Pflanzen in der Tat Körper enthalten, die zur Gruppe der Gerbstoffe gehören, und daß eine Verwechslung mit anderen Stoffen ausgeschlossen ist. Darum habe ich bei *Spirogyra* der mikrochemischen Untersuchung eine große Ausdehnung gegeben. Über 60 Stoffe habe ich bei dieser Untersuchung als Gerbstoffreagenzien benutzt, und durch vorläufige makrochemische Versuche mit verschiedenen Gerbstoffen habe ich ohne Ausnahme zuvor ihren Wert als Gerbstoffreagenzien festgestellt.

Nach der mikrochemischen Untersuchung gelang es mir, gesundes und reines *Spirogyra*-Material in ziemlich großer Quantität

<sup>1)</sup> Gorter, K., Beiträge zur Kenntnis des Kaffees. (Bull. du départem. de l'agricult. aux Indes Néerl. No. XIV. 1907 u. No. XXXIII. 1910; Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 372. 1910. p. 237 u. Bd. 379. 1910. p. 110; Arch. d. Pharm. Bd. 247. H. 3. 1909. p. 184.)

<sup>2)</sup> Reinitzer, F., Bemerkungen zur Physiologie des Gerbstoffes. (Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. VII. 1889. p. 187.)

<sup>3)</sup> Waage, Th., Die Beziehungen des Gerbstoffes zur Pflanzenchemie. (Pharm. Zentralbl. f. Deutschl. N. F. Jahrg. XII. 1891. No. 18. p. 247.)

<sup>4)</sup> l. c. 1908. D. I. p. V; D. II. p. 66; D. I. p. 211 u. 212.

<sup>5)</sup> l. c.

<sup>6)</sup> Braemer, L., Les tannoïdes. 1890–91. (Ref. Bot. Centralbl. Jahrg. XII. Bd. 47. 1891. p. 275.)

<sup>7)</sup> l. c.

zu finden, was eine willkommene Gelegenheit bot zu der Bereitung einer geringen Quantität von Spirogyragerbstoff, so daß ich mit diesem auch makrochemische Versuche anstellen und die Resultate der mikrochemischen Untersuchung einer schärferen Kontrolle unterziehen konnte. Ohne Ausnahme waren die Resultate der mikrochemischen und makrochemischen Untersuchung positiv, so daß ich mich der allgemeinen Meinung anschließe, daß *Spirogyra* eine gerbstoffhaltige Pflanze ist.

Die Untersuchung mit Gerbstoffreagenzien hatte doppelten Zweck. Ich wünschte nicht nur nachzuweisen, daß *Spirogyra* in der Tat Gerbstoff enthält, sondern beabsichtigte auch, die Einwirkung der Reagenzien in ihren Einzelheiten kennen zu lernen, um eine Methode zu finden, die für das Studium der physiologischen Bedeutung des Gerbstoffes geeignet sein würde.

## Über den Nachweis des Gerbstoffes bei *Spirogyra*.

Ältere Methoden. Bei den höheren Pflanzen haben die Forscher, die das physiologische Gerbstoffproblem studiert haben, verschiedene Methoden angewendet. Von den vielen Stoffen, die mit Gerbstoffen Färbungen oder Präzipitate geben, waren es besonders Ferrisalze und Kaliumbichromat, denen die Forscher den Vorzug gaben. Besonders ist Kaliumbichromat, das mit Gerbstoffen ein rotbraunes oder gelbrotes Präzipitat bildet, sehr oft benutzt worden, unter anderen von Schroeder<sup>1)</sup>, Schell<sup>2)</sup>, Kutscher<sup>3)</sup>, Rulf<sup>4)</sup>, Schulz<sup>5)</sup>, Moeller<sup>6)</sup> und Büsgen<sup>7)</sup>. Kutscher entwarf eine kolorimetrische Tabelle mit 8 verschiedenen Farbenabstufungen. Diese Tabelle diente zur Bestimmung der Stärke der Niederschläge. Kraus<sup>8)</sup> bestimmte die Quantität des Gerbstoffes durch Titrieren mit Kaliumpermanganat, oder er präzipitierte den Gerbstoff mit Kupferazetatlösung und wog das gefällte Kupfer als Kupferoxyde. Die titrimetrische Bestimmung mit Kaliumpermanganat wendete auch Rulf<sup>9)</sup> an.

<sup>1)</sup> Schroeder, J., Die Frühjahrperiode der Birke (*Betula alba* L.) und der Ahorn (*Acer platanoides* L.). (Die landwirtsch. Versuchs-Staß. Bd. XIV. 1871. p. 140.)

<sup>2)</sup> Schell, J., Physiologische Rolle der Gerbsäure. Kasan 1874. [Russisch.] (Bot. Jahresber. Jahrg. III. 1875. p. 873.)

<sup>3)</sup> Kutscher, Emil, Über die Verwendung der Gerbsäure im Stoffwechsel der Pflanze. (Flora. Jahrg. 66. 1883. p. 38 u. 39.)

<sup>4)</sup> Rulf, P., Über das Verhalten der Gerbsäure bei der Keimung der Pflanzen. (Zeitschr. f. Naturw. Halle. Bd. CLVII. 4. Folge. Bd. III. 1884. p. 42.)

<sup>5)</sup> Schulz, E., Über Reservestoffe in immergrünen Blättern unter besonderer Berücksichtigung des Gerbstoffes. (Flora. 1888. p. 227.)

<sup>6)</sup> Moeller, Hermann, Anatomische Untersuchungen über das Vorkommen der Gerbsäure. (Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. VI. 1888. p. LXVI.)

<sup>7)</sup> Büsgen, M., Beobachtungen über das Verhalten des Gerbstoffes in den Pflanzen. (Jenaische Zeitschr. f. Naturw. Bd. 24. N. F. Bd. 17. 1890. p. 13.)

<sup>8)</sup> Kraus, G., Grundlinien einer Physiologie des Gerbstoffes. 1889. p. 61.

<sup>9)</sup> l. c. p. 42.

Über den mikrochemischen Nachweis überhaupt. Bei dem Nachweis von Gerbstoff in der Pflanze muß man mehrere Faktoren berücksichtigen, die man beim Reagieren in vitro außer Betracht lassen kann. Man beabsichtigt natürlich die Nachweisung des Gerbstoffes an der Stelle, wo er sich in der lebenden Pflanze befindet. Nicht alle Reagenzien entsprechen aber dieser Forderung. Es kommt oftmals vor, auch bei *Spirogyra*, daß nicht der Zellsaft, der Sitz des Gerbstoffes, die Reaktion zeigt, sondern der Kern, die Chromatophoren- und die Zellwand, bei *Spirogyra* z. B. die Scheidewände. Diese Resultate haben die Forscher auf Irrwege geführt. Hugo de Vries<sup>1)</sup> hat besonders darauf hingewiesen und dadurch, daß er bei *Spirogyra* vor der Einwirkung der Gerbstoffreagenzien abnormale Plasmolyse hervorrief, gezeigt, daß der Gerbstoff sich im Zellsaft findet.

Bei der abnormalen Plasmolyse zieht die große Vakuole sich zusammen; der Zellsaft, der von einer Plasmaschicht umgeben ist, bildet mitten in der Zelle eine Kugel; die Chromatophoren befinden sich an der Zellwand und auch der Kern geht dahin. Die Vakuole mit umgebender Plasmaschicht bleibt gewöhnlich länger am Leben als der übrige Zellinhalt. Wenn man Gerbstoffreagenzien hinzufügt, so passieren dieselben erst die Zellwand, darauf das an der Wand liegende Plasma, in dem die Chromatophoren und der Kern sich befinden, und zuletzt dringen sie durch die Plasmaschicht, die den Zellsaft umgibt, der mit den obengenannten Reagenzien dann sehr hübsch die Gerbstoffreaktionen zeigt. Die Plasmaschicht und der Zellsaft werden von den eindringenden Reagenzien getötet.

Besonders merkwürdig bei der Einwirkung der Gerbstoffreagenzien nach der Methode von de Vries ist, daß der Zellsaft, welcher den Gerbstoff enthält, von einer lebenden Plasmaschicht umgeben ist. So lange das Plasma lebendig ist, läßt es keinen Gerbstoff passieren. Tötet man aber einen Spirogyrafaden durch schwache Erwärmung, so geht der Gerbstoff bald durch die Plasmaschicht und die Zellwand und verbreitet sich im umgebenden Wasser. Im Zellsaft kann man dann keinen Gerbstoff mehr nachweisen, während der Protoplast, der Gerbstoff absorbieren kann, bisweilen eine schwache Reaktion zeigt. So lange die Plasmaschicht, die nach abnormaler Plasmolyse den Zellsaft umgibt, am Leben bleibt, können der Kern, die Chromatophoren und die Zellwand keinen Gerbstoff absorbieren. Die eindringenden Gerbstoffreagenzien töten die Plasmaschicht, aber kommen dann sofort in Kontakt mit dem Zellsaft, in dem sie die Gerbstoffreaktionen hervorrufen.

Daß die Methode von de Vries so ausgezeichnete Resultate erzielt, muß besonders der Isolierung der lebendig bleibenden Vakuole zugeschrieben werden. Findet diese Isolierung nicht statt, wirken nämlich die Gerbstoffreagenzien ohne vorhergehende abnormale Plasmolyse unmittelbar auf die lebenden Spirogyren ein,

<sup>1)</sup> de Vries, Hugo, Over looistofreactiën van *Spirogyra nitida*. (Maandbl. voor Natuurwetensch. 1885. No. 7 u. 8.)

so werden bei Anwendung giftiger Reagenzien die Protoplasten getötet. Das Absterben der Protoplasten findet dann auf ganz andere Weise statt als bei abnormaler Plasmolyse. Die Protoplasten werden nämlich im ganzen getötet. Wenn die dem Leben schädliche Wirkung zuerst sich geltend macht und danach die Gerbstoffreaktion eintritt, so wird nach geringem Eindringen des Reagens in die Zelle der Protoplast getötet, und bevor es in genügender Quantität vorhanden ist, um den Gerbstoff zu fällen, ist dieser aus der Vakuole heraus. Ein Austritt aus der Zelle wird meist von dem eindringenden Reagens verhindert, und der Gerbstoff wird dann besonders von dem Protoplasten absorbiert. Wenn danach die Gerbstoffreaktion erscheint, zeigt nicht der Zellsaft die Reaktion, sondern der Protoplast, besonders der Kern und die Chromatophoren. Auch die Zellwand, besonders die Scheidewand, zeigt bisweilen Gerbstoffreaktion.

Wenn ein Reagens obschon dem Leben schädlich, die Gerbstoffreaktion bald hervorruft, d. h. nicht einige Momente nach dem Absterben des Protoplasten, sondern gleichzeitig hiermit oder eher, so können mit demselben befriedigende Resultate erzielt werden. Die Reaktion erscheint dann an der Stelle, wo der Gerbstoff sich in dem lebendigen Objekt befindet. Im letzteren Falle können die Reaktionen mit abnormaler Plasmolyse nach der Methode von de Vries kombiniert werden, wodurch die Lokalisation des Gerbstoffes noch deutlicher demonstriert wird, aber ein Erfordernis zur Vorbeugung falscher Resultate ist es nicht. Aus obigem geht hervor, daß man bei der Bestimmung der Lokalisation des Gerbstoffes in der Pflanze besonders die Giftigkeit der Reagenzien berücksichtigen muß.

Ein anderer Faktor, auf den man acht geben muß, ist die Fähigkeit der Reagenzien, in die Zellwand und das Plasma einzudringen. Einige Stoffe dringen selbst nicht bis in die Zellen, und es sind besondere Kunstgriffe erforderlich, um sie als Gerbstoffreagenzien benutzen zu können. Andere Stoffe greifen die Zellwand an und dringen demzufolge sehr langsam ein. Wieder andere passieren sehr leicht die Zellwand und das Plasma. Je nachdem bleibt das Protoplasma dabei lange lebendig oder stirbt nach kurzer Zeit oder wird sehr bald getötet.

Es versteht sich, daß Stoffe, welche dem Leben unschädlich oder nur in geringem Maße schädlich sind und leicht die Zellwand und die Plasmaschicht passieren, besonders als Gerbstoffreagenzien in Betracht kommen müssen. Unter den gut 60 Stoffen, mit welchen ich den Gerbstoff bei *Spirogyra* nachgewiesen habe, habe ich in der Tat einige gefunden, die obengenannten Forderungen entsprechen.

Die Stoffe, welche zum Nachweis des Gerbstoffes bei *Spirogyra* in Betracht kommen, wurden einer vorläufigen Untersuchung unterzogen. Mit verschiedenen Gerbstofflösungen wurde versucht, ob sie als mikrochemische Gerbstoffreagenzien genügende Empfindlichkeit besaßen. In einigen Fällen wurde das Verhältnis zu Gallusgerbstoff, Eichenrindengerbstoff, Myrobalanengerbstoff, Eucalyptus-

gerbstoff, Katechugerbstoff und Kinogerbstoff studiert. Bald beschränkte ich mich auf Tannin oder Gallusgerbstoff, da es sich immer mehr zeigte, daß der Spirogyragerbstoff mit letzterem am meisten übereinstimmte. Als ich später eine genügende Quantität Gerbstoff aus *Spirogyra maxima* zur Verfügung hatte, wurden die Versuche mit Spirogyragerbstoff wiederholt.

Die Resultate, die ich bei *Spirogyra maxima* mit den verschiedenen Reagenzien erzielte, habe ich auf den folgenden Seiten angeführt:

Ferrisalze<sup>1)</sup>. Wie in einer Lösung von Tannin rufen Lösungen von Ferrisalzen im Zellsaft von *Spirogyra* ein dunkelblaues oder schwarzes Präzipitat oder blaue Färbung hervor, wenn nämlich die Reaktionen unter gewissen Bedingungen stattfinden. Oft verursachen Lösungen von Ferrisalzen in Tanninlösungen nur dunkelblaue oder blauviolette Färbungen, ohne daß Niederschläge entstehen. Dies ist der Fall, wenn Lösungen von Ferrichlorid, Ferrisulfat, Ferriammoniumsulfat und Ferrizitrat mit Tanninlösungen gemischt werden. Bei diesen Versuchen wurden 1- und 10-proz. Tanninlösungen und meist 1- und 10-proz. Ferrisalzlösungen benutzt. Auch wenn 10-proz. Lösungen zusammengefügt werden, entstehen keine Niederschläge.

Ferriazetat verhält sich anders als die schon genannten Eisenverbindungen. Wenn die Lösungen nicht zu sehr verdünnt sind und Ferriazetat im Überschuß anwesend ist, wird das Tannin vollständig gefällt. Wenn man die Mischung stehen läßt oder zentrifugiert, bildet sich ein Bodensatz; die obenstehende Flüssigkeit ist farblos und mit Ferrisalz kann darin kein Gerbstoff mehr nachgewiesen werden. Das Präzipitat besteht aus häutigen Gebilden. Wenn Tannin im Überschuß anwesend ist, entsteht mit Ferriazetat eine blauviolette Lösung.

Die Resultate, die ich bei *Spirogyra* bei der mikrochemischen Untersuchung erhielt, entsprechen im allgemeinen den oben-erwähnten. Um gute Resultate zu erreichen, ist es meistens nötig, daß man abnormale Plasmolyse hervorruft, was mit 10-proz. Kaliumnitratlösung geschehen kann.

Durch Ferriazetatlösung wird ein schwarzes Präzipitat in der kontrahierten Vakuole hervorgerufen. Das Präzipitat entsteht zuerst an verschiedenen Stellen an der Peripherie, wo das Reagens am ersten eindringt. Mit 10-proz. Ferrichloridlösung erhält man bisweilen ein ähnliches Resultat; gewöhnlich wird aber der Zellsaft blau gefärbt. Die blaue Farbe verbreitet sich allmählich in der umgebenden Flüssigkeit. Bei direkter Einwirkung der Lösungen von Ferrisalzen auf die Spirogyren bekommt man meistens unbefriedigende Resultate, nämlich Schwarzfärbung der Protoplasten, besonders der Kerne, und der Zellwand. Besonders mit verdünnten,

<sup>1)</sup> Dekker, J., l. c. D. I. p. 197; D. II. p. 35. — Sanio, C., Einige Bemerkungen über den Gerbstoff und seine Verbreitung bei den Holzpflanzen. (Bot. Zeitg. 1863. p. 17.) — de Vries, Hugo, l. c.

z. B. 1-proz., Lösungen sind die Resultate schlecht; mit 10-proz. Lösungen, z. B. mit 10-proz. Ferrichloridlösung, bekommt man bisweilen ein besseres Resultat, nämlich Blaufärbung oder ein schwarzes Präzipitat im Zellsaft.

Die Ferrisalze dringen im allgemeinen langsam durch die Zellwand, die während der Einwirkung oft eigentümliche Modifikationen zeigt (Fig. 7). In 1-proz. Lösungen schwillt der äußere, zellulosefreie Teil der Zellwand auf; Blasen entstehen in der Zellwand, und zuletzt wird der äußere Teil oft ganz emporgehoben. Der Protoplast stirbt bald, wenn das Reagens in denselben eindringt. Dies gilt auch für die Vakuole, wenn man die Reagenzien nach abnormaler Plasmolyse einwirken läßt.

Durch Zerquetschen der Spirogyren in Ferrisalzlösungen erreicht man oft bessere Resultate als durch langsame Einwirkung dieser Lösungen. Der Zellinhalt wird durch Risse nach außen gepreßt. Bei den Rissen entstehen in Ferriazetatlösung schwarze Präzipitate und bei Benutzung von Ferrichloridlösung und anderen Ferrisalzlösungen tritt daselbst Blaufärbung auf, während die Protoplasten mit Inbegriff der Kerne und Chromatophoren keine schwarze oder blaue Farbe annehmen.

Kaliumbichromat<sup>1)</sup>. Eine Kaliumbichromatlösung gibt mit einer Tanninlösung ein braunes, körniges Präzipitat. Eine gesättigte Lösung wird als mikrochemisches Gerbstoffreagens angewendet und ruft bei *Spirogyra* im Zellsaft ein Präzipitat hervor, das aus großen, durchscheinenden, braunen Körnern besteht. Die Protoplasten werden auch ein wenig braun gefärbt. Diese scheinen deshalb etwas Gerbstoff zu absorbieren. Nach vorhergehender abnormaler Plasmolyse mit 10-proz. Kaliumnitratlösung entsteht im Zellsaft ein ähnliches Präzipitat. Die Vakuolenwand wird auch braun gefärbt, aber im übrigen keine anderen Teile des Zellinhalts.

Osmiumsäure<sup>2)</sup>. Osmiumsäurelösung gibt mit Tanninlösung ein schwarzes, körniges Präzipitat. Eine 1-proz. Lösung ruft bei *Spirogyra* im Zellsaft auch ein schwarzes, körniges Präzipitat hervor (Fig. 2). Nach vorhergehender abnormaler Plasmolyse zeigen die Vakuolen einen schwarzen, körnigen Inhalt.

Natriumvanadat<sup>3)</sup>. Natriumvanadatlösung gibt mit Tanninlösung einen schwärzlichen Niederschlag. Ein ähnlicher Niederschlag entsteht auch bei *Spirogyra* im Zellsaft. Man kann das Reagens auf verschiedene Weise anwenden, z. B. zuerst mit 10-proz. Kaliumnitratlösung abnormale Plasmolyse hervorrufen und dann eine 10-proz. Kaliumnitratlösung zufügen, die etwas Natriumvanadat enthält. Auch kann man allein letztere Lösung oder eine 10-proz. Natriumvanadatlösung ohne Kaliumnitrat benutzen. In allen Fällen entsteht ein Niederschlag in der zusammengezogenen Vakuole.

<sup>1)</sup> Sanio, C., l. c. p. 17. — Dekker, J., l. c. D. I. p. 199. — de Vries, Hugo, l. c. — Büsgen, M., l. c. p. 89.

<sup>2)</sup> de Vries, Hugo, l. c.

<sup>3)</sup> van Wisselingh, C., l. c. p. 181.

Uranylazetat und Uranylnitrat<sup>1)</sup>. Uranylazetat und Uranylnitrat verhalten sich zu Tannin verschieden. Eine 10-proz. Uranylazetatlösung gibt mit einer 1-proz. Tanninlösung ein braunes, häutiges Präzipitat, das in Essigsäure löslich ist. Eine 10-proz. Lösung von Uranylnitrat gibt mit einer 1- oder 10-proz. Tanninlösung nur eine braune Färbung und kein Präzipitat. Wird im letzteren Falle Natriumbikarbonat zugefügt, so erscheint auch ein braunes Präzipitat. Im Zusammenhang hiermit bemerke ich, daß die Uranylazetatlösung schwach alkalisch und die Uranylnitratlösung schwach sauer gegen Lackmus reagiert.

Obschon die Uranylsalze sehr langsam durch die Zellwand dringen, werden die Protoplasten bald getötet. Sie greifen die Zellwand an, insbesondere den äußeren Teil. Ähnliche Erscheinungen zeigen sich wie bei Anwendung von Ferrisalzen (Fig. 7). In 10-proz. Uranylnitrat- oder Uranylazetatlösung schwillt der äußere Teil der Zellwand auf, bildet Falten und wird bisweilen ganz aufgehoben. Nach einigen Stunden oder nach längerem Aufenthalt in 10-proz. Uranylazetatlösung sind die Protoplasten braun gefärbt, aber von einem Niederschlag in den Zellen ist meistens nichts zu entdecken. Nur in einzelnen Zellen konnte ich im Zellsaft eine Fällung beobachten.

Zerquetscht man die Spirogyren in Uranylazetatlösung, so wird der Zellinhalt nach außen gepreßt und durch Mischung des Zellsaftes mit dem Reagens entsteht sofort ein rotbraunes Präzipitat außerhalb der Zellen. 10-proz. Uranylnitratlösung, der etwas Natriumbikarbonat zugefügt ist, verhält sich in derselben Weise wie Uranylazetatlösung. Mit 10-proz. Uranylnitratlösung ohne Natriumbikarbonat wird nach einigen Stunden Braunfärbung der Protoplasten wahrgenommen. Wie man erwarten kann, entsteht beim Zerquetschen der Spirogyren in Uranylnitratlösung kein Präzipitat.

Ammoniummolybdat<sup>2)</sup>. Eine Lösung von Ammoniummolybdat in konzentrierter Ammoniumchloridlösung ist als mikrochemisches Reagens für Gerbstoffe empfohlen worden. Eine 5-proz. Ammoniummolybdatlösung gibt mit einer Tanninlösung eine rotbraune Färbung. Wenn nachher eine 25-proz. Ammoniumchloridlösung zugefügt wird, so entsteht ein rotbrauner Niederschlag. Bei *Spirogyra* ruft 5-proz. Ammoniummolybdatlösung, wenn die Einwirkung durch schwache Erwärmung befördert wird, eine orange-gelbe Färbung im Zellsaft hervor. Eine 25-proz. Ammoniumchloridlösung wirkt in hohem Maße wasserentziehend auf die Protoplasten ein und verursacht eine völlige Desorganisation der Vakuolen. Darum benutzte ich eine verdünntere Lösung. Mit einem Gemisch von gleichen Teilen 25-proz. Ammoniumchloridlösung, 5-proz. Ammoniummolybdatlösung und destilliertem Wasser erhielt ich gute

<sup>1)</sup> Choay, E., Recherches anatomiques et physiologiques sur les Dryadées. [Thèse.] 1888. p. 125.

<sup>2)</sup> Gardiner, W., The generative occurrence of tannin in vegetable cells. (Proceed. Cambr. Philos. Soc. Vol. IV. VI. 1883. p. 387; Pharm. Journ. 1883—84. p. 588.) — Dekker, J., l. c. D. I. p. 199.)

Resultate. In den kontrahierten Vakuolen entstehen mit diesem Gemisch bei der Peripherie an einer oder mehreren Stellen schwere, orangebraune Präzipitate. Wenn die Vakuolewand reißt, bildet sich das Präzipitat innerhalb und außerhalb des Risses. Durch schwache Erwärmung kann die Reaktion befördert werden. Anstatt der Ammoniumchloridlösung kann auch 10-proz. Kaliumnitratlösung benutzt werden. Nachdem ich hiermit normale und abnormale Plasmolyse hervorgerufen hatte, fügte ich Ammoniummolybdatlösung zu. An einer oder mehreren Stellen bei der Peripherie bildete sich in der Vakuole ein orangebraunes Präzipitat. Durch schwache Erwärmung kann die Reaktion befördert werden.

Kaliumkarbonat und Natriumkarbonat<sup>1)</sup>. Fügt man eine 1- oder 10-proz. Kaliumkarbonatlösung zu, so entsteht ein Präzipitat, das sowohl in einem Überschuß Kaliumkarbonatlösung als in einem Überschuß Tanninlösung löslich ist. Natriumkarbonat fällt Tannin nur, wenn konzentrierte Lösungen miteinander in Berührung kommen. Die Tanninlösungen werden durch Alkalikarbonate braun und nachher grün.

1- und 10-proz. Kaliumkarbonatlösung und 20-proz. Natriumkarbonatlösung rufen bei *Spirogyra* im Zellsaft Niederschläge hervor. Falls eine der zwei letzteren Lösungen benutzt wird, tritt gleichzeitig normale oder abnormale Plasmolyse ein.

Kalkwasser und Barietwasser. Kalkwasser und Barietwasser rufen in Tanninlösungen Fällungen hervor, die besonders im Kontakt mit der Luft eine grüne bis blaue Farbe annehmen. Bei *Spirogyra* entstehen damit im Zellsaft schmutziggelbe Fällungen.

Ammoniumkarbonat<sup>2)</sup>. Wenn man eine 10-proz. Ammoniumkarbonatlösung einer 1- oder 10-proz. Tanninlösung zufügt, entsteht ein Präzipitat, das sowohl in einem Überschuß der Tanninlösung, als in einem Überschuß der Ammoniumkarbonatlösung löslich ist. Bei Anwesenheit anderer Salze ruft schon eine verdünntere Ammoniumkarbonatlösung, z. B. eine 1-proz., in Tanninlösung ein Präzipitat hervor.

Mit einer 1-proz. und mit einer  $\frac{1}{10}$ -proz. Ammoniumkarbonatlösung entsteht bei *Spirogyra* im Zellsaft ein Niederschlag. Wenn man die Spirogyren bald darauf in Wasser bringt, so verschwindet

<sup>1)</sup> Dekker, J., l. c. D. I. p. 199.

<sup>2)</sup> Darwin, Charles, Insectivorous plants. 1875. Chapter III. p. 38 ff. — Darwin, Charles, The Action of Carbonate of Ammonia on the Roots of certain plants. (The Journ. of the Linn. Soc. Botany. Vol. XIX. 1882. p. 239.) — de Vries, Hugo, Über die Aggregation im Protoplasma von *Drosera rotundifolia*. (Bot. Zeitg. Jg. 44. 1886. Nr. 1. p. 42, 43, 57 ff.) — Pfeffer, W., Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. (Unters. a. d. botan. Inst. Tübingen. Bd. 2. 1886—88. p. 239 ff.) — af Klercker, J. E. F., Studien über die Gerbstoffvakuolen. [Inaug.-Diss.] Tübingen 1888. p. 32, 36 ff. (Bihang till Svenska Vit.-Akad. Handlingar. Bd. 13. Afd. III. Nr. 8. 1888; Ref. Bot. Zeitg. Jg. 47. 1889. p. 210.) — Klemm, P., Über die Aggregationsvorgänge in Crassulaceenzellen. (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. X. 1892. p. 239.) — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen und einige Anwendungen derselben. (Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. XXVIII. 1910. H. 5. p. 147 ff.)

dieser Niederschlag. Ammoniumkarbonat ist der *Spirogyra* sehr schädlich. In einer 1-proz. Lösung sterben die Zellen sehr bald und in einer  $\frac{1}{10}$ -proz. Lösung in einigen Stunden.

Ammoniak<sup>1)</sup>. Wenn man 10-proz., wässrige Ammoniaklösung sehr vorsichtig einer konzentrierten, z. B. 20-proz., Tanninlösung zufügt, so erscheint ein Präzipitat, das sich sehr leicht in einem Überschuß der Ammoniaklösung löst. Auch gasförmiges Ammoniak ruft in einer 10- oder 20-proz. Tanninlösung ein Präzipitat hervor. Die Präzipitate scheinen dickflüssig; erst beobachtet man kleine Körner und dann Kugeln, die sich miteinander vereinigen.

1- und 10-proz., wässrige Ammoniaklösung verursachen bei *Spirogyra* im Zellsaft sofort eine Fällung. Wenn man einen Glasstab mit 10-proz. Ammoniaklösung über Spirogyren hält, die sich in Wasser auf einem Objektträger befinden, erscheint bald im Zellsaft eine starke, bräunliche, körnige Fällung. Bei gerbstoffreichen Spirogyren kann man demzufolge die Kerne nicht mehr beobachten. Durch Ammoniak werden die Spirogyren bald getötet.

Natriumarsenat ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>2)</sup> Wenn man eine 10-proz. Natriumarsenatlösung einer konzentrierten Tanninlösung zufügt, entsteht ein Präzipitat, das anfangs beim Schütteln sich löst. Nach Zufügung von mehr Natriumarsenat bildet sich ein bleibendes Präzipitat, das bei Verdünnung mit Wasser verschwindet.

Eine 1- und 10-proz. Natriumarsenatlösung ruft bei *Spirogyra* im Zellsaft allmählich eine Fällung hervor. Durch schwache Erwärmung mit einer 1-proz. Lösung wird sofort ein Präzipitat gebildet. Eine 10-proz. Lösung ruft zu gleicher Zeit normale oder abnormale Plasmolyse hervor. Durch Natriumarsenat werden die Zellen bald getötet.

Zinkchlorid. Eine 10-proz. Zinkchloridlösung gibt mit einer 10-proz. Tanninlösung ein Präzipitat, das in einem Überschuß der Tanninlösung löslich ist. Mit einer 1-proz. Zinkchloridlösung entsteht kein Präzipitat.

Mit 10-proz. Lösung kann man bei *Spirogyra* im Zellsaft ein Präzipitat hervorrufen. Das Reagens dringt aber nur langsam durch die Zellwand. Die Einwirkung muß darum durch schwache Erwärmung befördert werden.

Kupferazetat<sup>3)</sup>. Eine gesättigte, ungefähr 7-proz. Kupferazetatlösung ist als mikrochemisches Reagens empfohlen worden.

<sup>1)</sup> Darwin, Charles, The Action of Carbonate of Ammonia usw. (l. c.) — af Klercker, l. c. p. 32. — Klemm, P., Über die Aggregationsvorgänge usw. (l. c. p. 239.) — Overton, E., Über die osmotischen Eigenschaften der Zelle in ihrer Bedeutung für die Toxikologie und Pharmakologie. (Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. XXII. 1897. p. 203.) — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. (l. c. p. 156.)

<sup>2)</sup> Procter, H. R., Reaktion auf Gerbsäure. (Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 7. p. 598; Zeitschr. f. analyt. Chem. Jg. 13. 1874. p. 326.)

<sup>3)</sup> Moll, J. W., Eene nieuwe microchemische looistofreactie. (Maandbl. v. Natuurw. Jaarg. 11. 1884. p. 97.) — de Vries, Hugo, Über die Aggregation usw. (l. c. p. 41.) — de Vries, Hugo, Over looistof-reactiën van *Spirogyra nitida*. (l. c. p. 4.) — af Klercker, J. E. F., l. c. — Dekker, J., l. c. D. I. p. 198.

7- und 1-proz. Lösungen geben mit 1- und 10-proz. Tanninlösungen rotbraune, häutige Niederschläge. In Überschuß von Tanninlösung sind diese löslich. Durch Ferriazetatlösung werden sie erst blau und danach schwarz gefärbt. Man hat vorgeschlagen, die frischen Pflanzen oder Pflanzenteile erst mit gesättigter Kupferazetatlösung zu mazerieren, dann von denselben Durchschnitte anzufertigen und zuletzt diese mit Ferriazetatlösung zu behandeln.

Zwar gelang es mir bisweilen, durch sukzessive Behandlung mit Kupferazetat- und Ferriazetatlösung bei *Spirogyra* in der Vakuole Gerbstoff nachzuweisen, im allgemeinen aber liefert die Methode sehr unbefriedigende Resultate. Bei der Untersuchung gerbstoffreicher Spirogyren beobachtete ich folgendes: Erst fand normale Plasmolyse statt; dann zeigten sich allerlei Abweichungen bei den Protoplasten; bald folgte der Tod und trat Verschrumpfung ein; zuletzt nahmen die Protoplasten allmählich eine bräunliche Farbe an. Durch Behandlung mit Ferriazetatlösung ging diese in schwarz über. Selten beobachtete ich in der Vakuole einen körnigen, rotbraunen Niederschlag, der durch Ferriazetatlösung schwarz gefärbt wurde.

Daß die Methode oft keine befriedigenden Resultate liefert, schreibe ich der großen Giftigkeit und der langsamen Eindringung des Kupferazetates zu. Das Reagens tötet erst den Protoplast und fällt dann den Gerbstoff. Wenn der Protoplast tot ist, kann der Gerbstoff aus der Vakuole treten und von dem Protoplast absorbiert werden. Demzufolge kommt es oft vor, daß in der Vakuole kein Niederschlag entsteht und der Protoplast Gerbstoffreaktion zeigt.

Mit einer gesättigten Lösung von Kupferazetat in absolutem Alkohol<sup>1)</sup>, die auch als mikrochemisches Gerbstoffreagens empfohlen worden ist, und mit einer 1-proz., wässerigen Lösung habe ich keine besseren Resultate erhalten als mit der obenerwähnten. Zerquetscht man die Spirogyren in gesättigter, wässriger Kupferazetatlösung, so entstehen bei den Rissen in der Zellwand außerhalb der Zellen sofort rotbraune, häutige Niederschläge, die durch Ferriazetatlösung erst blau und allmählich schwarz gefärbt werden. Zerquetscht man die Spirogyren in Ferriazetatlösung, so entstehen sofort schwarze Niederschläge außerhalb der Zellen.

Goldchlorid ( $\text{HAuCl}_4, 4\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>2)</sup> Eine 5-proz. Goldchloridlösung gibt mit einer 10-proz. Tanninlösung einen schwärzlichen Niederschlag. Auch bei *Spirogyra* entsteht im Zellsaft dadurch ein Niederschlag.

Hexamethylenetetramin (Urotropin,  $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ ).<sup>3)</sup> Versetzt man nach Hock eine wässrige Lösung von Hexamethylenetetramin mit einer wässerigen Tanninlösung, so erhält man eine weiße Fällung, die je nach den angewendeten Mengenverhältnissen auf

<sup>1)</sup> af Klercker, J. E. F., l. c. p. 8.

<sup>2)</sup> Seyda, A., Eine empfindliche Gerbsäurereaktion. (Chem. Ztg. 1898. p. 1085; Jahresber. d. Pharm. 1899. p. 355.)

<sup>3)</sup> Hock, K., Darstellung von Kondensationsprodukten aus Gerbsäuren und Urotropin. (D. R.-P. No. 95. p. 186; Chem. Ind. 1898. p. 58; Jahresber. d. Pharm. 1898. p. 379.)

1 Mol. Hexamethylentetramin 3—6 Mol. Tannin enthält. Wenn gleiche Quantitäten von 1-proz. Lösungen von Hexamethylentetramin und Tannin miteinander gemischt werden, tritt nur ein geringes Präzipitat oder eine weiße Trübung auf, welche bei Verdünnung mit Wasser verschwinden. Wenn 10-proz. Lösungen miteinander gemischt werden, so entsteht sofort ein überflüssiges Präzipitat, das weiß bis hellgelb und in einem Überschuß von Hexamethylentetramin- oder Tanninlösung löslich ist. In Übereinstimmung mit den Resultaten von Hock zeigen die Niederschläge Verschiedenheiten, die abhängig sind von dem Mengenverhältnis der miteinander gemischten Körper. Bei Vermischung von gleichen Quantitäten einer 1-proz. Hexamethylentetraminlösung und einer 10-proz. Tanninlösung erhält man ein Präzipitat, das bei schwacher Erwärmung schmilzt und sich löst. Bei Abkühlung scheidet es sich in Form sehr kleiner Kügelchen ab, die sich miteinander zu größeren vereinigen. Nach 1 Tage haben sich sehr große Massen gebildet, die an der Glaswand haften, so daß man die obenstehende, klare Flüssigkeit abgießen kann. Die Farbe des Präzipitates ist gelb, ungefähr wie Tannin. Bei Vermischung von gleichen Quantitäten 10-proz. Hexamethylentetraminlösung und 1-proz. Tanninlösung erhält man ein Präzipitat, das aus sehr kleinen Kügelchen besteht und sich bei schwacher Erwärmung löst. Bei Abkühlung scheidet es sich wieder in der Form kleiner Kügelchen ab. Nach 1 Tage hat sich nur ein geringer Bodensatz gebildet; das Gemisch ist noch einer milchartigen Flüssigkeit ähnlich; unter dem Mikroskop beobachtet man sehr kleine Kügelchen, die Brownsche Bewegung zeigen.

Die Resultate, die ich bei *Spirogyra* erhielt, waren, wie man es von einer Pflanze, die einen Stoff enthält, der mehr oder weniger tanninähnlich ist, erwarten konnte. Ich untersuchte gerbstoffreiche und gerbstoffarme Spirogyren. In einer 1-proz. Lösung zeigten beide nach ein paar Stunden noch kein Präzipitat im Zellsaft, und nach 1 Tage hatte sich nur bei den gerbstoffreichen ein Präzipitat darin gebildet. Eine 10-proz. Lösung von Hexamethylentetramin rief Plasmolyse hervor, und allmählich erschien im Zellsaft ein Präzipitat, das bei den gerbstoffreichen Spirogyren reichlich und bei den gerbstoffarmen gering war. Das Präzipitat bestand aus größeren und kleineren Körnern, die oft zusammenhingen. Wenn ich eine 25-proz. Rohrzuckerlösung an die Stelle der 10-proz. Hexamethylentetraminlösung treten ließ, so verschwand das Präzipitat, während die Protoplasten lebendig blieben.

Phenylhydrazin ( $C_6H_5NHNH_2$ ).<sup>1)</sup> Eine gesättigte Phenylhydrazinlösung ruft in einer 10-proz. Tanninlösung ein reichliches Präzipitat hervor, das aus Tropfen besteht. In einem Überschuß von Tanninlösung und in Wasser ist es löslich.

Verdünnte Lösungen verursachen bei *Spirogyra* im Zellsaft keine Fällung; eine gesättigte Lösung ruft ein reichliches Präzipi-

<sup>1)</sup> Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. (l. c. p. 154.)

tat hervor, das bei Übertragung der Objekte in Wasser bald verschwindet. Es besteht aus kleinen Tropfen, die zu größeren zusammenfließen können. Die Spirogyren sterben bald in Phenylhydrazinlösung.

Koffein ( $C_8H_{10}N_4O_2, H_2O$ ).<sup>1)</sup> Tannin wird in wässriger Lösung durch Koffein gefällt. Wenn man  $\frac{1}{10}$ -proz. Lösungen von Koffein und Tannin miteinander mischt, so bekommt man noch einen Niederschlag. Durch Verdünnung mit Wasser löst sich der Niederschlag. Er ist weiß und besteht aus kleinen Kügelchen, die Brownsche Bewegung zeigen und sich allmählich zu größeren Kugeln und Massen vereinigen, die auf eigentümliche Weise zusammenhängen. Hieraus geht hervor, daß der Niederschlag nicht dünnflüssig, sondern dickflüssig ist. Er bildet allmählich einen Bodensatz und ist deshalb schwerer als Wasser.

Mit einer 1- und  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeinlösung entsteht bei *Spirogyra* im Zellsaft sehr bald ein Niederschlag von kleinen Kügelchen, die Brownsche Bewegung zeigen (Fig. 3). Oft ist der Niederschlag so reichlich, daß man den Kern nicht mehr sehen kann und bisweilen ist er noch reichlicher. Bringt man die Spirogyrafäden wieder in Wasser, so verschwindet der Niederschlag in kurzer Zeit, z. B. in 10 Minuten, und die Fäden sehen dann wieder ganz normal aus. Bleiben die Fäden in der Koffeinlösung, so sinkt der Niederschlag und die kleinen Kügelchen vereinigen sich zu größeren, farblosen Kugeln, die oft sehr groß sind und mit Fetttropfen Ähnlichkeit haben (Fig. 4). Ein derartiges Aussehen hat der Niederschlag gewöhnlich nach einigen Tagen. Das Sinken und die Vereinigung der Kügelchen zu großen Kugeln beweist, daß der Niederschlag schwerer als Wasser und flüssig ist. Die Bildung der großen Kugeln geht langsam vor sich und kann durch Zentrifugierung während einiger Minuten nicht zustande kommen. Hieraus geht hervor, daß der Niederschlag dickflüssig und nicht dünnflüssig ist. Wenn die Spirogyren wieder in Wasser gebracht werden, so lösen sich auch die großen Kugeln, aber die Auflösung geht langsamer als die des gerade entstandenen, noch fein verteilten Niederschlages vor sich.

Die Kugeln zeigen die Farbereaktionen, welche dem Spirogyragerbstoff eigentümlich sind; durch Ferrisalze werden sie blau oder schwarz gefärbt, durch Kaliumbichromat braun, durch Osmiumsäure erst blau und später schwarz (Fig. 5).

Wenn die Spirogyren in der Koffeinlösung endlich sterben, so färben sich die Kugeln braun und ihre Löslichkeit wird geringer. Mit den obengenannten Reagenzien geben sie aber noch die erwähnten Farbereaktionen.

<sup>1)</sup> Klemm, P., Über die Aggregationsvorgänge usw. (l. c. p. 239.) — Overton, E., (l. c. p. 189, 201 u. 202.) — van Wisselingh, C., Over het aantoonen van looistof in de levende plant en over hare physiologische beteekenis. (Versl. d. Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. 1910. p. 692 ff.) — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. p. 147.) — van Wisselingh, C., Over intravitale neerslagen. (Versl. d. Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. 1913. p. 1239 ff.)

Antipyrin ( $C_{11}H_{12}N_2O$ )<sup>1)</sup>; Tussol ( $C_{11}H_{12}N_2O \cdot C_8H_8O_3$ ); Hypnal ( $C_{11}H_{12}N_2O \cdot CCl_3CO[OH]_2$ ); Pyramidon ( $C_{11}H_{11}N_2O \cdot N[CH_3]_2$ ); Tolypyrin ( $C_{12}H_{14}N_2O$ ); Ferropyrin ( $C_{11}H_{12}N_2O \cdot FeCl_3$ ). Eine 1-proz. Tanninlösung gibt mit einer gleichen Quantität einer 1-pröz. Antipyrinlösung ein weißes, milchartiges Präzipitat. Mischt man eine 10-proz. Tanninlösung mit einer gleichen Quantität einer 1-proz. Antipyrinlösung, so entsteht ein Präzipitat, das eine schwache, gelbe Farbe zeigt. In einem Überschuß von Tanninlösung und bei Verdünnung mit Wasser lösen sich die Präzipitate.

Die Präzipitate sind dem Präzipitate von Koffein mit Tannin sehr ähnlich. Sie bestehen auch aus einer dickflüssigen Substanz, die kleine Körperchen oder Kügelchen bildet, die sich zu größeren vereinigen und bisweilen ziemlich große, miteinander zusammenhängende Kugeln und Massen bilden. Das ist besonders der Fall, wenn man Tannin in Überschuß angewendet hat. Die Präzipitate, die bei Vermischung von Tannin- und Antipyrinlösungen entstehen, sind löslicher als das Präzipitat von Tannin mit Koffein. Daher erscheint bei Vermischung von  $\frac{1}{10}$ -proz. Lösungen durchaus kein Präzipitat.

Wenn man Spirogyren in eine 1-proz. Antipyrinlösung bringt, so entsteht bald im Zellsaft ein Präzipitat (Fig. 3), das dem Präzipitate, welches Koffein hervorruft, vollkommen ähnlich ist und sich bei längerem Aufenthalt der Spirogyren in Antipyrinlösung (Fig. 4) und bei ihrer Übertragung in Wasser völlig gleich verhält wie das Koffein-Präzipitat. Auch das Verhältnis beider Präzipitate zu Reagenzien ist dasselbe. Die Einzelheiten des Antipyrin-Präzipitates brauche ich deshalb hier nicht zu besprechen, und ich verweise auf das, was oben von dem Koffein-Präzipitat erwähnt worden ist.

1-proz. Lösungen von Tussol, Hypnal, Pyramidon und Tolypyrin verhalten sich zu 1- und 10-proz. Tanninlösungen wie eine 1-proz. Antipyrinlösung und verursachen bei *Spirogyra* im Zellsaft dieselben Erscheinungen wie letztgenannte Lösung. Kleine Verschiedenheiten lasse ich hierbei außer Betracht.

Ferropyrin verhält sich zu Tannin auf andere Weise als die anderen obengenannten Stoffe. Wenn man gleiche Quantitäten einer 1-proz. Ferropyrinlösung und einer 1-proz. Tanninlösung miteinander mischt, so entsteht ein schwärzliches Präzipitat. Dieses ist auch der Fall, wenn man einen Überschuß der Ferropyrinlösung nimmt. Wenn aber Tanninlösung in Überschuß angewendet wird, so entsteht eine dunkelblauviolette Färbung und kein Niederschlag.

Wenn man Spirogyren in 1-proz. Ferropyrinlösung bringt, so zeigt der äußere Teil der Zellwand ähnliche Erscheinungen wie die, welche von anderen Eisenverbindungen hervorgerufen werden (Fig. 7). Im Zellsaft entsteht allmählich ein Niederschlag von Kügelchen, die Brownsche Bewegung zeigen.

<sup>1)</sup> van Wisselingh, C., Over het aantoonen van looistof usw. (l. c. p. 692 ff.) — Over intravitale neerslagen. (l. c. p. 1239 ff.) — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. (l. c. p. 154.)

Chinolin ( $C_9H_7N$ )<sup>1)</sup>; Isochinolin ( $C_9H_7N$ ); Lepidin ( $C_{10}H_9N$ ); Akridin ( $C_{13}H_9N$ ); Toluidin ( $C_6H_4CH_3NH_2$ ); Xylidin ( $C_6H_3[CH_3]_2NH_2$ ). Die Löslichkeit in Wasser bei den genannten Stoffen ist mit Ausnahme von Lepidin geringer als 1:100. Von Lepidin wurde eine 1-proz. Lösung und von den übrigen Stoffen gesättigte Lösungen benutzt. Die Lösungen von Chinolin, Isochinolin, Lepidin und Xylidin geben mit 1-proz. Tanninlösung milchartige, weiße oder gelbliche Präzipitate. Toluidinlösung gibt mit 10-proz. Tanninlösung ein Präzipitat und Akridinlösung gibt damit nur eine geringe Trübung. Die Präzipitate lösen sich in einem Überschuß von Tanninlösung und in viel Wasser. Sie bestehen aus kleinen Tropfen, die sich zu größeren und bisweilen zu flüssigen Massen vereinigen. Im allgemeinen sind sie weniger dickflüssig oder dünnflüssiger als die Kondensationsprodukte von Koffein und Antipyrin mit Tannin.

Chinolin, Isochinolin und Lepidin rufen im Zellsaft von *Spirogyra* sofort Präzipitate hervor, die aus kleinen Kügelchen bestehen, die Brownsche Bewegung zeigen und zu großen Kugeln zusammenfließen. Bei gerbstoffreichen Spirogyren sind die Präzipitate so bedeutend, daß man den Zellinhalt nicht mehr beobachten kann. Nach Übertragung der Spirogyren in Wasser lösen die Präzipitate sich allmählich.

Akridin verursacht im Zellsaft von *Spirogyra* nicht so reichliche Fällung wie die 3 letztgenannten Stoffe. Das Präzipitat erscheint nicht sofort. Nach Übertragung der Spirogyren in Wasser verschwindet es.

Die 4 obengenannten Stoffe sind dem Leben schädlich. Nach 1 Tage waren alle Zellen oder ein Teil derselben tot. Xylidin und Toluidin sind sehr giftig und darum als Gerbstoffreagenzien nicht geeignet. Toluidin ist überdies als Gerbstoffreagens wenig empfindlich. In Xylidinlösung bilden sich allmählich noch kleine Tropfen, die am Plasma haften und in Wasser löslich sind. Bei Anwendung von Toluidin, das bald tötet und langsam präzipitiert, erscheint durchaus kein Präzipitat im Zellsaft und der Gerbstoff wird von dem Protoplast absorbiert, der demzufolge durch Ferriazetatlösung schwarz gefärbt wird.

Pyridin ( $C_5H_5N$ )<sup>2)</sup>; Pikolin ( $C_6H_7N$ ); Lutidin ( $C_7H_9N$ ); Collidin ( $C_8H_{11}N$ ). Wässrige Lösungen dieser 4 Körper geben mit Tanninlösungen Niederschläge. Pyridin und Pikolin wurden in 1-proz. Lösungen angewendet, Lutidin und Collidin, die in Wasser wenig löslich sind, in  $1/2$ -proz. Lösungen. Die Niederschläge sind flüssig; sie bestehen aus Tropfen, die sich zu großen Kugeln und Massen vereinigen. Die Mengenverhältnisse der miteinander in Kontakt kommenden Körper beeinflussen das Aussehen der Niederschläge. Wenn man gleiche Quantitäten von 1- resp.  $1/2$ -proz.

<sup>1)</sup> Overton, E., l. c. p. 205. — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. (l. c. p. 154.)

<sup>2)</sup> Overton, E., l. c. p. 205. — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. (l. c. p. 154.)

Lösungen der 4 obengenannten Körper mit 1-proz. Tanninlösungen mischt, so erhält man milchartige Flüssigkeiten, die langsam einen Bodensatz bilden. Wendet man anstatt einer 1-proz. Tanninlösung eine 10-proz. an, so bekommt man gelbliche Niederschläge, die bald zusammenlaufen und zähe, dickflüssige Massen bilden. Fügt man viel Tanninlösung oder Wasser zu, so lösen sich die Niederschläge. Anstatt der Lösungen von Pyridin und seinen Homologen kann man auch die Dämpfe dieser Körper anwenden. Kommen diese in Kontakt mit einer 10-proz. Tanninlösung, so entsteht in dieser bald ein Niederschlag, der aus Tropfen besteht, die sich zu größeren zusammenhängenden Tropfen vereinigen.

Pyridin und seine Homologe rufen auch im Zellsaft von *Spirogyra* Niederschläge hervor, die aus kleinen Tropfen bestehen, welche Brownsche Bewegung zeigen. Bei gerbstoffreichen Spirogyren können diese Niederschläge sehr bedeutend sein. Mit  $\frac{1}{10}$ -proz. Pyridinlösung erhielt ich bei *Spirogyra* keinen Niederschlag, wohl aber mit einer  $\frac{1}{2}$ -proz. Lösung. Die 3 Homologe des Pyridins gaben schon Niederschläge, wenn ich  $\frac{1}{10}$ -proz. Lösungen benutzte. Auch die Dämpfe der 4 obengenannten Körper rufen bei Spirogyren, die sich auf Objektträgern in Wasser befinden, bald im Zellsaft Niederschläge hervor. Nach Übertragung der Spirogyren in reines Wasser verschwinden alle Niederschläge. Pyridin und seine Homologe sind dem Leben schädlich. In den benutzten Lösungen waren nach 1 Tage fast alle Zellen gestorben.

Alkaloide<sup>1)</sup>. Von den Alkaloiden oder Pflanzenbasen, deren Lösungen mit Tanninlösung Niederschläge geben, habe ich die folgenden benutzt. Die Stärke der Lösungen habe ich in den meisten Fällen hinter ihren Namen angegeben. Coniin ( $C_8H_{17}N$ ); Nikotin ( $C_{10}H_{14}N_2$ ); Brucin ( $C_{23}H_{26}N_2O_4, 4H_2O$ ) minder als  $\frac{1}{10}$  0/0; Colchicine ( $C_{22}H_{25}NO_6$ )  $\frac{1}{10}$  0/0; Berberin ( $C_{20}H_{18}O_4N.OH$ ) minder als  $\frac{1}{10}$  0/0; Atropin ( $C_{17}H_{23}NO_3$ ) minder als  $\frac{1}{10}$  0/0; Tropin ( $C_8H_{15}NO$ , Zersetzungsprodukt des Atropins) 1 0/0 und 10 0/0; Cytisin ( $C_{11}H_{14}N_2O$ ) 1 0/0 und 10 0/0; Cocain ( $C_{17}H_{21}NO_4$ ) minder als  $\frac{1}{10}$  0/0; Piperidin ( $C_5H_{10}NH$ ) 1 0/0 und Dampf; Codein ( $C_{18}H_{21}NO_3, H_2O$ )  $\frac{1}{10}$  0/0; Chinin ( $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ) gesättigte Lösung; Chininhydrochlorat ( $C_{20}H_{24}N_2O_2.HCl, 2H_2O$ ) 1 0/0; Chininsulfat ( $[C_{20}H_{24}N_2O_2]_2H_2SO_4, 8H_2O$ ).

Alle obengenannten Basen rufen auch im Zellsaft von *Spirogyra* Niederschläge hervor. Wie in Tanninlösung verursachen einige Basen dickflüssige Niederschläge im Zellsaft. Man kann konstatieren, daß sie aus kleinen Tropfen bestehen, die sich zu größeren Kugeln vereinigen. In Überschuß von Tanninlösung und in Wasser sind die Niederschläge meist löslich. Einige sehen gelb aus, z. B. der des Berberins. In den meisten Lösungen von Alkaloiden sterben die Spirogyren bald ab. Zu den am wenigsten schädlichen gehören Colchicin und Berberin, in deren Lösungen nach 1 Tage viele oder alle Spirogyrenzellen noch lebendig waren.

<sup>1)</sup> Klemm, P., Über die Aggregationsvorgänge usw. (l. c. p. 239.) — Overton, E., l. c. p. 205 ff. — Dekker, J., l. c. D. I. p. 201. — Czapek, F., Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen usw. (l. c. p. 154.)

Para-Diazobenzolsulfosäureanhydrid ( $C_6H_4N_2SO_3$ ). Eine wässrige Lösung von Para-Diazobenzolsulfosäureanhydrid gibt mit Glucose bei Anwesenheit eines Ätzalkalis allmählich eine dunkelrote Färbung. Ohne Ätzkali tritt keine Färbung ein. Eine 1-proz. Lösung gibt mit einer gleichen Quantität einer 1-proz. Tanninlösung eine intensiv gelbe Färbung und mit einer gleichen Quantität einer 10-proz. Tanninlösung eine orangerote Färbung. Durch Ammoniak und Ätzkali werden die Mischungen tief dunkelrot. Nach diesen Beobachtungen erhob sich die Frage, ob Para-Diazobenzolsulfosäureanhydrid ein geeignetes mikrochemisches Gerbstoffreagens sei.

In einer 1-proz. Lösung wurde bei *Spirogyra* der Zellsaft gelb gefärbt. Je nachdem der Gerbstoffgehalt größer war, war die Gelbfärbung intensiver. Ein verschiedener Gerbstoffgehalt wird durch diese Farbereaktion jedoch nicht so deutlich angezeigt als z. B. durch die Antipyrin- und Koffeinreaktion. Das Reagens ist dem Leben sehr schädlich. Nach der Gelbfärbung sterben die Zellen sehr bald. Die Gelbfärbung des Zellsaftes verschwindet, da der Farbstoff sich in der umgebenden Lösung verbreitet. Durch Ammoniak oder Ätzkali wird der noch gelbgefärbte Zellsaft rot gefärbt.

Bei *Cladophora*, bei welcher Pflanze ich mit verschiedenen Reagenzien keinen Gerbstoff nachweisen konnte, erhielt ich auch mit Para-Diazobenzolsulfosäureanhydrid keine Färbung.

Jodlösung<sup>1)</sup>. Jodlösung, nämlich Jodjodkaliumlösung, hat in der Botanik Anwendung als Gerbstoffreagens gefunden. Bei *Spirogyra* sollte diese Lösung in der auf plasmolytischem Wege kontrahierten Vakuole einen gelben Niederschlag hervorrufen.<sup>2)</sup> Dies ist aber nicht in Übereinstimmung mit den Angaben in den chemischen Lehr- und Handbüchern über das Verhältnis von Jod zu Tannin. Jod wird von Tanninlösung in beträchtlicher Menge aufgenommen; man bekommt eine rotbraune Lösung, in welcher durch Stärkekleister kein freies Jod nachweisbar ist. Von einem Niederschlag wird in chemischen Werken nicht geredet, aber wohl vom Eintreten einer Farbereaktion. Meine Resultate sind hiermit in Übereinstimmung.

Bei *Spirogyra* kann man mit Jodjodkaliumlösung eine schöne Farbreaktion hervorrufen, wenn man die Fähigkeit des Gerbstoffes, von Eiweißstoffen absorbiert zu werden, verwertet. Wenn man Hautpulver oder Stückchen Eiweiß in Tanninlösung bringt, nach einiger Zeit mit Wasser abwäscht und mit Jodjodkaliumlösung behandelt, so zeigen sie gewöhnlich eine schmutzig braune Farbe; nach wiederholten Abwaschungen tritt aber eine schön violettrote Farbe auf (Vergleiche Klincksieck et Valette, Code des couleurs; Nr. 591 u. 596). Diese Reaktion kann man auch bei *Spirogyra* benutzen, aber anstatt des Hautpulvers oder der Stückchen Eiweiß muß man dann die in den Spirogyrazellen anwesenden Eiweißstoffe verwerten, um den Gerbstoff festzulegen. Man erwärmt die Spiro-

<sup>1)</sup> Dekker, J., l. c. D. I. p. 200.

<sup>2)</sup> de Vries, Hugo, Over looistof-reactiën van *Spirogyra nitida*. (l. c. p. 8.)

gyrafäden in Wasser bis 60°. Sie werden dann getötet; der Gerbstoff tritt aus der Vakuole und verbindet sich zum größten Teile mit den Eiweißstoffen in dem Protoplast. Behandelt man jetzt die Spirogyren mit Jodjodkaliumlösung und wäscht man sie darauf so lange mit destilliertem Wasser aus, bis aus der Stärke die Jodreaktion verschwindet, so zeigt es sich, daß besonders die eiweißreicheren Teile des Protoplasten eine schöne, rotviolette Farbe angenommen haben (Kl. et V. Nr. 576). Die Kerne mit den Nukleolen sind besonders stark gefärbt, die Pyrenoide schwächer, während das an der Zellwand liegende Protoplasma auch eine schwache, rotviolette Farbe zeigt.

Eiweißstoffe<sup>1)</sup>. Dekker behauptet, daß man den Lösungen von Eiweißstoffen und Leim als Gerbstoffreagenzien größeren Wert beilegen muß als anderen Reagenzien, da sie selbst in sehr großer Verdünnung eine Gerbstofflösung noch trüben und der Gerbstoffbegriff untrennbar mit der Eigenschaft der Gerbstoffe, daß sie eiweißartige Hautsubstanz unlöslich machen, verbunden ist. Es befremdet ihn, daß im allgemeinen Eiweißstoffe bei mikrochemischen Untersuchungen keine Anwendung gefunden haben.

Es versteht sich, daß ich dem Beweis der Anwesenheit von Gerbstoff bei *Spirogyra* mittelst Eiweiß- und Leimlösungen großen Wert beilegte. Ich benutzte dazu eine 1-proz. Lösung von getrocknetem Eieralbumin und eine 1/2-proz. Gelatinelösung. (Eine 1-proz. Lösung gelatiniert bei Abkühlung.) Wenn man die Spirogyrafäden in diese Lösungen bringt, so kann selbstverständlich noch nichts geschehen, da Eiweiß und Gelatine nicht durch die Zellwand und das Protoplasma dringen und diese Stoffe demzufolge mit dem Gerbstoff im Zellsaft keinen Niederschlag bilden können. Man muß in diesem Falle deshalb besondere Methoden anwenden, will man die genannten Lösungen als Gerbstoffreagenzien benutzen.

Zerquetschen der Spirogyren in den Eiweiß- und Gelatinelösungen verursacht die Entstehung körniger und häutiger Niederschläge außerhalb der Zellen an den Stellen, wo der Zellsaft durch Risse in der Zellwand nach außen gepreßt worden ist. Schöner Resultate erzielt man, wenn man die Spirogyrafäden in den Lösungen auf einem Objektträger über einer Mikroflamme vorsichtig erwärmt. Wenn die Spirogyren getötet werden, lassen die Plasmaschicht und die Zellwand den Gerbstoff passieren. Demzufolge kann nach Erwärmung in Wasser kein Gerbstoff im Zellsaft mehr nachgewiesen werden. Wenn man die Spirogyren in einer Eiweiß- oder Gelatinelösung erwärmt, kommt der Gerbstoff außerhalb der Zelle sofort mit einem Stoff in Kontakt, mit dem er eine unlösliche Verbindung bildet. An der Außenseite bedeckt die Zellwand sich gewöhnlich mit einer sehr gleichmäßigen Schicht eines Niederschlages, der ein körniges Aussehen hat; bisweilen bilden sich auch Häute. Wenn noch nicht alle Spirogyrazellen getötet worden sind, was leicht zu erreichen ist, wenn man nur einen Teil des Fadens über der Mikroflamme hält, so beschränkt sich der Niederschlag auf die

<sup>1)</sup> Dekker, J., l. c. D. I. p. 201. — af Klercker, J. E. F., l. c. p. 38.

toten Zellen; er hört bei den noch lebendigen Zellen plötzlich auf. Mit Lösungen von Ferrisalzen kann man nachweisen, daß die Niederschläge Gerbstoffniederschläge sind. Sie sind stärker, je nachdem der Gerbstoffgehalt größer ist und auch andere Reagenzien stärkere Gerbstoffreaktionen geben, und bei *Cladophora*, bei welcher Pflanze ich keinen Gerbstoff nachweisen konnte, erhielt ich mit Eiweiß- und Gelatinelösungen auf die oben angegebene Weise überhaupt keine Niederschläge

Salzlösungen<sup>1)</sup>. Gesättigte und konzentrierte Lösungen einiger Salze geben bei Mischung mit konzentrierten Lösungen von Tannin und Spirogyragerbstoff Niederschläge. Diese sind bräunlich und häutig oder körnig. Bei mikroskopischer Beobachtung bekommt man in den meisten Fällen den Eindruck, daß sie aus dickflüssiger Substanz bestehen. Falls nicht sofort ein Niederschlag entsteht, kann man das Gemisch auf einem Objektträger eintrocknen lassen. Oft erscheint dann noch ein Niederschlag in Form mikroskopisch kleiner Tropfen, die mehr oder weniger zusammenfließen. Ich habe Versuche angestellt mit Lösungen von Chlornatrium, Chlorkalium, Jodkalium, Chlorkalzium, Natriumsulfat und Kaliumnitrat. Mit Chlornatrium ist es am leichtesten, einen Niederschlag hervorzurufen. Dieses habe ich auch erfahren, als ich anstatt mit Gerbstofflösungen mit Spirogyren experimentierte. Nach Übertragung der Spirogyren in 25-proz. Chlornatriumlösung (Fig. 8) zog die große Vakuole sich stark zusammen und teilte sich oft in mehrere kleine, in denen zahlreiche Tropfen erschienen. Mit Gerbstoffreagenzien gaben diese Gerbstoffreaktionen. Durch Ferriazetat z. B. wurden sie schwarz gefärbt. In Wasser lösen sie sich.

Bereitung von Spirogyragerbstoff und makrochemische Untersuchung. Spirogyren kommen selten in so großer Menge in der Natur vor, daß an eine makrochemische Untersuchung des Spirogyragerbstoffes gedacht werden kann. Es hat denn auch lange gedauert, bis ich *Spirogyra maxima* in solcher Menge und dabei in gesundem und reinem Zustande in der Natur fand. Auf die folgende Weise wurde der Spirogyragerbstoff bereitet.

Die Spirogyren wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen: das anhängende Wasser ließ ich so viel wie möglich abfließen und darauf wurden die Spirogyren durch Erwärmung bis auf 60° getötet. Die Flüssigkeit, in welcher die Fäden sich befanden, gab nach Filtration nur schwache oder durchaus keine Gerbstoffreaktionen. Der Gerbstoff war von den Protoplasten absorbiert worden, wie die Untersuchung mit Reagenzien zeigte. Die Spirogyren wurden nun durch Pressen zwischen Filtrierpapier so viel wie möglich getrocknet und ein paarmal mit einem Gemisch aus 4 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol extrahiert, wie das auch bei der Bereitung von Tannin aus Galläpfeln geschieht. Die Lösung in Äther und Alkohol wird filtriert und im Vakuum verdunstet.

Der Rückstand bildet eine gelbliche, leicht zerreibliche, amorphe Masse und sieht ungefähr wie Tannin aus. Er löst sich sehr leicht

<sup>1)</sup> af Klercker, J. E. F., l. c. p. 29.

in Wasser. Die filtrierte Lösung ist, wie eine Tanninlösung, gelb gefärbt; sie zeigt aber auch eine schwache, grünliche Nuance. Sie rötet Lackmuspapier. Sie gibt mit Reagenzien dieselben Gerbstoffreaktionen wie eine Tanninlösung und wie der Zellsaft von *Spirogyra* bei mikrochemischer Untersuchung. Mit Ferrichlorid z. B. erzielt man Blaufärbung, mit Ferriazetat ein schwarzes Präzipitat, mit Kaliumbichromat ein braunrotes Präzipitat, mit 1-proz. Antipyrinlösung und mit  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeinlösung Präzipitate in Form kleiner Tropfen, die zu größeren, zusammenhängenden Kugeln und Massen zusammenlaufen; mit Pyridindampf und mit Chinolindampf erhält man auch tropfenförmige Niederschläge; Eiweiß- und Gelatinelösungen verursachen Fällungen usw.

Schlußfolgerung bezüglich des Vorkommens von Gerbstoff bei *Spirogyra*. Die Untersuchungen, die ich in den vorigen Seiten besprochen habe, haben ohne Ausnahme zu dem Resultate geführt, daß alle von mir benutzten Stoffe, die mit Tannin Niederschläge und Färbungen geben, auch bei *Spirogyra* ähnliche Niederschläge und Färbungen hervorrufen können. Dieses gilt sowohl für den Zellsaft der lebendigen Spirogyren als auch für die Lösung des Stoffes, der durch Extraktion mit einem Gemisch aus Äther und Alkohol erhalten worden ist. Die mehr als 60 als Gerbstoffreagenzien angewendeten Stoffe waren von sehr verschiedener chemischer Natur. Viele fanden bei der mikrochemischen Untersuchung noch keine Anwendung. Auf Grund meiner Untersuchungen schließe ich mich der Ansicht anderer Forscher an, daß *Spirogyra* eine gerbstoffhaltige Pflanze ist. Die vorgekommene Verwechslung von Gerbstoff mit anderen Stoffen erforderte die nähere Bestätigung dieser Ansicht und die Ergänzung früherer Untersuchungen, speziell die Nachweisung des Gerbstoffes mit organischen Basen und Eiweißstoffen und die makrochemische Untersuchung des Spirogyragerbstoffes.

Übereinstimmung des Spirogyragerbstoffes mit Tannin. Den bei *Spirogyra maxima* anwesenden Gerbstoff habe ich mit verschiedenen anderen Gerbstoffen verglichen, nämlich mit Tannin oder Gallusgerbstoff, Eichenrindengerbstoff, Myrobalanengerbstoff, Eucalyptusgerbstoff, Catechugerbstoff und Kinogerbstoff. Mit keinem stimmt er aber so überein wie mit Tannin. Er gehört, wie dieses, zu den Gerbstoffen, die durch Ferrisalze blau gefärbt werden, also zu den Eisenblauenden. Die Verhältnisse der beiden Gerbstoffe zu Reagenzien zeigen sehr große Übereinstimmung. Man darf jedoch nicht annehmen, daß beide identisch seien. Im Zusammenhang hiermit verweise ich auf die bedeutenden Untersuchungen von Fischer und Freudenberg<sup>1)</sup>, welche Forscher durch Synthese einen Körper bereiteten, wahrscheinlich Pentagalloyl-Glukose, der, was optische Aktivität, geringe Azidität, Fällung durch Leimlösung, Färbung mit Ferrisalzen, Präzipitation durch Alkaloide und andere Basen, Löslichkeit in verschiedene Solvenzien, Gelatinierung durch

<sup>1)</sup> Fischer, Emil, u. Freudenberg, Karl, Über das Tannin und die Synthese ähnlicher Stoffe. (Ber. d. dtsh. chem. Ges. Jahrg. 45. 1912. p. 915.)

Arsensäure in alkoholischer Lösung, Geschmack und Hydrolyse betrifft, so große Übereinstimmung mit Tannin zeigt, daß eine Verwechslung möglich wäre, der aber doch damit nicht identisch ist, was besonders daraus hervorgeht, daß die beiden Stoffe bei verschiedener Temperatur erweichen und sich zersetzen.

Lokalisation des Spirogyragerbstoffes. Wie man erwarten konnte, kam ich, wie Hugo de Vries<sup>1)</sup>, zu dem Resultate, daß bei *Spirogyra* der Gerbstoff im Zellsaft vorkommt, was man nach abnormaler Plasmolyse (Fig. 6) besonders deutlich mit verschiedenen Reagenzien nachweisen kann, z. B. mit Ferrisalzen, Antipyrin, Koffein usw. Hierbei muß man berücksichtigen, daß man erst abnormale Plasmolyse herorrufen muß und nachher das Gerbstoffreagens einwirken läßt. Man bringt z. B. mit 10-proz. Kaliumnitratlösung erst abnormale Plasmolyse hervor und läßt darauf eine 10-proz. Kaliumnitratlösung zufließen, die 1% Antipyrin enthält. Läßt man aber die Reagenzien in umgekehrter Ordnung oder zu gleicher Zeit einwirken, so kann ein Teil des Niederschlages außerhalb der Vakuole geraten, was unrichtige Schlüsse veranlassen könnte.<sup>2)</sup>

Abweichende Resultate. Oben habe ich alles besprochen, was zur Bestätigung des Schlusses, daß *Spirogyra* eine gerbstoffhaltige Pflanze ist, dienen konnte. Vollständigkeitshalber muß ich darauf hinweisen, daß ich mit den Lösungen einiger Stoffe, Jodjodkaliumlösung, Lackmuslösung und Methylenblaulösung, die als mikrochemische Gerbstoffreagenzien angewendet und empfohlen worden sind, Resultate erhielt, die von denen anderer Forscher verschieden waren. Den Schluß, daß *Spirogyra* Gerbstoff enthält, können sie jedoch nicht modifizieren.

Die abweichenden Resultate mit Jodjodkaliumlösung habe ich oben schon besprochen. Auch mit Lackmuslösung gelangte ich zu einem anderen Resultat als de Vries.<sup>3)</sup> Zwar erhielt ich mit dieser Lösung im Zellsaft von *Spirogyra* ein Präzipitat, aber keines, das man als eine Verbindung des Farbstoffes mit dem Gerbstoff betrachten kann. Es war kein blaues Präzipitat, sondern ein farbloses, wie es Ammoniumkarbonat hervorruft. Demzufolge erhob sich die Frage, ob vielleicht eine Verunreinigung des Lackmus mit Ammoniumkarbonat oder Alkalikarbonat die Bildung eines Niederschlages verursacht haben könnte, da letztere Stoffe bei der Bereitung des Lackmus benutzt werden.

Methylenblau<sup>4)</sup>. Methylenblau ist besonders von Pfeffer als Gerbstoffreagens empfohlen worden. Bei *Spirogyra* ruft eine sehr verdünnte Methylenblaulösung allmählich ein Präzipitat in den lebendigen Zellen hervor. Nach Pfeffer ist das Präzipitat eine Verbindung von Methylenblau mit Gerbstoff.

<sup>1)</sup> de Vries, Hugo, Over looistofreactiën usw. (l. c. p. 8.)

<sup>2)</sup> van Wisselingh, C., Over intravitale neerslagen. (Versl. d. Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. 1913. p. 1243.)

<sup>3)</sup> de Vries, Hugo, Over looistofreactiën usw. (l. c. p. 8.)

<sup>4)</sup> Pfeffer, W., l. c.

Die Versuche Pfeffers habe ich<sup>1)</sup> bei *Spirogyra maxima* mit dem Chlorid des Methylenblaus ( $C_{16}H_{18}N_3S Cl$ , Methylenblau pro usu interno) und mit dem Chlorzinkdoppelsalz des Methylenblaus ( $C_{16}H_{18}N_3S Cl, Zn Cl_2$ ) wiederholt. Hierbei kam ich zu dem Schlusse, daß man dem Methylenblau als Gerbstoffreagens keinen Wert beilegen darf. Man darf nicht annehmen, daß bei *Spirogyra* eine mehr oder weniger vollständige Präzipitation des Gerbstoffes stattfindet.

Ich bemerkte wiederholt, daß die Quantität des blauen Niederschlages, selbst in gerbstoffreichen Zellen, gering war. Untersuchte ich Spirogyrafäden, die längere oder kürzere Zeit, z. B. 1 Tag oder 1 Stunde, in  $1/5000$ -proz. Methylenblaulösung verweilt hatten, so konnte ich feststellen, daß sich manchmal nach 1 Tage noch kein Niederschlag gebildet hatte. Es zeigte sich, daß die Reaktion mit Antipyrin und Koffein in diesen Fäden viel schwächer war als in den Fäden, welche nicht mit Methylenblau behandelt waren. Auf Grund obiger Wahrnehmungen nehme ich an, daß durch Methylenblau nicht aller Gerbstoff gefällt wird, und es kommt mir sehr wahrscheinlich vor, daß die Spirogyren während der Einwirkung des Methylenblaus Gerbstoff durch Exosmose verlieren.<sup>2)</sup> Auch ist es bemerkenswert, daß die Spirogyren in  $1/5000$ -proz. Methylenblaulösung nicht einen vom Anfang gefärbten Niederschlag bilden, sondern erst einen farblosen oder fast farblosen, der später allmählich blau gefärbt wird. Verschiedene Faktoren spielen bei der Entstehung des Niederschlages eine Rolle: Zuerst die schädliche Wirkung des Methylenblaus, wodurch Modifikationen im Organismus eintreten; dann scheint die Anwesenheit von Salzen die Bildung des Niederschlages zu befördern; auch der Sauerstoff der Atmosphäre scheint sich daran zu beteiligen. Endlich bemerke ich, daß Methylenblau selbst nicht präzipitierend zu wirken scheint und daß wahrscheinlich auf die eine oder andere Weise ein Gerbstoffniederschlag entsteht, der allmählich Farbstoff absorbiert. Die Resultate einer Anzahl Versuche mit Methylenblau, Salzen, Tannin, Spirogyragerbstoff und Gerbstoffreagenzien stimmten zu obigen Ansichten. Daß der Niederschlag bei *Spirogyra* Eiweiß enthalten kann, wie Pfeffer behauptet, ist nicht wahrscheinlich, da gelöstes Eiweiß nicht im Zellsaft vorkommt. Wie der Niederschlag in den Zellen entsteht, ist noch nicht ganz erklärt, aber gewiß liegt keine einfache Fällung von Gerbstoff durch Methylenblau vor, wie Pfeffer meint. Es zeigte sich, daß die Schlüsse, welche Pfeffer auf Grund seiner Versuche zieht, oft falsch sind, worauf ich schon in meiner Publikation über intravitale Niederschläge hingewiesen habe.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> van Wisselingh, C., Over het aantoonen van looistof in de levende plant en over hare physiologische beteekenis. (Versl. d. Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. 1910. p. 691 u. 692.) — Over intravitale neerslagen. (l. c. p. 1253 ff.)

<sup>2)</sup> Vergl. über Exosmose besonders Czapek, F., Versuche über Exosmose aus Pflanzenzellen. (Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. Bd. XXVIII. 1910. p. 159.)

<sup>3)</sup> van Wisselingh, C., l. c. p. 1253 ff.

Einen Punkt will ich hier etwas ausführlicher besprechen, nämlich die giftige Wirkung des Methylenblaus. Pfeffer spricht wiederholt über die Unschädlichkeit verdünnter Methylenblaulösungen und über die Unschädlichkeit seiner Methode. Auf Grund der hierunter erwähnten Versuche bin ich aber zu ganz anderen Resultaten gekommen; ich schreibe dem Methylenblau eine sehr giftige Wirkung zu. Die Versuche betreffen eine vergleichende Untersuchung über das Wachstum von Spirogyrafäden in Grabenwasser und in Grabenwasser, in dem Methylenblau gelöst war.

Am 28. März 1911 brachte ich Stückchen von Spirogyrafäden in frisches, sterilisiertes Grabenwasser und in sehr verdünnte Methylenblaulösungen von verschiedener Stärke, die ich mit demselben Grabenwasser bereitet hatte. Die Stückchen bestanden aus 12 bis 29 Zellen. Von jedem Stückchen maß ich 3 Zellen. Am 31. März und am 3. April untersuchte ich die Stückchen wieder. Ich erhielt die hierunter erwähnten Resultate. Ich habe die Länge der 3 gemessenen Zellen und die sämtliche Länge ihrer Nachkommen in  $\mu$  angegeben, die Zahl der Nachkommen zwischen Klammern gestellt und das Längenwachstum in Prozenten angegeben:

#### 1. Reihe von Versuchen.

Versuch No. 1. In Grabenwasser. Nach 6 Tagen alle Zellen lebendig und gesund. Viele Zellteilungen. Die Länge der Zellen betrug am 28. März, 31. März und 3. April resp. 244, 265 und 481 (4 Zellen), — 239, 257 und 446 (4 Zellen), — 252, 270 und 489 (4 Zellen). Das Längenwachstum betrug deshalb in den drei ersten Tagen resp. 8,6, 7,5 und 7,1 Proz. und in den drei letzten Tagen resp. 81,5, 73,5 und 81,1 Proz.

Versuch No. 2, 3 und 4. In Grabenwasser resp. mit 0,0001, 0,0003 und 0,0009 Proz. Methylenblau (Chlorid). Nach 3 Tagen alle Zellen tot. Kein Längenwachstum.

#### 2. Reihe von Versuchen.

Versuch No. 1. In Grabenwasser. Nach 6 Tagen alle Zellen lebendig und gesund. Viele Zellteilungen. Die Länge der Zellen betrug am 28. März, 31. März und 3. April resp. 296, 325 (2 Zellen) und 600 (7 Zellen), — 306, 341 (2 Zellen) und 651 (8 Zellen), — 276, 311 (2 Zellen) und 620 (8 Zellen). Das Längenwachstum betrug deshalb in den drei ersten Tagen resp. 9,8, 11,4 und 12,7 Proz. und in den drei letzten Tagen resp. 84,6, 90,9 und 99,4 Proz.

Versuch No. 2, 3 und 4. In Grabenwasser resp. mit 0,0001, 0,0003 und 0,0009 Proz. Methylenblau (Chlorzinkdoppelsalz). Nach 3 Tagen alle Zellen tot. Kein Längenwachstum.

Die große Verschiedenheit des Wachstums in den 3 ersten und in den 3 letzten Tagen bei dem ersten Versuch der 1. und 2. Reihe muß der Übertragung in frisches Grabenwasser zugeschrieben werden, dessen Einfluß sich nicht sofort geltend macht, sondern erst nach einiger Zeit.

Eine Wiederholung obiger Versuche führte, was das Methylenblau betrifft, zu ebenso ungünstigen Resultaten. In Grabenwasser mit 0,0001 Proz. Methylenblau (Chlorid oder Chlorzinkdoppelsalz) waren nach einem Tage schon viele Zellen zu Grunde gegangen, und in Grabenwasser mit 0,0003 und mit 0,0009 Proz. wurden

nach einem Tage keine lebendigen Zellen mehr gefunden. Vergleichende Versuche im Juli 1909 hatten zu ähnlichen Resultaten geführt. In Grabenwasser war das Längenwachstum der Zellen in zwei Tagen durchschnittlich 56,8 Proz. In Grabenwasser mit 0,00001 Proz. Methylenblau waren nach einem Tage die meisten Zellen gestorben und in Grabenwasser mit 0,0001 Proz. war nur noch eine einzige Zelle lebendig.

Bei Wiederholung obiger Versuche mit Knoppscher Lösung und destilliertem Wasser anstatt des Grabenwassers sah ich in den Lösungen des Methylenblaus (Chlorid) die Spirogyren noch rascher zu Grunde gehen.

Verschiedene Ansichten über die Niederschläge mit basischen Stoffen. Über die chemische Natur der Niederschläge, die basische Stoffe, wie Ammoniumkarbonat, Antipyrin, Koffein und viele andere, im Zellsaft der subepidermalen Zellen der Crassulaceenblätter (*Echeveria*, *Cotyledon*), der Tentakelzellen von *Drosera rotundifolia*, bei *Spirogyra* und in sehr viel anderen Fällen hervorbringen, haben die Forscher sehr verschiedene Ansichten. Nach Pfeffer<sup>1)</sup> besteht der Niederschlag, den Ammoniumkarbonat verursacht, aus gerbsaurem Eiweißstoff. Nach Loew und Bokorny<sup>2)</sup> ist der essentielle Bestandteil der Niederschläge, die obengenannte Stoffe im Zellsaft hervorrufen, aktives Eiweiß; andere Stoffe, wie z. B. Gerbstoff, welche die Niederschläge bisweilen enthalten können, sind nach beiden letzteren Autoren nur Beimischungen von untergeordneter Bedeutung.

Die Auffassungen von Loew und Bokorny und von Pfeffer sind zu wiederholten Malen widerlegt worden, unter anderen von af Klercker<sup>3)</sup>, Klemm<sup>4)</sup>, Czapek<sup>5)</sup> und auch von mir<sup>6)</sup>. Wiederholt hat man darauf hingewiesen, daß die Niederschläge wohl Gerbstoffreaktionen, aber keine Eiweißreaktionen zeigen.

Bei *Spirogyra maxima* und *Drosera rotundifolia* habe ich die Niederschläge mit verschiedenen Eiweißreagenzien untersucht. Da die Eiweißreaktionen, über welche wir verfügen, im allgemeinen als mikrochemische Reaktionen wenig empfindlich sind, habe ich vorher die üblichsten geprüft, nämlich die Reaktion mit Schwefelsäure und Zucker, die Biuretreaktion, die Millonsche Reaktion und die Salpetersäurereaktion.

Für die Biuretreaktion benutzte ich ein Gemisch von Kupferazetatlösung, Kalilauge und Glycerin, die zusammen eine klare, blaue Flüssigkeit bilden. Dieses Gemisch gefiel mir besser als die besonderen nacheinander folgenden Behandlungen mit Kupferazetatlösung und Kalilauge.

<sup>1)</sup> l. c. p. 239 ff.

<sup>2)</sup> Loew, O., u. Bokorny, Th., Zur Chemie der Proteosomen. (Flora. 1892. Ergänzungsbd. p. 117 ff.)

<sup>3)</sup> l. c. p. 36.

<sup>4)</sup> Klemm, P., Über die Aggregationsvorgänge usw. (l. c. p. 240.) — Beitrag zur Erforschung der Aggregationsvorgänge in lebenden Pflanzenzellen. (Flora. 1892. p. 414 ff.)

<sup>5)</sup> Über Färbungsreaktionen usw. (l. c. p. 151 u. 152.)

<sup>6)</sup> Over intravitale neerslagen. (l. c. p. 1244 ff.)

Mit der Biuretreaktion, der Millonschen Reaktion und der Salpetersäurereaktion erhielt ich nicht sehr günstige Resultate. Probiert man die Reaktionen mit sehr kleinen Stückchen geronnenem Hühnereiweiß, so kann man die verschiedenen Färbungen wohl sehr deutlich wahrnehmen, aber man merkt doch, daß man den Reaktionen für mikrochemische Untersuchung keinen großen Wert beilegen kann. Bei sehr dünnen Stückchen Eiweiß ist die Farbe sehr schwach. Bei den Protoplasten von *Spirogyra* erhielt ich denn auch keine befriedigenden Resultate.

Die Reaktion mit Schwefelsäure und Rohrzucker gab bessere Resultate. Die Objekte ließ ich einige Zeit in einer Zuckerlösung liegen und ließ dann Schwefelsäure zufließen. Ich benutzte ein Gemisch von 9 Gewichtsteilen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Gewichtsteil destilliertem Wasser, also Schwefelsäure von 85 $\frac{1}{2}$  Proz. Dieses Gemisch wirkt viel minder verkohlend auf den Zucker ein als konzentrierte Schwefelsäure und gefiel mir darum besser. Mit kleinen Stückchen Hühnereiweiß ist die Reaktion sehr schön. Erst ist die Farbe rot (Klincksieck et Valette, Code des couleurs, Nr. 16 und 21), bisweilen mit sehr schwacher, violetter Nuance, dann rein rot (Kl. et V. Nr. 41) und danach orangerot (Kl. et V. Nr. 51). Bei sehr dünnen Stückchen kann man die Farbe noch wahrnehmen. Auch bei mikrochemischer Untersuchung kann man die Reaktion mit Erfolg anwenden. Bei *Spirogyra* färben die Protoplasten sich deutlich hellrot, die Kerne und Pyrenoide dunkler.

Ebensowenig wie af Klercker, Klemm und Czapek habe ich in den intravitalen Niederschlägen mit Koffein, Antipyrin und Ammoniumkarbonat Eiweiß nachweisen können. Auch habe ich keine Eiweißreaktionen erhalten können, wenn die Niederschläge einige Wochen alt und mehr oder weniger unlöslich geworden waren. In den lebendigen Zellen verlieren nämlich die zu Kugeln zusammengeflossenen Antipyrin- und Koffeinniederschläge allmählich ihre Löslichkeit. Bei Übertragung in Wasser lassen sie Bläschen zurück und zuletzt scheinen sie ganz unlöslich zu sein. In toten Zellen findet man braun gefärbte, in Wasser unlösliche Kugeln. Bei den unlöslichen Kugeln und bei den unlöslichen Resten konnte ich selbst mit Schwefelsäure und Zucker keine Eiweißreaktion erhalten, während die Protoplasten sich deutlich rot färbten. Die Kugeln und Reste geben dagegen wohl Gerbstoffreaktionen. Mit Ferrisalzen färben sie sich blau oder schwarz, mit Osmiumsäure schwarz, mit Kaliumbichromat und Natriumvanadat braun, mit Jodjodkaliumlösung rotviolett. Die Niederschläge, die Lösungen von Antipyrin, Koffein, Ammoniumkarbonat und andere basische Stoffe im Zellsaft von *Spirogyra* hervorrufen, stimmen völlig überein mit denen, welche entstehen, wenn obengenannte Lösungen mit Lösungen von Tannin und Spirogyragerbstoff in Berührung kommen.

Im Gegensatz zu de Vries<sup>1)</sup> gelang es mir auch nicht, die Eiweißnatur der Niederschläge in den Tentakelzellen von *Drosera*

<sup>1)</sup> de Vries, Hugo, Über die Aggregation im Protoplasma von *Drosera rotundifolia*. (l. c. p. 57 u. 58.)

*rotundifolia* auf mikrochemischem Wege festzustellen, während ich in denselben leicht Gerbstoff nachweisen konnte.

Niederschläge von Gerbstoff mit Eiweiß in Spirogyrazellen. Dafür, daß Gerbstoff und Eiweiß im Zellsaft von *Spirogyra* nebeneinander in gelöstem Zustand anwesend sind, wie Pfeffer behauptet, kann man überhaupt keine hinreichenden Gründe angeben. Unter den gegebenen Bedingungen können sie nebeneinander nicht in Lösung sein, weil dann sofort ein Präzipitat entstehen müßte. Wie ich<sup>1)</sup> in meiner Publikation über intravitale Niederschläge gezeigt habe, kommt bei *Spirogyra* im Protoplasma auch gelöstes Eiweiß vor. Auf eine eigentümliche Weise ist es mir gelungen, den gerbstoffhaltigen Zellsaft mit dem gelösten Eiweiß in Berührung zu bringen, was die Entstehung von Niederschlägen veranlaßte, die aus Gerbstoff und Eiweißstoff bestehen. Diese echten Gerbstoffeiweißniederschläge können auf folgende Weise hervorgebracht werden.

Man läßt auf die Spirogyren eine 5-proz. Ätherlösung einwirken (5 Gewichtsteile Äther und 95 Gewichtsteile destilliertes Wasser [Fig. 9]). Zytoplasma fließt dann nach dem Kern und sammelt sich da an; die Aufhängefäden lassen los und werden in die Plasmamasse um den Kern aufgenommen. Diese Plasmamasse schwillt und schließlich ist der Kern von einer großen Blase umgeben, deren Wand aus Hyaloplasma besteht und deren Inhalt eine wässrige Flüssigkeit bildet, in welcher der Kern sich befindet und sich auch einige Körnchen zeigen. Diese wässrige Flüssigkeit enthält auch gelöstes Eiweiß. Wenn unter dem Einfluß des Äthers die Protoplasten sterben, so kommt der Inhalt der Blase in Kontakt mit dem Zellsaft und es entstehen an der Peripherie der Blase an einer oder mehreren Stellen Präzipitate von Gerbstoff und Eiweiß. Diese Präzipitate geben mit Eiweißreagenzien deutliche Eiweißreaktionen und mit Gerbstoffreagenzien deutliche Gerbstoffreaktionen, z. B. Rotfärbung mit Zuckerlösung und 85 $\frac{1}{2}$ -proz. Schwefelsäure, Rotviolett färbung mit verdünnter Jodjodkaliumlösung und Schwarzfärbung mit Ferriazetatlösung. An den Präzipitaten konnte ich gewöhnlich zwei Teile unterscheiden, einen kompakten und einen voluminösen; beim ersteren sind die Reaktionen stärker. Dieser Versuch ist in verschiedener Hinsicht bedeutend. Auf merkwürdige Weise wird nämlich bei *Spirogyra* in der Zelle mit Eiweiß die Anwesenheit von Gerbstoff im Zellsaft nachgewiesen und mit Gerbstoff das Vorkommen von gelöstem Eiweiß im Zytoplasma gezeigt und zu gleicher Zeit liefert der Versuch einen neuen Beweis für die Abwesenheit von gelöstem Eiweiß im Zellsaft von *Spirogyra*. Die Präzipitate mit Antipyrin, Koffein, Ammoniumkarbonat und anderen basischen Stoffen können deshalb keine Eiweißpräzipitate sein, wie Loew und Bokorny zu wiederholten Malen behauptet haben, und auch keine Präzipitate von gerbsaurem Eiweiß, wie Pfeffer annimmt. Sie geben mit Reagenzien denn auch keine Eiweißreaktionen, während Präzipitate in Zellen, die in der Tat

<sup>1)</sup> l. c. p. 1251 und 1252.

aus Eiweiß und Gerbstoff bestehen, wie die oben besprochenen, deutliche Eiweiß- und Gerbstoffreaktionen zeigen.

Nicht nur mit einer wässerigen, 5-proz. Ätherlösung, sondern auch mit einigen stark plasmolytisch wirkenden Salzlösungen ist es mir gelungen, Präzipitate von Gerbstoff und Eiweiß in den Zellen hervorzurufen, unter anderen mit einer 25-proz. Natriumsulfat- (Fig. 10) und mit einer 20-proz. Kaliumnitratlösung. Wenn die Vakuole sich stark zusammengezogen hat, findet sich zwischen der Vakuolewand und der Zellwand eine wässerige Lösung, in welcher die Chromatophoren und der Kern liegen, und die Eiweiß in gelöstem Zustand enthält. Wenn die Vakuolewand stirbt, kommt der Inhalt der Vakuole in Kontakt mit der umgebenden Flüssigkeit und bildet sich irgendwo an ihrer Peripherie ein Präzipitat, das aus Gerbstoff und Eiweiß besteht und mit Reagenzien sowohl Gerbstoff- als Eiweißreaktionen gibt. Wie an den oben beschriebenen Präzipitaten, kann man an demselben einen kompakten und einen voluminösen Teil unterscheiden, von denen der erstere die Reaktionen am deutlichsten zeigt. Die Vakuolewand absorbiert ein wenig Gerbstoff und zeigt mit Ferriazetatlösung eine schwache Gerbstoffreaktion.

Die letzterwähnten Versuche bilden einen eigentümlichen Kontrast zu dem Versuche mit Ätherlösung. In dem einen Falle entsteht eine Blase mit gelöstem Eiweiß in der gerbstoffhaltigen Vakuole, in dem anderen Falle befindet sich die zu einer Blase zusammengezogene Vakuole in einer wässerigen Flüssigkeit, die gelöstes Eiweiß enthält. In beiden Fällen aber bildet sich beim Absterben ein Präzipitat von Gerbstoff und Eiweiß an der Peripherie der Blase, was beweist, daß in der lebendigen Zelle beide Stoffe getrennt sind und nicht nebeneinander in gelöstem Zustande vorkommen können. Die gerbstoffhaltige Vakuole kann deshalb kein gelöstes Eiweiß enthalten.

Die Niederschläge mit Ammoniumkarbonat, Antipyrin, Koffein und anderen basischen Stoffen sind in der Tat Gerbstoffniederschläge, und die experimentale Untersuchung hat keine einzige Andeutung für einen Eiweißgehalt gegeben. Die Möglichkeit, daß sie bisweilen in geringer Quantität andere Stoffe enthalten, ist jedoch nicht ausgeschlossen. Wenn z. B. der Zellsaft neben Gerbstoff auch roten Farbstoff enthält, wie dies in den Tentakelzellen von *Drosera rotundifolia*, den Epidermiszellen der Ausläufer von *Saxifraga sarmenosa* und den Epidermiszellen von *Primula sinensis* der Fall ist, dann nehmen die Niederschläge, die die obengenannten Reagenzien hervorrufen, den Farbstoff auf. Anfangs bestehen sie aus kleinen Kügelchen und allmählich bilden sich große, rotgefärbte Kugeln.

Einfluß von Säuren und Salzen auf die Bildung der Niederschläge. Eine von Pfeffers<sup>1)</sup> Argumentationen für die Behauptung, daß die Niederschläge mit Ammoniumkarbonat in den lebendigen Spirogyrazellen nicht übereinstimmen mit den Nieder-

<sup>1)</sup> l. c. p. 239 ff.

schlagen, die Ammoniumkarbonat in Tanninlösungen hervorbringt, war, daß Ammoniumkarbonat in den Spirogyrazellen schon bei größerer Verdünnung als in Tanninlösungen einen Niederschlag hervorruft. Daß diese Erscheinung sich in der Tat ereignet, kann man leicht konstatieren. Um sie zu erklären, nimmt Pfeffer an, daß der Zellsaft außer Gerbstoff und Eiweiß auch freie Säure enthält. Nach Pfeffer veranlaßt die Bindung der Säure die Entstehung des Niederschlages von Gerbstoff und Eiweiß. Die Anwesenheit von freier Säure im Zellsaft verhindert nach ihm die Fällung.

Im Zusammenhang mit der obenerwähnten Erscheinung habe ich einige Versuche angestellt. Mischt man 1 cM<sup>3</sup> einer 1-proz. Lösung von getrocknetem Hühnereiweiß mit 9 cM<sup>3</sup> destillierten Wassers und 1 cM<sup>3</sup> einer 1-proz. Tanninlösung, so entsteht ein Präzipitat. Nimmt man anstatt 9 cM<sup>3</sup> destillierten Wassers 9 cM<sup>3</sup> 1-proz. Zitronensäurelösung, so bleibt die Mischung klar. Fügt man darauf Ammoniumkarbonatlösung hinzu, so entsteht ein Präzipitat. Dasselbe ist in einem Überschuß von Zitronensäure und in einem Überschuß von Ammoniumkarbonat löslich. 1 cM<sup>3</sup> einer 1/2-proz. Gelatinelösung gibt mit 24 cM<sup>3</sup> destillierten Wassers und 1 cM<sup>3</sup> einer 1-proz. Tanninlösung ein Präzipitat. Nimmt man anstatt des destillierten Wassers 1-proz. Zitronensäurelösung, so bleibt die Flüssigkeit klar. Nachfolgende Zufügung von Ammoniumkarbonatlösung ruft ein Präzipitat hervor. Hieraus geht hervor, daß, wenn in der Tat Gerbstoff, Eiweiß und freie Säure nebeneinander im Zellsaft von *Spirogyra* anwesend wären, die Erklärung von Pfeffer vielleicht richtig sein könnte. Daß freie Säure und Eiweiß im Spirogyrazellsaft anwesend wären, hat er aber nicht bewiesen. Die Pfeffersche Erklärung ist denn auch falsch.

Oben haben wir schon gesehen, daß gelöstes Eiweiß im Spirogyrazellsaft nicht vorkommt. Über das Vorkommen freier Säure im Zellsaft bemerke ich, daß es mir nicht gelungen ist, sie nachzuweisen. Die Versuche, die ich angestellt habe, zeigen vielmehr, daß sie darin nicht vorkommt.

Wenn man Spirogyren mit destilliertem Wasser abwäscht und dann zerquetscht, so zeigt die Masse eine schwach saure Reaktion gegen Lackmuspapier. Lösungen von Tannin und Spirogyragerbstoff reagieren aber auch schwach sauer. Ich versuchte darum, auf die folgende Weise freie Säure in den lebendigen Spirogyrazellen nachzuweisen. Ich brachte die Spirogyren in eine Lösung von Jodkalium (0,1 Proz.) und Kaliumjodat (0,025 Proz.), konnte aber nichts wahrnehmen, was eine Abscheidung von Jod durch freie Säure andeutete ( $5 \text{ KJ} + \text{KJO}_3 + 6 \text{ -COOH} \rightsquigarrow 6 \text{ -COOK} + 6 \text{ J} + 3 \text{ H}_2\text{O}$ ). Ließ ich die Spirogyren einige Zeit in 0,1-proz. Zitronensäurelösung, ehe ich sie in die Lösung von Kaliumjodid und Kaliumjodat brachte, so beobachtete ich eine schwache Blaufärbung der Stärke und eine schwache Violettfärbung der Kerne, welche Gerbstoff aus dem Zellsaft absorbiert hatten. Die Zellen waren indessen abgestorben. Die beiden Färbungen zeigen eine Aufnahme von Zitronensäure und eine Abscheidung von Jod durch diese Säure an. Falls die Spirogyren selbst freie Säure enthielten,

würde auch bei dem ersten Versuche Jodabscheidung stattgefunden haben und würde man sehr wahrscheinlich auch die beiden oben genannten Farbreaktionen beobachtet haben. Ich bemerke hierbei noch, daß Spirogyren selbst gegen schwache Lösungen organischer Säure sehr empfindlich sind. In einer 0,1-proz. Lösung von Zitronensäure, Weinsteinsäure, Apfelsäure oder Chininsäure gehen sie bald zu Grunde. Schon deswegen darf man nicht erwarten, daß Spirogyren freie Säure in einer einigermaßen bedeutenden Quantität enthalten. Wenn man die Spirogyrafäden in eine verdünnte Lösung von Kongorot bringt, nimmt die Zellwand Farbstoff auf und wird demzufolge rot gefärbt. Die Spirogyren bleiben dabei lebendig. Werden sie darauf durch schwache Erwärmung getötet, so darf man annehmen, daß eventuell im Zellsaft anwesende Säure die Zellwand passiert und die rote Farbe in eine blaue umwandelt. Dies findet aber nicht statt. Auf keinerlei Weise habe ich deshalb bei *Spirogyra* freie Säure nachweisen können.

Wie sich unten zeigen wird, wird das verschiedene Verhältnis von Ammoniumkarbonat zu Gerbstofflösungen und dem Spirogyrenzellsaft durch die Anwesenheit von Salzen verursacht, welche die Fällung des Gerbstoffes durch Ammoniumkarbonat befördern.

Wenn man eine 1-proz. Ammoniumkarbonatlösung mit einem gleichen Volumen einer 1-proz. Lösung von Tannin oder Spirogyragerbstoff mischt, so bildet sich kein Präzipitat, oder es findet erst nach längerer Zeit eine Fällung statt. Enthält die Tanninlösung aber 0,1 Proz. Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), 1 Proz. kristallisiertes Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ), 1 Proz. kristallisiertes Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ ), 1 Proz. Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ ), 1 Proz. Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ ), 5 Proz. oder 2 Proz. Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), so entsteht sofort ein Präzipitat, das in einigen Fällen, besonders bei Anwesenheit von Kalziumchlorid, sehr bedeutend ist. Die Quantitäten der Kalzium- und Magnesiumsalze in den benutzten Lösungen sind so, daß bei Mischung mit der Ammoniumkarbonatlösung keine Fällung stattfindet.

Vermischte ich  $50\text{ cm}^3$  2-proz. Tanninlösung mit  $50\text{ cm}^3$  Knoppscher Nahrungsflüssigkeit und fügte ich zu diesem klaren Gemisch eine gleiche Quantität einer 1-proz. Ammoniumkarbonatlösung hinzu, so trat ein Präzipitat auf. Löste ich in dem Grabenwasser, worin die Spirogyren kultiviert wurden, 1 Proz. Tannin und vermischte ich dann die klare Lösung mit einer gleichen Quantität 1-proz. Ammoniumkarbonatlösung, so wurde das Gemisch sofort sehr trübe.

Es versteht sich, daß in dem Grabenwasser, worin die Spirogyren wachsen, und in ihrem Zellsaft Salze vorkommen und diese Salze, wie aus obigem hervorgeht, die Fällung des Gerbstoffes durch Ammoniumkarbonat befördern müssen.

## Methoden der physiologischen Untersuchung.

Ältere Methoden. Die Methoden, die man bis jetzt bei höheren Pflanzen bei Untersuchungen über die physiologische Be-

deutung des Gerbstoffes anwendete oder dafür empfohlen hatte, konnte ich aus verschiedenen Gründen bei *Spirogyra* nicht benutzen.

Für die titrimetrischen und gravimetrischen Methoden ist *Spirogyra* gewiß ein zu kleines Objekt. Andere Methoden, z. B. mit Kaliumbichromat, gestatten nur eine einzige Untersuchung der Objekte, da dieselben dabei getötet werden. Die Methode mit Methylenblau, die Pfeffer sehr empfohlen hat, ist für physiologische Untersuchungen ohne Wert. Das Methylenblau ist sehr giftig und als Gerbstoffreagens untauglich. Eine Methode mit Ferrizitrat und Ferriammoniumzitrat, die Büttner<sup>1)</sup> zur Nachweisung des Gerbstoffes in lebendigen Zellen empfohlen hat, liefert unbefriedigende Resultate. Die Reagenzien dringen zu langsam durch die Zellwand und sind dem Leben schädlich. Für physiologische Untersuchungen kann sie nicht in Betracht kommen.

Erfordernisse. Keine einzige der älteren Methoden entsprach den Erfordernissen, die ich gestellt hatte. Ich wünschte nämlich über eine Methode zu verfügen, die geeignet war, bei derselben Zelle von Zeit zu Zeit den Gerbstoffgehalt mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen und eine eventuelle Zunahme oder Abnahme mit Gewißheit zu konstatieren, ohne sie zu töten oder ihr zu schaden. Das Bedürfnis einer derartigen Methode hatte sich fühlbar gemacht bei der Untersuchung verschiedener abnormaler Zellen, wie mehrkerniger, kernloser und solcher mit viel, wenig und ohne Chromatophoren. Während ich durch Messungen das Wachstum einer beliebigen Zelle bestimmen konnte und aus der Größe der Stärkeherde schließen konnte, ob ihr Stärkegehalt zugenommen oder abgenommen hatte, war es mir nicht möglich, zu konstatieren, ob ihr Gerbstoffgehalt sich geändert hatte.

Antipyrin und Koffein. Von den gut 60 Stoffen, die ich als Gerbstoffreagenzien geprüft habe, gehören Antipyrin, Koffein und Pyramidon zu den am wenigsten schädlichen. Dies gilt besonders für Antipyrin und Koffein. Die genannten Stoffe gehören überdies zu denjenigen, welche schnell durch die Zellwand und das Protoplasma dringen und bald im Zellsaft die schon beschriebenen Präzipitate hervorrufen, die bei Übertragung der Spirogyrafäden in Wasser bald verschwinden, wonach die Zellen wieder ganz normal aussehen und sich zu den meist verschiedenen Reagenzien wieder verhalten wie Zellen, mit welchen noch nicht experimentiert worden war.

Auf Grund dieser Tatsachen habe ich die Wirkung des Antipyrins und Koffeins ausführlich studiert, um ihren Wert für physiologische Untersuchungen genau kennen zu lernen. Hierbei habe ich darauf geachtet, ob die Fällung des Gerbstoffes im Zellsaft vollständig ist, welche Konzentration die Lösungen im Zusammenhang hiermit haben müssen, ob die Stärke des Präzipitates der Quantität des Gerbstoffes entspricht, auf welche Weise man am besten die Stärke der Niederschläge bestimmen kann, ob

<sup>1)</sup> Büttner, R., Über Gerbsäure-Reaktionen in der lebenden Pflanzenzelle. [Inaug.-Diss.] Erlangen 1890. p. 13 u. 24.

die Fällung vielleicht von anderen in der Zelle anwesenden Stoffen beeinflusst wird und inwiefern Antipyrin und Koffein dem Leben schädlich sind.

Wie oben erwähnt wurde, fließen die kleinen, beweglichen Kügelchen der Niederschläge, die eine 1-proz. Antipyrinlösung und eine 1-proz. oder  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeinlösung im Zellsaft hervorrufen, allmählich zu großen Kugeln zusammen. Bringt man Spirogyrafäden mit derartigen Kugeln in eine Ferrichloridlösung, so nehmen die Kugeln bald eine blaue Farbe an, während der Zellsaft nicht blau gefärbt wird. Zwar gibt Antipyrin mit Ferrichlorid eine rotviolette Färbung, aber die dabei entstehende Verbindung verbreitet sich bald in der Flüssigkeit, sodaß auch bei Anwendung des Antipyrins die Gerbstoffreaktion bei den Kugeln deutlich wahrnehmbar ist, während sie im Zellsaft nicht eintritt, wenn nämlich das Ferrichlorid schnell einwirkt. Bringt man die Spirogyrafäden aus der Antipyrin- oder Koffeinlösung in eine 1-proz. Osmiumsäurelösung, so werden die Kugeln anfangs blau und bald darauf schwarz, während der Zellsaft ungefärbt bleibt (Fig. 5).

Aus den obenerwähnten Versuchen geht hervor, daß der Gerbstoff durch eine 1-proz. Antipyrinlösung und eine  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeinlösung vollständig oder fast vollständig gefällt wird, denn sonst hätte auch der Zellsaft mit Ferrichlorid oder Osmiumsäure Blau- oder Schwarzfärbung zeigen müssen.

Aus Versuchen mit Lösungen verschiedener Stärke ging hervor, daß, wenn man eine vollständige oder fast vollständige Präzipitation wünscht, man am besten keine verdünnteren Lösungen als die obengenannten anwenden muß.

Zur Lösung der Frage, ob die Stärke der Antipyrin- und Koffeinniederschläge der Stärke der Niederschläge und Färbungen, welche andere Reagenzien hervorbringen, entspricht, stellte ich vergleichende Experimente an mit 1-proz. Antipyrin- und  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeinlösung und verschiedenen anderen Gerbstoffreagenzien, wie Kaliumbichromat, Osmiumsäure und Ferrisalzen, bei Spirogyrazellen mit einem verschiedenen Gerbstoffgehalt. Für diese Experimente dienten Spirogyrafäden, die einige Wochen zuvor zentrifugiert worden waren, und in welchen neben normalen auch allerlei abnormale Zellen vorkamen, wie kernlose, chromatophorenfreie, mehrkernige usw., mit sehr verschiedenem Gerbstoffgehalt.

Erst behandelte ich die Fäden mit der Antipyrin- oder Koffeinlösung und notierte die Stärke der Niederschläge in den verschiedenen Zellen; darauf brachte ich die Fäden in Wasser und, als die Niederschläge sich vollständig gelöst hatten, in eine Lösung von Kaliumbichromat, Osmiumsäure oder Ferrichlorid, wonach ich wieder die Stärke der erzielten Reaktionen notierte. Bei Vergleichung der verschiedenen Notierungen zeigte es sich, daß die Stärke der Antipyrin- und Koffeinniederschläge übereinstimmte mit der Stärke der Reaktionen der anderen Reagenzien und deshalb dem Gerbstoffgehalt der Zellen entsprach.

Die Stärke der Niederschläge mit Antipyrin und Koffein bestimmte ich auf verschiedene Weise. So beachtete ich, ob der

Kern, den man bei *Spirogyra maxima* unter normalen Bedingungen sehr deutlich beobachten kann, nach der Präzipitation des Gerbstoffes noch wahrnehmbar war. Weiter untersuchte ich, ob die Aufhängefäden, die Chromatophoren und die Stärkeherde oben und unten in der Zelle noch sichtbar waren. Um festzustellen, in welchen Zellen die Niederschläge am stärksten waren, verglich ich nach der Präzipitation die verschiedenen Zellen miteinander. Auch beachtete ich, in welchen Zellen der Niederschlag zuerst erschien und nach Übertragung in Wasser am längsten wahrnehmbar blieb. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß der Niederschlag zuerst in den Zellen mit dem größten Gerbstoffgehalt auftritt und daß er in diesen Zellen nach Übertragung in Wasser auch am längsten wahrnehmbar bleibt.

Auch experimentierte ich mit Antipyrin- und Koffeinelösungen verschiedener Stärke. Zu diesem Zweck hatte ich 10 Antipyrinlösungen von 0,1 bis einschließlich 1 Proz. und 10 Koffeinelösungen von 0,01 bis einschließlich 0,1 Proz. bereitet. Die Spirogyren kamen zuerst in die schwächeren Lösungen und allmählich in die stärkeren. Vergleichende Versuche mit Lösungen von Antipyrin, Koffein, Tannin und Spirogyragerbstoff von verschiedener Stärke hatten mich gelehrt, daß, je größer der Gerbstoffgehalt ist, desto schwächer die Lösung ist, die eine noch gerade wahrnehmbare Fällung hervorruft.

Bei Mischung von gleichen Volumina der Gerbstofflösungen und der Antipyrin- oder Koffeinelösungen erhielt ich folgende Resultate:

0,6-proz. Antipyrinlösung	mit	0,1-proz. Tanninlösung	Präzipitat
0,5	"	"	geringes Präzipitat
0,4	"	"	klar
0,4	"	"	sehr gering. Trübung
0,3	"	"	klar
0,3	"	"	geringe Trübung
0,2	"	"	klar
0,08-proz. Koffeinelösung	"	0,1	Präzipitat
0,07	"	"	klar
0,07	"	"	Präzipitat
0,06	"	"	geringes Präzipitat
0,05	"	"	klar
0,05	"	"	klar
0,4-proz. Antipyrinlösung	"	1-proz. von Sp.-Gerbstoff	Präzipitat
0,3	"	"	sehr gering. Präzip.
0,2	"	"	klar
0,07-proz. Koffeinelösung	"	1	Präzipitat
0,06	"	"	geringes Präzipitat
0,05	"	"	klar

Was für Tanninlösungen und für Lösungen von Spirogyragerbstoff gilt, gilt auch für den gerbstoffhaltigen Zellsaft. So erhielt ich z. B. in Spirogyrafäden, die reichlich mit Stärke ausgestattet waren, mit 0,2-proz. Antipyrinlösung kein Präzipitat, mit

0,3-proz. nach einigen Momenten ein sehr geringes, mit 0,4-proz. sofort ein deutliches und mit 1-proz. ein reichliches Präzipitat; mit 0,03-proz. Koffeidlösung kein Präzipitat, mit 0,04-proz. ein geringes, mit 0,05-proz. ein deutliches und mit 0,1-proz. ein reichliches Präzipitat. Aus obigen Angaben folgt, daß eine Antipyrinlösung ungefähr siebenmal so stark sein muß als eine Koffeidlösung, will man denselben Effekt erreichen.

Außer den obenerwähnten Verdünnungen können auch noch mit Erfolg zwischenliegende angewendet werden. So konnte ich z. B. bei gerbstoffreichen Spirogyren mit einer 0,02-proz. Koffeidlösung nur in einem Teile der Zellen eine schwache Fällung konstatieren, während ich mit einer 0,022-proz. Koffeidlösung in allen Zellen ein deutliches Präzipitat erhielt.

Im Zellsaft der Pflanze können verschiedene Stoffe vorkommen, wie Salze, Zuckerarten, organische Säuren usw.; es frug sich, ob vielleicht einige dieser Stoffe die Präzipitation des Gerbstoffes durch Antipyrin und Koffein hemmen können. Bei den angestellten Versuchen zeigte es sich, daß organische Säuren tatsächlich hemmend einwirken können. Eine wässrige Flüssigkeit, die 0,15 Proz. Tannin und 0,15 Proz. Antipyrin enthält, ist trübe; eine ähnliche Flüssigkeit, die überdies noch 0,15 oder 0,3 Proz. Zitronensäure enthält, ist weniger trübe und eine, die 1 Proz. Zitronensäure enthält, ist klar. Eine Flüssigkeit, die 0,2 Proz. Tannin und 0,02 Proz. Koffein enthält, ist viel trüber als eine Flüssigkeit, die überdies noch 1 Proz. Zitronensäure enthält. Mit Weinsteinsäure erhält man ähnliche Resultate.

Wie oben schon besprochen worden ist, kann im Spirogyrazellsaft keine freie Säure nachgewiesen werden. Man darf darum annehmen, daß für den Nachweis des Gerbstoffes die Anwesenheit von eventuellen Spuren freier Säure von sehr geringer oder gar keiner Bedeutung ist, und zwar um so sicherer, weil die Gerbstoffreagenzien in Überschuß angewendet werden.

Untersuchungen über die Schädlichkeit des Antipyrins und Koffeins. Bei den vorläufigen Versuchen hatte es sich schon gezeigt, daß die Spirogyren in den Lösungen einiger Gerbstoffreagenzien Stunden und Tage lang lebendig bleiben konnten. Besonders war das der Fall mit Antipyrin- und Koffeidlösungen, mit denen ich eine Anzahl vergleichende Versuche anstellte.

Ich brachte übereinstimmende Stückchen von Spirogyrafäden in sterilisiertes Grabenwasser oder destilliertes Wasser und in Antipyrin- oder Koffeidlösungen verschiedener Stärke, welche mit demselben Wasser bereitet worden waren. In jedem Stückchen bestimmte ich die Länge einiger nacheinander folgenden Zellen, die sich in der Mitte des Stückchens befanden. In jedem Falle wiederholte ich einige Male diese Messungen, jedesmal nach einer Periode von einem oder mehreren Tagen. Zu den Versuchen dienten Spirogyren, die reichlich mit Stärke und Gerbstoff ausgestattet waren.

In den folgenden Tabellen habe ich angegeben: Die Art der Flüssigkeit, den Antipyrin- und Koffeingehalt in Prozenten, die Data,

die Zahl der bei dem Anfang des Versuches gemessenen Zellen und die Zahl der Zellen nach jeder Periode, welche eventuell durch Teilung zugenommen hatte, beide Zahlen mit fett gedruckten Ziffern, das durchschnittliche Längenwachstum der Zellen in jeder Periode und das totale Längenwachstum, beide in Prozenten.

Die Tabellen I bis einschließlich XII beziehen sich auf den Einfluß des Antipyrins und Koffeins. Die Tabellen XIII, XIV und XV habe ich hinzugefügt, um die Ziffern in den 12 ersten Tabellen besser beurteilen zu können.

Tabelle I.

Antipyrin, Grabenwasser, April 1909.

Proz. Antip.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.
0	<b>4</b>	<b>5</b> 12,2	<b>6</b> 10,9	<b>7</b> 19,4	<b>9</b> 14,4	<b>9</b> 13	<b>9</b> 5,9	<b>11</b> 8,5	<b>11</b> 7,5	<b>11</b> 5,4
$\frac{1}{16}$	<b>5</b>	<b>6</b> 9,5	<b>6</b> 8,2	<b>6</b> 14,8	<b>6</b> 13,8	<b>6</b> 10,6	<b>6</b> 5	<b>7</b> 4,1	<b>7</b> 2,8	<b>7</b> 2,3
$\frac{1}{8}$	<b>5</b>	<b>6</b> 10,6	<b>6</b> 4	<b>6</b> 8	<b>6</b> 9,3	<b>6</b> 8,2	<b>6</b> 3	<b>6</b> 4,4	<b>6</b> 1,9	<b>6</b> 3,2
$\frac{1}{4}$	<b>4</b>	<b>6</b> 2,8	<b>6</b> 2,4	<b>6</b> 2,1	<b>6</b> 2,8	<b>6</b> 1,9	<b>6</b> 2,3	<b>6</b> 1	<b>6</b> 1,6	<b>6</b> 0,3
$\frac{1}{2}$	<b>6</b>	<b>6</b> 2,3	} keine Zellteilungen und kein meßbares Längenwachstum.							
1	<b>6</b>	<b>6</b> 0,7								

Tabelle II.

Antipyrin, Grabenwasser, Mai 1909.

Proz. Antip.	18.	22.	26.
0	<b>4</b>	<b>9</b> 142,6	<b>16</b> 62,1
$\frac{1}{4}$	<b>4</b>	<b>8</b> 7,5	<b>8</b> 14,8
$\frac{1}{2}$	<b>2</b>	<b>2</b> 13,3	<b>2</b> 0,5
1	<b>3</b>	<b>3</b> 0,9	tot

Tabelle III.

Antipyrin, Grabenwasser (stets 18° C).

Dezember 1910 und Januar 1911.

Proz. Antip.	15. XII.	22. XII.	29. XII.	5. I.	12. I.
0	<b>4</b>	<b>14</b> 99,8	<b>32</b> 132,3		
0	<b>4</b>	<b>9</b> 101,8			
0,1	<b>4</b>	<b>8</b> 55,6	<b>16</b> 72,8	<b>16</b> 40	<b>20</b> 19,1
0,2	<b>4</b>	<b>4</b> 30,4	<b>4</b> 53,4	<b>12</b> 7,3	<b>12</b> 11,8
0,4	<b>4</b>	<b>4</b> 4,8	<b>4</b> 5	<b>5</b> 13,1	<b>5</b> 10,8
0,8	<b>4</b>	viele Zellen tot.			

Tabelle IV.  
Antipyrin, Grabenwasser (stets 18° C), Dezember 1910.

Proz. Antip.	5. XII.	12. XII.
0	4	8
0	4	8
0,1	4	8
0,2	4	8
0,4	4	4
0,8	4	4
		100
		85,5
		47
		19,8
		5,2
		0,1

Tabelle VA.  
Antipyrin, destilliertes Wasser, Juni 1909.

Proz. Antip.	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.	18.	20.	22.	24.											
0	4	4	17,9	8	24,9	8	2,5	8	0,4														
1/100	4	6	14,7	6	28,1	6	4,5	6	5,5	6	0,7	6	7,3	7	13	7	7,6	7	1	7	5,5	7	6
1/25	4	4	10,6	8	18,9	8	20,7	8	17,1	12	12,1	16	14	16	8,6	16	4,8	16	2,2	16	2,1	16	2,1
1/10	4	5	7,9	8	13,1	8	8,9	8	13,9	8	6,7	8	5,6	8	4,3	8	6,2	8	6,3	8	1	8	1

0 12. Juni die meisten Zellen tot.  
 1/100 9. Juli die meisten Zellen tot.  
 1/25 30. Juni viele Zellen tot.  
 1/10 30. Juni viele Zellen tot.

Tabelle VB (gehört zu VA).  
Totales Längenwachstum vom Anfang des Versuches an.

Proz. Antip.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.	18.	20.	22.	24.
0	17,9	47,3	51	51,7							
1/100	14,7	46,9	53,6	62	63,2	75,2	97,9	113	115,6	127,4	176,7
1/25	10,6	31,5	58,7	87,9	110,6	140	160,7	173,4	179,8	185,7	
1/10	7,9	22	32,9	51,3	61,4	70,4	78	89,1	101	103,9	

Tabelle VI.  
Antipyrin, kohlensäureanhydridfreies destilliertes Wasser.  
Juni und Juli 1909.

Proz. Antip.	24. VI.	26. VI.	28. VI.	30. VI.	2. VII.	4. VII.
0	2	2	19,5	2	10,3	3
0	2	2	18,5	3	4,8	4
1/100	2	3	25	3	5,1	3
1/25	2	2	17,9	2	10,4	2
1/10	2	2	11,7	2	2,1	0
						2,7
						5,3
						0,2
						0
						6
						2,9
						0,2
						4
						4,9

Tabelle VII.  
Koffein, Grabenwasser, April 1909.

Proz. Koff.	24.	25.	26.	27.
0	4	8	8	8
$\frac{1}{80}$	6	8	9	9
$\frac{1}{80}$	5	7	8	8
$\frac{1}{40}$	4	4	4	4
$\frac{1}{20}$	3	3	3	3
$\frac{1}{10}$	6	6	6	

Tabelle VIII.  
Koffein, Grabenwasser, Juli 1909.

Proz. Koffein	Zellen 6. Juli	Zellen 8. Juli	Wachstum vom 6.—8. Juli	Zellen 10. Juli	Wachstum v. 8.—10. Juli	totales Wachstum bis 10. Juli	Zellen 12. Juli	Wachstum v. 10.—12. Juli	totales Wachstum bis 12. Juli	Zellen 14. Juli	Wachstum v. 12.—14. Juli	totales Wachstum bis 14. Juli
0	4	8	25,8	11	42,8	79,7	19	65,9	198,1	43	75,4	442,8
0	4	8	16,8	8	39,2	62,6						
$\frac{1}{100}$	4	8	12,2	8	28,7	44,3	16	52,9	120,7	30	47,2	228,8
$\frac{1}{10}$	4	4	1,9	4	1,3	3,2	4	0,4	3,6	4		
1	4	4	1,4	4	0,6	2	4	0,1	2,1	4		

Tabelle IX.  
Koffein, Grabenwasser (stets 18° C), Februar 1911.

Proz. Koff.	2.	9.	16.	23.
0	4	11	32	32
0	5	18	48	59
0,01	4	8	17	25
0,02	4	4	4	7
0,08	4	4	4	4

Tabelle X.  
Koffein, Grabenwasser (stets 18° C), Januar 1911.

Proz. Koff.	23.	30.
0	5	26
0	4	16
0,01	4	16
0,02	6	6

Tabelle XI.

Antipyrin, Koffein, Grabenwasser, August 1909.

No. 1 und 2 stets in Grabenwasser. No. 3, 4 und 5 12. und 13. August  $\frac{1}{2}$  Stunde und 14., 15., 16. und 17. August 10 Minuten in 1% Antipyrinlösung, 0,1% Koffeinlösung oder 1% Koffeinlösung.

	12.	14.	16.	18.	totales Wachstum	
No. 1 stets in Grabenwasser	4	8 44,5	8 30,2	15 31,7	147,6	
No. 2 stets in Grabenwasser	4	8 24,9	8 23,8	9 30,9	102,5	
No. 3 täglich in 1% Antip.	4	6 21,7	8 29,6	9 32,7	109,2	
No. 4 täglich in 0,1% Koff.	4	8 16,8	8 21,5	8 26	78,9	
No. 5 täglich in 1% Koff.	4	8 26,4	8 43,1	8 24,3	124,9	

Tabelle XII.

Antipyrin, Koffein, Grabenwasser, Juli 1909.

No. 1 stets in Grabenwasser, No. 2, 3 und 4 26., 27., 28. und 29. Juli 10 Minuten, 30. Juli 15 Minuten und 31. Juli 20 Minuten in 1% Antipyrinlösung, 0,1% Koffeinlösung oder 1% Koffeinlösung.

	26.VII.	28. VII.	30. VII.	1. VIII.	totales Wachstum	
No. 1 stets in Grabenwasser	4	8 64	15 71,2	16 47,5	314	
No. 2 täglich in 1% Antip.	4	8 80,6	14 69,5	16 45,8	346,4	
No. 3 täglich in 0,1% Koff.	4	8 74,8	16 56,5	16 49,2	308,5	
No. 4 täglich in 1% Koff.	4	8 45,6	14 90,1	16 50,5	316,4	

Tabelle XIII.

Einfluß der Erneuerung des Grabenwassers. Januar und Februar 1911.

No. 1 und 2 am Fenster, Temperatur nicht konstant. No. 3 und 4 im Brutschrank, Temperatur stets 19° C.

	20. I.	27. I.	3. II.	10. II.
No. 1 Grabenw. nicht erneut .	4	4 29,3	8 43,1	8 15
No. 2 20. Jan. in neues Grabenw.	4	4 22	16 65,2	16 35,9
No. 3 Grabenw. nicht erneut	4	12 116,2	12 40	14 30,1
No. 4 20. Jan. in neues Grabenw.	4	12 149,9	42 209,2	±100 131,2

Tabelle XIV.

Verschiedenheiten beim Wachstum normaler Zellen.

Anfang des Versuches 27. November.

	2. XII.	11. XII.	25. XII.	4. II.
Zelle No. 1	1 28	1 30	2 28	2 52
Zelle No. 2	1 22	1 34	2 30	2 58
Zelle No. 3	1 18	1 25	1 20	2 47
Zelle No. 4	1 19	1 34	1 16	2 48

## Tabelle XV.

Verschiedenheiten beim Wachstum normaler Zellen.

Anfang des Versuches 2. Mai.

	5. V.		9. V.		13. V.	
Zelle No. 1	2	27	4	74	8	78
Zelle No. 2	2	20	4	83	8	81
Zelle No. 3	1	26	2	52	4	80
Zelle No. 4	1	30	2	45	4	53
Zelle No. 5	2	29	4	82	8	68
Zelle No. 6	2	26	4	97	8	87

Bei der Beurteilung der Schädlichkeit des Antipyrins und Koffeins habe ich besonders acht gegeben auf das Längenwachstum der Spirogyrazellen. Im allgemeinen darf man annehmen, daß das Längenwachstum geringer, je nachdem die schädliche Einwirkung größer ist. Ein genauer Maßstab ist das Längenwachstum jedoch nicht. Es ist das Resultat vieler Faktoren. Bisweilen kann ein gewisser Faktor, z. B. das Licht, unter gewissen Bedingungen, hemmend auf das Wachstum einwirken, ohne daß man darum von einem schädlichen Einfluß reden darf. Auch muß man beachten, daß das Wachstum normaler Zellen fortwährend der Veränderung unterliegt und daß das Wachstum von Zellen, die sich in demselben Faden nebeneinander befinden, und selbst von Schwesterzellen bisweilen sehr verschieden ist (Tab. XIV und XV). Allerlei bekannte und unbekannte Faktoren beeinflussen das Wachstum. Die Übertragung der Spirogyren in neues sterilisiertes Grabenwasser z. B. befördert das Wachstum. Das Resultat ist nicht sofort, sondern erst nach einigen Tagen merkbar (Tabelle XIII, Nr. 1 und 2). Es zeigte sich nicht nur nach Übertragung in neues Grabenwasser, sondern auch noch Übertragung in sehr verdünnte, mit Grabenwasser bereitete Antipyrin- und Koffeinlösungen.

Aus obigem geht hervor, daß man aus den Ziffern, welche die Versuche mit Antipyrin und Koffein ergeben haben, nur mit größter Vorsicht Schlüsse ziehen darf und daß man kleine Verschiedenheiten außer Betracht lassen muß.

Die Zufügung von Antipyrin oder Koffein zu dem Grabenwasser in so großer Quantität, daß im Zellsaft Fällung des Gerbstoffes stattfindet, ist gewiß dem Leben schädlich. Das Längenwachstum ist dann sehr gering oder hört ganz auf. Kern- und Zellteilungen finden nicht mehr statt. Die Zellen zeigen allerlei Abnormalitäten. Die Chromatophoren werden längs der Wand verschoben und der Kern verliert seine Stelle im Zentrum der Zelle. Nach einigen Tagen, oft erst nach einigen Wochen, sterben die Zellen, während die im Grabenwasser kultivierten Spirogyren kräftig weiter wachsen. Derartige Resultate erhielt ich, wenn dem Grabenwasser 0,5, 0,8 oder 1 Proz. Antipyrin oder 0,1 oder 1 Proz. Koffein zugefügt worden war (Tabelle I, II, III, IV, VII, VIII, IX und X).

Vergleichende Versuche mit 1-proz. Antipyrin- und 0,1-proz. Koffeinlösung zeigten, daß letztere Lösung minder schädlich war. Nach einigen Wochen waren in der Koffeinlösung alle oder fast alle Zellen noch lebendig, während in der Antipyrinlösung alle oder fast alle abgestorben waren.

Wenn soviel Antipyrin oder Koffein dem Grabenwasser zugefügt war, daß kein oder nur ein geringes Präzipitat entstand, nämlich  $\frac{1}{4}$  Proz. Antipyrin oder  $\frac{1}{50}$  oder  $\frac{1}{80}$  Proz. Koffein, war das Wachstum noch gering, aber doch schon von einiger Bedeutung. (Vergl. die obengenannten Tabellen.) Im allgemeinen war der nachteilige Einfluß geringer. Bisweilen kamen jedoch noch Abweichungen im Wachstum vor; so sah ich z. B. in den Koffeinlösungen oft unvollständig entwickelte Scheidewände.

Andere Resultate erzielte ich, wenn ich dem Grabenwasser noch weniger Antipyrin oder Koffein zugefügt hatte, nämlich  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{25}$  oder  $\frac{1}{10}$  Proz. Antipyrin oder  $\frac{1}{100}$  Proz. Koffein. (Vergl. die obengenannten Tabellen.) Die Spirogyren behielten ihr normales Aussehen; die Kern- und Zellteilungen hatten gewöhnlich einen normalen Verlauf, traten aber in einer geringeren Anzahl auf als in den in Grabenwasser kultivierten Spirogyren, während das Längenwachstum auch geringer war. Die Antipyrin- und Koffeinlösungen üben in diesem Fall einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum und auf die Vermehrung der Spirogyrazellen aus.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Präzipitation des Gerbstoffes eine Rolle bei der Hemmung und bei dem Aufhören des Längenwachstums spielt. Diese Erscheinungen werden aber nicht ausschließlich durch die Bindung des Gerbstoffes verursacht, denn auch bei *Cladophora*, bei welcher Pflanze man keinen Gerbstoff nachweisen kann, findet in Antipyrinlösungen Hemmung oder Stillstand des Wachstums statt. Bei *Cladophora glomerata* erhielt ich, was das Längenwachstum der Zellwand betraf, folgende Resultate:

	Längenwachstum von 3 Zellen vom 7. bis 12. Juli	Zellenvermehrung vom 7. bis 12. Juli
In dem Wasser, in welchem die Fäden in der Natur wuchsen	95%	von 3 bis 7 Zellen
In demselben Wasser mit $\frac{1}{10}$ % Antipyrin	32%	von 3 bis 5 Zellen
In demselben Wasser mit 1 % Antipyrin.	0%	keine Vermehrung

Die Frage, ob der Einfluß des Antipyrins und Koffeins unter allen Bedingungen für das Leben schädlich sei, darf man nicht bejahen. Dies zeigte sich bei vergleichenden Versuchen mit Spirogyren, die in verdünnte Lösungen von Antipyrin in destilliertem Wasser und in destilliertes Wasser übertragen wurden. (Vergl. Tabelle V A und V B.) Die hemmende Einwirkung des Antipyrins auf das Wachstum war anfangs sehr merkbar, aber allmählich

änderte sich das und später waren die Spirogyren in den Antipyrinlösungen in einer günstigeren Kondition als die, welche sich im destillierten Wasser befanden. Das Wachstum, und zwar auch das totale Wachstum, war bei ersteren bedeutender geworden, während sie auch länger lebendig blieben. Nachdem diese Resultate erzielt worden waren, erhob sich die Frage, ob die Spirogyren vielleicht auch das Antipyrin mit Vorteil verwerten können.

Versuche mit Spirogyren in kohlensäureanhydridfreiem, destilliertem Wasser und in kohlesäurenanhydridfreien Antipyrinlösungen, welche mit destilliertem Wasser bereitet worden waren, lieferten keine bestimmten Resultate (Tabelle VI).

Nachdem die Versuche mit Antipyrin und Koffein zu dem Resultate geführt hatten, daß schwache Lösungen dieser Stoffe dem Leben nicht immer nachteilig sind, studierte ich den Einfluß täglicher kurzer Einwirkungen der benutzten stärkeren Lösungen. Falls es sich zeigte, daß z. B. eine tägliche Einwirkung einer 1-proz. Antipyrinlösung oder einer  $\frac{1}{10}$ -proz. oder 1-proz. Koffeinlösung während 10 Minuten keinen schädlichen Einfluß ausübte, würde man in diesen Lösungen für physiologische Untersuchungen sehr wertvolle Gerbstoffreagenzien besitzen. Eine Zeit von 10 Minuten reicht aus, um allen oder fast allen Gerbstoff zu fällen und den Gerbstoffgehalt zu beurteilen. Die Spirogyren können danach mit Grabenwasser ausgewaschen werden und darin fortwachsen. Von Zeit zu Zeit würde man deshalb dieselben Zellen untersuchen können, ohne ihnen zu schaden.

Im Zusammenhang hiermit habe ich bei Spirogyren, die ich in sterilisiertem Grabenwasser kultivierte, mit 1-proz. Antipyrin- und  $\frac{1}{10}$ - und 1-proz. Koffeinlösungen vergleichende Versuche angestellt. (Vergl. Tabelle XI und XII.) Das Resultat dieser Versuche war, daß ich durchaus nicht konstatieren konnte, daß ein täglicher Aufenthalt von 10, 15, 20 oder 30 Minuten in den obengenannten Lösungen einen schädlichen Einfluß auf die Spirogyren ausübte. In allen Lösungen behielten die Spirogyren ein ganz normales Aussehen. Bald war das Wachstum der Zellen, die fortwährend in Grabenwasser gewesen waren stärker, bald dasjenige der Zellen, die periodisch mit Antipyrin- oder Koffeinlösung behandelt worden waren. Die Ursache der beobachteten Verschiedenheiten muß vielmehr in den untersuchten Zellen selbst, als in der Behandlung gesucht werden, denn das Wachstum verschiedener Zellen in einer normalen und derselben Nahrungsflüssigkeit zeigt gleichfalls Verschiedenheiten. (Vergl. Tabelle XIV und XV.)

Auf Grund der obenerwähnten Resultate nehme ich an, daß ein täglicher, kurzer Aufenthalt der Spirogyrafäden in den obengenannten Lösungen für das Wachstum und den Lebensprozeß im allgemeinen nur sehr geringe oder gar keine Bedeutung hat. Für physiologische Untersuchungen kann ich die angegebene Methode deshalb sehr empfehlen.

## Über die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes.

Über den gegenwärtigen Stand des Problems. Die Meinungen der Forscher über die physiologische Bedeutung der Gerbstoffe sind immer sehr verschieden gewesen. Th. Hartig<sup>1)</sup> nahm an, daß die Gerbstoffe sich an dem Aufbau des pflanzlichen Organismus beteiligen. Schleiden<sup>2)</sup> dagegen sah in dem Gerbstoff nur ein Zersetzungsprodukt der Zellwand. In Übereinstimmung mit der Ansicht Hartigs kam Wigand<sup>3)</sup> zu dem Schlusse, daß der Gerbstoff einen wesentlichen Faktor im chemischen Prozeß des Pflanzenlebens bildet, und zwar physiologisch als ein Glied in der Reihe der Kohlenhydrate, auf deren Bildung und Umbildung vorzugsweise der Lebensprozeß der Pflanze beruht, zu betrachten ist. Im Gegensatz zu der Stärke, die sich als Reservestoff in den Ruhezeiten der Vegetation bildet, gehört nach Wigand der Gerbstoff im allgemeinen in die Reihe der flüssigen, aktiven, die bildende Tätigkeit bedingenden Stoffe. In gewissen Fällen scheint er jedoch, nach dem genannten Forscher, auch als Reservestoff zu fungieren. Aus obigem geht hervor, daß nach Wigand der Gerbstoff ein höchst bedeutendes Produkt des Stoffwechsels im Pflanzenleben ist. Kein anderer Forscher hat dies so deutlich und entschieden behauptet.

Die Ansicht Wigands ist besonders von Sachs bestritten worden, während sie im allgemeinen unter den Botanikern wenig Beistimmung gefunden hat, was unter anderm folgt aus dem Abschnitt über die physiologische Bedeutung der Gerbsäuren in Czapeks Biochemie der Pflanzen<sup>4)</sup>, wo die Ansicht Wigands mit der Th. Hartigs<sup>5)</sup> über das Gerbmehl als Sitz des Gerbstoffes und des organisierten Reservestoffes zu den irrigen Auffassungen über die physiologische Rolle der Gerbsäuren gerechnet wird. Wigand hat seine Beobachtungen, auf denen seine Folgerungen beruhen, nicht ausführlich mitgeteilt, was wahrscheinlich dazu beigetragen hat, daß andere Autoren sie bald zurückgewiesen haben.<sup>6)</sup>

Die Ansicht über die Rolle der Gerbstoffe, zu welcher Sachs<sup>7)</sup> auf Grund seiner Untersuchungen über die Keimung verschiedener

<sup>1)</sup> Hartig, Th., Entwicklungsgeschichte des Pflanzenkeims. 1858. p. 103.

<sup>2)</sup> Schleiden, M. J., Grundzüge der wissenschaftlichen Botanik. 1861. p. 141.

<sup>3)</sup> Wigand, A., Einige Sätze über die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes und der Pflanzenfarbe. (Bot. Zeitung. Jahrg. 20. 1862. p. 121 u. 129.)

<sup>4)</sup> p. 588.

<sup>5)</sup> Hartig, Th., Das Gerbmehl. (Bot. Zeitung. Jahrg. 23. 1865. p. 53.) Weitere Mitteilungen das Gerbmehl betreffend. (Bot. Zeitung. Jahrg. 23. 1865. p. 235.)

<sup>6)</sup> Vergl. Kutscher, Emil, l. c. p. 37.

<sup>7)</sup> Sachs, J., Physiologische Untersuchungen über die Keimung der Schminkbohne (*Phaseolus multiflorus*). (Sitzber. d. Kais. Akad. d. Wiss. Wien. Bd. 37. 1859. p. 57.) — Zur Keimungsgeschichte der Dattel. (Bot. Zeitung. Jahrg. 20. 1862. p. 241 u. 249.) — Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen. 1865. p. 360.)

Samen gekommen ist, hat mehr Eingang gefunden als die Ansicht Wigands. Sachs betrachtete die bei der Keimung sich bildenden Gerbstoffe nur als Exkretionsprodukte, Nebenprodukte oder Zersetzungsprodukte. Er fand es sehr unwahrscheinlich, daß die Gerbstoffe irgendwie als Baumaterial an der Gewebebildung sich beteiligen.

Die Resultate einiger anderer Forscher schließen sich denjenigen von Sachs an. So kommt z. B. Kraus<sup>1)</sup>, der sich besonders für die physiologische Bedeutung der Gerbstoffe interessiert hat, zu der Konklusion, daß der gebildete Gerbstoff sich in keinem Fall mehr an dem Stoffwechsel beteiligt. Nach Gerber<sup>2)</sup> verschwinden die Gerbstoffe durch Oxydation, ohne daß dabei Kohlenhydrate entstehen. Af Klercker<sup>3)</sup> betrachtet die Gerbstoffe als Exkretionsprodukte. Waage<sup>4)</sup> nennt sie Nebenprodukte des Stoffwechsels. Büsgen<sup>5)</sup> behauptet, daß die gemachten Beobachtungen in keinem Fall uns zu der Annahme berechtigen, daß der Gerbstoff als Baustoff fungiert. Dagegen spielt nach Schulz<sup>6)</sup> der Gerbstoff in den immergrünen Blättern die Rolle eines Reservestoffes.

Nach einigen Forschern muß man die Gerbstoffe in einigen Fällen als Exkretionsprodukte oder als Nebenprodukte des Stoffwechsels betrachten, während sie in anderen Fällen sich an dem Stoffwechsel beteiligen und zu Baumaterial dienen. Derartige Resultate haben Schell<sup>7)</sup>, Kutscher<sup>8)</sup> und Westermaier<sup>9)</sup> erzielt.

Nach Schroeder<sup>10)</sup> ist der Gerbstoff der Birke (*Betula alba* L.) und des Ahorns (*Acer platanoides* L.) kein Reservestoff und auch kein Exkretionsprodukt. Wahrscheinlich bildet er, sagt genannter Forscher, ein Endprodukt des Stoffwechsels, während es weiteren Untersuchungen vorbehalten bleibt, über die physiologische Bedeutung zu entscheiden.

Bei vielen Forschern hat die Meinung Eingang gefunden, daß die Gerbstoffe dazu dienen, die Pflanzen gegen äußere, schädliche Einwirkungen zu schützen. Dieselben könnten sehr verschieden sein. Stahl<sup>11)</sup> behauptet, daß der Gerbstoff wegen seines unan-

<sup>1)</sup> Kraus, G., Grundlinien einer Physiologie des Gerbstoffes. 1889. p. 38 u. 44.

<sup>2)</sup> Gerber, C., Rôle des tannins dans les plantes et plus particulièrement dans les fruits. (Compt. rend. T. 124. p. 1106.)

<sup>3)</sup> l. c. p. 50.

<sup>4)</sup> l. c. p. 250.

<sup>5)</sup> l. c. p. 59. — Erläuterung zu dem Referat über Beobachtungen etc. (Bot. Zeitung. 1890. p. 381.)

<sup>6)</sup> l. c. p. 256.

<sup>7)</sup> Schell, J., Physiologische Rolle der Gerbsäure. Kazan 1874. [Russisch.] (Botan. Jahresber. Jahrg. III. 1875. p. 876.)

<sup>8)</sup> l. c. p. 73.

<sup>9)</sup> Westermaier, M., Zur physiol. Bedeutung des Gerbstoffes in den Pflanzen. (Sitzungsber. d. königl. preuß. Akad. d. Wissensch. Berlin. Jahrg. 1885. Halbbd. 2. p. 1124 u. 1125.)

<sup>10)</sup> Schroeder, J., Die Frühjahrsperiode der Birke (*Betula alba* L.) und des Ahorns (*Acer platanoides* L.). (Die landwirtsch. Versuchs-Stat. Bd. XIV. 1871. p. 146.)

<sup>11)</sup> Stahl, Ernst, Pflanzen und Schnecken. (Jenaisch. Zeitschr. f. Naturw. Bd. XXII. N. F. Bd. XV. p. 590 u. 594.)

genehmen Geschmacks als Schutzmittel gegen Tiere, besonders gegen Schnecken, dient. Auch Kraus<sup>1)</sup> ist der Meinung zugetan, daß der Gerbstoff ein Schutzmittel sei, und zwar nicht nur gegen Tierfraß, sondern auch gegen Fäulnis.

Bei Pflanzen mit überwinternden Laubblättern ist Warning<sup>2)</sup> zu dem Schluß gekommen, daß der Gerbstoffreichtum des Hautgewebes vielleicht ein Schutzmittel gegen Austrocknen bildet, im Winter gegen die für die Vegetation besonders gefährlichen, kalten, trockenen Winde schützt und zur schnellen Wiederherstellung des verlorenen Turgors dient. Schell<sup>3)</sup> findet es wahrscheinlich, daß der Gerbstoff in Samen ein Schutzmittel gegen äußere, schädliche Einflüsse bildet. Auch Büsgen<sup>4)</sup> nimmt an, daß der Gerbstoff die Pflanze schützt.

Andere Autoren haben den Gerbstoffen wieder andere Funktionen zugeschrieben. Nach Gerber<sup>5)</sup> verhindern sie in den Früchten die pectischen Umwandlungen und die Gärung des Zuckers. Pfeffer<sup>6)</sup> findet es sehr wahrscheinlich, daß die Rolle der Gerbstoffe auch darin besteht, daß sie Zucker und andere Stoffe in den Zellen festhalten. Kutscher<sup>7)</sup> glaubt, daß der Gerbstoff als Respirationsmittel dient und im Atmungsprozeß einer Oxydation anheimfällt.

Im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel in den Pflanzen sind den Gerbstoffen noch verschiedene andere Rollen zugeschrieben worden. So nahm Wigand<sup>8)</sup> an, daß die roten Farbstoffe aus Gerbstoffen entstehen, mit welcher Ansicht unter anderen Pick<sup>9)</sup>, Mielke<sup>10)</sup> und Tschirch<sup>11)</sup> einverstanden sind. Einige meinen, daß der Gerbstoff mit der Harzbildung zusammenhängt. Wiesner<sup>12)</sup> glaubt, daß die Stärke und die Zellwand sich in Gerbstoff umwandeln können und nachher in Harz. Auch Schell<sup>13)</sup> und Mielke<sup>14)</sup> betrachten den Gerbstoff als einen Übergang von Stärke zu Harz

<sup>1)</sup> l. c. p. 21.

<sup>2)</sup> Warning, E., Beobachtungen über Pflanzen mit überwinternden Laubblättern. (Botan. Centralbl. Jahrg. IV. Bd. 16. 1883. p. 350.)

<sup>3)</sup> l. c. p. 877.

<sup>4)</sup> l. c. p. 58.

<sup>5)</sup> l. c.

<sup>6)</sup> Pfeffer, W., Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. (Untersuch. a. d. botan. Institut. Tübingen. Bd. 2. 1886—1888. p. 310.)

<sup>7)</sup> l. c. p. 73.

<sup>8)</sup> l. c.

<sup>9)</sup> Pick, H., Über die Bedeutung des roten Farbstoffes bei den Phanerogamen und die Beziehungen desselben zur Stärkewanderung. (Botan. Centralbl. Jahrg. IV. 1883. p. 284.)

<sup>10)</sup> Mielke, G., Über die Stellung der Gerbsäure im Stoffwechsel der Pflanzen. (Progr. d. Realschule vor d. Holstentore in Hamburg. 1893; Ref. Botan. Centralblatt. Bd. 59. 1894. p. 281.)

<sup>11)</sup> Tschirch, A., Schweiz. Wochenschr. f. Pharm. No. 7; Pharm. Zentralbl. 1891. p. 141.)

<sup>12)</sup> Wiesner, J., Über die Entstehung des Harzes im Inneren der Pflanzenzellen. (Sitzber. d. Wien. Akad. Bd. 52. Abt. II. 1865. p. 126 u. 129; Ref. Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Chem. 1865. p. 627.)

<sup>13)</sup> l. c.

<sup>14)</sup> l. c.

und von Zellulose zu Harz. Beide nehmen aber auch an, daß der Gerbstoff sich in Stärke umwandeln kann. Bastin und Trimble<sup>1)</sup> sind auf Grund ihrer Untersuchungen über die Harzgänge der Koniferen auch der Ansicht, daß Gerbstoff und Harzbildung miteinander zusammenhängen.

Nach Buignet<sup>2)</sup> beteiligt der Gerbstoff sich in den Früchten an der Bildung des Zuckers und nach Stadler<sup>3)</sup> liefert er in den Nektarien von *Oenothera* und *Saxifraga* das Material zur Bildung des Honigs.

Im Zusammenhang mit dem Studium der physiologischen Bedeutung der Gerbstoffe und des Stoffwechsels in den Pflanzen muß man auch die Ansichten der Botaniker über Wanderung und Entstehung der Gerbstoffe berücksichtigen. Einige Forscher nehmen an, daß die Gerbstoffe in den Pflanzen wandern können, nämlich Kraus, Moeller und Westermaier. Nach Kraus<sup>4)</sup> wandert der Gerbstoff als Gerbstoff. Moeller<sup>5)</sup> glaubt, daß die Kohlenhydrate in der Gestalt von Gerbstoffverbindungen wandern. Westermaier<sup>6)</sup> läßt es unentschieden, ob der Gerbstoff als Gerbstoff wandert und ob die Stärke in der Gestalt von Gerbstoff oder eines löslichen Kohlenhydrates wandert.

Über die Entstehung der Gerbstoffe in den Pflanzen haben die Botaniker sehr verschiedene Ansichten. Wie oben erwähnt, ist nach Schleiden<sup>7)</sup> der Gerbstoff ein Zersetzungsprodukt der Zellwand. Nach Th. Hartig<sup>8)</sup> bildet sie sich beim Keimungsprozeß von *Quercus pedunculata* aus Stärke. Auch nach Schell<sup>9)</sup> entsteht bei der Keimung der Samen von *Faba vulgaris* und *Pisum sativum* Gerbstoff aus Stärke. Mielke<sup>10)</sup> nimmt an, daß die Gerbstoffe aus Kohlenhydraten, aus Gerbstoffglucosiden und auch aus Stärke und Zellulose entstehen. Nach Westermaier<sup>11)</sup> sind die Gerbstoffe Assimilationsprodukte, aber er behauptet auch, daß sie sich bei Zersetzung von Eiweißkörpern bilden können. Schroeder<sup>12)</sup> nimmt an, daß sie in den Pflanzen aus organischer Substanz durch Oxydation gebildet werden. Kraus<sup>13)</sup> glaubt, daß sie bei der Syn-

1) Bastin E., a. Trimble, H., A contribution to the knowledge of some North Amerikan Coniferae. (Amer. Journ. Pharm. Vol. 68. 1896.)

2) Buignet, H., Recherches sur la matière sucrée contenue dans les fruits acides, son origine, sa nature et ses transformations. (Compt. rend. T. 51. p. 894.)

3) Stadler, S., Beiträge zur Kenntnis der Nektarien und der Biologie der Blüten. Berlin 1886.

4) l. c. p. 20.

5) l. c. p. LXXX.

6) Westermaier, M., Neue Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Bedeutung des Gerbstoffes in den Pflanzengeweben. (Sitzber. d. kgl. preuß. Akad. d. Wiss. Berlin. Jahrg. 1887. Halbbd. 1. p. 134.)

7) l. c. p. 141.

8) l. c. p. 102.

9) l. c.

10) l. c.

11) Zur physiol. Bedeutung des Gerbstoffes in den Pflanzen. (l. c. p. 1124.)

12) l. c. p. 146.

13) Grundlinien. p. 47.

these der Eiweißkörper aus amidartigen Substanzen entstehen. Durch die Untersuchungen von Moeller<sup>1)</sup> an den Blättern von *Ampelopsis hederacea* und von Büsgen<sup>2)</sup> an keimenden Samen von *Vicia Faba* und abgeschnittenen Blättern auf 10-proz. Glucoselösung ist die Entstehung des Gerbstoffes aus Zucker angezeigt worden.

Kraus<sup>3)</sup> und Westermaier<sup>4)</sup> haben in einigen Fällen nachgewiesen, daß die Bildung der Gerbstoffe von dem Einfluß des Lichtes abhängig ist.

Aus obigem geht hervor, daß die Ansichten der Botaniker über die physiologische Bedeutung der Gerbstoffe sehr verschieden sind. Man kann sie der Hauptsache nach wie folgt zusammenfassen: Nach einigen sind die Gerbstoffe für die Pflanzen ohne Wert und Abfallprodukte des Stoffwechsels. Andere betrachten die Gerbstoffe als Schutzmittel gegen verschiedene schädliche, äußere Einflüsse. Nur wenige glauben, daß die Gerbstoffe sich an dem Aufbau des pflanzlichen Organismus beteiligen. Einige meinen, daß sie in den Pflanzen verschiedene Funktionen haben können.

Daß die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes noch so wenig geklärt worden ist, wird verschiedenen Ursachen zugeschrieben. Nach Czapek<sup>5)</sup> haben bisweilen einzelne auf mikroskopischem oder chemischem Wege festgestellte Tatsachen zur Generalisierung und zur Ausarbeitung unhaltbarer Theorien Veranlassung gegeben. Dekker<sup>6)</sup> weist überdies auf die Unvollkommenheit der Untersuchungsmethoden und die einseitige Anwendung derselben hin, was Verwechslung von Gerbstoffen mit anderen Pflanzenstoffen veranlaßt hat. Nach meiner Meinung muß die Hauptursache darin gesucht werden, daß man beim Ziehen der Schlüsse oft viel zu wenig Kritik geübt hat. Das physiologische Gerbstoffproblem ist gewiß sehr schwer, weil man bei seiner Lösung eine große Anzahl von Faktoren berücksichtigen muß. Diese Faktoren sind uns mehr oder weniger bekannt, aber auch unbekanntere können eine Rolle spielen. Darum muß man beim Ziehen der Schlüsse sich der größten Vorsicht befleißigen. Wenn man eine Erklärung einer beobachteten Erscheinung gibt, muß man reiflich erwägen, ob sie die einzig mögliche sei und muß man durch Anstellung vergleichender Versuche versuchen, sie zu beweisen. Dies alles hat bei weitem nicht in einem solchen Maße stattgefunden, wie es das schwierige Problem erfordert. Infolge einzelner Beobachtungen haben viele Forscher Erklärungen gegeben, während andere auch sehr plausibel waren, oder die Ansichten anderer Forscher bestritten, die vielleicht eine richtigere Einsicht hatten, aber dafür auch keine hinreichenden

1) Moeller, Mitt. d. naturw. Ver. f. Neu-Vorpomm. u. Rügen in Greifswald. 1887.

2) l. c. p. 34 und 35.

3) Grundlinien. p. 20 u. 44.

4) Zur physiol. Bedeutung des Gerbstoffes in den Pflanzen. (l. c. p. 1117.) Neue Beiträge etc. (l. c. p. 128 u. 133.)

5) l. c. p. 588.

6) l. c. D. I. p. 210 u. 211.

Gründe anführen konnten. Selbst ernsthafte Forscher sind in diesen Fehler verfallen. Mit einem Beispiele werde ich dies erläutern. Ich werde nämlich zeigen, aus welchen ungenügenden Gründen die Ansicht, daß die Gerbstoffe als Baumaterial dienen, verworfen worden ist.

Wie oben schon erwähnt wurde, glaubt Sachs nicht, daß die Gerbstoffe als Baumaterial bei der Gewebebildung fungieren. Diese Ansicht wird von Sachs teils durch Beobachtungen, teils durch einen, nach meiner Meinung falschen Schluß gestützt. Sachs<sup>1)</sup> stellte fest, daß bei der Keimung von Samen, die keinen Gerbstoff im Endosperm oder im Embryo enthalten, bei der Gewebebildung Gerbstoffe erscheinen und zwar zuerst da, wo die Gewebebildung gerade angefangen hat. Nie sah er während der Keimung die Gerbstoffe verschwinden oder sich vermindern. In anderen Fällen, nämlich bei der Eichel und der Kastanie, wo der Embryo Gerbstoffe enthält, nahm er auch keine Verminderung wahr, vielmehr sogar noch eine Vermehrung. Ähnliche Beobachtungen machte er bei der Entwicklung von Knospen. Sachs zieht aus den mitgeteilten Tatsachen den Schluß, daß die Gerbstoffe an den Stellen, wo sie gebildet werden, liegen bleiben und daß sie sich deshalb nicht an der Gewebebildung beteiligen, denn, wenn dies der Fall wäre, so hätte man eine Verminderung wahrnehmen müssen. Dieser Schluß ist nicht richtig. Auf Grund der Beobachtungen von Sachs hätte man ebensogut einen andern ziehen können, nämlich den, daß die Gerbstoffe im Zusammenhang mit ihrem häufigen Auftreten bei der Gewebebildung sehr wahrscheinlich dabei eine Rolle spielen. Nach meiner Meinung hat Sachs durchaus nicht bewiesen, daß der Gerbstoff an der Stelle, wo er gebildet wird, auch liegen bleibt und daß er nicht als Baumaterial bei der Gewebebildung dient. Wenn nämlich bei der Keimung der Samen mehr Gerbstoff sich gebildet hat, als umgewandelt wird, braucht keine Abnahme des Gerbstoffgehalts stattzufinden, sondern es wird sogar eine Zunahme stattfinden können. Für die Reservestoffe, wie Stärke und fettes Öl, darf man nicht annehmen, daß sie sich direkt an der Bildung der Zellwände beteiligen. Sie müssen erst in lösliche Stoffe umgewandelt werden. Angenommen, daß der Gerbstoff zu dieser Kategorie gehört, das heißt, zu den Baustoffen, die im gelösten Zustande in der Pflanze vorkommen, kann es nicht Wunder nehmen, daß für die Erhaltung des Wachstums dieser Baustoff fortwährend in genügender Quantität vorhanden ist, und daß, wenn von demselben aus dem Reservestoff mehr produziert als beim Wachstum der Zellwände verwendet wird, der Gerbstoffgehalt auch zunehmen kann. Bewiesen ist es wenigstens nicht, daß der Gerbstoff, weil keine Abnahme desselben stattfindet, an der Stelle, wo er gebildet wird, ohne verwendet zu werden, liegen bleibt und nicht zum Aufbau der Zellwände dient.

<sup>1)</sup> Physiol. Unters. über die Keimung der Schminkbohne. (l. c. p. 111.) — Zur Keimungsgeschichte der Dattel. (l. c. p. 246.). — Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen. 1865. p. 361.

Wie Sachs nimmt auch Kraus<sup>1)</sup> an, daß eine Zunahme des Gerbstoffgehalts bei der Keimung beweist, daß dieser Stoff nicht verwendet wird und nicht als Baustoff dient. Auf Grund quantitativer Bestimmungen des Gerbstoffgehalts kommt er bei der Keimung der Eichel zu dem Schlusse, daß nicht nur kein Gerbstoff verwendet wird, sondern daß auch seine Quantität noch zunimmt und daß er deshalb nicht dem Wachstume dient.

Während Sachs bei der Keimung der Samen nur eine Zunahme des Gerbstoffgehalts konstatieren konnte, konnte Schell<sup>2)</sup> bei einigen Pflanzen eine Zunahme und bei anderen eine Abnahme oder ein Verschwinden feststellen. Im ersten Fall nimmt Schell, in Übereinstimmung mit Sachs, an, daß die Gerbstoffe Nebenprodukte des Stoffwechsels seien, im letzten Falle aber betrachtet er sie als Baustoffe. Nach dem obenerwähnten versteht es sich, daß ich auch mit den Schlüssen Schells nicht einverstanden bin. Nach meiner Meinung ist man durch die Beobachtungen einer Zunahme des Gerbstoffgehalts in einigen Fällen und einer Abnahme in anderen noch nicht gezwungen, anzunehmen, daß die Gerbstoffe in verschiedenen Pflanzen sich ganz anders verhalten. Nehmen wir an, daß die Gerbstoffe Baustoffe sind, so kann es schon von den Quantitäten abhängen, die produziert und verwendet werden, ob eine Zunahme oder Abnahme stattfindet. Es kommt mir auch sehr wahrscheinlich vor, daß bei einer und derselben Pflanze bald Vermehrung, bald Verminderung des Gerbstoffgehalts eintritt.

Mehrere Botaniker nehmen an, daß die Gerbstoffe in den Pflanzen wandern können. Über die Weise, auf welche das stattfindet, sind die Ansichten verschieden, aber keine Meinungsverschiedenheit kann darüber vorliegen, daß die eventuelle Wanderung der Gerbstoffe die Lösung der Frage, ob sie als Baustoff dienen können, viel komplizierter und schwerer macht. Bei der Zunahme und Abnahme des Gerbstoffgehalts in einem Pflanzenteile spielen deshalb nicht allein die Produktion und Verwendung eine Rolle, sondern auch die Zufuhr und Abfuhr muß man dabei berücksichtigen. Nur die Tatsache, daß in einer Keimpflanze oder in einem Pflanzenteil Vermehrung und Verminderung des Gerbstoffes stattfindet, liefert keine Anhaltspunkte für die Lösung der Frage über seine Bedeutung als Baustoff.

Bevor ich die Besprechung der Resultate anderer Forscher abschließe, muß ich besonders die Aufmerksamkeit auf Untersuchungen recenten Datums richten, nämlich auf diejenigen von Francis E. Lloyd<sup>3)</sup> über die Entwicklung und Nahrung des Embryos, des Samens und der Frucht der Dattel, *Phoenix dactylifera*. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt er zu dem Schlusse, daß der Gerbstoff im Ei, Endosperm und Embryo eine bedeutende Rolle bei der Ernährung spielt, während er im Fruchtblatt ein Abfall-

<sup>1)</sup> Grundlinien. p. 38.

<sup>2)</sup> l. c. p. 876.

<sup>3)</sup> Lloyd, E. Francis, Development and Nutrition of the Embryo, Seed and Carpel in the Date, *Phoenix dactylifera* L. (From the 21. Ann. Report of the Missouri Botan. Garden. 1910. p. 157.)

produkt ist. Lloyd unterscheidet plastischen und aplastischen Gerbstoff. Der plastische Gerbstoff wandert, wird verwendet und verschwindet, woraus hervorgeht, daß er als Baumaterial dient. Der aplastische erscheint in besonderen Zellen und bleibt da liegen.

Die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes bei *Spirogyra maxima*. Wie aus obigem hervorgeht, haben die Botaniker bis jetzt zum Studium der physiologischen Bedeutung nur höhere Pflanzen gewählt. Das Studium des Problems bei einer niederen Pflanze, *Spirogyra maxima*, ist deshalb neu.

Wie oben erwähnt, hat die Ansicht, daß die Gerbstoffe zur Bildung der Zellwände dienen, im allgemeinen wenig Eingang und vielen Widerspruch gefunden. Mit Hilfe der von mir ausgearbeiteten Methode ist es mir aber jetzt bei *Spirogyra maxima* gelungen, Beobachtungen zu machen, die deutlich zeigen, daß der Gerbstoff eine bedeutende Rolle bei der Zellwandbildung spielt, daß er während dieses Prozesses verwendet wird und als Baumaterial dient.

Die Beobachtungen betreffen die Kopulation, die Zellteilung, pathologische Zellen, verschiedene Lichtstärke, Vorenthaltung des Kohlensäureanhydrids, zweikernige, kernlose, chromatophorenreiche und chromatophorenarme Zellen.

Kopulation (Fig. 16). Zellen, die Neigung zum Kopulieren zeigen, sind reichlich mit Gerbstoff ausgestattet. Während der Kopulation nimmt der Gerbstoffgehalt ab und in den vollwüchsigen Zygosporen, die mit Reservestoff gefüllt sind, kann man nur noch mit Ferrisalzen eine schwache Gerbstoffreaktion hervorrufen. Aus obigem geht noch nicht hervor, was mit dem Gerbstoff stattfindet, aber wenn man die Kopulation im einzelnen studiert, so zeigt es sich, daß es viele Gründe gibt, um anzunehmen, daß wenigstens ein Teil des Gerbstoffes als Baumaterial für die Zellwand dient. Die Kopulation ist ein Prozeß, der auf eine derartige Weise stattfindet, daß man erwarten darf, daß ihr Studium für unsere Kenntnis der physiologischen Bedeutung des Gerbstoffes bedeutende Anhaltungspunkte liefern wird. Die Kopulation fängt bei allen Zellen nicht gleichzeitig an; einige Zellen sind anderen voraus. Bei einer größeren oder kleineren Anzahl besteht offenbar die Neigung zum Kopulieren, aber die Kopulation gelingt nicht, und wieder andere zeigen keine Spur von diesem Prozesse. Während die kopulierenden Zellen viel Reservestoff als Fett und Stärke bilden, werden die nicht kopulierenden augenscheinlich sehr inhaltsarm und gehen zuletzt zu Grunde. Zufällige Umstände, wie die Berührung der Zellen mit Zellen anderer Fäden, die Nachbarschaft solcher Zellen, das Verhältnis der Zellen zueinander in Bezug auf ihre Lage, rufen die obenerwähnten Unterschiede hervor. Man kann sie beobachten bei Material, das vor der Kopulation ausschließlich aus gesunden, normalen Zellen besteht.

Was im Zusammenhang mit dem Gerbstoffproblem wichtig ist, ist, daß man bei kopulierenden Spirogyrafäden Zellen miteinander vergleichen kann, die kurz vorher noch vollkommen ähnlich waren und später mehr oder weniger bedeutende Unterschiede zeigen, welche durch zufällige natürliche Reize hervorgebracht sind. Inter-

essant ist es, bei diesen verschiedenen Zellen mit den empfohlenen Antipyrin- und Koffeinlösungen den Gerbstoffgehalt zu studieren und zu konstatieren, daß Unterschiede in der Entwicklung der Zellwand der Quantität des in den Zellen anwesenden Gerbstoffes entsprechen. Die kopulierenden Zellen bekommen dickere Wände und bilden seitliche Auswüchse, die zusammenwachsen. Bei den Zellen, die seitlich ausgewachsen und zusammengewachsen sind, ist der Gerbstoffgehalt bedeutend geringer als bei den Zellen, die nur den ersten Anfang des seitlichen Auswuchses zeigen. Beiderlei Zellen unterscheiden sich nur, was die Zellwand und den Gerbstoffgehalt betrifft; im übrigen sind sie einander noch vollkommen ähnlich. Sie liegen in den Fäden durcheinander. Aus obigem geht hervor, daß Zellwandbildung und Gerbstoffgehalt miteinander im Zusammenhang stehen; der Schluß, daß der Gerbstoff als Baumaterial dient, liegt auf der Hand.

Bemerkenswert ist besonders die bedeutende Gerbstoffzunahme in den Zellen, die keine Gelegenheit, zu kopulieren haben, und bei denen der Prozeß frühzeitig stehen geblieben ist. Diese Zellen gehen zuletzt zu Grunde. Gewöhnlich sind sie als inhaltsarm beschrieben worden. Sie fahren aber noch einige Zeit mit der Produktion des Gerbstoffes fort, und da der Gerbstoff nicht zur Zellwandbildung oder zur Bildung von Reservestoffen verwendet wird, nimmt der Gerbstoffgehalt bedeutend zu, und geht mit ihrem Tod eine beträchtliche Menge Baumaterial in Form von Gerbstoff verloren.

Der Verlust von Gerbstoff in der Natur, z. B. beim Blätterabfall im Herbst, ist mehrmals als Argument angeführt worden, daß der Gerbstoff kein Baumaterial sein kann und sich nicht an dem Stoffwechsel beteiligt. Ich bin mit dieser Ansicht nicht einverstanden; es nimmt mich nicht Wunder, daß Mengen eines Stoffes verloren gehen, den bestimmte Pflanzen für ihre Entwicklung bedürfen, und sehe darin überhaupt keinen Beweis, daß derselbe nicht als Baumaterial für die Entwicklung der Pflanzen dienen kann. Wie viel kommt in der Natur nicht zu seinem Recht und geht verloren, ohne seiner Bestimmung entsprechen zu können! Außerdem kommt es mir als erwünscht vor, daß die Pflanze über einen Überschuß von Baumaterial verfügen kann, damit sie durch Mangel desselben in ihrer Entwicklung nicht gestört wird. Daß der Stengel im Herbst nicht imstande oder in der Lage sei, aus den Blättern allen Gerbstoff oder, was von dem Überschuß in den Blättern übrig bleibt, in sich aufzunehmen, beweist noch nicht, daß der Gerbstoff nicht zum Aufbau der Gewebe dienen kann. Noch weniger kann es uns Wunder nehmen, daß bei *Spirogyra* Gerbstoff verloren geht, denn offenbar ist es hier nicht die Absicht der Natur, daß derselbe verloren gehen soll. Die Natur sorgt bei *Spirogyra* für eine genügende Menge Gerbstoff, da dieser Stoff für die Entwicklung nötig ist, wie es unter anderem bei der Kopulation und bei der Sporenbildung der Fall ist. Daß die Kopulation bisweilen mißlingt, wobei dann viel Gerbstoff verloren geht, beweist nicht, daß dieser Stoff z. B. ein Abfallprodukt ist und kein Baustoff sein kann.

Scheidewandbildung (Fig. 11, 12, 13 und 14). Eine zweite Reihe von Beobachtungen, die auch zeigen, daß der Gerbstoff eine Rolle bei der Zellwandbildung spielt, betrifft die Scheidewandbildung. Bei der Untersuchung von Spirogyrafäden, in denen sich teilende Zellen vorkamen, konnte ich wiederholt konstatieren, daß der Gerbstoffgehalt bei diesen Zellen etwas geringer war als bei denen, welche sich nicht teilten. Der Unterschied war nicht groß und mit einigen der üblichen Gerbstoffreagenzien, wie Ferrisalze und Kaliumbichromat, vielleicht selbst nicht nachweisbar, aber mit Antipyrin- und Koffeidlösungen konnte ich den Unterschied mit Gewißheit feststellen (Fig. 11). Nicht nur konnte ich deutlich beobachten, daß der Niederschlag mit Antipyrin- oder Koffeidlösung in den Zellen, die sich teilten, etwas geringer war als in anderen, sondern es zeigte sich auch, daß der Niederschlag in den sich teilenden Zellen etwas später erschien als in anderen und nach Übertragung der Spirogyren in destilliertes Wasser oder Grabenwasser auch etwas eher verschwand. Der Vollständigkeit halber erwähne ich noch, daß die Zellen, bei welchen die Kern- und Zellteilung eben angefangen hatte, und die nicht in Teilung begriffenen Zellen noch keinen Unterschied in dem Gerbstoffgehalt zeigten, aber wohl hatte der Gerbstoffgehalt abgenommen, wenn der Kern- und Zellteilungsprozeß in vollem Gange oder gerade beendet war.

Die obenerwähnten Resultate zeigen, daß die Abnahme des Gerbstoffgehaltes und der Kern- und Zellteilungsprozeß miteinander im Zusammenhang stehen. Dieser Prozeß besteht eigentlich aus 2 Prozessen, der Kernteilung und der Zellteilung, welche beide gleichzeitig stattfinden, und im Anschluß hiermit erhob sich die Frage, welcher Prozeß mit der Abnahme des Gerbstoffgehaltes zusammenhängt. Zur Lösung dieser Frage habe ich einige Versuche angestellt.

Wie ich schon erwähnt habe, finden keine Kern- und Zellteilungen mehr statt und hört das Wachstum der Zellen auf, wenn man die Spirogyrafäden in eine 1-proz. Antipyrin- oder in eine  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeidlösung bringt. In schwächeren Lösungen finden bisweilen Kernteilungen statt, während die Entwicklung der Scheidewände unvollkommen ist oder ganz unterbleibt. Derartige Erscheinungen beobachtete ich in Antipyrinlösungen von 0,2 und 0,4 Proz. und in Koffeidlösungen von  $\frac{1}{20}$  Proz. In noch schwächeren Lösungen sind, wie schon erwähnt, die Kern- und Zellteilungen normal, aber weniger zahlreich als unter normalen Bedingungen. Infolge dieser Beobachtungen erhob sich die Frage, welchen Einfluß eine 1-proz. Antipyrin- und eine  $\frac{1}{10}$ -proz. Koffeidlösung auf die Scheidewandbildung und die Karyokinese ausüben, wenn die sich teilenden Zellen und diejenigen, welche die ersten Symptome des Kern- und Zellteilungsprozesses zeigen, kurze Zeit in den genannten Lösungen verweilen. Ein kurzer Aufenthalt, z. B. von 10 oder 15 Minuten, übte keinen merkbaren Einfluß. Die Scheidewände zeigten nichts abnormales. Ein längerer Aufenthalt, z. B. einer halben Stunde, kann aber schon sehr störend einwirken. Verweilten Spirogyrafäden, in welchen Zellen vorkamen, die in Teilung be-

griffen waren oder sich bald teilen mußten, während  $1\frac{1}{2}$  Stunden in den genannten Lösungen, so konnte ich am nächsten Tage beobachten, daß die Scheidewandbildung stehen geblieben war oder verhindert worden war. Die Scheidewände, die in Entwicklung begriffen waren, waren nicht weiter gewachsen (Fig. 14), während in den Zellen, die im Begriff standen, sich zu teilen, oft überhaupt keine Scheidewandbildung stattgefunden hatte (Fig. 12). Der Zellteilungsprozeß war deshalb ganz unterdrückt worden.

Ganz anders verhielt sich der Kernteilungsprozeß. In allen Zellen, in welchen derselbe im Gange war oder die ersten Symptome zeigte, war der Prozeß weiter gegangen und zum Abschlusse gekommen. Das Resultat waren immer 2 normale Tochterkerne, die gewöhnlich in einiger Entfernung voneinander eine Stelle in der Zellachse erhalten hatten (Fig. 12 und 14).

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß eine Festlegung des Gerbstoffes durch Antipyrin und Koffein die Scheidewandbildung unterdrückt, aber nicht unmittelbar die Kernteilung beeinflußt. Auf Grund dieses Resultates nehme ich an, daß die obenerwähnte Abnahme des Gerbstoffgehaltes und die Scheidewandbildung miteinander im Zusammenhang stehen. Sowohl die Verhinderung der Scheidewandbildung durch Festlegung des Gerbstoffes als auch die Abnahme des Gerbstoffgehaltes während der Scheidewandbildung zeigen, daß Gerbstoff für die Scheidewandbildung nötig ist und verwendet wird.

Um diesem Schluß mehr Sicherheit zu gewähren, wurde auch bei *Cladophora* der Einfluß von Antipyrin auf die Scheidewandbildung studiert. Mit Ferrisalzen, Osmiumsäure und Antipyrin erhielt ich bei *Cladophora* keine Gerbstoffreaktion, und darum interessierte es mich, welchen Einfluß die Übertragung in eine 1-proz. Antipyrinlösung auf die Scheidewandbildung ausüben würde. Es zeigte sich, daß Scheidewände, die sich zu bilden angefangen hatten, fortwuchsen, bis sie vollendet waren. Dies war selbst der Fall, wenn die *Cladophora*-fäden während des ganzen Zellteilungsprozesses in der Antipyrinlösung blieben. Diese Resultate stützen auch die Ansicht, daß bei *Spirogyra* nur die Festlegung des Gerbstoffes die Scheidewandbildung zum Stillstand bringt oder verhindert. Bei *Cladophora*, wo bei der Scheidewandbildung kein Gerbstoff verwendet werden kann, verursacht eine 1-proz. Antipyrinlösung keinen Stillstand im Zellteilungsprozeß. Die einzige ungezwungene Erklärung der Resultate, die ich bei der Kopulation und bei der Scheidewandbildung erhielt, ist nach meiner Meinung die, daß Gerbstoff bei der Zellwandbildung als Baumaterial dient.

Die Einwirkung von Antipyrin oder Koffein während oder vielmehr kurz vor der Kern- und Zellteilung gibt uns ein neues Mittel, 2 und mehrkernige Spirogyrazellen zu erhalten. Wiederholt man den Versuch mit durch Einwirkung dieser Stoffe entstandenen zweikernigen Zellen, so bekommt man vierkernige, die oft keine Spur von Scheidewandbildung zeigen (Fig. 13).

Pathologische Zellen (Fig. 15). In den Spirogyrafäden beobachtet man bisweilen Zellen, deren Querwände eine derartige

Wölbung zeigen, daß man annehmen darf, daß in diesen Zellen der Turgor größer ist als in anderen Zellen. Sie unterscheiden sich überdies gewöhnlich noch durch einen größeren Stärkegehalt. Es zeigte sich, daß ihr Wachstum geringer war als das Wachstum anderer Zellen oder ganz zum Stillstand gekommen war.

Die folgende Angabe betrifft das Längenwachstum von 4 in einem Faden nacheinander folgenden Zellen, von denen die zweite die erwähnten Abweichungen zeigte.

Länge der Zellen 30. April 1913	resp. 126, 80, 143 und 140 $\mu$
Länge der Zellen 2. Mai 1913	resp. 146, 80, 164 und 157 $\mu$
Längenwachstum in Prozenten	resp. 15,9, 0, 14,7 und 12,1 %

Die genannten Symptome weisen auf einen krankhaften Zustand hin, denn oft konstatierte ich, daß die abnormalen Zellen sich nicht mehr teilten und zu Grunde gingen. Was die Ursache des abnormalen Zustandes ist, kann ich nicht sagen, aber es ist bemerkenswert, daß der Gerbstoffgehalt bei den abnormalen Zellen, wie es sich bei der Untersuchung mit Antipyrin- oder Koffeinlösung zeigt, größer als bei anderen Zellen und oft sehr beträchtlich ist. Wie bei den Zellen, bei welchen die Kopulation mißlingt, ist auch bei den obenbeschriebenen krankhaften Zellen der Stillstand im Wachstum mit einer Zunahme des Gerbstoffgehalts verbunden.

Wachstum unter dem Einfluß von verschieden starkem Licht. Wenn Spirogyren sich unter ungünstigen Bedingungen befinden, nimmt der Stärke- und Gerbstoffgehalt ab und wird das Wachstum gering. Läßt man Spirogyren unter dem Einfluß von verschieden starkem Licht wachsen, so ist anfangs das Längenwachstum derjenigen, die das meiste Licht empfangen, geringer, aber später, wenn sie mehr Stärke und Gerbstoff enthalten als die anderen, ist es stärker. Die folgenden Angaben betreffen die Zellenvermehrung und das Längenwachstum von Spirogyrazellen, die sich im Februar und März am Fenster gegen Süden in Grabenwasser in einem gläsernen und porzellanenen Gefäß befanden. Die Temperatur war nicht konstant, aber der Versuch war so angestellt worden, daß in beiden Fällen die Temperatur und die anderen Bedingungen stets vollkommen übereinstimmten. Ich ging am 22. Febr. von 2 Stückchen desselben Fadens aus, und in jedem Fall von 10 Zellen, die sich in der Mitte des Stückchens befanden.

	Zahl der Zellen.							
	22. II.	27. II.	5. III.	10. III.	14. III.	18. III.	22. III.	26. III.
im gläsernen Gefäß	10	10	20	20	40	40	83	159
im porzellanenen Gefäß	10	12	20	29	32	35	40	40
	Wachstum in Prozenten.							
im gläsernen Gefäß		16	11	37	39	35	73	53
im porzellanenen Gefäß		21	16	51	19	29	24	15

Nach meiner Meinung stimmen die obenerwähnten Resultate zu der Ansicht, daß der Gerbstoff zu Baumaterial dient. Das Licht

wirkt hemmend auf die Verlängerung der Zellen ein und befördert die Bildung der Stärke und des Gerbstoffes. Im Anfange des Versuches, wenn die Spirogyrazellen in beiden Gefäßen noch gleichviel Stärke und Gerbstoff enthalten, ist das Wachstum im Porzellangefäß stärker, aber später, wenn die Spirogyrenzellen im Glasgefäß mehr Baumaterial, Stärke und Gerbstoff, enthalten, ist das Wachstum bei letzteren stärker.

Wachstum in kohlenäureanhydridfreiem Wasser. Wenn man Spirogyren in kohlenäureanhydridfreies, destilliertes Wasser bringt, nehmen Stärke- und Gerbstoffgehalt ab, das Wachstum wird geringer und es werden die Zellteilungen seltener. Allmählich kommt das Wachstum zum Stillstand und es finden keine Zellteilungen mehr statt, und zuletzt gehen die Spirogyren zu Grunde. Wenn man für den Versuch sehr stärke- und gerbstoffreiche Spirogyren benutzt, finden noch zahlreiche Zellteilungen und ein bedeutendes Wachstum statt. Ein Stückchen Spirogyrafaden, das ich am 17. August in kohlenäureanhydridfreies, destilliertes Wasser gebracht hatte, war am 19. Oktober, also nach gut 3 Monaten, fünfmal länger geworden, während die Zahl der Zellen von 29 bis 81 zugenommen hatte. Zum Nutzen des Wachstums waren die Stärkeherde sehr klein geworden und hatte der Gerbstoffgehalt stark abgenommen. Am 19. November schien die Stärke ganz verschwunden zu sein. Später konnte ich mit Antipyrin und Koffein auch keinen Gerbstoff mehr nachweisen. Die Zellen waren mittlerweile sehr lang geworden, mehr als 400  $\mu$ . Erst nach ungefähr 5 Monaten gingen viele Zellen zu Grunde, wonach ich den Versuch beendete. Offenbar hatten die Zellen Monate lang von dem Stärke- und Gerbstoffvorrat gezehrt. Die beobachteten Erscheinungen stimmen zu der Ansicht, daß der Gerbstoff kein Exkretionsprodukt ist, sondern, wie die Stärke, als Baumaterial dient.

Zweikernige Zellen. Wie ich<sup>1)</sup> früher dargelegt habe, kann man, wenn man Spirogyren während oder vor der Karyokinese zentrifugiert, zweikernige Zellen erhalten mit einer doppelten Chromatophorenmasse. Es zeigte sich, daß der Gerbstoffgehalt dieser Zellen nach einigen Tagen zugenommen hatte. Danach nahm derselbe ab und nach 3 oder 4 Wochen war er bei den meisten zweikernigen Zellen wieder der gewöhnliche. Die ersten Tage ist das Längenwachstum bei den zweikernigen Zellen oft geringer als bei den normalen einkernigen. Danach kommt eine Periode, in welcher die zweikernigen stärker in die Länge wachsen und dicker werden. Während des Wachstums finden Kern- und Zellteilungen statt, wobei die zweikernigen Zellen gewöhnlich wieder zweikernige hervorbringen, aber auch wohl drei- und einkernige und die dreikernigen wieder dreikernige oder vier- und zweikernige; die drei- und vierkernige teilen sich bisweilen durch zwei Scheidewände in 3 Tochterzellen, wobei die 6 oder 8 Tochterkerne sich über die 3 Tochterzellen verteilen.

Die folgende Tabelle dient dazu, das verschiedene Verhalten der zweikernigen und normalen einkernigen Zellen in Grabenwasser

<sup>1)</sup> Zur Physiol. d. Spirogyrazelle. (l. c. p. 156 ff.)

zu erläutern. Das Wachstum der Zellen und ihrer Nachkommen in den verschiedenen Perioden ist in Prozenten angegeben. Die Zahl der Zellen ist zwischen Klammern gesetzt. Am 3. November wurde zentrifugiert:

	8. Nov.	13. Nov.	18. Nov.	23. Nov.	28. Nov.
zweikernige	8,5	60 (2)	95,7 (3)	69,2 (4)	30,7 (6)
einkernige	10,9	50 (2)	51,1 (3)	51,8 (4)	22 (4)
einkernige	12,7	42,7 (2)	49,7 (3)	48,7 (4)	19 (4)

Das Wachstum (in Grabenwasser) der zweikernigen Zellen und ihrer Nachkommen ist bisweilen sehr verschieden. Zur Erläuterung dienen die folgenden 2 Beispiele, die 2 Paar zweikernige Schwesterzellen betreffen. Zahl und Art ihrer Nachkommen sind zwischen Klammern angegeben.

Länge d. Zellen 9. Mai.	Wachstum in Proz. vom 9. bis 13. Mai	Wachstum in Proz. vom 13. bis 20. Mai
144 $\mu$	34 (1 zweik.)	23,3 (1 zweik.)
124 $\mu$	78,2 (1 dreik. und 1 eink.)	139,4 (2 dreik. und 3 eink.)
124 $\mu$	32,3 (1 zweik.)	50 (1 dreik. und 1 eink.)
112 $\mu$	67 (2 zweik.)	179,1 (4 zweik.)

Die schwächer wachsenden zweikernigen Zellen unterscheiden sich von anderen zweikernigen Zellen durch stärkeren Turgor und größeren Gerbstoffgehalt.

Die Resultate bei den zweikernigen Zellen schließen sich an andere an. Die anfängliche Zunahme des Gerbstoffgehaltes bei geringerem Wachstum und die Abnahme, wenn das Wachstum stärker wird, und auch der große Gerbstoffgehalt bei den wenig wachsenden Zellen sind Resultate, die man im Zusammenhang mit dem schon erwähnten erwarten konnte und die zu der Ansicht, daß auch der Gerbstoff als Baumaterial dient, stimmen.

Kernlose Zellen. In der Natur findet man bisweilen kernlose Spirogyrazellen, und künstlich kann man diese auf verschiedene Weise hervorrufen. Sie bilden sich z. B., wenn man die Spirogyrazellen vor oder während der Kern- und Zellteilung zentrifugiert. Die auf diese Weise erhaltenen kernlosen Zellen enthalten eine größere oder kleinere Chromatophorenmasse, oder sind ganz chromatophorenfrei. Sie können einige Wochen lebendig bleiben. Früher habe ich<sup>1)</sup> nachgewiesen, daß in den kernlosen Zellen die verschiedensten Lebensprozesse stattfinden. Im allgemeinen halten sie aber nicht lange an und sind weniger intensiv als in normalen Zellen. Ich konnte konstatieren, daß die folgenden Prozesse in den kernlosen Zellen vor sich gehen: Zellwandbildung, Längenwachstum, Stärke-

<sup>1)</sup> Zur Physiol. d. Spirogyrazelle. (l. c. p. 164 ff.)

bildung, Stärkeverwendung, Wachstum der Chromatophoren, Bildung von Stärkeherden mit Pyrenoiden, Bildung von Fett, Zunahme des Plasma, Zunahme des Turgors und Entstehung von sehr kräftigen Plasmaströmungen. Auch fand ich es als wahrscheinlich, daß der Gerbstoffgehalt zunehmen konnte, was ich jetzt mit Hilfe von Antipyrin- und Koffeinlösungen festgestellt habe.

Es erregte mein Interesse, daß der Gerbstoffgehalt bei den kernlosen Zellen bisweilen sehr verschieden war. Bald war er gering, bald sehr beträchtlich. Um diese merkwürdige Erscheinung einigermaßen erklären zu können, habe ich mittelst der Zentrifugiermethode kernlose Zellen hervorgebracht und bei jeder kernlosen Zelle während einiger Wochen die Veränderungen beobachtet und mittelst Antipyrin- und Koffeinlösungen den Gerbstoffgehalt studiert. Ich kam dabei zu den folgenden Resultaten: In kernlosen Zellen ohne Chromatophoren nahm der Gerbstoffgehalt stets zu. Ebenso verhielten sich kernlose Zellen, in denen höchstens nur ein paar sehr kleine Stückchen von Chromatophoren vorkamen. Befand sich darin etwas Stärke, so wurde diese verwendet. Der Turgor nahm in keinem der beiden Fälle zu, bisweilen wohl aber ab. Die kernlosen Zellen mit einer nicht sehr geringen Chromatophorenmasse verhielten sich mehr oder weniger verschieden. Drei Erscheinungen erregten besonders die Aufmerksamkeit, nämlich die Zunahme der Stärke, des Turgors und des Gerbstoffes. Diese 3 Erscheinungen traten nicht immer zu gleicher Zeit ein. Wenn die Chromatophorenmasse gering war, fand bisweilen anfangs selbst eine bedeutende Abnahme der Stärke statt und trat erst später Zunahme ein, welche zu einer überflüssigen Anhäufung von Stärke in den Chromatophoren führte. Die Zunahme des Turgors tritt gleichfalls früher oder später ein, bisweilen nach einigen Tagen, bisweilen erst nach zwei oder drei Wochen. Eigentümlich ist die Änderung des Gerbstoffgehaltes. Nach einigen Tagen hatte er immer bedeutend abgenommen. Ungefähr eine Woche nach dem Zentrifugieren war diese Abnahme besonders merkbar. Danach nahm der Gerbstoffgehalt allmählich zu und zuletzt war er sehr beträchtlich. Im allgemeinen konnte man sagen, daß erst der Stärkegehalt zunahm, dann der Turgor und zuletzt der Gerbstoff.

Das Längenwachstum der in Grabenwasser befindlichen kernlosen Zellen mit und ohne Chromatophoren ist auch verschieden. Es betrug in 18 Tagen (von dem 5. bis zu dem 23. Tage nach dem Zentrifugieren) bei chromatophorenhaltigen Zellen 3, 5.5, 5.6, 6.8 und 8.8 Proz., bei einer fast chromatophorenfreien Zelle 10,5 Proz., in 15 Tagen (von dem 4. bis zum 19. Tage nach dem Zentrifugieren) bei einer chromatophorenhaltigen Zelle 3 Proz. und bei einer chromatophorenfreien 14,3 Proz.

Bei einem Versuche im Brutschrank (27° C.) erhielt ich folgende Resultate: Bei den chromatophorenhaltigen Zellen, die reichlich Stärke bildeten, betrug das Wachstum in 4 Tagen (von dem 3. bis zum 7. Tag nach dem Zentrifugieren) 7.1, 8, 8.4, 9.5, 11.3 und 12.2 Proz. und bei den chromatophorenfreien und denjenigen, die nur Spuren von Chromatophorenmasse enthielten, woraus die eventuell

anwesende Stärke verschwand, 10.5, 11.5, 11.8, 12.8, 13.9 und 15.8 Proz.

Es war nun die Frage, welche Folgerungen man auf Grund der Resultate bei kernlosen Zellen machen darf. Es kommt mir vor, daß die Resultate zu der Ansicht, daß der Gerbstoff als Baumaterial dient, stimmen. Bei den kernlosen Zellen hören das Längenwachstum und die Zellwandbildung, das heißt die Bildung neuer Zellwandschichten durch Apposition, bald auf. Die Produktion der Stärke und des Gerbstoffes dauert fort, und da sie nicht verwendet werden, sind sie beide bald im Überschuß anwesend. In diesem Falle ist deshalb auch Stillstand des Wachstums mit Anhäufung von Baumaterial verbunden.

Aus der bedeutenden Zunahme des Gerbstoffes in den kernlosen, chromatophorenfreien Zellen geht hervor, daß der Gerbstoff nicht unmittelbar von den Kernen oder Chromatophoren gebildet wird. Es ist aber nicht ausgeschlossen und selbst wahrscheinlich, daß sie auf indirekte Weise sich an der Gerbstoffbildung beteiligen, nämlich durch Absonderung verschiedener Stoffe, als Enzyme oder Zucker.

Interessant ist das verschiedene Verhalten der chromatophorenhaltigen und chromatophorenfreien Zellen. In letzteren findet bald Gerbstoffzunahme statt, in ersteren Wachstum der Chromatophoren, was ich früher und auch jetzt wieder feststellen konnte, eine bedeutende Zunahme der Stärke und des Turgors und eine anfängliche Abnahme des Gerbstoffes. Nach meiner Meinung weisen diese Erscheinungen auf eine Korrelation zwischen Chromatophoren und Gerbstoff hin. Das Wachstum der chromatophorenhaltigen ist wie das Wachstum der chromatophorenfreien gering, ja sogar oft noch geringer. Man darf deshalb nicht annehmen, daß in den chromatophorenhaltigen im Anfang mehr Gerbstoff verwendet wird, aber wohl daß die anfängliche Abnahme des Gerbstoffgehaltes mit der Anwesenheit der Chromatophoren im Zusammenhang steht.

Die Chromatophoren können die Gerbstoffbildung unmittelbar befördern. Im allgemeinen gilt, je mehr Stärke die Chromatophoren produzieren, um so mehr Gerbstoff enthält der Zellsaft. Unter bestimmten Bedingungen aber, wie z. B. in den kernlosen Zellen, scheinen die Chromatophoren auch eine Abnahme des Gerbstoffgehaltes veranlassen zu können. Vielleicht kann man diese Erscheinung einigermaßen vergleichen mit dem Verschwinden des Gerbstoffes in den Zygosporien, wenn diese mit Reservestoffen, Stärke und Fett, sich füllen.

Chromatophorenreiche und chromatophorenarme Zellen. Wenn kräftig wachsende Spirogyren zentrifugiert werden, entstehen bei der Kern- und Zellteilung oft chromatophorenreiche und chromatophorenarme, einkernige Schwesterzellen. Diese Zellen sind in mancher Hinsicht verschieden. Erstere wachsen und vermehren sich schneller als normale Zellen und sind bald reicher an Stärke als diese. Die chromatophorenärmeren wachsen und vermehren sich langsamer als normale und enthalten weniger Stärke als letztere. Die folgenden Angaben mögen dieses erläutern:

Am 27. April zentrifugierte ich Spirogyren und studierte darauf 6 chromatophorenreiche Zellen, ihre 6 chromatophorenarmen Schwesterzellen und 6 Zellen mit normaler Chromatophorenmasse aus demselben Faden. Das durchschnittliche Wachstum (in Grabenwasser) der verschiedenen Zellen ist hierunten in Prozenten angegeben. Die Zahl der Zellen und ihrer Nachkommen am Ende jeder Periode ist in Klammern gefaßt:

2. Mai	vom 2. bis zum 5. Mai	vom 5. bis zum 9. Mai	vom 9. bis zum 13. Mai
reiche (6)	30,1 (12)	123,6 (28)	97,6 (55)
arme (6)	10,8 (6)	61,3 (11)	58,1 (18)
normale (6)	26 (10)	72,1 (20)	74,5 (40)

Die folgenden Angaben betreffen das Wachstum chromatophorenreicher und chromatophorenarmer Schwesterzellen. Das Wachstum (in Grabenwasser) ist in Prozenten angegeben; die Länge der Zellen und die Zahl der Zellen, Tochterzellen, Enkeltochterzellen usw. am Ende jeder Periode ist in Klammern gefaßt:

## Zentrifugiert 3. November.

8. Nov.	vom 8. bis zum 13. Nov.	vom 13. bis zum 18. Nov.	vom 18. bis zum 23. Nov.	vom 23. bis zum 28. Nov.
reich (136 $\mu$ )	54,6 (2)	69,2 (4)	56,2 (4)	29,2 (7)
arm (126 $\mu$ )	32,5 (2)	34 (2)	38,1 (2)	19,8 (3)
reich (123 $\mu$ )	63,4 (2)	57 (3)	56 (4)	29,4 (6)
arm (127 $\mu$ )	33,9 (2)	36,5 (2)	37,5 (2)	21,9 (4)

## Zentrifugiert 27. April.

2. Mai	vom 2. bis zum 5. Mai	vom 5. bis zum 9. Mai	vom 9. bis zum 13. Mai	vom 13. bis zum 20. Mai
reich (100 $\mu$ )	23 (2)	109,8 (4)	98,8 (8)	197,5 (16)
arm (78 $\mu$ )	11,5 (1)	79,3 (2)	73,7 (4)	166,2 (8)
reich (148 $\mu$ )	19,6 (2)	90,4 (4)	74,8 (8)	163,3 (16)
arm (104 $\mu$ )	7,6 (1)	59,8 (2)	58,7 (4)	131,3 (8)
reich (114 $\mu$ )	27,3 (2)	117 (4)	87,6 (8)	(15)
arm (94 $\mu$ )	17 (1)	60,9 (1)	44,6 (2)	(4)
reich (116 $\mu$ )	28,4 (2)	134,9 (4)	101,7 (8)	175,8 (21)
arm (93 $\mu$ )	5,4 (1)	63,3 (2)	55,6 (4)	127,7 (8)
reich (101 $\mu$ )	40,6 (2)	141,5 (4)	112 (8)	175,7 (22)
arm (86 $\mu$ )	16,3 (1)	50 (2)	54 (2)	121,2 (7)
reich (131 $\mu$ )	45 (2)	148,9 (8)	110,1 (15)	178,5 (30)
sehr arm (84 $\mu$ )	8,3 (1)	53,8 (2)	62,1 (2)	102,2 (5)

## Zentrifugiert 27. April.

1. Mai	vom 1. bis zum 3. Mai	vom 3. bis zum 8. Mai	vom 8. bis zum 16. Mai
reich (94 $\mu$ )	11,8 (1)	51,6 (2)	200,7 (8)
arm (73 $\mu$ )	3 (1)	44,1 (1)	140,8 (4)

## Zentrifugiert 14. Mai.

16. Mai	vom 16. bis zum 18. Mai
reich (115 $\mu$ )	44,3 (2)
arm (108 $\mu$ )	10,2 (1)
reich (110 $\mu$ )	66,4 (2)
arm (110 $\mu$ )	16,4 (1)

Die Länge, welche die verschiedenen Zellen erreichen, verhält sich entgegengesetzt zu der Quantität der Chromatophorenmasse. Um das zu bestimmen, maß ich Zellen, die sich teilten. Ich verglich deshalb nur die maximalen Längen der Zellen miteinander. Die durchschnittliche maximale Länge von 41 chromatophorenreichen Zellen betrug 153  $\mu$  (von 136—164  $\mu$ ), von 8 chromatophorenarmen 189  $\mu$  (von 170—204  $\mu$ ) und von 7 mit einer normalen Chromatophorenmasse 167  $\mu$  (von 159—174  $\mu$ ). Die chromatophorenreichen und chromatophorenarmen sind bisweilen auch verschieden, was den Turgor und den Gerbstoffgehalt betrifft. Bei letzteren Zellen ist der Turgor oft stärker, aber auch das entgegengesetzte kommt vor. Der Gerbstoffgehalt ist bei den chromatophorenreichen Zellen nach einigen Tagen größer als bei den chromatophorenarmen. Nach einigen Wochen konnte ich darin aber keinen Unterschied mehr bemerken. Alle Verschiedenheiten verschwinden allmählich und zuletzt kann man die Nachkommen der chromatophorenreichen und chromatophorenarmen Zellen nicht mehr voneinander unterscheiden.

Aus den obenerwähnten Versuchen geht in erster Linie hervor, daß das Wachstum und die Quantität der Chromatophorenmasse miteinander im Zusammenhang stehen. Je mehr Chromatophorenmasse die Zellen enthalten, desto mehr Stärke wird produziert, desto mehr Gerbstoff wird gebildet, desto mehr Zellwandbildung findet statt, desto mehr Plasma entsteht und um so mehr vermehren sich die Kerne. Das Studium der chromatophorenreichen und chromatophorenarmen Zellen gibt wieder keinen einzigen Anhaltspunkt für den Schluß, daß der Gerbstoff ein Exkretionsprodukt ist, während nichts der Ansicht widerstreitet, daß er als Baumaterial dient. Ein größerer Gerbstoffgehalt in den chromatophorenreicheren Zellen, die mehr Stärke enthalten und kräftiger wachsen, ist eine Erscheinung, die zu letzterer Ansicht stimmt. Analoge Fälle habe ich schon oben besprochen.

Bemerkenswert ist das Verhalten der chromatophorenreichen und chromatophorenarmen, kernhaltigen Zellen in kohlenensäureanhydrid-

freiem, destilliertem Wasser. Nach ungefähr 10 Tagen konnte ich feststellen, daß die chromatophorenreichen Zellen minder Gerbstoff enthielten als die chromatophorenarmen. Wenn die Chromatophoren aus Mangel an Kohlensäureanhydrid nicht assimilieren können, verhalten sich beiderlei Zellen deshalb, was den Gerbstoffgehalt betrifft, gerade umgekehrt wie unter normalen Bedingungen, d. h. wenn die atmosphärische Luft zutreten kann und wenn sie sich in Grabenwasser befinden. Oben habe ich schon erwähnt, daß, wenn der Kern fehlt und demzufolge die Stärke nicht verarbeitet wird, der Gerbstoffgehalt in den Zellen mit Chromatophoren geringer ist als in den Zellen ohne Chromatophoren oder in solchen mit nur Spuren derselben. Die besprochenen Erscheinungen weisen auf Korrelationen zwischen Chromatophoren und Gerbstoffgehalt und zwischen Stärke und Gerbstoffgehalt hin.

### Zusammenfassung.

Durch mikrochemische und makrochemische Untersuchungen mit über 60 Gerbstoffreagenzien habe ich nachgewiesen, daß *Spirogyra maxima* eine gerbstoffhaltige Pflanze ist, daß der Spirogyragerbstoff dem Gallusgerbstoff oder Tannin sehr ähnlich ist, daß er im Zellsaft vorkommt und daß die Niederschläge, die Ammoniumkarbonat, Koffein, Antipyrin und andere basische Stoffe darin hervorrufen, Gerbstoffniederschläge und keine Eiweißniederschläge sind. Es hat sich gezeigt, daß Antipyrin und Koffein ausgezeichnete Gerbstoffreagenzien sind, die sich besonders dazu eignen, bei der lebendigen Pflanze eine Untersuchung über die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes anzustellen, ohne der Pflanze zu schaden.

Auf Grund der erhaltenen Resultate bei kopulierenden, sich teilenden, kernlosen, chromatophorenfreien, chromatophorenreichen, chromatophorenarmen, mehrkernigen und pathologischen Zellen und beim Wachstum in kohlensäureanhydridfreiem Wasser und in verschieden starkem Licht nehme ich an, daß bei *Spirogyra maxima* der Gerbstoff als Baumaterial für die Zellwände dient und kein Exkretionsprodukt ist. Es ist kein Reservestoff, sondern er gehört zu den aufgelösten Stoffen, welche die Pflanze fortwährend zu ihrer Entwicklung verwendet. Meine Resultate stimmen nicht überein mit den Ansichten von Sachs und Kraus, sondern bestätigen, was Wigand vor 50 Jahren veröffentlicht hat. Deutlichkeitshalber bemerke ich, daß ich nicht behaupte, daß der Gerbstoff der einzige Stoff wäre, der sich bei *Spirogyra* an der Zellwandbildung beteiligt und auch nicht, daß diese Rolle die einzige sei, welche er im Pflanzenreich spielt.

Zum Schluß bemerke ich noch, daß es sich gezeigt hat, daß zwischen dem Gerbstoff und anderen Inhaltsbestandteilen, wie Chromatophoren und Stärke, Korrelationen bestehen.

## Figuren-Erklärung.

### Tafel I, 4

- Fig. 1. *Spirogyra maxima*, normale Zelle.  
" 2. Der Gerbstoff durch Osmiumsäure niedergeschlagen.  
" 3. Der Gerbstoff durch Antipyrin niedergeschlagen.  
" 4. Der Niederschlag von Antipyringerbstoff zu Kugeln zusammengeflossen.  
" 5. Der Niederschlag von Antipyringerbstoff zu Kugeln zusammengeflossen und durch Osmiumsäure schwarz gefärbt.  
" 6. Zentrifugiert, abnorme Plasmolyse und der Gerbstoff durch Antipyrin niedergeschlagen.  
" 7. In 1-prozentiger Ferrichloridlösung.  
" 8. In 25-prozentiger Chlornatriumlösung.  
" 9. In 5-prozentiger Ätherlösung.  
" 10. In 25-prozentiger Natriumsulfatlösung.

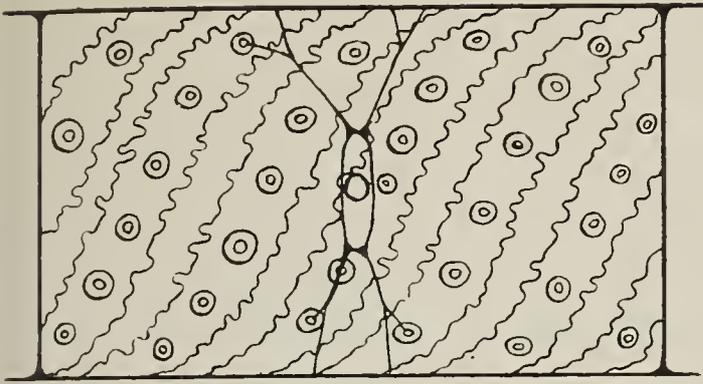
### Tafel II, 5

- Fig. 11. Der Niederschlag von Antipyringerbstoff ist in der sich teilenden Zelle geringer als in anderen Zellen.  
" 12. Die Scheidewandbildung ist durch zeitweilige Einwirkung von Antipyrin verhindert worden.  
" 13. Die Scheidewandbildung ist zum zweiten Male durch zeitweilige Einwirkung von Antipyrin verhindert worden.  
" 14. Die weitere Entwicklung der Scheidewand ist durch zeitweilige Einwirkung von Antipyrin verhindert worden.  
" 15. Der Antipyringerbstoffniederschlag ist in der Zelle mit größerem Turgor und geringem Wachstum stärker als in anderen Zellen.  
" 16. Die Antipyringerbstoffniederschläge sind in den kopulierenden Zellen geringer als in den nicht kopulierenden.
-

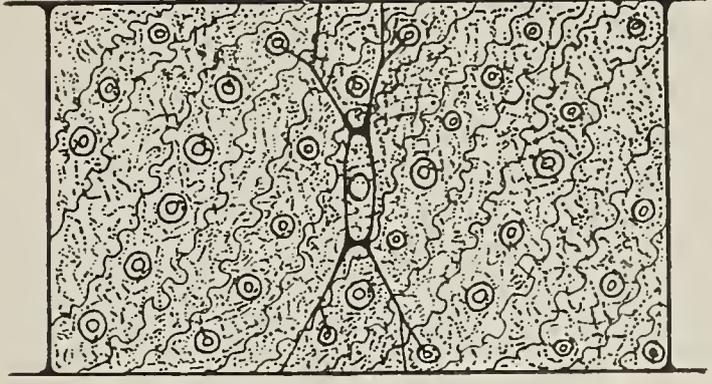
## Inhalt.

	Seite
Einleitung . . . . .	155
Über den Nachweis des Gerbstoffes bei <i>Spirogyra</i> . . . . .	158
Ältere Methoden . . . . .	158
Über den mikrochemischen Nachweis überhaupt . . . . .	159
Ferrisalze . . . . .	161
Kaliumbichromat . . . . .	162
Osmiumsäure . . . . .	162
Natriumvanadat . . . . .	162
Uranylazetat und Uranylnitrat . . . . .	163
Ammoniummolybdat . . . . .	163
Kaliumkarbonat und Natriumkarbonat . . . . .	164
Kalkwasser und Barietwasser . . . . .	164
Ammoniumkarbonat . . . . .	164
Ammoniak . . . . .	165
Natriumarsenat . . . . .	165
Zinkchlorid . . . . .	165
Kupferazetat . . . . .	165
Goldchlorid . . . . .	166
Hexamethylentetramin (Urotropin) . . . . .	166
Phenylhydrazin . . . . .	167
Koffein . . . . .	168
Antipyrin etc. . . . .	169
Chinolin etc. . . . .	170
Pyridin etc. . . . .	170
Alkaloide . . . . .	171
Para-Diazobenzolsulfosäureanhydrid . . . . .	172
Jodlösung . . . . .	172
Eiweißstoffe . . . . .	173
Salzlösungen . . . . .	174
Bereitung von Spirogyragerbstoff und makrochemische Untersuchung	174
Schlußfolgerung bezügl. des Vorkommens von Gerbstoff bei <i>Spirogyra</i>	175
Übereinstimmung des Spirogyragerbstoffes mit Tannin . . . . .	175
Lokalisation des Spirogyragerbstoffes . . . . .	176
Abweichende Resultate . . . . .	176
Methylenblau . . . . .	176
Verschiedene Ansichten über die Niederschläge mit basischen Stoffen	179
Niederschläge von Gerbstoff mit Eiweiß in Spirogyrazellen . . . .	181
Einfluß von Säuren und Salzen auf die Bildung der Niederschläge	182

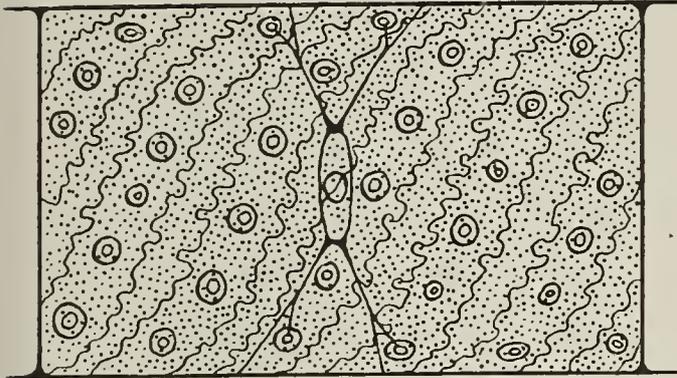
1.



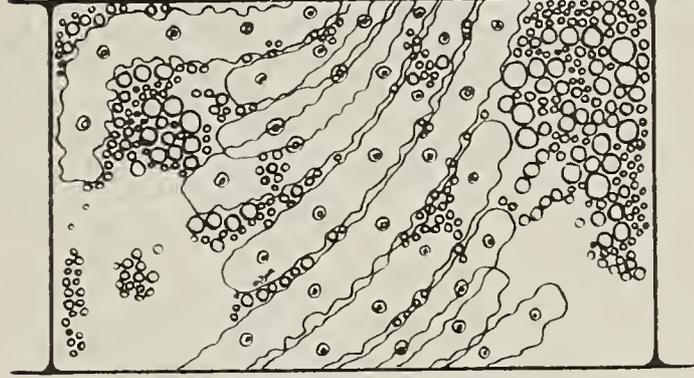
2.



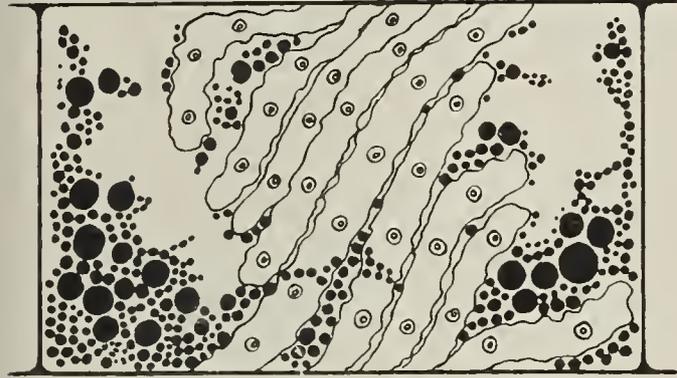
3.



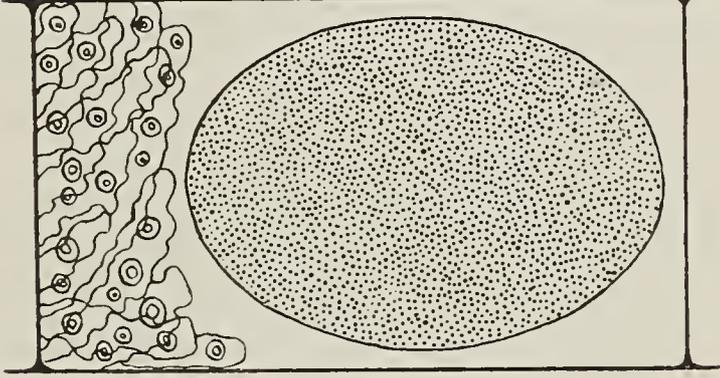
4.



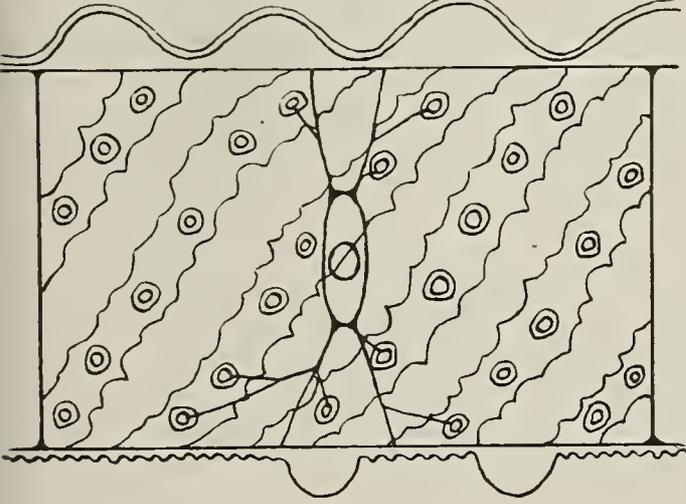
5.



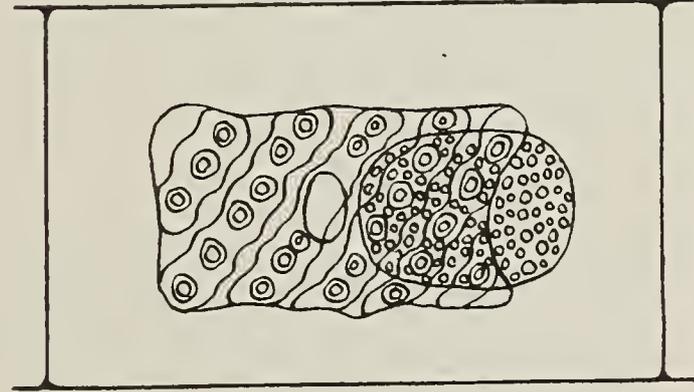
6.



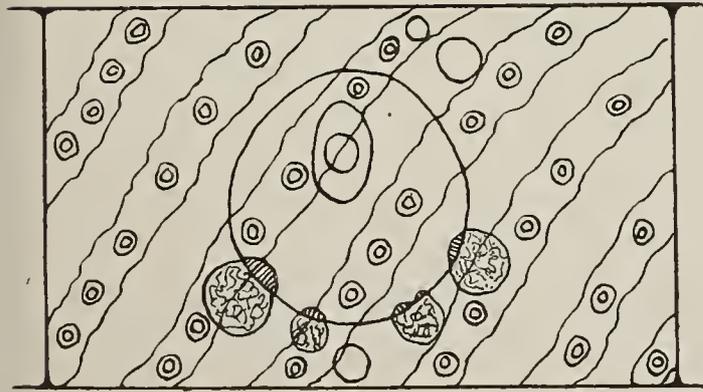
7.



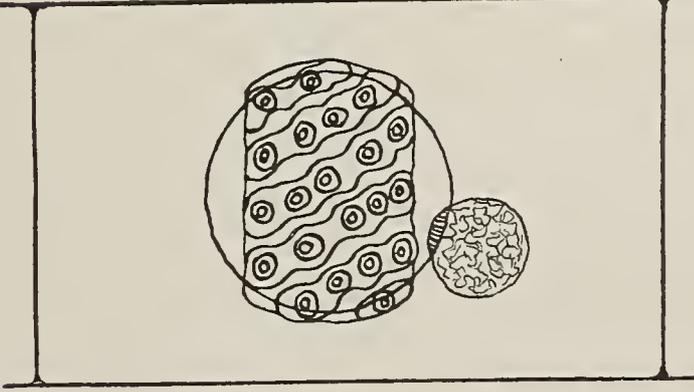
8.



9.

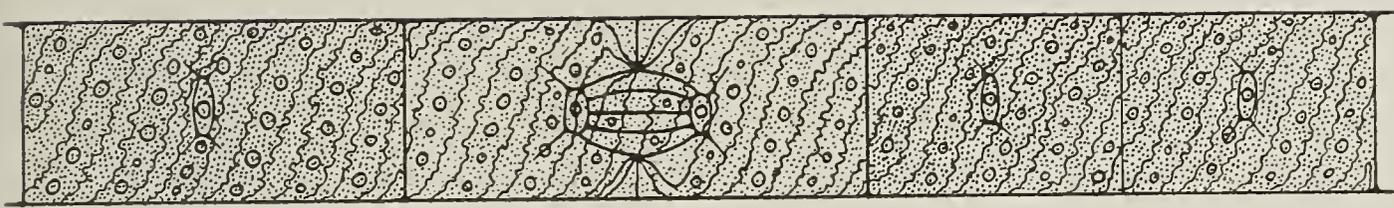


10.

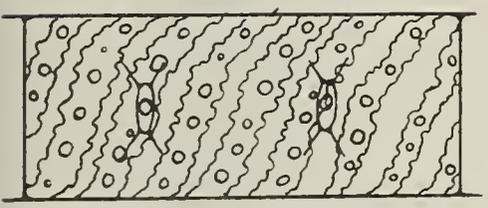




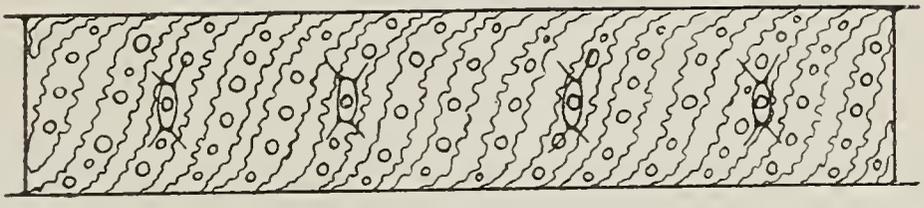
11.



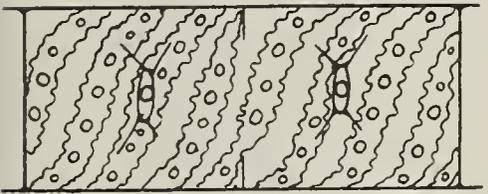
12.



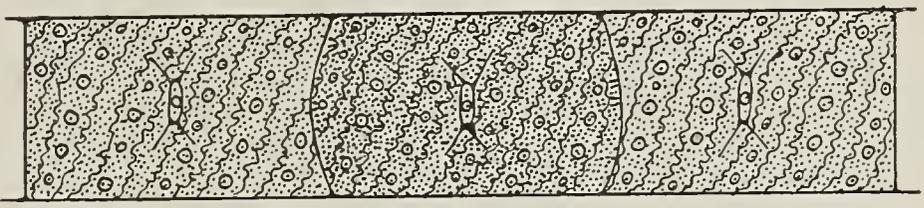
13.



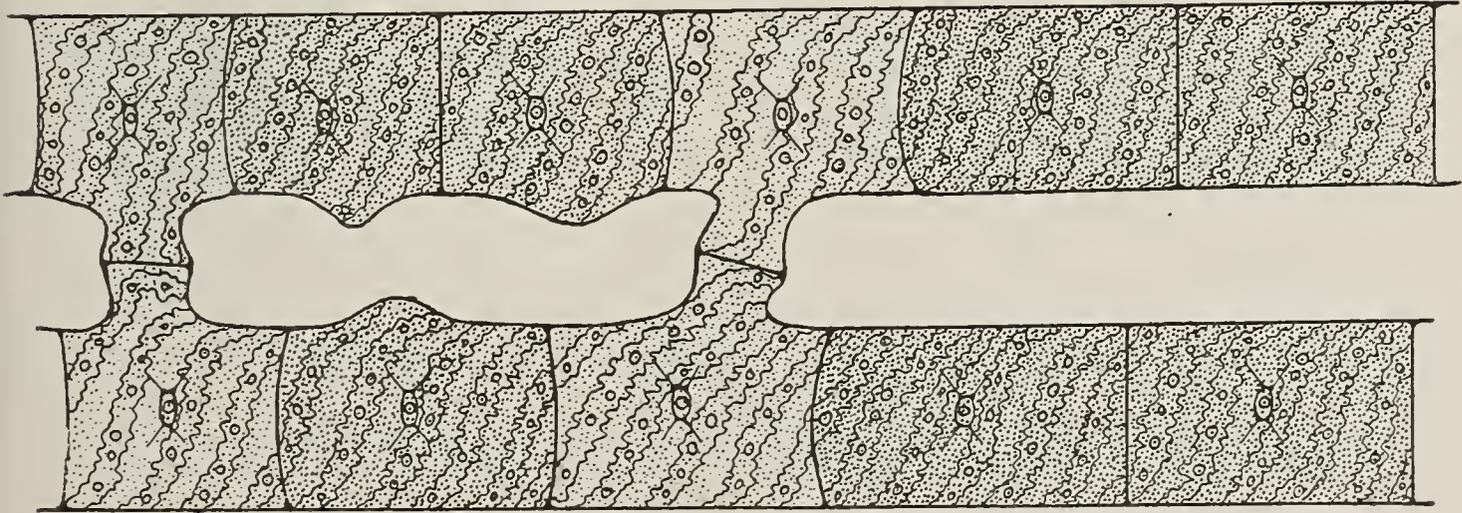
14.



15.



16.





	Seite
Methoden der physiologischen Untersuchung . . . . .	184
Ältere Methoden . . . . .	184
Erfordernisse . . . . .	185
Antipyrin und Koffein . . . . .	185
Untersuchungen über die Schädlichkeit des Antipyrins und Koffeins	188
Über die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes . . . . .	196
Über den gegenwärtigen Stand des Problems . . . . .	196
Die physiologische Bedeutung des Gerbstoffes bei <i>Spirogyra</i> . .	203
Kopulation . . . . .	203
Scheidewandbildung . . . . .	205
Pathologische Zellen . . . . .	206
Wachstum unter dem Einfluß von verschieden starkem Licht . .	207
Wachstum in kohlenensäureanhydridfreiem Wasser . . . . .	208
Zweikernige Zellen . . . . .	208
Kernlose Zellen . . . . .	209
Chromatophorenreiche und chromatophorenarme Zellen . . . . .	211
Zusammenfassung . . . . .	214
Figurenerklärung . . . . .	215

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Centralblatt](#)

Jahr/Year: 1915

Band/Volume: [BH\\_32\\_1](#)

Autor(en)/Author(s): Wisselingh C. van

Artikel/Article: [Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung. 155-217](#)