

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Wien.)

Reservestoff- und Exkretspeicherung bei Bodentieren, unter besonderer Berücksichtigung der Harnsäureverbindungen.

Von

Judithmarie Schindler.

Mit 8 Textabbildungen.

A. Einleitung.

Die Angaben über den chemischen Charakter der verschiedenen Speichersubstanzen der Insekten sind, soweit nicht makrochemische Analysen durchgeführt werden konnten, mangelhaft und unsicher. Man beschränkte sich bei den Untersuchungen einerseits auf Analogien durch Vergleiche mit den besser untersuchten Formen; andererseits weisen die angewandten mikrochemischen Methoden große Mängel hinsichtlich Spezifität und Lokalisation auf.

Es wurde daher in dieser Arbeit der Versuch unternommen, mikrochemische Methoden zu finden, die es ermöglichen, eindeutige, lokale und mit den geringen vorhandenen Substanzmengen noch positiv verlaufende Reaktionen zu geben.

Die Arbeiten wurden am Zoologischen Institut der Universität Wien durchgeführt. Ich bin meinen verehrten Lehrern Herrn Professor Dr. O. Storch für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und Herrn Professor Dr. W. Kühnelt für die Anregungen zu diesen Untersuchungen, für seine wertvollen Ratschläge und seine freundliche, immer bereite Hilfe zu großem Dank verpflichtet. Ferner danke ich den Herren Professoren Dr. Ing. H. Pöll und Ing. W. Kress für ihre liebenswürdigen Bemühungen in der Beschaffung der so schwer erhältlichen Chemikalien. Herrn Dr. E. Schild sei für seine fachmännische Ausführung der Mikrophotographien und Herrn Dr. E. W. Jancsik für die Unterstützung bei den Versuchen mit der Papierverteilungs-chromatographie herzlichst gedankt.

B. Material.

Für die hier vorgenommenen Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere aus Bodenproben verwendet: Collembola, Diplura, Thysanura; verschiedene Insektenlarven und -puppen (hauptsächlich Dipteren); Acarina; also Tiere, die ihr ganzes Leben bzw. einen geschlossenen Lebensabschnitt im Boden verbringen. Zu Vergleichszwecken wurden auch einige andere Formen untersucht.

Gesammelt wurde in zwei Bereichen: 1. im Mischwald, 2. von Kompost.

C. Methodik.

Bei Durchsicht von Fachzeitschriften der Mikrochemie fällt es auf, daß seit Beginn des letzten Jahrzehntes die Art der mikrochemischen Methoden, direkt an mikroskopischen Gewebspräparaten und -schnitten zu arbeiten, immer mehr in den Hintergrund tritt; in den letzten Jahren wurde darüber sowohl auf botanischem als auch auf zoologischem Gebiet fast nichts mehr referiert.

Wohl hat die Mikrochemie im Anschluß an den gewaltigen Aufschwung der gesamten Chemie große Fortschritte gemacht, doch erstrecken sich diese auf das Gebiet der allgemeinen Mikrochemie, auf Arbeiten mit reinen, homogenen Substanzen. Sind die Untersuchungen schon hier nicht immer einfach, so erschweren und komplizieren sie sich bei ihrer Anwendung auf tierische und pflanzliche Objekte, also inhomogenem Material, bedeutend. Diese Schwierigkeiten dürften voraussichtlich die Schuld daran tragen, daß man sich von den direkten Untersuchungen am Präparat selbst abgewandt und zur Herstellung verschiedener Apparaturen gegriffen hat, die gewiß viel sicherere Resultate zeitigen. Und dennoch ist die Durchführung von mikrochemischen Reaktionen am Präparat selbst die einzig anwendbare Methode, wenn es sich darum handelt, chemisch-physiologische Untersuchungen an einzelnen kleinen Tieren vorzunehmen.

Gerade bei den Organismen des Bodens, die wohl in großer Menge auftreten, lassen sich kaum so viel Individuen einer Art finden, um damit eine chemische Analyse durchzuführen. Selbst wenn dies gelänge — im Kompost war ein größeres Vorkommen von Collembolen zu beobachten — bleibt es doch fast unmöglich, bei Tieren von Millimetergröße einzelne Organe wie Fettkörper oder Exkretionsorgane in solchen Mengen isoliert zu erhalten, daß damit noch chemische Untersuchungen möglich wären. Es könnten also lediglich in den ganzen Tieren bestimmte chemische Verbindungen festgestellt werden, ihre Lokalisation wäre aber so nicht zu ermitteln. Ich war daher ausschließlich auf den Nachweis durch Mikromethoden angewiesen.

Meine Untersuchungen wurden alle nur an frischem, nie an fixiertem Material durchgeführt; es handelte sich hier ja nicht so sehr darum, die genaue Lage der Substanz in Zelle oder Gewebe zu erfahren, als vielmehr den chemischen Charakter derselben, soweit es mikrochemisch möglich ist, festzustellen. Durch Fixierungen ist er aber meist weitgehend verändert und die an sich schon schwierigen mikrochemischen Nachweise werden dadurch nicht einfacher und vor allem nicht eindeutiger.

Die zu behandelnden Organe, Fettkörper bzw. Exkretionsschläuche der Milben, ließen sich teilweise isolieren. Es war dadurch eine eindeutiger Bestimmungsmöglichkeit gegeben als in einem Gewebsschnitt, in welchem die verschiedenen Körperbestandteile nebeneinander liegen. Die von kleineren Individuen hergestellten Zupfpräparate stehen bei vorsichtiger Präparation einem Gewebsschnitt, der ja ebenfalls die verschiedenen Organe in sich vereinigt hat, nicht nach. (Es ist bei einiger Übung nicht schwierig, zum Beispiel den Fettkörper der größeren Collembolen, neben dem unverletzten Darm liegend, zu erhalten.) Sie haben aber den Vorteil, daß die nachzuweisenden Substanzen hier in relativ größeren Mengen vorhanden sind; im Schnitt liegt vieles unter der Erfassungsgrenze.

Die Präparate wurden sofort nach Narkotisierung der Tiere hergestellt; ich achtete besonders darauf, daß vor Beginn der chemischen Untersuchungen im Präparat nichts eingetrocknet war, da dies schon wieder Schwierigkeiten

in der Lösung von Einschlüssen nach sich gezogen hätte. Die Präparation führte ich zum Teil in physiologischer Kochsalzlösung, zum Teil ohne Flüssigkeit durch.

Als Nachweismethoden verwendete ich sowohl Färbungen als auch Mikrokristallisationen, um durch Vergleich beider die Mängel der einzelnen Methoden auszugleichen.

Ferner versuchte ich, die seit zehn Jahren von Chemikern zu Mikroanalysen verwendete Papierverteilungschromatographie (PVC) anzuwenden. Gerade diese Methode verspricht in Zukunft ein wertvolles Mittel zur Feststellung chemischer Vorgänge in solchen Tieren zu werden, bei denen, infolge ihrer Kleinheit oder ihres seltenen Auftretens, normale chemische Bestimmungen nicht durchgeführt werden können. Derzeit freilich bieten die chemischen Grundlagen der PVC dem Biologen erst bei einigen Substanzen genügend Sicherheit, um Versuche durchzuführen.

Ich bin mir vollkommen bewußt, daß die von mir vorgenommenen Untersuchungen verschiedene Mängel aufweisen. Große, zeitbedingte Schwierigkeiten in der Beschaffung von geeigneten Chemikalien, die Unmöglichkeit, reine Präparate der gesuchten Verbindungen für Kontrollzwecke zu erhalten, und die Schwierigkeiten, welche die Mikrochemie an sich bietet, machten diese unvermeidbar. Doch hoffe ich, in dieser Arbeit der biologischen Mikrochemie neue Möglichkeiten gezeigt zu haben und damit einem neuen Beginn dieser alten mikrochemischen Richtung förderlich gewesen zu sein.

D. Der mikrochemische Nachweis von Purinen.

I. Harnsäure und Urate.

Harnsäure wurde erstmalig 1818 von *Brugnatelli* in den Malpighischen Gefäßen und im Meconium der Schmetterlinge nachgewiesen⁽⁹⁾. Später wurden die Angaben über ihr Vorkommen häufiger: So hat man sie z. B. 1844 bei Schmetterlingen (*Heller*³⁵), 1862 in den Malpighischen Gefäßen im Fettkörper und in der Pigmentschicht von *Deilephila euphorbiae*-Raupen durch die Murexidprobe (*Fabre*²⁶) und gegen Ende des Jahrhunderts bei verschiedenen Hymenopteren (*Plateau*⁷², *Koschnikow*⁴⁹, *Berlese*⁶), Coleopteren (*Marshall*⁵⁸) und Orthopteren (*Guenot*¹⁶) gefunden. Auch bei Collembolen und Thysanuren wurde ihr Vorhandensein festgestellt. (*Willem*, Kristallisation aus salzsaurer Lösung⁹⁸, *Philipschenko*⁷¹, *Bruntz*¹¹, Murexidprobe, Löslichkeitsproben). Neuere Arbeiten hierüber liegen u. a. von *Kreuschner* (*Dytiscus*, 1922, Murexprobe⁵¹), *Becker* (*Phoroniden*, 1938, ebenso³), *Reisinger* (*Chaetognaten*, 1934—36, ebenso, Färbungen^{72, 73}), *Marten* (*Campodea*, 1939, Murexidprobe⁵⁹), vor. Die jüngsten physiologisch-chemischen Arbeiten über Insekten (*Timon-David*, 1945⁹⁰ und *Wigglesworth*, 1947⁹⁷) erwähnen für den Harnsäurenachweis überhaupt keine Mikromethoden mehr.

Aus dieser kurzen Übersicht ist zu ersehen, daß die Identifizierung von Harnsäure mit sehr unspezifischen Methoden durchgeführt wurde. Es ist selbstverständlich, daß dadurch Irrtümer auftraten. So hielt man die Flügelpigmente der Pieriden für Harnsäure, bzw. Purine, da sie eine positive Murexidprobe ergaben, bis *Schöpf* und *Wieland*, allerdings durch makrochemische Analysen, feststellen konnten, daß es sich hier um Pterine handelt ^(84, 85, 86).

Es ergab sich somit die Notwendigkeit, sowohl die Methoden als auch die Resultate des Harnsäurenachweises zu überprüfen. Im Laufe meiner Untersuchungen ist es mir gelungen, mit Hilfe von alkoholischer Kalilauge eine Nachweismöglichkeit zu finden, mit welcher ich sehr sichere Resultate erzielen konnte.

Im Fettkörper aller hier untersuchten Collembolen, Thysanuren und gewisser Dipterenlarven finden sich kleine, im durchfallenden Licht schwach grünliche, runde oder ovale Körnchen; im polarisierten Licht leuchten dieselben hellweiß, mit dunklem Achsenkreuz auf und zeigen radiale Streifung.

Diese Kristalleinschlüsse werden nun in der Literatur erwähnt, teils ohne näher auf ihren chemischen Charakter einzugehen, teils sind sie als Harnsäure, bzw. deren Salze beschrieben.

Der Mikronachweis stützt sich hauptsächlich auf zwei Arten von Reaktionen, auf Färbungen und auf Mikrokristallisationen.

1. Farbreaktionen.

a) *Die Murexidprobe.* Bekanntlich führt die Einwirkung von HNO_3 auf Harnsäure zur Bildung von Alloxan, Alloxantin und Purpursäure, welche bei Reaktion mit NH_4OH oder KOH ein gefärbtes Salz ergibt, das Murexid. Die Versuche lassen sich auf dem Objektträger bei vorsichtigem Erhitzen durchführen; es ist aber wichtig, darauf zu achten, daß die mit HNO_3 versetzte Probe bis zur vollständigen Trockne eingedampft wird. Schwaches Erwärmen allein (*Philiptschenko* ⁷¹) kann zu keiner Reaktion führen, da sich Alloxan erst nach vollständigem Abdampfen der HNO_3 bildet. Auch durch Einwirkung von NH_3 -Dämpfen auf das entstandene Alloxan ist Murexid herzustellen: Die Probe wird auf einem Sublimationsring den Dämpfen eines Tropfens NH_4OH ausgesetzt. Der Vorgang ist unter dem Mikroskop leicht zu beobachten.

Trotz vieler positiver Resultate ist die Murexidprobe aber nicht unbedingt verlässlich, wie *Lison* (⁵⁷) mit Recht feststellt. Auch bei meinen Versuchen waren ca. ein Drittel der unter denselben Bedingungen gurchgeführten Proben sogar mit reiner Harnsäure negativ; dasselbe war bei den Versuchen an Geweben festzustellen. Positives Ausfallen der Reaktion zeigt die Anwesenheit der Harnsäure somit an; aus negativen Reaktionen darf jedoch nicht auf ihr Fehlen geschlossen werden. Das Vorhandensein von Eiweiß kann die Murexidprobe dadurch stören, daß die gelbbraune Farbe der Xanthoproteinreaktion, beruhend auf der Bildung von Nitroderivaten, die Rotfärbung des Murexid verdeckt oder zumindest verwischt. Es entstehen dann rotbraune Farbtöne, welche kein sicheres Resultat mehr zulassen; dies konnte ich bei meinen Versuchen öfter beobachten.

b) *Weidelsche Probe*. Diese ist eine variierte Murexidprobe; die Oxydation der Harnsäure zu Alloxan geschieht hier durch Chloreinwirkung. Der weiße oder schwach gelbe Rückstand färbt sich in einer Ammoniak-Atmosphäre dunkelrosenrot.

Die Weidelsche Probe ist in der Literatur (⁵⁸) für Xanthin angegeben, gibt aber selbstverständlich auch mit Harnsäure positive Resultate, und ist, wie es scheint, verlässlicher als die Murexidprobe. Meine Versuche mit reiner Harnsäure waren hier immer positiv.

Bei beiden Proben muß hinsichtlich der Färbung gesagt werden, daß genaue Feststellungen der Farben äußerst schwierig sind. Diese sind von der Konzentration, der Beleuchtung und anderen Umständen derart abhängig, daß fast an jeder Probe andere Tönungen auftreten. Für die Weidel'schen Proben bewegen sich die Farben bei *Onychiurus armatus* (mit freiem Auge, bei künstlichem Licht, auf weißem Untergrund) nach *Ostwalds* Farbnormatlas zwischen ga 7 — ga 8. Reine Harnsäure gibt unter denselben Bedingungen dunklere Farbtöne derselben Reihe, la 6—7, ia 6—7.

Die Violett-färbung der Murexidprobe mit Kalilauge ergibt go 10.

Sowohl Murexid- als auch Weidel'sche Probe, die als Mikromethoden beschränkt anzuwenden sind, lassen in keiner Weise eine Lokalisation zu. Die Oxydation mit so starken Mitteln, wie Salpetersäure und Chlor es sind, zerstört das Gewebe vollständig und es ist nachher nur mehr die Feststellung möglich, daß in dem Prä-

parat Harnsäure, bzw. Urate vorhanden waren. Ferner sind beide Proben bei der Anwesenheit von anderen Purinen (Guanin, Xanthin) positiv, allerdings nur mit Kalilauge und in etwas anderer Farbtonung, was ihre Spezifität stark beeinträchtigt. Daher lassen sich beide Methoden wohl als Ergänzung eines anderen Harnsäurenachweises, nicht aber als einzigen Nachweis, verwenden.

Resultate: Von Collembolen, die alle die oben erwähnten Kristalleinschlüsse in reicher Menge aufwiesen, wurden u. a. Individuen der Gattungen Onychiurus, Lepidocyrtus, Folsomia, Entomobrya, Pseudosinella, Achorutes untersucht. Die Murexidprobe verlief, wie schon gesagt, bei einem Teil der Versuche negativ, die Weidel'sche Probe hingegen immer positiv.

Die Kristalle in den Exkretionsorganen der Milben waren von anderem Aussehen (siehe Guanin). Die Murexidprobe zeigte hier nie Rotfärbung, die Weidel'sche Probe verlief immer negativ. Von den untersuchten Dipterenlarven wiesen nur Cecidomyidenlarven im Fettkörper die erwähnten Kristalleinschlüsse auf, die Weidel'sche Probe war hier auch positiv. Die Larven von Drosophiliden, Chironomiden, Psychodiden, Sciariden gaben keine Reaktionen, es fehlte auch jede Spur von Kristalleinschlüssen.

Die Kontrollversuche mit reiner Harnsäure habe ich schon oben erwähnt.

Ebenso ergaben Proben mit Schlangenexkrementen (als Vergleichsversuche) positive Resultate.

Die verschiedenen weiteren Farbreaktionen, die zum Nachweis der Harnsäure Anwendung finden, eignen sich hauptsächlich für die Identifizierung isolierter Substanzen. Histochemisch ist ihre Verwendung einmal wegen der geringen Spezifität, zum anderen wegen der komplizierten Durchführungsart nicht sehr zu empfehlen. Der Vollständigkeit halber seien sie hier aber erwähnt.

c) *Carminfärbung (nach Romeis und Schulze, 76)*. Diese Methode, die auch Glykogen (allerdings rot) färbt und bei diesem näher besprochen wird, gibt mit Harnsäure blaue bis grüne Farbtöne.

d) *Reaktionen mit Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure (Follin, Riegler, 38)*. Diese weisen zwar eine sehr große Empfindlichkeit auf, sind aber nur nach Entfernung von Eiweiß und Zucker möglich, welche beide auch die genannte Blau-

färbung geben. Dies ist im histologischen Präparat kaum durchführbar.

e) *Reaktion nach Ganassini* (³⁸). Sie zeigt ebenfalls eine sehr hohe Empfindlichkeitsgrenze, läßt sich im Präparat aber wegen der komplizierten Durchführung nicht verwenden. Auch ist noch nicht geprüft, wie weit sie für Harnsäure spezifisch ist.

Neben den Farbreaktionen spielt die Mikrokristallisation im histochemischen Nachweis eine wichtige Rolle. Bei dieser Methode ist besonders darauf zu achten, daß die chemischen Vorgänge einsetzen, bevor das Gewebe zu stark eingetrocknet ist, weil diese sonst an Genauigkeit verlieren. (So sind z. B. die Harnsäureeinschlüsse im eingetrockneten Präparat nur mehr durch Heben und Senken des Deckglases zu lösen. Im frischen Präparat sind sie bei Zufließen der entsprechenden Flüssigkeit ohne weiteres vollständig in Lösung zu bringen, das Fortschreiten des Lösungsmittels und die Lösung der Einschlüsse kann gut unter dem Mikroskop beobachtet werden. Es ist klar, daß im ersteren Falle jede Lokalisation unmöglich gemacht wird.) Ich führte daher die Untersuchungen nur an frischen Präparaten durch.

Die Kontrollversuche an reinen Substanzen sind hier sehr wichtig, obwohl man immer damit zu rechnen hat, daß im histologischen Präparat durch die Anwesenheit so vieler anderer Verbindungen Mischkristalle auftreten können.

Man prüft zuerst Reagens sowie nachzuweisenden Stoff — soweit sie flüssig sind — durch Verdunstenlassen der Flüssigkeit auf ihre Kristallformen; hierauf werden die Kontrollversuche auf die zu erwartenden Substanzen mit reinen Präparaten durchgeführt. Sowohl bei den Kontrollversuchen, als auch bei denen am Gewebspräparat ist besonders darauf zu achten, daß sie immer unter denselben Bedingungen stattfinden, da ein großer Unterschied in der Kristallisation besteht, ob diese z. B. unter dem Deckglas oder im freien Tropfen vor sich geht; auch muß die Konzentration der Lösungs-, bzw. Fällungsmittel immer gleich groß sein.

Ich entschloß mich nach einer Reihe von Versuchen, die Kristallisation unter dem Deckglas durchzuführen, weil sie der geringen Menge wegen meist länger dauert und die freien Tropfen zu schnell verdunsten; um dies zu verhindern, wurde auch oft eine

Umrandung der Präparate vorgenommen. (Hiefür eignet sich besonders Stearin, da es nach der Auskristallisation leicht zu entfernen ist und weitere Versuche an dem Präparat vorgenommen werden können, z. B. Lösungen zu Kontrollzwecken.)

Eine Charakterisierung der Kristalle vor und nach der Mikrokristallisation kann durch Feststellungen von Farbe und Form, durch ihr Verhalten im auffallenden, durchfallenden, polarisierten Licht und bei Dunkelfeldbeleuchtung, durch ihre spezifische Löslichkeit und durch Umkristallisationen aus geeigneten Lösungsmitteln durchgeführt werden. Mikroschmelzpunktbestimmungen, die an Reinsubstanzen sehr gute Erfolge liefern (⁴⁷, ⁴⁸), sind im histologischen Präparat derzeit noch nicht angewendet worden. Es ist fraglich, ob sie hier durchgeführt werden können. (Mir fehlten zu Versuchen darüber die erforderlichen Apparaturen.)

2. Harnsäurenachweis durch Mikrokristallisation (Uratbildung).

Beim Lösen der Einschlüsse des Fettkörpers verschiedener Collembohlen in alkoholischer Kalilauge konnte ich eine Neubildung von Kristallen beobachten, welche vom Rand her zur Mitte des Präparates ziemlich rasch fortschreitet. Es entstehen büschelförmige Anordnungen von Kristallnadeln, die zu Drusen und bäumchenartigen Gebilden zusammengefügt sein können. Ihre Ausbildung beginnt bald nach Zufügen der alkoholischen Lauge und kann bis zu zwei Stunden dauern. Sie zeigen im polarisierten Licht, in dem sie weiß, bei dichter Lage gelblich aufleuchten, Auslöschung, bzw. ein schwaches dunkles Achsenkreuz (Abb. 1).

Auch mit alkoholischer Natronlauge zeigen sich dieselben Erscheinungen, nur sind die Nadeln zu dichter gelagerten Drusen vereinigt.

Es handelt sich hier um die Bildung von Salzen der Harnsäure mit der entsprechenden Lauge.

Da nach *Rosenthaler* (⁷⁷) die Mikroverseifung von Fetten mit alkoholischen Laugen sehr rasch vor sich gehen soll, war es naheliegend, auch hier die Möglichkeit einer Verseifung in Betracht zu ziehen, da sich die Versuche ja im Fettkörper abspielten. Daß die Kristalle nicht direkt aus Fetttropfen entstehen, war zu sehen. Zur genaueren Feststellung färbte ich das Fett zuerst mit Sudan-schwarz B und setzte erst nach 20 Minuten, nachdem alles Fett blau gefärbt war, die alkoholische Lauge zu. Die Ausbildung der

Kristalle erfolgte normal, man sah aber deutlich, daß sie von Fetttropfen völlig unabhängig vor sich ging, oft an Stellen, wo überhaupt kein Fett vorhanden war. Dieser Versuch zeigt somit, daß es sich im vorliegenden Fall nicht um Seifenkristalle handeln kann.

Da die oben beschriebenen Kristalleinschlüsse des Fettkörpers in der Literatur teils als Harnsäure, teils als Alkali- bzw. Ammoniumurate beschrieben sind, war es natürlich interessant fest-

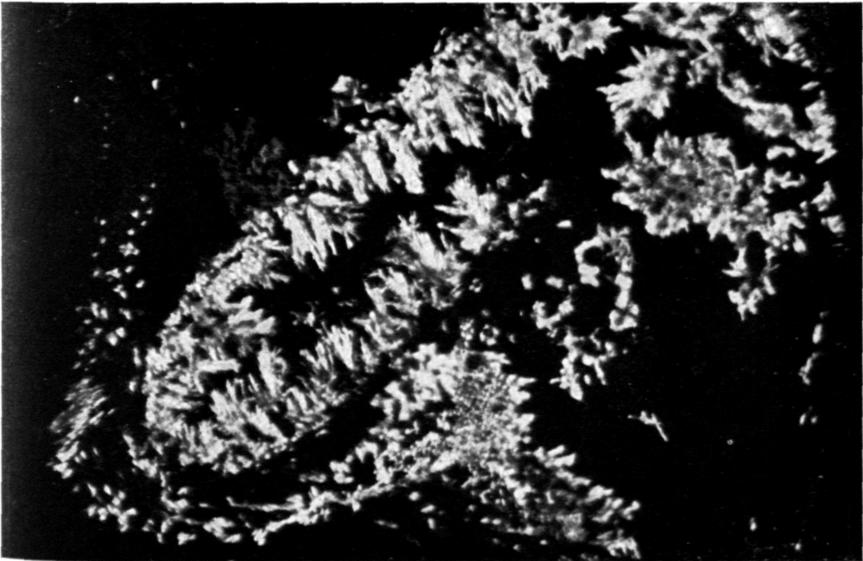


Abb. 1. *Onychiurus armatus*, Fettkörper mit gesättigter alkoholischer KOH behandelt: Ausbildung bäumchenförmiger $K-NH_4$ -Uratkristalle. In der Mitte unten ist ein Teil des Fettes zu Sphäriten verseift.
(Polarisiertes Licht, Vergr. 80 : 1).

zustellen, worum es sich nun hier handelte. Bei Kontrollversuchen mit Schlangen- und Käferexkrementen, welche ich in wässriger Kalilauge löste, erhielt ich nach der Auskristallisation der Lösungen unter dem Deckglas übereinstimmende Formen mit denen reiner Harnsäure, also Kaliumurat (Abb. 2, 3). Mit alkoholischer Kalilauge war bei Exkrementen und auch bei reiner Harnsäure keine Reaktion zu erreichen.

Die Kristallformen, die durch Zufügen von alkoholischer Lauge aus den Kristalleinschlüssen des Fettkörpers entstanden,

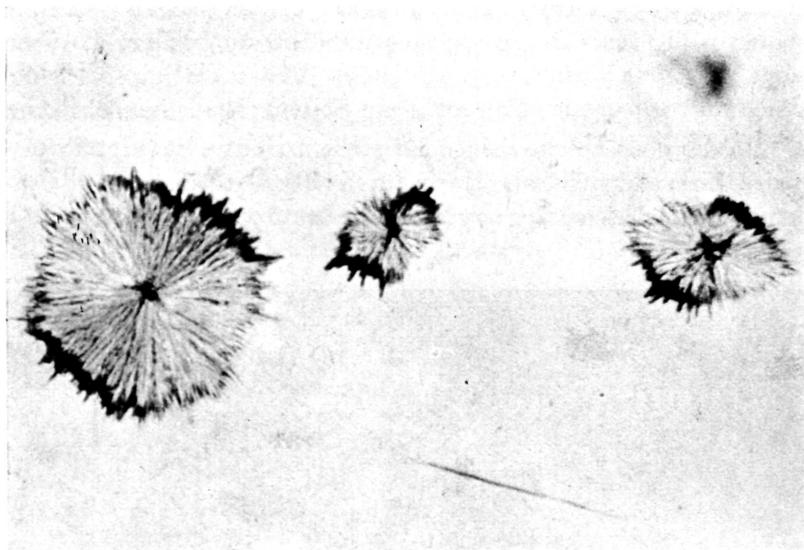


Abb. 2. K-Urat, aus reiner Harnsäure mit $n/10$ KOH behandelt: Auftreten eines charakteristischen dunklen Kristallrandes (Vergr. 80 : 1).

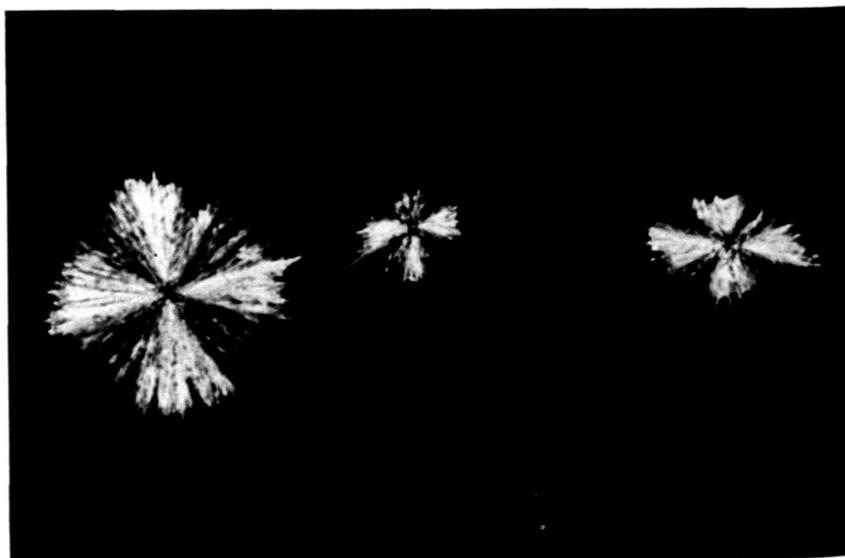


Abb. 3. Dasselbe Präparat im polarisierten Licht (Vergr. 80 : 1).

zeigten Unterschiede zu denen reiner Harnsäure. Um nun festzustellen, welche Urate der Fettkörper enthält, führte ich Kristallisations- und Löslichkeitsproben durch.

Ich stellte die Alkali- bzw. das Ammoniumurat her, indem ich eine Lösung der Harnsäure in der betreffenden Lauge unter dem Deckglas auskristallisieren ließ. Dabei glichen die Kristallformen des Ammoniumurates denen im Collembolenfettkörper. (Die beschriebenen „Stechapfelformen“ — in der Literatur so genannt — des Ammoniumurates konnte ich weder in Tieren noch in Kon-

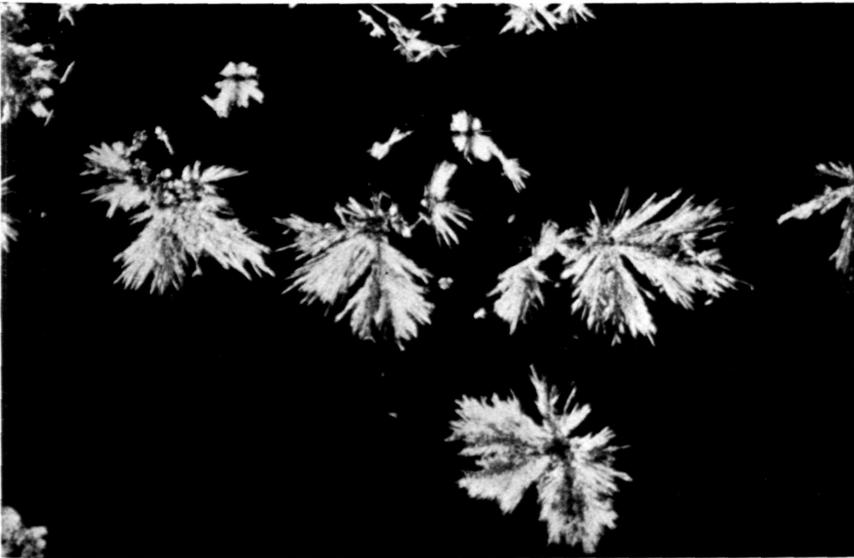


Abb. 4. $K-NH_4$ -Urat, aus Harnsäure nach Lösung in NH_4OH und Zufügen von alkoholischer Kalilauge auskristallisiert. (Polarisiertes Licht, Vergr. 80 : 1).

trollpräparaten sehen.) Wie im Fettkörper bildeten diese auch radialgestreifte Sphärite mit dunklem Achsenkreuz. Fügte ich nun zu dieser Ausbildung alkoholische Kalilauge, so entstanden nach kurzer Zeit vollkommen übereinstimmende Kristallformen mit denen, welche sich im Fettkörper der Tiere nach Zusatz der alkoholischen Lauge bildeten, nachdem sich das Ammoniumurat zuvor rasch gelöst hatte. Prüfung der Löslichkeit der entstandenen Ammonium-Kaliumurate, sowie ihr Verhalten im polarisierten Licht ergaben übereinstimmende Resultate mit denen der Collembolen

(Abb. 4, 1). Beide zeigen gerade Auslöschung, beide sind in Wasser gut löslich.

Nun gibt aber auch Natriumurat, mit alkoholischer Kalilauge versetzt, ähnliche Kristallformen. Zwar fehlen hier die bäumchenartigen Anordnungen der Kristallnadeln, es gibt nur kleine Büscheln und Drusen; im polarisierten Licht ist jedoch keine Unterscheidung möglich, die Auslöschung ist ebenfalls gerade. Die schwere oder minder schwere Löslichkeit ist im histologischen Präparat ein so relativer Begriff, daß ich sie hier besser nicht

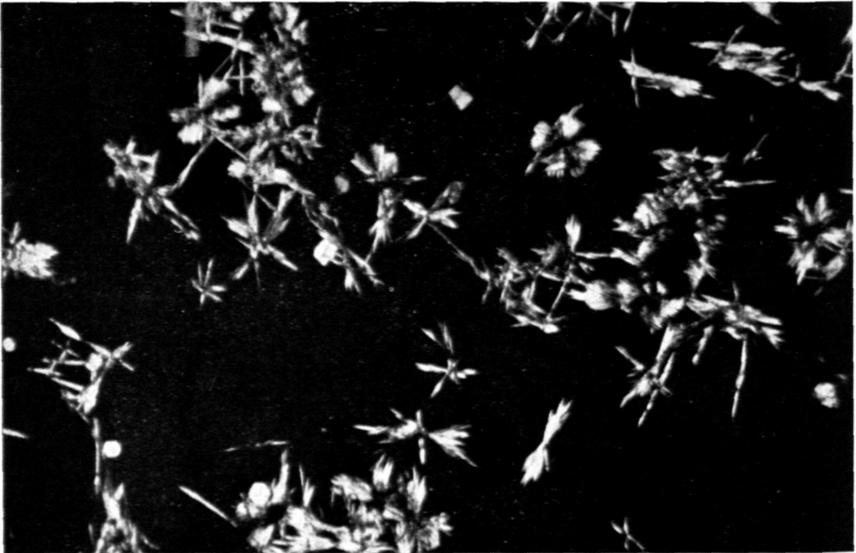


Abb. 5. Na-NH₄-Urat, Herstellung wie oben; die Ausbildung der bäumchenartigen Formen fehlt (Polarisiertes Licht, Vergr. 80 : 1).

zur Unterscheidung heranziehe, obwohl das Natrium-Kaliumurat (Abb. 5) sich schlechter löst als das Ammonium-Kaliumurat.

Aus diesen Versuchen ergibt sich nun die Folgerung, daß die Kristalleinschlüsse des Collembolen-, bzw. Apterygotenfettkörpers, sowie die der in Frage kommenden Insektenlarven und -puppen Ammoniummonourat eventuell auch Natriummonourat darstellen.

Bei allen Tieren fand die Auskristallisation der oben beschriebenen Formen nur statt, wenn die erwähnten Kristalleinschlüsse im Fettkörper vorhanden waren (Tiere, die wohl Fett, aber keine

oder andere Kristalle enthielten, z. B. Milben, zeigten sie nie. Reine Harnsäure gab, wie gesagt, nur mit wässriger Lauge Reaktionen). In diesen Fällen waren die Weidel'sche Probe und auch die später noch zu erwähnenden PVC-Versuche immer positiv.

Dem Vorteil dieses Uratnachweises, seiner Spezifität und seiner Fähigkeit, Spuren festzustellen, steht der Nachteil gegenüber, daß das Phänomen der Liesegang'schen Ringe auftritt und damit die Lokalisation begrenzt ist. Dies spielt insofern hier keine große Rolle, weil es sich ja nur um den Nachweis im Gewebe und nicht in der Zelle handelt und dieser Nachweis ist trotzdem lokal durchführbar.

Resultate: Außer an den mit der Murexidprobe untersuchten Tieren, die alle eine positive Uratprobe gaben, soweit die Murexidprobe positiv war (bei Milben war kein positives Resultat zu erzielen, ebenso nicht bei den erwähnten Dipterenlarven), führte ich hier die Versuche noch an folgenden Tieren durch: Campodea und Machilis, beide enthielten im Fettkörper die Kristalleinschlüsse, beide ergaben schöne positive Uratproben; Puppen aller oben erwähnten Dipterenlarven und Puppen von *Bibio marci*, ebenfalls alle positiv; Fettkörper der Larven von *Melolontha vulgaris*, *Oxyomus silvestris*, *Tenebrio molitor* (alle ausgewachsen und knapp vor der Verpuppung) mit positiven Resultaten.

Durch die bisher verwendeten Nachweismethoden war wohl die Ermittlung von Harnsäureverbindungen möglich, doch gaben sie keinen Aufschluß darüber, ob diese als Reinsubstanzen oder in Form ihrer Salze, der Urate, im Tier vorhanden waren. Allein Willem, der die Kristalleinschlüsse des Collembolenfettkörpers in Salzsäure löste, zog nach dem Auftreten von kochsalzartigen Kristallformen den Schluß, daß es sich in vorliegendem Fall um Natriumurat gehandelt habe (*). Ich konnte die erwähnten Kristalle mit HCl nicht herstellen und nehme an, daß diese Reaktion für die geringe Uratmenge des Collembolenfettkörpers zu wenig empfindlich ist.

Meine Uratprobe läßt jedoch die Identifizierung der Exkretionsprodukte zu: Alkoholische Kalilauge weist Urate (als Ammonium-Kalium- und Natrium-Kaliumurat) noch in Spuren, wässrige Kalilauge reine Harnsäure nach.

3. Löslichkeitsversuche.

Alle Versuche, die Harnsäureeinschlüsse in Säuren zu lösen, um nachher Auskristallisation reiner Harnsäurekristalle zu erhalten, waren negativ. Hier dürfte sich wieder der Einfluß der Erfassungsgrenze bemerkbar gemacht haben, möglicherweise hätte eine größere Menge Materials positive Resultate ergeben, sowie sie bei reiner Harnsäure zu verzeichnen waren (hier allerdings nur nach Lösen in Lauge und nachherigem Zusatz der Säure).

Tabelle 1. Harnsäureversuche.

	Murexid-	Weidel'sche	Urat-
		Probe	Probe
Harnsäure	+	+	+
Collembola			
Onychiurus	+	+	+
Pseudosinella	+	+	+
Achorutes		+	+
Tomocerus		+	+
Folsomia		+	+
Entomobrya	+	+	+
Diplura			
Campodea staphilinus		+	+
Thysanura			
Machilis sp.			+
Dipterenlarven			
Lycoriiden			
Lycoria triseriata		—	—
Lycoria grandicellaris		—	—
Chironomiden			
Syndiamesa sp.	—		—
Ceratopogoniden			
Culicoides sp.	—		—
Psychodiden			
Psychoda sp.		—	—
Cecidomyiden			
Synaptella sp.		+	+
Drosophiliden			
Drosophila obscuroides		—	—
Aphiochaeta xanthina		—	—
Dipterenpuppen			
Lycoriiden			
Lycoria triseriata			+
Lycoria grandicellaris			+
Chironomiden			
Syndiamesa sp.			+
Ceratopogoniden			
Culicoides sp.			+

	Murexid-	Weidel'sche	Urat-
	P r o b e		
Cecidomyiden			
Synaptella sp.	+	+	+
Bibioniden			
Bibio marci			+
Drosophiliden			
Drosophila obscuroides			+
Aphiochaeta xanthina			+
Hister sp. *), Exkreme			+
Schlangenexkreme	+	+	+

*) Nur mit n/10 KOH, daher reine Harnsäure.

Bevor ich zur Besprechung der weiteren Purine übergehe, möchte ich in einer Tabelle kurz die Anwendungsmöglichkeiten der einzelnen Nachweismethoden zeigen:

Methode	Harn- säure	Urate	Guanin	Xanthin	Adenin	Hypo- xanthin
Murexidprobe *)	+	+	+	+		—
Weidel'sche Pr.	+	+		+	—	—
Diazotierung	—	—	+	+	+	+
Pikrate **)			+		+	+
Agulhon'sche Pr.	+	+	—	—	+	+
Uratprobe	+	+	—	—	—	—

*) Die Farbunterschiede bei den verschiedenen Purinen sind unzuverlässig.

***) Pikrat von Guanin in NH_3 unlöslich, von Adenin und Hypoxanthin in NH_3 leicht löslich, daher Unterscheidung möglich.

II. Guanin.

Über das Vorkommen von Guanin bei Insekten gibt es nur spärliche Angaben. Bei den wenigen daraufhin untersuchten, meist größeren Insektenlarven und -imagines wurde es nicht gefunden, weder im Fettkörper noch in den malpighischen Gefäßen (*Timon-David*⁹⁰, *Wigglesworth*⁹⁷).

Als Exkretionsprodukt der Spinnen wurde Guanin aber festgestellt (⁹⁶). *Neumann* fand auch bei *Parasitus kempseri* Guanin in den Exkretionsschläuchen (⁹⁵). Obwohl es sich hier um keine ausgesprochene Exkretspeicherung handelt, da Guanin ja als Exkretionsprodukt ausgeschieden wird, ist aber doch eine speicherartige Anreicherung desselben zu verzeichnen, weil bei Spinnen Exkretion erst bei Neuaufnahme von Nahrung erfolgt; ich konnte dies auch bei Milben beobachten.

Es war nun von Interesse, zu erfahren, ob es sich bei den Exkreten von Milben wirklich um Guanin handelt und ob bei Apterygoten und Insektenlarven nicht doch auch solches festgestellt werden kann.

Die Exkretionsschläuche der Milben, deren gefüllter Zustand ja leicht schon mit freiem Auge beobachtet werden kann und unter schwacher mikroskopischer Vergrößerung im Auflicht eine weiße, körnige Masse darstellt, enthalten Kristalleinschlüsse, die aber von denen des Collembolenfettkörpers stark verschieden sind. Zwar zeigen sie unter dem Mikroskop im durchfallenden Licht keine auffallenden Unterschiede, ausgenommen bedeutendere Größe; auch sie sind grünlich und rund bis oval. Im polarisierten Licht ist deutliche konzentrische Schichtung zu erkennen, ferner Interferenzfarben, aber nie ein dunkles Achsenkreuz festzustellen. (Meine Beobachtungen stimmen hier mit denen *Neumann's* ⁽⁶⁵⁾ überein.)

Die Überprüfung der Löslichkeit der beschriebenen Kristalle gab im Vergleich zu reinem Guanin folgende Resultate:

Lösungsmittel	Guanin	Kristalle der Exkretionsorgane
H ₂ O, kalt	unl.	• unl.
H ₂ O, heiß	„	„
Alkohol	„	„
Äther	„	„
Alkali	ll.	ll.
NH ₃	schw. l.	unl.
Mineralsäuren	ll.	l.
Organ. Säuren	unl.	unl.

Die Löslichkeit der Kristalleinschlüsse stimmt also mit der des reinen Guanins überein.

Zum mikrochemischen Nachweis des Guanin lassen sich wieder Farbe- und Kristallisationsmethoden anwenden.

1. Farbreaktionen.

a) *Diazotierung*: Diese beruht auf der Bildung eines Diazofarbstoffes durch Kupplung von Guanin mit Sulfanilsäure und spielt als Mikronachweis für das Guanin scheinbar dieselbe Rolle, wie die Murexidprobe für die Harnsäure. Ich fand nur die Diazotierung für den Mikronachweis des Guanin in der Literatur angegeben.

Die Lösung wurde nach *Burian-Schneider* hergestellt: 2 g Sulfanilsäure werden in 5 ccm NaOH gelöst, 0,8 g NaOH₂ werden in 10 ccm H₂O gelöst. Beide Lösungen ergeben die Diazoniumverbindung. Sie sind unter Eiskühlung zu mischen und mit Essigsäure anzusäuern. (Hier ist die Kühlung besonders notwendig, da sonst Zersetzung eintritt.) Die Diazoniumverbindung ist äußerst kurz haltbar und muß immer frisch zubereitet werden. Sie wird den Präparaten, in denen die Kristalle vorher durch Lauge in Lösung gebracht wurden, zugesetzt. Es tritt sofort Rotfärbung auf, welche sich nach einer bis zwei Minuten intensiviert. Genau dasselbe Resultat ergaben Präparate reinen Guanins. Es wird angegeben, daß ein Zusetzen der Lauge nach Zugabe des Diazokörpers die Guaninkörner einzeln rot färbe. Dies ist aber im histologischen Präparat aus folgendem Grund nicht möglich: Mit Diazoverbindungen kuppeln außer sämtlichen Purinen (mit Ausnahme der Harnsäure und ihrer Salze) auch eine große Anzahl anderer organischer Verbindungen, so z. B. Eiweiß. Aus diesem Grund kann man wohl von reinen Purinsubstanzen charakteristische Diazoverbindungen herstellen, die Reaktion verliert aber histochemisch jeden Wert.

Die Versuche waren mit reinem Guanin, bei allen Milben und auch bei verschiedenen Collembolen positiv.

b) *Murexidprobe*: Diese gibt mit Guanin, aber nur bei Versetzen des Alloxans mit Lauge, Orangefärbung. Das positive Ausfallen der Xanthoproteinreaktion (die ja nicht nur mit Ammoniak, sondern auch mit Lauge ausgeführt werden kann) gibt hier aber noch größere Störungen als bei der Murexidprobe auf Harnsäure. Dadurch ist sie für einen Mikronachweis auf Guanin ganz unzuverlässig. Rotfärbung trat bei Versuchen mit Milben nie auf, die Orangefärbung betrug nach *Ostwald's* Farbnormatlas für reines Guanin in 3.

2. Mikrokristallisation.

a) *Guaninnachweis mit Pikrinsäure*: *Wulff* (¹⁰¹) und *Capranica* (¹⁵) beschreiben die Auskristallisation des Guanins als Bichromat, Pikrat und Ferricyanid. Ersteres und letzteres sind in so kleinen Mengen, wie sie hier in Betracht kommen, nicht mehr fällbar. In einer Verdünnung von 1 : 30.000 ist aber Guanin noch als

Pikrat nachzuweisen. Ich versuchte daher, diese Methode mikrochemisch anzuwenden.

Kontrollversuche wurden mit reinem Guanin und einer stark guaninhaltigen organischen Substanz (Fischschuppen) durchgeführt. Es handelt sich hier um die Bildung von Additionssalzen mit der Imidogruppe des Guanins, wobei der Stickstoff 5-wertig wird.

Die Pikrate der übrigen Purine, soweit diese solche bilden, sind zum Unterschied von Guaninpikrat in Ammoniak leicht löslich. Es ist aber nicht bekannt, daß auch sie in so großer Verdünnung noch positive Reaktionen geben.

Guanin, bzw. die Kristalleinschlüsse der Exkretionsschläuche der Milben, wurden unter dem Deckglas durch Zufügen eines Tropfens $n/1$ HCl gelöst und gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung zugesetzt. Ebenso wurde nach Lösen des Guanins in $n/1$ KOH den Präparaten Pikrinsäurelösung zugefügt.

Hier ist besonders darauf zu achten, daß die Lösung möglichst konzentriert bleibt, also nur wenig Säure bzw. Lauge zugesetzt wird. Auch soll das Lösungsmittel einige Zeit einwirken, damit das Guanin vollständig in Lösung geht, bevor das Fällungsmittel zugesetzt wird. Da die Auskristallisation aber mehrere Stunden in Anspruch nimmt, muß durch einen Überschuß an Fällungsmittel dafür gesorgt werden, daß das Präparat längere Zeit flüssig bleibt. Man setzt also eventuell nochmals verdünnte Pikrinsäure zu.

Es fallen neben dem Guaninpikrat in salzsaurer Lösung Pikrinsäurekristalle aus (diese, von Fürth⁽²⁹⁾ als „Schwalbenschwanzkristalle“ beschrieben, sind kein Guaninpikrat, sie entstehen auch, wenn man zur Pikrinsäurelösung nur Salzsäure zusetzt). Aus der alkalischen Lösung scheiden sich neben Guaninpikrat auch Kaliumpikratkristalle (bzw. Natriumpikrat) aus. Es ist aber auch hier keine Verwechslung mit Guaninpikrat möglich. Dieses tritt immer in pinsel- oder büschelförmigen Bündeln feinsten Kristallnadeln auf, die einen charakteristischen goldgelben Glanz besitzen (Abb. 6). Kaliumpikrat hingegen kristallisiert in einzelnen großen Kristallnadeln und rhombischen Säulen, welche hellgelb und glanzlos sind.

Bei den Versuchen mit Milben kristallisierte aus der salzsaurer Lösung kein Pikrat aus. Es dürfte diese Lösung für die geringe Guaninmenge, welche bis zu sechs Stunden zur Ausscheidung

brauchen kann, zu schnell verdunsten. Die Versuche in alkalischer Lösung zeigten positive Resultate.

Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß keine Lokalisation möglich ist. Die Kristalle können zwar in nächster Umgebung des Präparates, manchmal aber auch nur am Deckglasrand entstehen.

Die Guaninpikratkristalle waren in Ammoniak unlöslich, in Wasser sehr schwer bis unlöslich genau so wie die aus der Reinsubstanz erhaltenen.

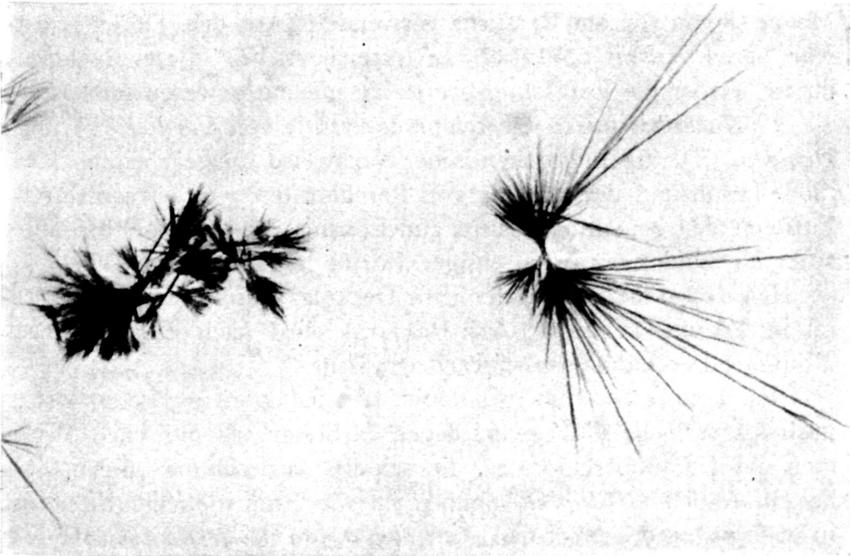


Abb. 6. Guaninpikrat, Kristallisation aus alkalischer Guaninlösung (Vergr. 80 : 1).

Resultate: Milben (Oribatiden, Gamasiden, Uropodinen) gaben schon bei Verwendung eines einzelnen Tieres positive Resultate. Um bei Collembolen solche zu erhalten, mußten mindestens 5 Tiere in einem Präparat verwendet werden, bei weniger Individuen war die Reaktion negativ. Collembolen weisen im Fettkörper also Guanin auf.

Auch im Fettkörper der untersuchten Dipterenlarven waren Spuren von Guanin nachzuweisen. Ebenso enthielt der Fettkörper von Sciarapuppen und Bibiopuppen Guanin, allerdings in ganz geringen Mengen.

b) *Bildung von salz- bzw. salpetersaurem Guanin*: Diese beruht ebenfalls auf der Entstehung von Additionssalzen ⁽³⁸⁾. Man läßt eine Lösung von Guanin in verdünnter Salzsäure oder Salpetersäure, bzw. seine, durch Zufügen der genannten Säuren im histologischen Präparat entstandene Lösung, unter dem Deckglas auskristallisieren. Das salzsaure Salz scheidet sich in vierseitigen schlanken farblosen Säulen ab, die im polarisierten Licht schiefe Auslöschung zeigen; das salpetersaure Salz erscheint in sechsseitigen oder vierseitigen Formen. Mit reinem Guanin waren beide Salze mikrochemisch herzustellen, wenn man eine entsprechende Menge davon für die Versuche verwendete. Aus den Tieren selbst war keine Auskristallisation zu erreichen. Für diese Reaktion dürfte wieder die Erfassungsgrenze zu niedrig gewesen sein.

c) *Nachweis durch Überchlorsäure*: Die von *Cordier* ⁽¹⁹⁾ und *Denigés* ⁽²¹⁾ für mikrochemische Nachweise ausgearbeitete Methode beruht auf der Bildung von Perchloraten, welche man durch Zufügen der genannten Säure zur Lösung verschiedener organischer Verbindungen, u. a. einiger Purine, erhält.

Die Substanz wird unter dem Deckglas durch geeignete Mittel in Lösung gebracht; das Präparat wird nach Zugabe eines Tropfens Perchlorsäure schwach erwärmt.

Ich konnte bei reinem Guanin, das ich in n/10 H₂SO₄ löste, nach kurzer Zeit die beschriebenen farblosen, rhombischen Prismen des Guaninperchlorates, die schiefe Auslöschung zeigen, erhalten. (Nach *Cordier's* Angaben ist die Empfindlichkeitsgrenze in Milligramm hier 0,001.)

Mit Milben waren keine positiven Resultate zu erzielen; *Cordier* selbst gelang diese an Schuppen von Goldfischen, die stark guaninhaltig sind, ebenso wenig. Im Gewebe dürfte also eine andere Verbindung die Reaktion stören.

Es hat sich durch die Versuche nun ergeben, daß Guanin tatsächlich das Exkretionsprodukt der Milben darstellt. Die bei Nahrungsaufnahme beobachtete starke Exkretion machte es mir möglich, das Exkret isoliert zu erhalten, indem ich die abgeschiedenen Tröpfchen der weißen, körnigen, ziemlich flüssigen Masse mit einer Präpariernadel aufnahm. Ich konnte darin Guanin nachweisen.

Daß die entsprechenden Versuche bei *Araneus diadematus* ebenfalls positive Resultate ergaben, genau so wie die an Fischschuppen, soll noch erwähnt sein.

Tabelle 2. Guaninmachweise.

	Diazo- tierung	Murexid rot	gelb	Pikrat s. alk.	Guanin HCl _s .	HNO ₃ s.	Per- chlorat
Guanin	+	—	+	+	+	+	+
Fischschuppen	+			+	+		
Acarina							
Oribatiden	+	—	+	—	+	—	—
Uropodinen	+	—	+	—	+	—	—
Gamasiden	+	—	+	—	+	—	—
Araneus diadematus	+	—	+	+	+		
Collembola							
Onychiurus	+	+			+	—	
Pseudosinella	+	+			+		
Entomobrya	+	+			+		
Insektenlarven (Fettkörper)							
Chironomiden							
Syndiamesa sp.		—	+		+		
Cecidomyiden							
Synaptella sp.		+			+		
Melolontha vulg.		+			+		
Insektenpuppen (Fettkörper)							
Lycoriiden							
Lycoria triseriata		+			+		
Bibioniden							
Bibio marci		+			+		

III. Übrige Purine (Xanthin, Adenin, Hypoxanthin).

Der Nachweis der übrigen Purinbasen ergibt große Schwierigkeiten, da alle angegebenen Mikromethoden nicht spezifisch sind oder zu geringe Erfassungsgrenzen besitzen. So entstehen auch mit ihnen rote Diazoverbindungen; die Murexidprobe (von *Strecker* hier als Xanthinprobe bezeichnet ⁽³⁸⁾) gibt mit Xanthin, allerdings nur mit Lauge, orange bis violette Farben und ist darum unspezifisch *); die Weidel'sche Probe gibt mit Harnsäure genau dieselben Resultate wie mit Xanthin. Die verschiedenen anderen Farbreaktionen, z. B. nach *Thomas und Agulhon* ⁽⁸⁸⁾ **), nach

*) Bekanntlich wird die Harnsäure mit Kalilauge auch violett, während Guanin damit Orangefärbung gibt.

**) Xanthin + Phenol und Alkalihypochloritlösung = olivgrüne Färbung, die aber auch verschiedene Aminosäuren geben; Xanthin + Kaliumbichromat + Schwefelsäure = Grünfärbung; hier wird aber eine ganze Liste anderer Stoffe, die ebenso wie Xanthin reagieren, angeführt.

Hoppe-Seyler (³⁸) u. a. sind viel zu unspezifisch, um hier Verwendung zu finden.

Die Mikrokristallisationsmethoden der übrigen Purine ergaben auch keine brauchbaren Resultate. Die Kristalle des salz-, bzw. salpetersauren Xanthins waren analog denen des Guanins herzustellen, doch versagte diese Reaktion im histologischen Präparat infolge der zu geringen Empfindlichkeitsgrenze; sie war nur mit reinem Xanthin zu erhalten. Auch die Methode nach *Cordier* (¹⁹), Xanthin als Perchlorat nachzuweisen, brachte keine positiven Ergebnisse. Mit Reinsubstanzen sind zwar die farblosen, wetzsteinartigen Kristalle herzustellen, wenn man das Xanthin mit einem Tropfen Perchlorsäure versetzt und das Präparat so wie bei Guanin vorsichtig erwärmt. In Tieren waren sie aber nie zu erhalten. *Cordier* selbst bezeichnet diese Reaktion als wenig empfindlich und für die mikrochemische Praxis nicht besonders gut geeignet.

Trotz des negativen Ausfalles sämtlicher Xanthinnachweise, darf natürlich nicht auf sein vollständiges Fehlen im Fettkörper der Insekten geschlossen werden. Xanthin und die weiteren Purine sind aber mit den derzeit bekannten Methoden histologisch nicht nachzuweisen.

E. Der mikrochemische Nachweis von Fett.

Fettstoffe als solche sind durch verschiedene mikrochemische Methoden nachzuweisen, doch stößt man bald auf Schwierigkeiten, wenn man eine Identifizierung einzelner Stoffe eines Fettgemisches auf diesem Wege durchführen will. Zwar wurde eine Reihe von Methoden ausgearbeitet, welche eine Trennung möglich erscheinen ließen, es dauerte meist aber nur kurze Zeit, bis die größte Zahl dieser Angaben widerlegt war und nur für wenige konnte tatsächlich eine Spezifität nachgewiesen werden.

Der Fettnachweis stützt sich hauptsächlich auf Färbungen; ferner wird die Mikrokristallisation durch Verseifungs- und Myelinbildungsprozesse angewandt; auch die Löslichkeitsverhältnisse werden zur Prüfung herangezogen; schließlich gibt es eine Reihe von mehr oder minder spezifischen Spezialreaktionen.

Meine Untersuchungen befaßten sich mit folgenden Methoden:

1. Färbungen.

Was die Spezifität der mikrochemischen Färbungen betrifft, war sie der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Auf dem Gebiet der Fettfärbung haben besonders *Kaufmann* und *Lehmann* (^{42, 43, 44}) durch exakt durchgeführte Versuchsreihen den Beweis für die Unspezifität zahlreicher Methoden erbracht. Sie stellten systematische Prüfungen bei einer großen Anzahl von Fettgemischen an, ausgehend von der Tatsache, daß derselbe Farbstoff unter gewissen Bedingungen verschiedene Substanzen zu färben imstande ist, wobei Farbton und -stärke oft verschieden, oft aber auch gleich sein kann. Die Versuche von *Kaufmann* und *Lehmann* wurden mit entfettetem Holundermark durchgeführt, welches mit verschiedenen Farbstoffen getränkt, geschnitten und wie ein histologisches Präparat behandelt wurde.

Die beiden Autoren machten mit Recht folgende Feststellungen: „Ehe man über spezifische Fettreaktionen spricht, muß man über die Gesetzmäßigkeit der Färbung nach chemischen Grundsätzen an Reinsubstanzen unterrichtet sein. Versagen die Reaktionen hier (es war nach ihren Untersuchungen der Fall), so scheint es uns nicht der Mühe wert, über Differenzierung von Fetten im Gewebe zu streiten“ und an einer anderen Stelle: „Wäre nach unseren Untersuchungen eine Gruppendifferenzierung erlaubt, so würden wir nie wagen, unsere Ergebnisse auf den Gewebeschnitt zu übertragen, denn am Gewebeschnitt steigen die Schwierigkeiten ins Ungeheure.“ „Wenn wir nun die uns so interessierende Frage der Spezifität prüfen, so können wir eine gewisse Affinität der in Frage stehenden Farbreaktionen zu einzelnen Stoffen bestimmter Fettgruppen bei Prüfung ungemischter Reinsubstanzen zugestehen. Kommen wir aber zu Fettmischungen — und nur mit solchen haben wir es im Gewebe zu tun — so müssen wir die Spezifität ablehnen.“

a) *Fettfärbungen mit Sudanfarbstoffen*: Sudanfarbstoffe gehören in die Klasse der Diazofarbstoffe und die Färbung mit ihnen dürfte ein rein physikalischer Prozeß sein, darauf beruhend, daß der Farbstoff, der in Fett und Alkohol löslich ist, aus dem schlechteren Lösungsmittel, Alkohol, durch das bessere, Fett, ausgezogen wird. Mikrochemisch sind hier insoferne Grenzen gesetzt, als das feinverteilte Zellfett oft nicht färbbar ist (es scheint dann unter der Erfassungsgrenze zu liegen). Auch unter gewissen Umständen, z. B. bei der Erscheinung der Löslichkeitserhöhung*), wird die Sudanfärbung beeinträchtigt. Die Beobachtung hat gezeigt, daß 70%iger Alkohol Fettgemische — und mit solchen hat

*) Es ist bekannt, daß ein an sich schwer löslicher Stoff durch Zusatz eines anderen leichter löslichen Stoffes nun in demselben Lösungsmittel in höherem Grade in Lösung geht.

man es ja im histologischen Präparat zu tun — leichter löst, als reine Fettsubstanzen. Versagt die Sudanfärbung mit 70%igem Alkohol, so geben 40%ige Lösungen oft noch positive Resultate. Trotzdem spielt die Sudanfärbung die überragende Rolle für die Fettfärbung, allerdings ohne Differenzierung, denn Farbunterschiede, welche infolge verschieden starker Anreicherung des Farbstoffes auftreten können, sind keine chemischen Unterscheidungsmerkmale einzelner Fette. Außer Glycerinestern verschiedener Fettsäuren und den Fettsäuren selbst, sind mit diesen Farbstoffen auch Lipoide im weiteren Sinne färbbar, also Phosphatide, Lecithine, Cholesterine, Cerebroside, Carotinoide und Wachse; ferner auch ätherische Öle.

Von den Sudanfarbstoffen werden in der Hitze alkoholische Lösungen hergestellt, welche nach der Filtration mehrere Wochen haltbar sind.

Ich färbte mit Sudan III ⁽⁷⁶⁾ und mit Sudan schwarz B ⁽⁵⁷⁾, wobei letzterer Farbstoff unbedingt vorzuziehen ist. Sudan III, das orange bis rot färbt, ist besonders bei sehr kleinen Tropfen oder Fett, welches noch im Gewebe enthalten ist, schwer von den umgebenden Gewebsteilen zu unterscheiden, wenn Tiere, wie Milben und gefärbte Insektenlarven außer der braungelben Körperfarbe auch noch gelb bis rötlich gefärbtes Fett besitzen. Sudan schwarz B hingegen färbt dunkelblau bis schwarz und ist bis in die kleinsten Tropfen deutlich zu erkennen.

Ich färbte die stets frisch hergestellten Präparate, indem ich einige Tropfen der Farbstofflösung zusetzte und mit dem Deckglas bedeckte. Ein Zufügen von Alkohol vor der Färbung war nicht nötig, da die Präparate nicht aus Wasser kamen; es hätte nur das Fett unnütz angegriffen. Die Färbung, welche sogleich nach Zutritt der Farblösung beginnt, ist nach ca. 20 Minuten beendet. Durch vorsichtiges Durchsaugen von Wasser oder schwachem Alkohol unter dem Deckglas wird die überschüssige Farblösung entfernt.

Bestehen bezüglich der Färbung Zweifel, so ist eine Überprüfung mit fettlösenden Mitteln dadurch möglich, daß man eine der später noch anzugebenden Flüssigkeiten unter dem Deckglas durchsaugt. Das Fett wird gelöst, die Farbe vergeht also, während andere eventuell mitgefärbte Stoffe ihre Farbe behalten.

Resultate: Der Fettkörper der Collembolen weist ein besonders flüssiges, stets farbloses Fett auf, welches sich bei der Herstellung von Präparaten zu Tröpfchen sammelt und gut zu färben ist. Sowohl mit Sudan III als auch mit Sudan schwarz B waren in allen Präparaten Fette in relativ großen Mengen deutlich nachzuweisen; auch die ergänzende Prüfung durch Lösung vor und nach der Sudanfärbung bestätigte die Resultate in allen Fällen.

Zur Untersuchung verwendet wurden Tiere der Gattungen *Onychiurus*, *Achorutes*, *Lepidocyrtus*, *Pseudosinella*, *Tomocerus*, *Entomobrya*.

Dieselben Resultate mit beiden Farbstoffen waren bei *Camptopoda* und *Machilis* zu verzeichnen.

Bei Milben ist Sudan III wegen der rotbraunen Eigenfarbe der Tiere nicht sehr zu empfehlen; Sudan schwarz B hingegen gibt sehr gute Resultate. Milben enthalten wenig Fett.

Die untersuchten Formen waren Gamasiden, Uropodinen, Oribatiden.

Der Fettkörper der Insektenlarven (Dipteren) kann von sehr wechselnder Quantität, je nach der Lebenslage, in der sich das Tier befindet, sein. Das Fett sammelt sich, ähnlich dem der Collembolen, im Präparat auch bald zu Tröpfchen und ist durch Sudanfärbung gut nachzuweisen. Bei einigen Sciaridenlarven, die ausgesprochen gelbes Fett besaßen, war die Sudan-schwarz-B-Färbung wieder vorzuziehen. Bei den meisten Individuen war eine Untersuchung des isolierten Fettkörpers möglich, nur von ganz kleinen Formen wurden Zupfpräparate der ganzen Tiere hergestellt (Cecidomyidenlarven).

Untersucht mit positiven Resultaten wurden die Larven von *Drosophiliden*, *Bibioniden*, *Chironomiden*, *Psychodiden*, *Lycoriiden*, *Cecidomyiden*; ferner die Puppen von *Drosophiliden*, *Bibioniden*, *Psychodiden* und *Lycoriiden* (Arten siehe Tabelle). Sudanfarbstoffe färben also Fett als solches, lassen aber keine weiteren Schlüsse über seinen Aufbau zu.

b) *Färbungen mit Scharlach R-, Alkannin- und α -Naphthol-lösungen:* (^{64, 76}) Diese Färbungen wurden in meiner Arbeit nicht durchgeführt, da sie ja auch nur Fett im allgemeinen nachweisen und die Resultate der Sudanfarbstoffe nicht überbieten können.

c) *Nilblausulfat:* Nilblausulfat, ein Oxazinfarbstoff, färbt Präparate nicht dauerhaft.

Die Angaben, wonach Nilblausulfat Neutralfett rosa, Fettsäuren aber blau färben soll, wurden durch die Untersuchungen von *Kaufmann* und *Lehmann* (43) widerlegt. Die Blaufärbung ist nur für ungesättigte Fettsäuren spezifisch und scheint sich mit Zunahme des ungesättigten Charakters zu intensivieren. Sie tritt aber auch bei Fettmischungen auf, z. B. von Cholesterin, Lecithin oder Glycerin mit Triolein, alles Verbindungen, welche einzeln keine Blaufärbung geben, im tierischen Organismus aber stets vorkommen können. Daher ist bei der Beurteilung Vorsicht geboten, ein positives Ausfallen dieser Färbung ist noch kein Beweis, daß freie, ungesättigte Fettsäuren vorhanden sind.

Die Rosafärbung ist nur für ungesättigte Glyceride, also z. B. Triolein, spezifisch und tritt auch auf, wenn sich in Fettgemischen Spuren davon befinden. Gesättigte Triglyceride geben diese Reaktion nicht.

Nun ist im Organismus aber nie Fett der Type I (Triglyceride gleicher Fettsäuren), sondern immer solches der Type II (Triglyceride verschiedener Fettsäuren) vorhanden. Ist eine dieser drei Fettsäuren ungesättigt, so ist die Färbung positiv. Daher sind die Versuche an natürlichen Fetten fast immer positiv; (das dürfte auch der Anlaß zu der irrtümlichen Meinung gewesen sein, alle Neutralfette gäben die Rosafärbung, man hat eben nicht mit Reaktionen an Reinsubstanzen verglichen!)

Die Färbung wurde an frischen Präparaten durchgeführt. Eine gesättigte wässrige Lösung von Nilblausulfat läßt man ungefähr 20 Minuten auf das Präparat einwirken und entfernt den überschüssigen Farbstoff durch Durchsaugen von etwas 1%iger Essigsäure. Ich färbte mit verdünnter und gesättigter Lösung, die Resultate waren bei letzterer besser, verdünnte Lösungen wirken sehr langsam und viel schwächer.

Resultate: Wie zu erwarten, färbte sich das Fett in der Hauptsache rosa, es sind also ungesättigte Fettsäuren darin vorhanden. Regelmäßig trat aber auch Blaufärbung auf, über die ich jedoch keine weiteren Feststellungen treffen möchte. Eine Vermischung der beiden Farben, also violette Töne, konnte ich nie beobachten, rosa und blaue Tropfen waren, obgleich nebeneinanderliegend, in ihrer Farbe deutlich zu unterscheiden. Nun ist die Färbung aber nicht gleichmäßig. An den Rand des Präparates getretene Fettropfen sind meist schon nach einigen Minuten deutlich gefärbt, je

weiter die Lösung ins Innere vordringt, desto schwächer wird die Färbung und bei dicht gelagerter Substanz versagt sie überhaupt. Auch konnte ich beobachten, daß außerhalb des Gewebes größere Tropfen leichter, kleinste hier aber überhaupt nicht färbbar sind.

Es läßt sich also feststellen, daß die Glyceride der untersuchten Tiere ungesättigte Fettsäuren in ihrer Verbindung enthalten; es ist aber mit dieser Methode kein quantitativer Nachweis in dem Sinn zu führen, daß alles sichtbare Fett gefärbt wird. Auch ist aus dem einleitend Gesagten zu bestätigen, daß man keine weiteren Schlüsse auf den Aufbau der Fette ziehen kann. Daß die Ergebnisse bei Collembolen fast negativ waren, ist nicht verständlich. Durch eine leise Rosafärbung, die bei *Onychiurus* einmal und bei *Pseudosinella* mehrmals im Verlauf der zahlreichen Versuche auftrat, ist ja bewiesen, daß ihr Fett auch ungesättigte Säuren enthält. Entweder sind die Fetttropfen zu klein, um gefärbt zu werden, oder aber stört irgend eine andere Verbindung die Reaktion.

Bemerkenswert ist eine Zunahme der Färbungsintensität in folgender Reihe von Insekten: ganz schwach rosa bei Collembolen, zu deutlicher Rosafarbe bei *Campodea*, *Machilis* und Insektenlarven. Die Blaufärbung hingegen bleibt in Farbe und Intensität konstant.

Milben brachten sehr gute positive Resultate. Die Farben waren nach Ostwald's Farbnormatlas, bei durchfallendem, künstlichem Licht im Mikroskop, nach Entfernung der überschüssigen Farblösung durch Auswaschen mit 1%iger Essigsäure, folgende:

	rosa	blau
Gamasiden	go 9, 10	na 14
Uropodinen	go, 10, 9	ia, la 14
<i>Pseudosinella</i>	go 9	ia 14
<i>Campodea</i>	go 9	ia 14
<i>Drosophila</i> - Synaptellalarve	ga 9	ia, la, na 14

d) *Wirkung von Farbstoffbasen*: Den in die Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe gehörenden Rosanilinen, die Salze darstellen, liegen Farbstoffbasen zugrunde, die mit Säuren den Farbstoff, eben das Salz, bilden. Diese Basen, in freiem Zustand nicht isolierbar, sind nur in verdünnter wässriger Lösung existenzfähig; es können aber durch indifferenten Medien aus der wässrigen Lösung Anhydride ausgezogen werden, welche eine andere Farbe besitzen.

Diese Anhydride bilden ein gutes Reagens zum Nachweis freier Fettsäuren, mit denen ihre Salze leuchtende Farben geben. Nun beschränkt sich ihre Reaktionsfähigkeit aber nicht nur auf Fettsäuren, sie reagieren auch mit anderen Säuren, Essigsäure, Salzsäure usw.

In den Präparaten trat immer starke Färbung auf, also sind saure Substanzen, welche allerdings nicht freie Fettsäuren sein müssen, vorhanden. Für die Untersuchung im histologischen Präparat ist die Wirkung der Farbstoffbasen, die in reinen Fettgemischen sehr gute Dienste leistet, daher zu wenig spezifisch. (Versuche mit reiner Ölsäure gaben schöne positive Resultate.)

Die verwendeten Basen waren: Methylgrünbase, Viktoriablaubase 4 R, Viktoriablaubase B, Rhodaminbase.

2. Fettnachweis mit OsO₄.

Die Osmierung beruht auf der Reduktion von OsO₄ zu OsO₂ bzw. metallischem Osmium durch die reduzierende Fähigkeit der Glycerinester ungesättigter Fettsäuren. In reinen Fettgemischen tritt deswegen bei deren Anwesenheit eine Schwärzung auf, die nur durch die Bestandteile mit der Bindung — C = C — herbeigeführt wird. Nun gehen aber nicht nur Glyceride ungesättigter Fettsäuren, sondern fast sämtliche ungesättigte Verbindungen und auch viele reduzierend wirkende Substanzen wie Aldehyde, Gerbsäuren u. a. den Anlaß zur Reduktion des OsO₄. Da im histologischen Präparat stets solche Verbindungen vorhanden sind, kann die Osmierung nicht als histochemischer Fettnachweis für ungesättigte Fette verwendet werden.

3. Fettnachweis durch Löslichkeitsproben.

Wie schon oben erwähnt, sind Löslichkeitsproben, besonders wenn Unklarheit darüber herrscht, ob es sich bei einer gefärbten Substanz wirklich um Fett handelt, von großem Wert. Als Fettlösungsmittel werden Äther, Schwefelkohlenstoff, Petroläther, Chloroform, Aceton, Phenol u. a. so verwendet, daß man sie unter dem Deckglas durch das Präparat saugt. Das Fett löst sich; war es gefärbt, so verschwindet an dieser Stelle die Farbe, während mitgefärbte fettfreie Substanzen dieselbe behalten.

Unlöslich sind Fette in konzentrierter Schwefelsäure.

Färbungen und Löslichkeitsproben können als Hilfsmethoden angesehen werden, mit denen sich der Fettcharakter einer Substanz im allgemeinen feststellen läßt. Jedoch auch durch die Mikroverseifung und die ihr verwandte Myelinformbildung von Fetten ist keine bessere Differenzierung der Fettstoffe zu erreichen, denn die von verschiedenen Autoren angegebenen Verseifungsformen der Reinsubstanzen verwischen sich im histologischen Präparat ja wieder, infolge der Fettmischungen, die hier auftreten.

4. Mikrokristallisation.

a) *Mikroverseifung*. Seifen, bekanntlich unter anderem Alkalisalze der Fettsäuren, können mikrochemisch in verschiedener Form, als Nadel, Nadelbüschel oder als Sphärite, auskristallisieren.

Auf die näheren Bedingungen und Begleitumstände der Mikrokristallisation wurde schon im vorigen Kapitel hingewiesen. Ich möchte hier nur nochmals betonen, daß vor allem bei der Verseifung eine Beobachtung der Präparate im polarisierten Licht unerläßlich ist, da sich die in Sphäritform verseiften Fetttropfen erst dabei erkennen lassen.

Die mikrochemischen Verseifungsmethoden der einzelnen Autoren zeigen gewisse Unterschiede. *Molisch* ⁽⁶⁴⁾ verseift pflanzliche Fette mit einer Lösung gleicher Teile konzentrierter wässriger Kalilauge und gesättigtem Ammoniumhydroxyd. Nach Zufügen eines Tropfens dieser Lösung wird das Präparat mit einem Deckglas bedeckt und umrandet, damit es nicht vertrocknet; die Verseifung kann mehrere Stunden bis Tage dauern, auch soll durch die Umrandung ein eventuelles Auftreten von Karbonaten verhindert werden. Man kann die Präparate auch für die Dauer des Versuches im feuchten Raume belassen. Entsprechend große Petrischalen, deren Boden mit Wasser bedeckt ist und die ein kleines Gestell als Träger der Präparate enthalten, eignen sich sehr gut hierfür. Ferner soll die Verseifung bei höherer Temperatur schneller erfolgen.

Tumann ⁽⁶¹⁾ verwendet konzentrierte wässrige Kalilauge und 20%ige Ammoniumhydroxydlösung 1 : 1, die Versuchsanordnung ist dieselbe.

Die Präparate sind in beiden Fällen bis zu 5 Tagen zu beobachten, da die Bildung von Seifenkristallen oft erst nach längerer Zeit eintritt; auch sind verschiedene Ausbildungsformen der Kri-

stalle möglich, Sphärite und einzelne oder zu Büscheln geordnete Kristallnadeln, welche die ersteren im Laufe der Untersuchungen ablösen können.

Hartwich und *Uhlmann* (^{33, 34}) geben für die Verseifungsformen genaue Bildungszeiten an, die sie bei verschiedenen Fetten, allerdings im isolierten Zustand, beobachtet haben. Sie verseifen ebenfalls mit einer konzentrierten Lösung von Ätzkali in Wasser und 20%iger Ammoniumhydroxydlösung 1 : 1, die sie aber in verschiedenen Verdünnungen mit Wasser verwenden ($\frac{1}{2}$ Lauge, $\frac{1}{3}$ Lauge, $\frac{1}{4}$ Lauge).

Rosenthaler (¹⁷) endlich verwendet konzentrierte alkoholische Lösungen von Ätzkali oder Ätznatron, da nach seiner Ansicht wässrige Lösungen viel zu langsam reagieren, alkoholische Lösungen aber oft unmittelbar wirken. Freilich ist die alkoholische Lauge nicht sehr lange haltbar, sie wird durch Auftreten von Aldehyden nach einiger Zeit gelb, später dunkelbraun und muß deshalb auch in dunklen Flaschen aufbewahrt werden. Die Verseifung mit alkoholischer Natronlauge scheint weniger gut vor sich zu gehen als die mit Kalilauge, besonders wenn in den Präparaten wenig Fett vorhanden ist; doch versagt sie bei zu geringen Fettmengen *) auch mit alkoholischer Kalilauge.

Die Seifenkristallformen der beiden Laugen sind verschieden. Mit Kalilauge treten Einzelkristalle und auch büschelförmig verzweigte Aggregate, mit Natronlauge Drusen und sternförmige Formen auf. Sie entstehen immer direkt am Rand des Fetttropfens, sobald es sich um Nadeln handelt, Sphärite werden durch Umwandlung des Fetttropfens selbst gebildet. Daher ist, wie gesagt, eine Beobachtung des Vorganges im polarisierten Licht unbedingt erforderlich. Die Sphärite sind nämlich von den normalen Fetttropfen nicht ohne weiteres zu unterscheiden, erst das dunkle Achsenkreuz, welches sich im polarisierten Licht auf dem nun anisotrop gewordenen Gebilde zeigt, kündigt die Vollendung der Verseifung an; gewöhnliche Fetttropfen sind isotrop; Seifenkristallnadeln leuchten im polarisierten Licht schwach auf.

Nach der Verseifung können Löslichkeitsproben die Resultate noch bestätigen. Alkaliseifen sind im Wasser löslich, bei Durch-

*) Bei allen Verseifungsmethoden spielt die Erfassungsgrenze eine große Rolle und ein negativer Ausfall der Reaktion ist noch kein Beweis für das vollständige Fehlen von Fett.

saugen von Wasser unter dem Deckglas müssen sich also die gebildeten Kristalle lösen.

b) Myelinformbildung: Bei Pflanzenfetten treten bei der Verseifung oft statt der Seifenkristalle Myelinformen, sogenannte „flüssige Kristalle“ auf. Sie sind sowohl bei isolierten Fetten, als auch bei Gewebsschnitten beschrieben worden. In Präparaten tierischer Fette sind sie, soweit ich aus der Literatur ersehen konnte, nie beobachtet worden. Auch bei meinen Untersuchungen sind bei der Verseifung nie Myelinformen entstanden. Nur mit reiner Ölsäure, die Ammoniakdämpfen ausgesetzt war, ließen sich Myelinformen herstellen. (Man stellt einen Sublimationsring über einen Tropfen Ammoniak auf einen Objektträger und bedeckt ihn mit einem Deckglas, auf dessen Unterseite sich das Präparat, in diesem Fall ein Tropfen Ölsäure, befindet. Nach ganz kurzer Zeit treten durch die Ammoniakdämpfe die Myelinformen auf, deren Bildung unter dem Mikroskop gut zu beobachten ist.) Myelinformen zeigen Doppelbrechung.

Resultate: Die Verseifung mit der Molisch-Methode ergab bei Collembolen wenig positive Resultate, es traten nur ganz vereinzelt Kristallnadeln auf, Sphärite konnte ich überhaupt nicht beobachten; die Nadeln erschienen erst nach mindestens zwölf Stunden. Auch höhere Temperaturen (ich ließ die Präparate bis zu zehn Stunden im Thermostaten bei 60 bis 70° C) ergaben keine besseren Resultate. Da meist starke Karbonatbildung auftrat, die in der Beurteilung der Präparate sehr störend wirkt, umrandete ich dieselben mit Stearin und konnte daher auf die feuchten Kammer verzichten.

Auch *Tumans* und *Hartwichs* Laugen wirkten nicht anders.

Die Ergebnisse mit alkoholischer Lauge waren besser (vergl. auch Abb. 1), die Verseifung begann aber auch erst nach der zweiten Stunde im Verlauf des Versuches und dauerte bis zu zwölf Stunden. (Die nach *Rosenthalers* Angaben fast unmittelbar nach Zugabe der Lauge beginnende Verseifung konnte ich bei Collembolen nie beobachten.) Waren in einem Präparat mehrere Tiere derselben Art vereinigt, erfolgte die Seifenbildung bedeutend schöner als bei Einzeltieren. Es schien sich also zu bestätigen, daß geringe Fettmengen zur Verseifung nicht ausreichen. Die Anzahl der Sphärite (hier entstanden nur solche) war immer wesentlich geringer als die der vorhandenen Fettröpfchen.

Im Ganzen gesehen gab die Verseifungsmethode bei Apterygoten keine zufriedenstellenden Resultate. Insektenlarven mit gut ausgebildetem Fettkörper wiesen bessere Ergebnisse auf. Drosophilafett zeigte mit alkoholischer Kalilauge verseift nach 90 Minuten Sphärrokristalle (Abb. 7) an Stelle der Fetttropfen, nach drei Stunden war das ganze Präparat von Kristallnadeln (Abb. 8) erfüllt, welche die Sphärite abgelöst hatten. Mit der Molisch-Methode verseift erschienen nur Kristallnadeln nach drei bis vier Stunden. Die untersuchten Insektenlarven waren:

Drosophiliden, Cecidomyiden und Scatopsiden mit positiven Resultaten;

Lycoriiden, Psychodiden, Ceratopogoniden und Chironomiden mit negativen Resultaten. (Artenangabe siehe Tabelle). Die negativen Ergebnisse bei diesen Dipterenlarven sind wahrscheinlich durch die geringen Fettmengen der Tiere bedingt; es ist auf Grund der Sudanversuche nicht anzunehmen, daß hier das Fett gänzlich fehlt.

Rosenthalers Unterscheidungen von Fettsubstanzen durch die Verschiedenheit der Seifenkristalle, besonders der Nadeln, sind auch nur an Reinsubstanzen zulässig. Ich konnte, infolge der Fettmischungen im Organismus, nie eine spezifische Kristallbildung im Vergleich zu *Rosenthalers* Abbildungen beobachten.

Die Verseifung läßt also auch nur die Feststellung von Fett zu, es ist durch sie keine Differenzierung möglich.

Bei Milben war ein positives Verseifungsergebnis nie zu erzielen, wohl wegen der schon oben angeführten zu geringen Fettmenge.

Alle diese mikrochemischen Fettnachweise wurden zu wiederholten Malen zur Identifizierung einzelner Fettbestandteile verwendet (^{1, 2, 25, 40}), sei es durch verschiedenartige Färbung, sei es durch unterschiedliche Auskristallisationen. Bei meinen Versuchen konnte ich diese Angaben nirgends bestätigen. Die an Reinsubstanzen gewonnenen Ergebnisse sind im histologischen Präparat begrenzt und es ist bei dem derzeitigen Stand der Untersuchungen nicht möglich, auf diese Weise einzelne Fettbestandteile zu identifizieren. (Ich hoffe aber, daß die PVC in nächster Zukunft eine Möglichkeit zur Lösung dieses interessanten Problems gestatten und daß man durch diese Mikromethode zu brauchbaren Resultaten gelangen wird.)

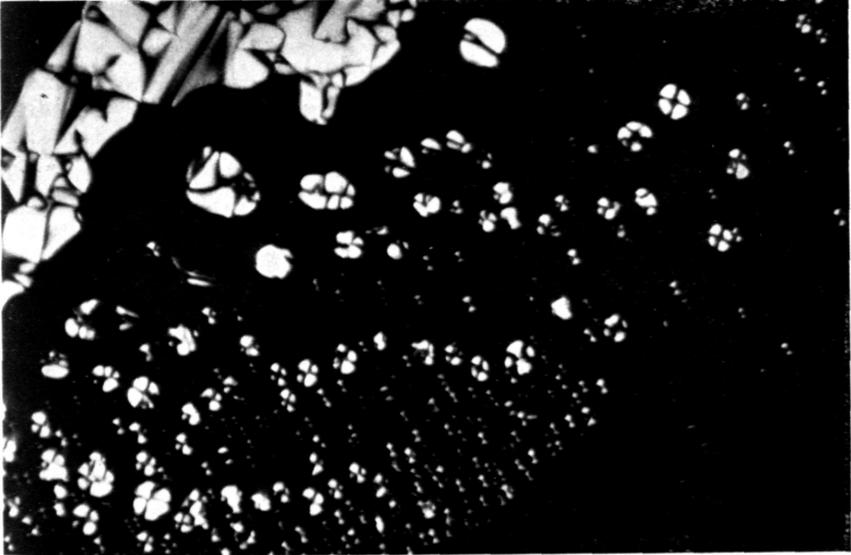


Abb. 7. *Drosophila obscuroides*, Fettkörper mit gesättigter alkoholischer Kalilauge verseift; $\frac{1}{2}$ Stunde nach Beginn der Verseifung: Ausbildung von Sphäriten. (Polarisiertes Licht, Vergr. 100 : 1).

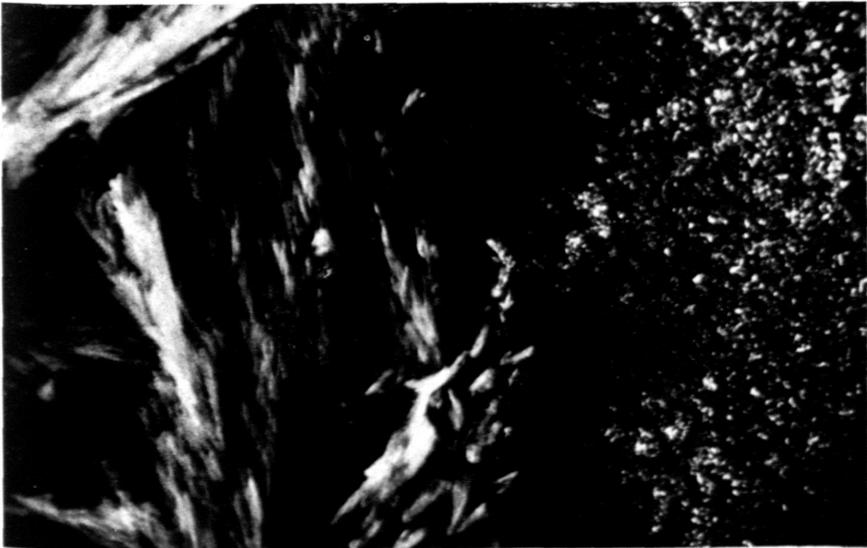


Abb. 8. Dasselbe Präparat 3 Stunden später; links Kristallnadeln, rechts noch Reste von Sphärokristallen. (Polarisiertes Licht, Vergr. 100 : 1).

Daß die bei größeren Insektenlarven durch chemische Analysen (⁹⁷) festgestellten hohen Anteile an Glyceriden ungesättigter Fettsäuren *) auch im Fett der Collembolen und der übrigen Apterygoten sowie der Milben anzunehmen sind, dürfte aus den Resultaten mit Nilblausulfat und aus der sehr flüssigen Konsistenz ihres Fettes hervorgehen.

Tabelle 3. *Fettversuche.*

	Sudan III	Sudan B	Nilbl. sulf. r	Farbst. basen b	Fettlsg. mittel	Ver- sei- fung	Myelin formen
Onychiurus	+	+	+	+	lösl.	+	--
Leapidocyrtus	+	+		+	„	—	—
Folsomia	+	+		+	„	—	—
Pseudosinella	+	+	+	+	„	+	—
Tomocerus	+	+			„	—	—
Entomobrya	+	+			„	—	—
Achorutes	+	+				—	
Camptodea	+	+	+	+	„	+	—
Machilis	+	+	+	+	„	+	—
Dipteren-Larven:							
Lycoriiden							
Lycoria grandicellaris	+	+		+	„	—	—
L. triseriata	+	+		+	„	—	—
Psychodiden							
Psychoda sp.	+	+			„	—	—
Chironomiden							
Syndiamesa sp.	+	+			„	—	—
Ceratopogoniden							
Culicoides sp.	+	+			„	—	—
Scatopsiden							
Scatops tristis						+	
Cecidomyiden							
Synaptella sp.	+	+	+	+	„	+	—
Bibioniden							
Bibio marci	+	+			„		
Drosophiliden							
Drosophila obscuroides	+	+	+	+	„	+	—
Aphiochaeta xanthina	+	+	+	+	„	+	—

*) Jodzahl im Fett der Seidenspinnerraupe 117, andere Lepidopteren 112—159, bei phytophagen Chrysomeliden 108—118, bei xylophagen Coleopteren 65,5 usw. Bei Tenebrio ist der Anteil der Fettsäuren folgender: Palmitinsäure u. a. gesättigte Fettsäuren 26,6%, Oleinsäure 41%, Linolsäure 32%, Linolensäure 0,35%; in der Puppe: Palmitinsäure u. a. 20%, Stearinsäure 4%, Oleinsäure 35%, Linolsäure 12%, Linolensäure 28% (⁹⁷).

	Sudan III	Sudan B	Nilbl. sulf. r	Farbst. basen b	Fettlsg. mittel	Ver- seifung	Myelin formen
Dipteren-Puppen:							
Lycoriiden							
L. grandicellaris	+	+	+	+	„	+	—
L. triseriata	+	+	+	+	„	+	—
Bibioniden							
Bibio marci	+	+			„		
Psychodiden							
Psychoda sp.	+	+			„		—
Drosophiliden							
Dr. obscuroides	+	+	+	+	„	—	—
Uropodinen	+	+	+	+	„	—	—
Gamasiden	+	+	+	+	„	—	—
Oribatiden	+	+	+	+	„	—	—

F. Der mikrochemische Nachweis von Glycogen.

Die Speicherung von Kohlehydraten erfolgt im animalischen Organismus in der Form des Glycogens, einer polymerisierten Diamylose von anderem Polymerisationsgrad als Stärke, jedoch mit der Summenformel $(C_6H_{10}O_5)_n$ (44).

Bei verschiedenen Insekten als Speichersubstanz bekannt, sind über das Vorkommen von Glycogen bei Apterygoten und Bodenmilben aber noch keine Untersuchungen vorhanden.

Für Glykogen sind bisher nur Färbemethoden als Nachweismittel bekannt.

1. Die Jodreaktion, (57, 76)

darauf beruhend, daß das Jod Glykogen mahagonibraun färbt, ist am längsten bekannt. Die Ursachen dieser Färbung sind chemisch noch nicht geklärt.

Abgesehen davon, daß Fette, und zwar Glyceride ungesättigter Fettsäuren durch die Bindung von Jod die Reaktion stören können, liefert sie die besten Resultate zum Nachweis des Glykogens. Der Unterschied, daß sie dieses dunkelbraun, das übrige Gewebe aber nur gelb bis hellbraun färbt, bietet relativ eindeutige Ergebnisse. In Zweifelsfällen läßt sich auch immer durch die Speichelprobe Sicherheit schaffen. (Durch die Wirkung der Speichelfermente Amylase und Maltase ist das Glykogen bei 37° C schon nach 30 Minuten in d-Glukose übergeführt und mit Jod nicht mehr nachweisbar.)

Ich führte die Jodprobe sowohl mit einer alkoholischen Jodlösung, als auch mit Lugol'scher Lösung (J — 1 Tl.; JK — 2 Tl.; aqu. dest. — 300 Tl.) durch, indem ich dem frischen Präparat, ohne es vorher mit irgend einer Lösung in Berührung gebracht zu haben, die Lösung zusetzte.

2. Glykogenfärbung nach Best. (i. 76)

Auch diese Methode liefert gute Ergebnisse, jedoch ist sie weniger spezifisch als die Jodprobe. Es werden durch das Best'sche Carmin auch Schleime, verschiedene Granula und andere Protoplasmalelemente gefärbt. Ferner läßt sich die Speichelprobe nur vor der Färbung anwenden, also müssen in diesem Fall zwei gleichartige Präparate mit und ohne Speichelprobe nach der Best'schen

Färbung verglichen werden. Ob diese Färbung eine physikalische Erscheinung, ähnlich wie bei Fetten oder einen chemischen Färbvorgang darstellt, ist noch nicht geklärt.

Ich stellte die Farblösung (nach Best-Romeis) her, indem ich 0,2 g Carmin (Grübler) mit 0,1 g K_2CO_3 , 0,5 g KCl und 6 ccm H_2O vorsichtig kochte und dann 2 ccm NH_4OH zusetzte. (Aufbewahrung in dunkler Flasche ist notwendig.). Diese Lösung wurde vor Gebrauch verdünnt: Carminlösung — 2 Tle, NH_4OH — 3 Tl, Methylalkohol — 3 Tl und den frischen Präparaten zugesetzt. Die Färbung des Glykogens erfolgte bereits nach 15 Minuten.

Die beiden hier angeführten Methoden, in Verbindung mit der Speichelprobe⁽⁵⁷⁾, ergänzen einander und lassen die Glykogenidentifizierung, soweit eben Färbemethoden spezifisch sind, zu. Es wäre aber sehr wünschenswert, hier auch noch einen anderen mikrochemischen Nachweis durchführen zu können, doch ist ein solcher derzeit nicht bekannt.

3. Polysaccharidreaktion nach Bauer⁽⁷⁶⁾

Auch sie ist eine Färbemethode und zwar mit fuchsin-schwefeliger Säure; diese wurde hier nicht angewandt, da sie keine besseren Resultate als die Best-Carmin-Färbung gibt, jedoch noch unspezifischer als diese ist (Lison).

4. Tannin-Safranin-Methode⁽⁶⁴⁾

Sie wurde von Molisch zum Glykogennachweis in Pflanzenschnitten verwendet. Hier konnte sie nicht durchgeführt werden, da sie sich nur, genau so wie die Färbung nach Bauer, für fixierte Gewebeschnitte eignet. In frischen Präparaten, in welchen nicht gründlich gewaschen werden kann, ist sie nicht anwendbar.

Resultate: Mit der Jodreaktion konnte Glykogen im Fettkörper der Collembolen *Onychiurus*, *Pseudosinella*, *Achorutes* und *Entomobrya* nachgewiesen werden. Ebenso waren die Resultate der Fettkörperuntersuchungen der Dipterenlarven *Drosophila*, *Lyconia* und *Bibio* positiv. Bei Milben war der Glykogennachweis stets negativ.

Dieselben Ergebnisse zeigte auch die Färbung mit Best'schem Carmin.

G. Der mikrochemische Nachweis von Pigmenten.

Anlässlich der PVC-Versuche machte ich die Feststellung, daß bei gewissen Collembolen in dem Teil der Körpersubstanz, welcher durch Phenol gefällt auf der Bleistiftlinie geblieben, also nicht „mitgelaufen“ war, bei der Behandlung mit Salpetersäure Dunkelviolett-Blaufärbung auftrat. Eine Reihe von Untersuchungen, die ich sowohl als Tüpfelreaktionen auf Filtrierpapier, als auch unter dem Mikroskop durch Zufügen von Salpeter-, bzw. Schwefelsäure durchführte, ergab bei allen pigmentierten Collembolenformen intensive Blaufärbung. (Genauere Farbangaben nach Ostwald's Farbnormatlas waren hier nicht zu machen, weil sich die Farbtöne nach kurzer Zeit verändern.)

Ich nahm daher an, daß es sich hier um Pigmente, wahrscheinlich der Nahrung entnommen, handle, die, im Fettkörper gespeichert, dem Tier seine Farbe verleihen. Von Collembolen ist ja bekannt, daß sie im Laufe des Lebens nachdunkeln; die Jugendformen sind meist lichter als die erwachsenen Tiere und dies beruht auf Pigmentzunahme.

Bei den blauen Achorutiden ist ganz deutlich eine Ablagerung von Pigmentkörnchen im Fettkörper festzustellen, welche sich bei Zugabe der Säure sofort färben. Man muß den Vorgang im Mikroskop beobachten, denn der Farbstoff breitet sich bald nach seiner Bildung aus. Im Moment der Berührung mit der Säure ist die Färbung aber ganz lokal an die Pigmentkörnchen gebunden.

Diese in Säure also blauvioletten, in alkalischer Lösung aber weinroten Pigmente dürften in die Gruppe der Carotinoide, die mit Schwefelsäure Blaufärbung geben, oder zu den Abbauverbindungen des Chlorophylls (Phyllins) gehören und der Pflanzennahrung entstammen.

Die Färbungen lassen keineswegs eine genaue Charakterisierung der Pigmente zu, ich konnte auch keine mikrochemische Methode finden, mit welcher eine Identifizierung möglich gewesen wäre.

H. Papierverteilungschromatographie (PVC).

Die von *R. Consden*, *A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin* (17) ausgearbeitete mikroanalytische Methode der PVC läßt die Trennung einzelner Substanzen einer Mischung und ihre Identifizierung zu. Einfach durchführbar, bietet sie relativ sichere Ergebnisse und den Vorteil, mit ganz geringen Mengen arbeiten zu können. Sie hat bereits auf verschiedenen Gebieten der reinen und der physiologischen Chemie Anwendung gefunden.

Da aber die chemischen Grundlagen für die Untersuchung von Fetten, Eiweiß und Kohlehydraten durch die PVC noch nicht genügend bearbeitet sind, mußte ich mich auf den Nachweis der Purine, bzw. der Harnsäure beschränken.

Die Trennung der Substanzen erfolgt bei dieser Methode dadurch, daß die Verschiedenheit ihrer Teilungskoeffizienten zwischen einer stationären und einer beweglichen, flüssigen Phase herangezogen wird. Als Träger der meist wässrigen, stationären Phase wird Filtrierpapier verwendet, das nur die Rolle einer passiven, nicht mitreagierenden Stütze spielt.

Die Versuche wurden nach Angaben der oben genannten Autoren in einer etwa $200 \times 250 \times 300$ mm großen Glaswanne durchgeführt, die mit einer Glasplatte bedeckt wird; zum Luftabschluß wird der Rand der Wanne mit Vaseline bestrichen. Im Innern befindet sich ein passendes Glasgestell; es trägt ein Gefäß mit dem Lösungsmittel, in welches der obere Rand des Filtrierpapierstreifens taucht. Ein zweites Gefäß am Boden der Wanne enthält die Flüssigkeit, die zur Aufrechterhaltung der stationären Phase dient. Ein mit Watte umwickelter Glasstab, in diese getaucht, ermöglicht

es, in kurzer Zeit wieder eine dampfgesättigte Atmosphäre herzustellen, wenn das Gefäß im Laufe des Versuches geöffnet werden muß.

Der Vorgang am Filtrierpapier selbst, welches ich in 100 mm breiten und 250 mm langen Streifen verwendete, ist folgender: Auf einer vom oberen Rand 50 mm entfernten Bleistiftlinie wird die zu untersuchende Substanz aufgetragen (ich möchte hier gleich erwähnen, daß ich nur 1-dimensional arbeitete). Man kann ohne weiteres mehrere Proben auf einem Streifen „laufen“ lassen, es genügt, zwischen ihnen einen Abstand von 10 bis 20 mm zu halten. Man klemmt nun diesen Streifen an seinem oberen Ende in das Gefäß, noch ohne Lösungsmittel. Auf dem Filtrierpapier bildet sich die stationäre Phase, d. h. es sättigt sich mit der Flüssigkeit, die in der Kammer zum Verdunsten aufgestellt ist. Eine Zeitspanne von ein bis zwei Stunden reicht dazu aus. Nun gießt man das entsprechende Lösungsmittel hinzu, welches als bewegliche Phase gilt und durch Kapillarkräfte angesaugt wird. Diesen Vorgang nennt man „Lauf“.

Die zu bestimmenden und zu trennenden Substanzen verteilen sich nun zwischen der stationären und der nach unten fortschreitenden beweglichen Phase, entsprechend ihrer Teilungskoeffizienten.

Consden, Gordon und Martin haben für die Identifizierung der Substanzen den R_F -Wert eingeführt, der eine Funktion des Teilungskoeffizienten ist und das Verhältnis des Weges der Substanz zu dem der fortschreitenden Front der beweglichen Phase bezeichnet.

Es ist sehr vorteilhaft, am selben Streifen eine Probe eines reinen Präparates der gesuchten Verbindung mitlaufen zu lassen, um Vergleichswerte zu erhalten, da es verschiedene Umstände gibt, die die R_F -Werte beeinflussen, bzw. verändern können.

Hat das Lösungsmittel den unteren Rand des Papiers fast erreicht, nimmt man den Streifen aus der Kammer und markiert die Lage der Lösungsmittelfront. Nachdem das Papier entweder an der Luft oder im Trockenschrank gut getrocknet wurde, werden die darauf verteilten Substanzen durch geeignete Methoden sichtbar gemacht.

Nun kann der R_F -Wert ermittelt und mit dem im Probeversuch erhaltenen Wert verglichen werden.

Die Richtigkeit der R_F -Werte hängt von der Unveränderlichkeit folgender Faktoren ab: Lösungsmittel, Sättigungsgrad der Atmosphäre, Temperatur, Länge des „Laufes“, Papier, Menge der aufgetragenen Substanz und Beeinflussung durch fremde Begleitstoffe. Man rechnet gewöhnlich mit Schwankungen der Werte von $\pm 10\%$.

Meine Versuche erstreckten sich, wie schon erwähnt, auf die Identifizierung der Harnsäure, bzw. der Purine.

Der Nachweis der Harnsäure und ihrer Salze bildet keine besonderen Schwierigkeiten (die Angaben zu ihrer Identifizierung verdanke ich Herrn Dr. *E. W. Jancik*).

Leider stieß ich beim Nachweis der übrigen Purine auf große Schwierigkeiten. Einerseits waren die notwendigen Lösungsmittel nicht erhältlich, andererseits versagten die nur an Reinsubstanzen durchgeführten Versuche am Gewebe.

Zum Nachweis der Harnsäure verwendete ich für die stationäre Phase phenolgesättigtes Wasser, als Lösungsmittel für die bewegliche Phase wassergesättigtes Phenol. Die Versuche wurden auf Filtrierpapier Schleicher-Schüll LS 16 und 595 durchgeführt, doch eignete sich ersteres besser, weshalb ich es später allein verwendete.

In einer Entfernung von 50 mm vom oberen Rand des Filtrierpapierstreifens wurde als Vergleichssubstanz eine Lösung von 10 mg Harnsäure in 2 ccm $n/10$ KOH mittels einer feinen Mikropipette, die geeicht war, in Mengen von 1 bis 5 cmm aufgetragen. Ebenso wurde eine Lösung von 5 mg Ammoniumurat in 1 ccm $n/10$ KOH verwendet.

Ferner wurde die zu untersuchende Substanz nach Hinzufügen eines Tropfens $n/10$ KOH auf einer Stelle der Bleistiftlinie mit einem feinen Glasstab vorsichtig, doch gründlich zerrieben. (In wässriger oder saurer Lösung fand keine Reaktion statt.)

Nun wurde der Streifen in der oben beschriebenen Weise für ein bis zwei Stunden zur Herstellung der stationären Phase in die Kammer gehängt und dann das Lösungsmittel, also wassergesättigtes Phenol, zugefügt. Der „Lauf“ dauerte bei Filtrierpapier LS 16 zirka drei Stunden, bei 595 $3\frac{1}{2}$ bis 6 Stunden, bei einer Raumtemperatur von 22° C. War sie höher (25° C), so verkürzte sich die Laufzeit um zirka 20 bis 30 Minuten. Zwei Versuche, die

bei 15° C durchgeführt wurden, dauerten für LS 16 fast vier Stunden.

Ich ließ das Lösungsmittel bis zu einer Entfernung von 10 bis 20 mm vom unteren Rand des Papierstreifens laufen. Getrocknet wurde nur an der Luft und meist über Nacht.

Zur Sichtbarmachung und Identifizierung der Harnsäure wendete ich folgende Methode an: Die trockenen Filtrierpapierstreifen wurden auf einen Rahmen gespannt und mit einer Lösung von $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ in $n/2$ HNO_3 gleichmäßig besprüht. Die Harnsäure wird dadurch an Ort und Stelle durch Quecksilber gefällt, es bildet sich eine unlösliche Quecksilberverbindung der Harnsäure. Das überschüssige $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, das sich am Papier verteilt befindet, wurde durch kurzes Waschen mit $n/2$ HNO_3 und gründliches Waschen in fließendem Wasser entfernt. Nun ließ ich das Filtrierpapier kurz trocknen und brachte es in eine gesättigte Ammoniumsulfidlösung. Das Hg^{++} Ion der Harnsäureverbindung wird durch schwarzes Quecksilbersulfid nachgewiesen und damit ist die Lage der Harnsäure selbst sichtbar gemacht. Nach abermaligem Waschen in Wasser und Trocknen konnten die R_F -Werte ermittelt und mit denen der Reinsubstanzen verglichen werden.

Resultate: Als Beispiel seien zwei der protokollierten Versuche hier angeführt. Die übrigen Resultate sind errechnete Mittelwerte der verschiedenen Versuchsreihen.

Streifen 1	H_2O 9,30h, Phenol 10,50h — 13,45h		
	Harnsäure	(10 mg — 2 ccm $n/10$ KOH)	
		1,0 cmm	
LS 16		1,5 cmm	+ R_F 0,241
16. III. 49		2,5 cmm	+ R_F 0,244
Temp. 22° C	Onychiurus		
	armatus	3 Tiere ($n/10$ KOH)	+ R_F 0,240
		5 Tiere ($n/10$ KOH)	+ R_F 0,247
Streifen 2	H_2O 11,15h, Phenol 13h — 15,40h		
	NH_4 -Urat	(5 mg — 1 ccm $n/10$ KOH)	
16. III. 49		1,5 cmm	+ R_F 0,236
LS 16		2,5 cmm	+ R_F 0,244
Temp. 21° C	Pseudosinella	3 Tiere	+ R_F 0,238
	Synaptella sp.	2 Tiere	+ R_F 0,236
Larven v.	Drosophila		
	obscuroides	2 Tiere	—
	Lycoria		
	triseriata	1 Tier	—

Tabelle 4. PVC-Versuche.

	LS 16	595
Collembola		
Onychiurus armatus	0,239	0,156
Pseudosinella sp.	0,233	0,146
Diplura		
Campodea staphilinus	0,241	
Thysanura		
Machilis sp.	0,239	
Acerina		
Oribatidae		negativ
Gamasidae		negativ
Uropodidae		negativ
Dipterenlarven		
Lycoriiden		
Lycoria triseriata (ganzes Tier)		negativ
Chironomiden		
Syndiamesa sp. (ganzes Tier)		negativ
Psychodiden		
Psychoda sp. (ganzes Tier)		negativ
Cecidomyiden		
Synaptella sp. (ganzes Tier)	0,235	0,153
Drosophiliden		
Drosophila obscuroides (ganzes Tier)		negativ
Dipterenpuppen		
Lycoriiden		
Lycoria triseriata (ganzes Tier)	0,240	
Psychodiden		
Psychoda sp. (ganzes Tier)	0,239	
Cecidomyiden		
Synaptella sp. (ganzes Tier)	0,241	
Bibioniden		
Bibio marci (Fettkörper)	0,243	
Bibio marci (Enddarm)	0,241	
Drosophiliden		
Drosophila obscuroides (ganzes Tier)	0,238	
Coleopterenlarven *)		
Melolontha vulgaris (Fettkörper)	0,232	
Tenebrio molitor (Fettkörper)	0,240	
Oxyomus silvestris (ganzes Tier)	0,235	
Harnsäure	0,241	0,152
NH ₄ -K-Urat	0,239	
Na-K-Urat	0,236	

*) Ausgewachsene Tiere, knapp vor der Verpuppung.

Diese Ergebnisse bestätigen meine mikrochemischen Untersuchungen vollkommen. Es konnte übereinstimmend festgestellt werden, daß alle unter dem Mikroskop positiv verlaufenden Versuche auch mit der PVC-Methode positive Harnsäurenachweise ergaben; auch die negativen Resultate waren einander gleich.

Die Methode der PVC erlaubt auch eine annähernd quantitative Bestimmung der untersuchten Substanzen durch Vergleiche der sichtbar gemachten Menge der Probe mit der einer reinen Substanz bekannter Konzentration.

Es entsprachen hier 2,5 cmm aufgetragener Vergleichslösung (5 mg NH_4 -Urat, gelöst in 1 ccm n/10 KOH) der Uratmenge von 5 Exemplaren der Gattung *Onychiurus armatus*.

Ein Tier enthält danach ca. 2,5 γ Urate. (Hieraus ist auch ersichtlich, daß die Empfindlichkeitsgrenze des Uratnachweises mit alkoholischer Kalilauge sehr groß ist, da ja schon bei dem Fettkörper eines Collembolen positive Resultate zu verzeichnen waren.)

Ein *Onychiurus* wiegt im Durchschnitt 0,025 mg (es wurde mehrmals das Gewicht von 30 Individuen dieser Art festgestellt und dann der Durchschnittswert errechnet).

Die Uratspeicherung im Fettkörper der Collembolen beträgt also ca. 10% des Lebendgewichtes.

Der Nachweis der übrigen Purine sollte auf dieselbe Weise geführt werden, doch ergaben sich dabei große Schwierigkeiten. Guanin „läuft“ z. B. weder in saurer, noch in alkalischer Lösung in Phenol. Ich richtete mich daher in der Wahl der Lösungsmittel nach den Angaben in *Vischer* und *Chargaff's* (⁹³) Arbeit und führte anfänglich die Versuche mit n-Butanol durch. Für die bewegliche Phase verwendete ich wassergesättigtes Butanol, für die stationäre Phase butanolgesättigtes Wasser. Als Papier verwendete ich hauptsächlich Schleicher-Schüll 595, um gleiche Bedingungen zu erhalten, damit ein Vergleich meiner R_F -Werte mit denen der genannten Autoren möglich war. Die „Laufzeit“ betrug für 595 ca. fünfeinhalb bis sechs Stunden, für I.S 16 drei Stunden, bei einer Raumtemperatur von 22° C.

Die Proben wurden in saurer Lösung aufgetragen, das reine Präparat von Guanin in einer Lösung von 1 mg in 1 ccm n/10 H_2SO_4 verwendet. Die Tiere wurden, wie oben beschrieben, in einem Tropfen n/10 H_2SO_4 zerrieben.

Reines Guanin ergab positive Resultate mit R_F -Werten von 0,082 (*Vischer* und *Chargaff* verzeichnen R_F -Werte von 0,074).

Es war mir aber nicht möglich, bei den Milben, die in den Exkretionsorganen relativ soviel Guanin aufweisen, eine positive Reaktion zu erhalten.

Auch eine Mischung von Collidin-Chinolin 1 : 2, mit 1,5 Teilen Wasser gesättigt, brachte keine besseren Ergebnisse. (Weitere Lösungsmittel standen mir nicht zur Verfügung.). Voraussichtlich dürfte irgend eine andere Verbindung im Gewebe die PVC-Veruche mit Guanin und den übrigen Purinen verhindern.

J. Biologische Auswertung.

Im Laufe der vorliegenden Untersuchungen konnte die wichtige Stellung des Fettkörpers der Insekten gezeigt werden. Über Entstehung, Bau und Anordnung des Fettkörpers und seiner Produkte stehen noch verschiedene Fragen offen. Ihre Besprechung würde im Rahmen dieser Arbeit zu weit führen, ich möchte aber auf die darüber existierende Literatur hinweisen (2, 8, 20, 32, 37, 49, 51, 54, 58, 59, 70, 71, 80, 90, 95, 97, 102).

Der Speicherung von Fett, Glycogen und der als Eiweißprodukt gedeuteten eosinophilen Granulation*), mit der bekannten Bedeutung für den Bau- bzw. Betriebsstoffwechsel, steht die Speicherung von Exkreten gegenüber, die dauernd oder vorübergehend stattfinden kann. Durch diese exkretorische Fähigkeit wird der Fettkörper zu einem wichtigen Exkretionsorgan, zu einer „Speicherniere“. Die Unschädlichmachung giftiger Stoffwechselprodukte und ihre physiologische Weiterverwendung**) sind dabei seine Aufgabe.

Wie erwartet, ließ sich Fett und Glycogen bei Apterygoten als Speicherprodukt nachweisen. Über die Speicherung der stickstoffhaltigen Exkretionsprodukte der Bodentiere liegen aber noch keine zusammenhängenden Darstellungen vor und die Untersuchungsmethoden — oft begnügte man sich mit vergleichenden Schlüssen auf die Verhältnisse bei anderen, besser untersuchten, größeren Insekten — haben alle große Mängel aufzuweisen. Aus

*) Sie konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da es derzeit noch keinen annähernd eindeutigen histochemischen Mikronachweis für Eiweiß gibt.

**) S. S. 519; S. 560; S. 561.

diesem Grunde nehmen die Untersuchungen darüber in meiner Arbeit breiteren Raum ein.

Endlich sei noch erwähnt, daß verschiedene Pigmente, die im Fettkörper vorkommen können, auch Speicherprodukte darstellen und ihm, wie auch oft dem ganzen Tier, seine bestimmte Farbe verleihen.

So wird zum Beispiel die Produktion des Melanins als Mechanismus zur Beseitigung giftiger Phenole, die als Abfallprodukt des Stoffwechsels auftreten, bezeichnet (*Cordier*); viele Carotinoide (Carotin, Xanthophyll) stammen aus der Nahrung. Ob sie in der Physiologie der Insekten eine ähnliche Rolle wie bei den Mammaliern spielen, wo das Vitamin A auf Carotin zurückgeführt wird, ist unbekannt. Daß auch Anthocyane und Flavone Nahrungsmittelpigmente darstellen, ist bei einigen Arten nachgewiesen worden. So enthält die Larve von *Cionus olens* im Fettkörper Anthocyankörnchen, die aus ihrer Nahrungspflanze, den Blüten von *Verbascum*, stammen. Eine Reihe anderer Pigmente und die durch sie hervorgerufenen Färbungen sind aber sowohl in ihrer Entstehung als auch in ihrer Herkunft noch völlig unbekannt.

Meine mikrochemischen Versuche haben ergeben, daß die stickstoffhaltigen Exkretions-(Speicher)-produkte der Collembolen den weitaus größten Anteil der Speichersubstanzen darstellen; sie übertreffen an Menge die Reservespeicherprodukte. Ich konnte zeigen, daß die gespeicherten Urate bei *Onychiurus armatus* 10% des Lebendgewichtes betragen.

Ferner war es mir möglich, nachzuweisen, daß die Exkretspeicherung des Fettkörpers pterygoter Insekten aus Uraten von Ammoniak und Natrium besteht; der Harnsäureanteil der Exkremente aber, soweit ein solcher darin auftritt, stellt reine Harnsäure dar.

Uratspeicherung konnte ich bei allen Apterygoten mit einer dem Alter proportional zunehmenden Menge feststellen. Ganz junge Tiere, die ich untersuchte, zeigen bei normalem Fettgehalt fast keine Kristalleinschlüsse, bei ausgewachsenen Formen war der Fettkörper vollkommen davon erfüllt (Funktion als Akkumulationsapparat, da keinerlei Ausführungsgänge vorhanden sind). Daß es sich hier um eine definitive Speicherung handelt, ist daraus zu ersehen, daß in den Exkrementen und im Enddarm dieser Tiere nie Harnsäure nachzuweisen war. Die Bedeutung dieser Speiche-

rung scheint darin zu liegen, daß die Tiere auf diese Weise Eiweißabbauprodukte unschädlich machen, da ja die bei anderen Insekten zu deren Ausscheidung vorhandenen Malpighischen Gefäße hier fehlen*). (Proturen. Collembolen besitzen keine; bei Campodea zeigt sich ihre erste Anlage in sechs Papillen am Ende des Mitteldarmes vor dem Übergang in den Enddarm; Japygiden fehlen sie vollkommen; Thysanuren besitzen bereits Malpighische Gefäße).

Wenn die Angaben von *Wigglesworth* ⁽⁹⁷⁾ stimmen, nach denen Harnsäure wegen ihres geringen Wasserstoffgehaltes im Vergleich zu anderen stickstoffhaltigen Exkreten zur Zurückhaltung von Wasser**) sehr befähigt wäre, würde ihr Vorkommen bei Thysanuren zu erklären sein. Hier treten trotz Malpighischer Gefäße im Fettkörper Uratablagerungen in großer Menge auf, die Tiere leben aber in bedeutend trockenerer Umgebung als die übrigen Apterygoten und sind somit zu sparsamem Wasserverbrauch gezwungen.

Danach wäre auch verständlich, daß ich bei den untersuchten Dipteren erst im Puppenstadium Urateinschlüsse im Fettkörper nachweisen konnte; die Larven lebten alle im feuchten Medium, hatten also reichlich Wasser zur Verfügung und konnten die Eiweißabbauprodukte durch die Malpighischen Gefäße ausscheiden. In der Puppe stehen dem Insekt aber keine Mittel zur Verfügung, seinen Wasservorrat zu ergänzen oder stickstoffhaltige Abbauprodukte abzugeben.

Die reiche Ablagerung von Uraten im Fettkörper der Cecidomyidenlarven war mir zuerst unverständlich, da die Tiere genau so wie die anderen Dipterenlarven hier in feuchtem Erdreich lebten, bis ich eine Erklärung dafür in der eigenartigen Ausbildung der Malpighischen Gefäße fand, welche für die Exkretion mehr oder weniger untauglich sein dürften. Sie besitzen nämlich zwei Malpighische Gefäße, die aber kontinuierlich ineinander übergehen. Dieser einheitliche schleifenförmige Schlauch mündet mit zwei Öffnungen in den Enddarm. *Hendel* ⁽³⁶⁾ erwähnt dazu in *Kückenthal's* Handbuch der Zoologie:

*) Es wäre ferner nicht ausgeschlossen, daß die Speicherung von Stickstoffexkreten für Collembolen auch noch den Wert hätte, die zersetzende Bakterientätigkeit, die ja nach der Exkretabgabe beginnen würde, aus der unmittelbaren Umgebung der Tiere fernzuhalten.

**) Es waren über die Vorgänge dieser Wasserzurückhaltung keine näheren Angaben zu ermitteln.

„Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese anatomische Eigentümlichkeit in irgend einer Beziehung zur Lebensweise der Gallmückenlarven steht.“

Auch *Wigglesworth* erwähnt eine ähnliche Erscheinung bei den Larven von *Apis mellifica*. Die Malpighischen Gefäße enden hier blind und der Fettkörper speichert Urate.

Wie weit diese Beobachtungen auch bei anderen Insektengruppen Bestätigung finden, müßte noch näher überprüft werden.

Neben der biologischen Bedeutung der Uratspeicherung für die Tiere selbst, spielt sie auch eine nicht zu unterschätzende Rolle für den Boden.

Die Milben-Collembolen-Fauna hat im Verein mit den Bakterien und Nematoden für den Boden eine doppelte Aufgabe. Erstens gehören diese Tiere zu den wichtigsten Humusbildnern; zweitens aber sind sie Stickstoffbinder. Die der Nahrung entzogenen Stoffe gelangen durch den Körperstoffwechsel schließlich als stickstoffhaltige Speicherprodukte nach dem Tod der Tiere in den Boden zurück. Hier führen nun eine Reihe von aeroben Bakterien, welche als ausgesprochene Harnsäurezerersetzer fungieren, den Prozeß weiter. Als Zwischenprodukt dieses Abbaues treten Allantoin, als Endprodukte Oxalsäure und Harnstoff, bzw. CO_2 und NH_3 auf.

Von den Bakterien, welche zu diesem Abbau befähigt sind, seien als Sporenbildner *Bacillus capri*, von den nicht sporenbildenden *Bacillus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* u. a. erwähnt.

Die Ammonifizierung des Harnstoffes dürfte aber nicht von allen in Frage kommenden Bakterien durchgeführt werden. Hier wären u. a. *Bacillus probatus* (*Urobacillus Pasteuri*, *U. Leubi* usw.), die sporenbildend in der Erde auftreten, ferner die nicht sporenbildenden *Urococcus* und *Urosarcina* zu nennen. Auch andere Bakterien haben die Fähigkeit der Harnstoffspaltung, z. B. *Bacillus coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megatherium*, ferner Pilze und Hefe.

Neben Harnsäure und Uraten können die oben genannten Bakterien auch die übrigen Purine abbauen. Daher spielen die Milben hier keine geringere Rolle als die Collembolen, trotzdem die Abgabe der Stoffwechselprodukte laufend und nicht erst nach dem Tode erfolgt. Auch sie produzieren ja eine relativ große Menge von Stickstoffexkreten (Guanin).

Ebenso muß die Harnsäurespeicherung der Insektenpuppen hier erwähnt werden, weil der größte Teil davon durch das Meconium, noch bevor das Insekt den Boden verläßt, abgegeben wird.

Genau so wie in Erde und Dünger ein verschieden hoher Prozentsatz an Bodentieren zu finden ist, ist auch das Auftreten der Bakterien verschieden. In der Erde (hier ist Kulturboden gemeint) sind 1 bis 2%, im Dünger bis zu 10% von ihnen Harnsäure- bzw. Harnstoffzersetzer. Nur ein kleiner Teil des Stickstoffes wird dabei zur Deckung des eigenen Energiebedarfes von den Bakterien verwendet und bleibt, wenigstens zeitweise, in organischer Form gebunden. Der weitaus größte Teil wird durch die Zersetzung frei und entweder als löslicher Harnstoff oder als flüchtiger Ammoniak für die Pflanzen verwertbar.

Aus den kurzen Ausführungen kann die Wichtigkeit der Bodentiere im Stickstoffkreislauf beurteilt werden, wenn sie darin auch nur ein Zwischenglied darstellen.

K. Zusammenfassung der Ergebnisse.

I. Durch mikrochemisch-histologische Versuche wurden folgende Speichersubstanzen nachgewiesen:

A. Harnsäure, bzw. Urate: Zum Nachweis wurde eine neue Mikrokristallisationsmethode ausgearbeitet. Die Fällung erfolgt dabei als sekundäres Alkaliurat.

1. Ammonium- und Natriumurat tritt als Exkretspeicherstoff im Fettkörper von Apterygoten (Collembola, Diplura, Thysanura) und verschiedenen terrestrischen Dipterenpuppen auf. (Lycoriidae, Cecidomyidae, Psychodidae, Chironomidae, Ceratopogonidae, Bibionidae, Drosophilidae).

Die Larven dieser Familien enthalten im Fettkörper keine nachweisbaren Urate mit Ausnahme von Cecidomyidenlarven (*Synaptella* sp. und andere terrestrische Arten).

Im Fettkörper einiger Coleopterenlarven finden sich im ausgewachsenen Zustand, knapp vor der Verpuppung, Urate (*Melolontha vulgaris*, *Tenebrio molitor*, *Oxyomus silvestris*).

2. Harnsäure ist im Enddarm, bzw. den Exkrementen von Insektenimagines nachzuweisen (z. B. Käfer der Gattung *Hister*).

Die Uratspeicherung der Apterygoten ist definitiv und beträgt bei Colembolen (*Onychiurus armatus*) ca. 10% des Lebendgewichtes.

Die Uratspeicherung der untersuchten Dipteren gilt nur für einen bestimmten Lebensabschnitt.

Bei Milben treten weder Harnsäure noch Urate auf.

B. Purine: Zum Nachweis des Guanins wurde die Guanin-Pikratfällung zu einer Mikromethode modifiziert. Für die übrigen Purine konnte kein einwandfreier Mikronachweis gefunden werden.

1. Guanin tritt in Spuren im Fettkörper von Apterygoten (Collembola, Diplura, Thysanura) und Dipterenlarven, bzw. -Puppen auf (Chironomiden-, Cecidomyiden-, *Melolontha*-Larven; Lycariiden-, Bibioniden-Puppen wurden untersucht).

2. In großen Mengen ist Guanin in den Exkretionsschläuchen der Milben vorhanden.

Weitere Purine sind bei den untersuchten Insekten und Milben mit Sicherheit nicht nachzuweisen.

C. Fette: Fette treten als Reservespeicherstoffe im Fettkörper aller untersuchten Formen auf.

Eine Differenzierung der einzelnen Fettbestandteile ist mit den derzeit bekannten Mikromethoden nicht möglich.

Ein höherer Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Glyceriden ist nachweisbar.

D. Glykogen: Im Fettkörper aller untersuchten apterygoten und pterygoten Insekten ist Glykogen vorhanden (verschiedene Collembola; Campodea; Machilis; die Larven und Puppen der oben angeführten Dipteren).

Bei Milben ist Glykogen nicht nachweisbar.

E. Pigmente: Im Fettkörper gefärbter Collembolen (Achorutiden, Entomobryiden u. a.) treten Pigmente, wahrscheinlich aus der Gruppe der Carotinoide, auf. Es ist anzunehmen, daß es sich um Pigmente handelt, die der Nahrung entnommen sind.

II. Die Papierverteilungschromatographie wurde als qualitativer und quantitativer Mikronachweis für Harnsäure mit Erfolg angewendet.

Literatur.

- ¹ *Altmann, R.* (1889): Über die Fettumsetzung im Organismus, Arch. f. Anat. u. Physiol., Suppl. Bd., Anat. Abt.; ² (1893): Die Granulalehre und ihre Kritik, Arch. f. Anat. u. Physiol., Anat. Abt. — ³ *Becker, G.* (1938): Untersuchungen über Darm und Verdauung von Cnephidocyten, Bryozoen u. Phoroniden, Z. Morph. u. Oek., 33/72. — ⁴ *Bhrens-Kley* (1922): Organische mikrochemische Analyse. — ⁵ *Behrens, W.-Schieferdecker, P.-Kossel, A.* (1889): Das Mikroskop, Brühm, Braunschweig. — ⁶ *Berlese, A.* (1909): Gli Insetti, Milano. — ⁷ *Best, F.* (1906): Über Karminfärbung des Glykogens und der Kerne, Z. Mikrosk. 23/319. — ⁸ *Brammertz, W.* (1913): Morphologie des Glykogens während der Eibildung und Embryonalentwicklung von Wirbellosen, Arch. Zellf. 11/389. — ⁹ *Brugnatelli, G.* (1818): Giornale di Fisica, Chimica e Storia Naturale, Milano, Vol. 8. — ¹⁰ *Brunswick, H.* (1923): Die Grenzen der mikrochemischen Methodik in der Biologie, Die Naturwissensch. 11/881. — ¹¹ *Bruntz, L.* (1908): Nouvelles recherches sur l'excrétion et la phagocytose chez les Thysanoures, Arch. Zool. Expér. 814. — ¹² *Burian, R.* (1904): Diazoverbindungen der Imidazole und Purinsubstanzen, Ber. dtsh. chem. Ges. 37/1; ¹³ (1924): Die Exkretion, in Winterstein's Handbuch der vergl. Physiologie. — ¹⁴ *Capek, F.* (1920): Biochemie der Pflanzen, Fischer, Jena. — ¹⁵ *Capranica, S.* (1880): Vorläufige Mitteilungen einiger neuer Guaninreaktionen, Z. physiol. Chem. 4/232. — ¹⁶ *Conden, R.* (1948): Partition Chromatography on Paper in Scope and Application, Nature 162/359. — *Conden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. P.* (1938): Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatography Method Using Paper, Bioch. J. 38/224. — ¹⁸ *Cuénot, L.* (1896): Etudes physiologiques sur les Orthopteres, Arch. Biol. 14. — ¹⁹ *Cordier, V.* (1922): Überchlorsäure als mikrochem. Reagens, Monatsh. d. Chemie 43/525. — ²⁰ *Deegener, P.* (1926): Zirkulation und Leibeshöhle, in Schröder's Handbuch der Entomologie. — ¹² *Denigés, G.* (1926): Analyse qualitative (Micro-cristalloscopie), Mikroh. 4/1. — ²² *Emich, F.* (1926): Lehrbuch der Mikrochemie, Bergmann, München:

- ²³ (1929): Methoden der Mikrochemie, in Abderhalden's Handbuch d. biologischen Arbeitsmethoden I. — ²⁴ *Erreca, L.* (1886): Über den Nachweis von Glykogen, Bot. Zeitg. 44/316. — ²⁵ *Escher, H.* (1909): Grundlagen einer exakten Histochemie der Fettfarbstoffe, Korr. Bl. f. Schweizer Ärzte 49 II/1609; — ²⁶ *Fabre, J. H.* (1903): Etude sur rôle du tissu adipeux dans la sécrétion urinaire chez les Insectes, Ann. Sc. Nat. Zool. 1 séc. 19. — ²⁷ *Feigl, F.* (1924): Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, Springer, Berlin-Wien. — ²⁸ *Fürth, O.* (1903): Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere, Fischer, Jena; ²⁹ (1900): Über den Stoffwechsel der Cephalopoden, Z. physiol. Chem. 31/353. — ³⁰ *Gallistel, H.* (1936). Histochemische Untersuchungen über die Speicherung von Fett und Glykogen bei *Daphnia magna*, Z. Zellf. 25/66. — ³¹ *de Giacomo, A.* (1910): Eine mikrochemische Methode zur Erkennung des Guanins in den Geweben, Z. Mikrosk. 27/257. — ³² *Gierke, E.* (1905): Das Glykogen in der Morphologie des Zellstoffwechsels, Beitr. path. Anat. 37/302. — ³³ *Hartwich, C.* und *Uhlmann, W.* (1902): Beobachtungen über den Nachweis fetten Öles und seine Bildung in Pflanzen, Arch. Pharm. 240/471; ³⁴ (1903): Nachweis fetter Öle durch Mikroverseifung, Arch. Pharm. 241/111. — ³⁵ *Heller, M.* (1844): Harnsäure, ein reichliches Exkret der Schmetterlinge, Arch. Chem. u. Mikr., Wien. — ³⁶ *Hendel, F.* und *Beier, M.* (1926—30): Diptera, in Rückenthal's Handbuch der Zoologie. — ³⁷ *Hermenguy, F.* (1900): Les corps adipeux des muscides pendant l'hystolyse C. R. Ac. Sc. Paris 131. — ³⁸ *Hoppe-Seyler, Tierfelder* (1924): Handbuch der physiologischen und pathologischen chemische Analyse, Berlin. — ³⁹ *Hotchkiss, R. D.* (1948): The quantitative Separation of Purines, Pyrimidines and Nucleosides by Paper Chromatography, J. biol. chem. 175/315. — ⁴⁰ *Jäger, G.* (1934): Über den Fettkörper von *Daphnia magna*, Z. Zellf. 22/89. — ⁴¹ *Karrer, P.* (1928): Lehrbuch der organischen Chemie, Leipzig. — ⁴² *Kaufmann, C.* und *Lehmann, E.* (1926): Kritische Untersuchungen über die Spezifitätsbreite histochemischer Fettdifferenzierungsmethoden, Zbl. Pathol. 37/145; ⁴³ (1926): Sind die in der histologischen Technik gebräuchlichen Fettdifferenzierungsmethoden spezifisch? Virch. Arch. 261/623; ⁴⁴ (1928): Über histochemische Fettnachweise im Gewebe (Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung des von Ciaccio angegebenen Färbeverfahrens), Virch. Arch. 270/360. — ⁴⁵ *v. Kennnitz, C.* (1912): Die Morphologie des Stoffwechsels bei *Ascaris lumbricoides*, Arch. Zellf. 7/463. — ⁴⁶ *Klein, G.* (1933): Handbuch der Pflanzenanalyse, Springer, Wien-Berlin. — ⁴⁷ *Kofler, L.* (1942): Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Substanzen, Beih. Z. Ver. dtsh. Chem. 46/1. — ⁴⁸ *Kofler, L.* und *Kofler, A.* (1948): Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Wagner-Innsbruck. — ⁴⁹ *Koschnikov, G.* (1900): Über den Fettkörper der Honigbiene, Zool. Anz. 23/337. — ⁵⁰ *Krause, R.* (1926): Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien. — ⁵¹ *Kreuscher, A.* (1922): Der Fettkörper und die Oenozysten von *Dytiscus marginalis*, Z. wiss. Zool. 119/247. — ⁵² *Kruse, W.* (1916): Allgemeine Mikrobiologie. — ⁵³ *Landois, L.* (1856): Über die Funktion des Fettkörpers, Z. wiss. Zool. 15/371. — ⁵⁴ *Leifert, H.* (1935): Untersuchungen über den Exkretstoffwechsel bei Eiern, Raupen und Puppen von *Antheraea pernyi*, Zool. Jb. (Physiol.) 55/131. — ⁵⁵ *Lenhartz, E.* (1943): Einführung in die chemische Physiologie, Springer, Berlin. — ⁵⁶ *Liesegang, R. E.* (1914): Exogene Fällungen bei der histologischen Färbung, Z. f. Mikrosk. 31/466. — ⁵⁷ *Lison, L.* (1936): Histochemie animale (Méthodes et Problèmes) Gautier Villas Editeur Paris. —

- ⁵⁵ *Marshal, C.* (1889): L'acide urique et la fonction rénale chez les Invertébrés, Mém. Soc. Zool. France 3. — ⁵⁹ *Marten, W.* (1939): Zur Kenntnis von Campodea, Z. Morph. u. Oek. 36/41. — ⁶⁰ *May und Kordowich* (1935): Mikronachweis von Glykogen und Galaktogen, Z. Biol. 93/233. — ⁶¹ *Mayer, P.* (1909): Zur Färbung des Glykogens, Z. Mikrosk. 24; ⁶² (1920): Zoomikrotechnik, Borntraeger, Berlin. — ⁶³ *Mayerhofer, A.* (1925): Die Anwendungsmöglichkeiten qualitativer mikrochemischer Reaktionen bei der Untersuchung tierischer Organe, Mikroch. 3/68. — ⁶⁴ *Molisch, H.* (1921): Mikrochemie der Pflanze, Deuticke-Wien. — ⁶⁵ *Neumann, K. W.* (1941): Beitrag zur Anatomie und Histologie von Parasitus kempseri, Z. Morph. u. Oek. 37/613. — ⁶⁶ *Noll, A.* (1935): Zum Glykogennachweis in der Muskulatur, Virch. Arch. 293/409. — ⁶⁷ *Nordenskiöld, E.* (1908): Anatomie und Histologie von Ixodes, Zool. Jb. (Anat.) 25/637. — ⁶⁸ *Peschen, K. E.* (1939) Untersuchungen über das Vorkommen und den Stoffwechsel des Guanins im Tierreich, Zool. Jb. (Physiol.) 59/429. — ⁶⁹ *Peterfi, T.* (1928): Methodik der wissenschaftlichen Zoologie, Springer-Berlin. — ⁷⁰ *Philipschenko, F.* (1907): Beiträge zur Kenntnis der Apterygoten, Z. wiss. Zool. 88/99; ⁷¹ (1907): Anatomische Studien über Collembolen, Z. wiss. Zool. 85/270. — ⁷² *Plateau, F.* (1876): Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les Insectes. Mém. Acad. roy. Sci. Belg. 4. — ⁷³ *Reisinger, E.* (1934): Zur Exkretionsphysiologie von Spadella (Beiträge zur Kenntnis der Chaetognathencorona), Thalassia 1/Nr. 10; ⁷⁴ (1936): Zur Exkretionsphysiologie von Ophryotrocha puerilis, Thalassia 2/Nr. 4. — ⁷⁵ *Rippel, A.* (1930): Der Boden in seiner chemischen und biologischen Beschaffenheit, in Blanck's Handbuch der Bodenlehre, Bd. 7, Springer-Berlin. — ⁷⁶ *Romeis, B.* (1943): Taschenbuch der mikroskopischen Technik, Oldenbourg, Berlin-München. — ⁷⁷ *Rosenthaler, L.* (1920): Beiträge zum mikrochemischen Nachweis von Ölen und Fetten, Schweizer Apotheker-Ztg. 58/545 und Mikroch. 8/72 (1930); ⁷⁸ (1923): Nachweis organischer Verbindungen; ⁷⁹ (1928): Grundzüge der chemischen Pflanzenuntersuchungen. — ⁸⁰ *Samson, K.* (1908): Über das Verhalten der Vasa malpighii und die exkretorische Funktion der Fettzellen während der Metamorphose von Heterogonea limacodes, Zool. Jb. (Anat.) 26/403. — ⁸¹ *Schild, E.* (1947): Praktische Mikroskopie für Arzt und Biologen, Hollinek-Wien. — ⁸² *Schneider-Zimmermann* (1922): Botanische Mikrotechnik, G. Fischer, Jena. — ⁸³ *Schönbach, P.* (1913): Zur Morphologie des Glykogens bei Trematoden und Cestoden, Arch. Zellf. 11/413. — ⁸⁴ *Schöpf, C.* (1939): Zur Kenntnis des Xanthopterin, Lieb. Ann. 539/128. — ⁸⁵ *Schöpf, C. und Wieland, H.* (1925): Über den gelben Flügel-farbstoff des Zitronenfalters, Ber. dtsh. chem. Ges. 58/2178; ⁸⁶ (1926): Über das Leukopterin, das weiße Flügelpigment der Pieriden, Ber. dtsh. chem. Ges. 59/2067. — ⁸⁷ *Strebinger, R. und Klein, G.* (1928): Fortschritte der Mikrochemie in ihren Anwendungsgebieten, Deuticke-Wien. — ⁸⁸ *Thomas, O. und Agulhon, H.* (1910): Farbreaktionen verschiedener Aminokörper in Gegenwart von Mineralsäuren und Kaliumbichromat, Bull. Soc. chim. France (4) 9/881; C. 1914 II/1554 und Bull. Soc. chim. France (4) 11/69; C. 1912 I/855. — ⁸⁹ *Thon, K.* (1903): Die neuen Exkretionsorgane bei der Hydrachnidenfamilie Limnocharidae, Z. wiss. Zool. 79. — ⁹⁰ *Timon-David, J.* (1945): Fragments de biochimie entomologique, III. Excrétion et Secrétion. Ann. fac. sci. Marseilles, 16/IV. — ⁹¹ *Tumann, N.* (1925): Mikrochemie der Pflanze, Borntraeger, Berlin; ⁹² (1917): Zum Nachweis der Purinbasen in Drogen, Pharm. Post 51/305. — ⁹³ *Vischer, E. und Chargaff, E.* (1944): The Separation and Characterisation of Purines in minute Amounts of Nucleid acid hydro-

lysates, J. biol. chem. 168/78; ⁹⁴ (1948): The Separation and qualitative Estimation of Purines and Pyrimidines in Minute Amounts, J. biol. chem. 176/307. — ⁹⁵ Weber, H. (1933): Lehrbuch der Entomologie, G. Fischer-Jena. — ⁹⁶ Weinland, C. (1889): Guanin in Exkrementen der Kreuzspinne, Z. Biol. 25/390. — ⁹⁷ Wigglesworth, V. B. (1947): The Principles of Insect Physiology, London. — ⁹⁸ Willem, V. (1900): Recherches sur les Collemboles et les Thysanures, Mém. Cons. Acad. roy. Belg. Nr. 3. — ⁹⁹ Winsten, W. A. (1947): A simplified Apparatur for one-dimensional Paper Partition Chromatography, Science 107(2788)/605. — ¹⁰⁰ Wolf, G. (1939): Die physiologische Chemie der nephridialen Stickstoffabscheidung bei *Helix pomatia*, Z. vergl. Physiol. 19/ 1. — ¹⁰¹ Wulff, C. (1893): Beiträge zur Kenntnis der Nukleinbasen. Z. physiol. Chem. 17/468. — ¹⁰² Zaloska, Z. (1928): Recherches histochimiques sur le tissu adipeux des larves et des nymphes de *Tenebrio molitor*, „Kosmos“, J. Soc. Polon Nat. Kopernik 53.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Österreichische Zoologische Zeitschrift](#)

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: [02](#)

Autor(en)/Author(s): Schindler Judithmarie

Artikel/Article: [Reservestoff- und Exkretspeicherung bei Bodentieren, unter besonderer Berücksichtigung der Harnsäureverbindungen. 517-567](#)