LIBRARY
NEW YORK
BOTANICAL
GARDEN

Untersuchungen über lichtkatalytische Vorgänge von physiologischer Bedeutung.

Von

Kurt Noack.

Einleitung.

Die mannigfaltigen Einwirkungen, die die Strahlungsenergie des Lichtes auf die lebende Zelle ausübt, müssen letzten Endes auf Änderungen der Struktur und der chemischen Zusammensetzung des Protoplasmas zurückgeführt werden können. Hierbei erhebt sich die Frage, in welchem Stadium des gesamten Prozesses der Lichteinwirkung die strahlende Energie in chemische Arbeit übergeführt wird. Es ist denkbar, daß diese Umformung von der lebenden Materie selbst, das heißt von dem organisierten Eiweiß vorgenommen wird; wieweit dies zutrifft, läßt sich zurzeit nicht sagen. Wohl aber sind experimentelle Anhaltspunkte für die andere Möglichkeit vorhanden, nämlich dafür, daß zwischen strahlender Energie und lebender Substanz nichtorganisierte Umformer eingeschaltet sind, die Strahlungsenergie in chemische Energie umsetzen.

Solche physiologisch wirksame Lichtkatalysatoren sind in den fluoreszierenden organischen Substanzen und in einer Anzahl von Schwermetallsalzen gegeben.

Die Gruppe der fluoreszierenden Farbstoffe und einige andere fluoreszierende organische Substanzen ohne Farbstoffcharakter besitzen die Eigenschaft, in belichteter wässeriger Lösung auf lebendes Protoplasma, Enzyme, Toxine usw. schädigend zu wirken, und zwar in Konzentrationen, die im Dunkeln von denselben Objekten ohne weiteres ertragen werden. Tappeiner[1], der mit seinen Schülern diese Erscheinung ent-

[1]) Tappeiner; vgl. bes. Deutsches Arch. f. klin. Med. **80**, 1904. 427 und Zusammenfassung in: Ergebnisse d. Physiologie v. Asher-Spiro. **8**, 1909. 698.

1920

deckt und eingehend untersucht hat, bezeichnet die hierher gehörigen Substanzen als photodynamisch wirksame.

Als Regel für das Ausmaß der photodynamischen Wirkung gilt, daß innerhalb einer chemischen Gruppe fluoreszierender Stoffe die Wirkung mit sinkender Fluoreszenzhelligkeit zunimmt, während eine und dieselbe Substanz um so wirksamer ist, je höher ihre, durch chemische Mittel beeinflußbare, Fluoreszenz gesteigert werden kann. Soweit die Konzentration in Frage kommt, lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: in der einen (Fluoreszeinreihe, Methylenblau u. a.) ist ein Maximum der Wirkung bei $^1/_{5000}$—$^1/_{2000}$ n vorhanden, während in der anderen (dichloranthracen-sulfosaures Natrium) die Wirkung mit der Konzentration dauernd steigt. Die Beziehungen zwischen photodynamischer Wirkung und Belichtung mit Strahlen verschiedener Wellenlänge sind gleichlaufend mit der Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Lichtabsorption in verschiedenen Spektralbezirken.

Die Untersuchung der photodynamischen Wirkung aufs lebende Protoplasma wurde zumeist an Tieren vorgenommen. Als ein äußerst empfindliches Objekt erwies sich Paramaecium caudatum, das z. B. in Eosinlösung 1 : 10000 bei starker Belichtung in wenigen Minuten getötet wird. Ferner wurde festgestellt, daß die fluoreszierenden Stoffe im Licht eine zerstörende Wirkung auf rote Blutkörperchen ausüben, wie an der eintretenden Hämolyse leicht erkannt werden kann (Sacharoff und Sachs)[1]. Auch an höheren Tieren bzw. ihren überlebenden Organen lassen sich tiefgreifende, photodynamische Schädigungen erzielen (vgl. u. a. H. Fischer[2], Amsler und Pick[3], L. Adler[4]).

Der Wirkung der fluoreszierenden Stoffe auf das pflanzliche Protoplasma ist bislang relativ wenig Beachtung geschenkt worden, was um so auffallender ist, als die erste diesbezügliche Beobachtung, allerdings ohne Ahnung der Zusammenhänge,

[1]) Sacharoff und Sachs. Münch. med. Woch. **52**, 1905. 297.
[2]) Fischer, H. Zeitschr. f. physiol. Chem. **95, 96, 97, 98.**
[3]) Amsler und Pick. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **82**, 1918. 86.
[4]) Adler, L. Ebenda. **85**, 1919. 152.

mit an Pflanzen gemacht wurde: Marcacci[1] teilte 1887 mit, daß Chinin und Cinchonamin im Licht auf keimende Samen, grüne Pflanzen, Froscheier, Gärungsprozesse schädigend wirkt, während im Dunkeln keine Wirkung zu sehen ist. Bakterien, Hefe und Fadenpilze scheinen nach den Beobachtungen der Tappeinerschen Schule gegen belichtete fluoreszierende Stoffe relativ wenig empfindlich zu sein. Auch bei den am stärksten photodynamisch wirkenden Substanzen trat eine Schädigung erst nach 12—14 Stunden ein, eine Tatsache, die Tappeiner auf das Vorhandensein der den Zutritt erschwerenden Zellmembran zurückführt. Neuerdings ist von Metzner[2] in Spirillum volutans ein Organismus gefunden worden, der gegen fluoreszierende Stoffe noch empfindlicher als Paramaecium ist.

Beobachtungen an grünen Pflanzen wurden in umfassender Weise auf Veranlassung Molischs von Gicklhorn[3] (1914) unternommen, der eine stark schädigende Wirkung belichteter fluoreszierender Stoffe auf Algen und höhere Pflanzen feststellte und auch eine Beschleunigung der Plasmaströmung mit darauffolgender Sistierung im gegebenen Fall als erstes Symptom der Schädigung feststellen konnte. Daß den fluoreszierenden Stoffen bei Belichtung außerhalb der letalen Zone auch noch andere Wirkungen zukommen, lehrt unter anderem die erwähnte Studie Metzners, der feststellte, daß an sich nicht lichtempfindliche Organismen unter dem Einfluß fluoreszierender Stoffe phobophototaktische Bewegungen ausführen können, ein Befund, der weiterer Untersuchung wert erscheint.

Die photodynamischen Erscheinungen sind nun für die Physiologie von ganz allgemeiner Bedeutung, da ja viele Organismen selbst fluoreszierende Stoffe, sei es als normalen oder pathologischen Bestandteil, beherbergen, und besonders die Pflanzen im Chlorophyll eine Substanz besitzen, die, wie Gicklhorn (vgl. S. 1262) im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen hat, auch im intakten Chloroplasten stark rot fluoresziert. Von an-

[1]) Marcacci. XII. Kongr. Assoc. med. Ital. 1887 (zit. n. Meyer-Gottlieb. Exp. Pharmakologie. 1914. S. 368).

[2]) Metzner. Biochem. Zeitschr. **100**, 1919. 33.

[3]) Gicklhorn. Sitzgsber. K. Akad. Wiss. Wien. Math.-nat. Kl. **123**, 1914. I, 1. 1221.

deren pflanzlichen Stoffen ist hier z. B. das von Suárez[1] aus »Maizena« und Maiskeimen gewonnene, stark blau fluoreszierende Zeochin zu nennen, dem eine starke photodynamische Wirkung auf Paramaecien zukommt. Nicht unerwähnt soll bleiben, daß die Ursache einiger nur bei Lichtzufuhr auftretenden Krankheiten, z. B. Pellagra, Fagopyrismus u. a., auf die Wirkung fluoreszierender Pflanzenstoffe zurückgeführt wird; speziell die Maisernährung steht in engem Zusammenhang mit der Pellagra.

Mit Chlorophyllösungen wie auch mit Extrakten aus etiolierten Pflanzenteilen haben Hausmann und Portheim[2] eine photodynamische Wirkung auf Paramaecien und rote Blutkörperchen erzielt. Inwieweit hierbei das Chlorophyll als solches beteiligt ist, erscheint jedoch nicht sicher, worüber später Weiteres mitgeteilt werden wird.

Für die Pflanzenphysiologie sind alle diese Untersuchungen sehr wertvoll, können aber für die Erforschung der physiologischen Funktion der fluoreszierenden Stoffe, speziell des Chlorophylls, nur dann herangezogen werden, wenn der Charakter der photodynamischen Wirkung näher definiert werden kann. In dieser Frage nun gehen die Ansichten auseinander.

Die am nächsten liegende Möglichkeit, die Fluoreszenzstrahlen direkt für die photodynamische Wirkung verantwortlich zu machen, konnte von Tappeiner dadurch ausgeschaltet werden, daß er Paramaecien in Wasser aufschwemmte und durch ein Eosinfilter hindurch belichtete; derartig bestrahlte Paramaecien blieben vollständig unversehrt.

Dagegen ergab sich, daß zur Erzielung einer photodynamischen Wirkung Sauerstoff unerläßlich ist; und so lag es nahe, in der photodynamischen Wirkung einen Oxydationsvorgang zu erblicken. Es wurde nun von Straub[3], Tappeiner, Edlefsen[4] festgestellt, daß eine Reihe von Substanzen im

[1]) Suárez. Biochem. Zeitschr. **77**, 1916. 17.

[2]) Hausmann. Ber. d. d. bot. Ges. **26a**, 1908. 452. Jahrb. f. wiss. Bot. **46**, 1909. 599. Hausmann und Portheim. Biochem. Zeitschr. **21**, 1909. 51.

[3]) Straub. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. **51**, 1904. 383.

[4]) Edlefsen. Münch. med. Woch. **51**, 1904. 1585.

Licht bei Gegenwart von Eosin oxydiert werden, z. B. Benzylalkohol, Pyrogallol, Salizylaldehyd, α-Naphthol, metallisches Ag, $FeSO_4$. Straub untersuchte genauer die Abspaltung von J aus KJ und hält die photodynamische Wirkung des Eosins für die Folge einer intermediären Eosinperoxydbildung.

Dagegen ist Tappeiner trotz dieser Befunde nicht geneigt, in der photodynamischen Wirkung eine Schädigung des Protoplasten durch Oxydation zu erblicken. Er sucht vielmehr die photodynamische Wirkung der physiologischen Wirkung der Lichtstrahlen unterzuordnen und stützt sich dabei auf die Tatsache, daß langwelliges Licht nur bei Sauerstoffgegenwart, kurzwelliges auch ohne Sauerstoff schädigend wirkt. Hieraus schließt er (1909, l. c.):

»Das Primäre der Wirkung beider Strahlenarten ist eine Spaltung, bei der Produkte entstehen, welche bei weiterer Belichtung und in Gegenwart von gasförmigem O_2 oxydabel sind. Bei den schwach wirkenden langwelligen Strahlen ist der Gleichgewichtszustand bald erreicht; d. h. die Umsetzung kommt sehr bald zum Stillstand und geht erst bis zu einem sichtbar nachweisbaren Grad weiter, wenn durch anwesenden O_2 das oxydable Spaltungsprodukt oxydiert und dadurch weggeschafft wird. Fluoreszierende Substanzen beschleunigen diese Oxydation und damit auch die Lichtwirkung. Bei dem energischen kurzwelligen Licht dagegen geht die Umsetzung viel weiter, so daß es wenig oder gar nichts ausmacht, ob Sauerstoff zugegen ist und die oxydablen Spaltungsprodukte beseitigt werden oder nicht.«

Tappeiner sieht also in der photodynamischen Wirkung eine Beschleunigung der Lichtwirkung derart, daß die Schädlichkeit des Lichts in chemisch nicht definierbaren Spaltungsprozessen innerhalb der lebenden Substanz beruht und den fluoreszierenden Stoffen nur die Eigenschaft zukommt, dabei entstehende, die Lichtwirkung hemmende Spaltungsprodukte, die als reduzierbar angenommen werden, zu oxydieren und so das Gleichgewicht nach der Seite der schädlich wirkenden Spaltung hin dauernd zu verschieben.

Die anderen Autoren, die sich mit der photodynamischen Wirkung befaßten, gingen auf den Charakter des Prozesses nur wenig ein und erblicken häufig in der Eigenschaft der Fluoreszenz direkt die Ursache der Schädlichkeit. Nur Sacharoff und Sachs (l. c.) bringen eine kurze Mitteilung, daß die durch belichtetes Erythrosin bewirkte Hämolyse durch Zusatz von Na_2SO_3 gehemmt werden kann.

Von anderen Gesichtspunkten ausgehend kam Neuberg[1] zu einem Studium der Eigenschaften belichteter fluoreszierender Stoffe. In früheren Arbeiten hatte Neuberg festgestellt, daß Eisen-, Mangan-, Uran- und andere Salze als Lichtkatalysatoren fungieren und bei Belichtung in kurzer Zeit die mannigfachsten Umsetzungen bewerkstelligen, z. B. die Umwandlung von Benzoësäure in Salizylsäure, die Spaltung zusammengesetzter Kohlehydrate und Eiweißkörper usw. Angesichts der starken physiologischen Wirksamkeit der fluoreszierenden organischen Stoffe versuchte nun Neuberg die genannten Umsetzungen auch mit diesen Substanzen zu erhalten. Jedoch konnte er sogar mit den photodynamisch wirksamsten Stoffen keinen derartigen Prozeß, auch nicht bei vieltägiger Einwirkung des Lichts, verwirklichen; nur die Anthrazenderivate (z. B. dichloranthrazendisulfosaures Natrium) machen eine Ausnahme, indem sie sowohl photodynamisch wirksam sind, als auch in der Weise der metallischen Lichtkatalysatoren zu Umwandlungen chemischer Substanzen Anlaß geben.

Was die Erklärung der katalytischen Lichtwirkung allgemein betrifft, so sieht sie Neuberg in der Tatsache gegeben, daß die metallischen Lichtkatalysatoren in verschiedenen Oxydationsstufen auftreten können und auch die fluoreszierenden organischen Stoffe in Form der stets realisierbaren Chinonstruktur eine Oxydationsstufe darstellen, zu der eine entsprechende Hydrochinonverbindung als Reduktionsstufe gehört. Im Licht geht nun eine ständige Umwandlung der beiden Stufen vor sich, wobei der bei der Reduktion freiwerdende Sauerstoff auf das Substrat übertragen und dieses in der verschiedensten Weise oxydiert und gespalten wird.

Deneben läßt Neuberg jedoch die Möglichkeit offen, daß bei der lichtkatalytischen Wirkung der fluoreszierenden Farbstoffe Farbstoffperoxyde beteiligt sind, wie sie von Gebhard[2] in belichteten Lösungen von Malachitgrün, Alizarin u. a. nachgewiesen worden sind.

Eine vergleichende Betrachtung der fluoreszierenden Stoffe und der Lichtkatalysatoren Neubergs ergibt also, daß die

[1]) Neuberg. Biochem. Zeitschr. **61**, 1914. 315.

[2]) Gebhard. Zeitschr. f. angew. Chemie. **22**, 1909. 2484. **23**, 1910. 820.

Wirkung beider Gruppen irgendwie mit Sauerstoffwanderung zusammenhängt, daß aber — mit Ausnahme der Anthrazenderivate — hinsichtlich der von ihnen angreifbaren Substrate wesentliche Verschiedenheiten bestehen.

In vorliegender Abhandlung soll nun physiologisches Material für die Ansicht beigebracht werden, daß die photodynamische Wirkung der fluoreszierenden organischen Stoffe direkt auf eine Sauerstoffwirkung und zwar peroxydischen Charakters zurückgeführt werden kann. Ferner soll die Vergleichung der photodynamisch wirksamen Stoffe und der metallischen Lichtkatalysatoren, die Neuberg vom chemischen Gesichtspunkt aus unternommen hat, eine Ergänzung von der biologischen Seite aus erfahren.

I. Kapitel.

Die Oxydation pflanzlicher Chromogene durch belichtete fluoreszierende Stoffe und ihre Beeinflußbarkeit durch verschiedene Agentien.

A. Oxydation von Pflanzenextrakten.

Die oxydierende Wirkung belichteter fluoreszierender Stoffe wurde von Tappeiner u. d. a. an Substanzen festgestellt, die zu den im Tier- und Pflanzenreich verbreiteten in keiner oder nur sehr lockerer Beziehung stehen; im Gegenteil, die Versuche mit physiologisch wichtigen Substanzen, wie mit Kohlehydraten und Eiweiß, fielen, wie erwähnt, negativ aus.

Es wurde daher versucht, eine Oxydation an solchen Stoffen des Pflanzenreichs zu erzielen, die sehr leicht oxydabel sind und deren eingetretene Oxydation schon in Spuren infolge deutlicher Farbänderung nachweisbar ist. Bekanntlich werden diese Substanzen unter dem Namen »Atmungschromogene« zusammengefaßt. Die neueren Untersuchungen Palladins[1], insbesondere die schönen chemischen Studien Heinr. Wielands[2]

[1]) Palladin. Biochem. Zeitschr. 1914. **60**, 170.

[2]) Wieland, Heinr. Ber. chem. Ges. **45**, 1912. I, 679. **45**, 1912. II, 2606. **46**, 1913. III, 3327.

machen es so gut wie sicher, daß die Atmungschromogene und -farbstoffe aufs engste mit dem Betriebstoffwechsel verknüpft sind. Die Atmungsfarbstoffe entstehen aus den Chromogenen durch Dehydrierung, d. h. durch eine in Wasserstoffentzug bestehende Oxydation, und haben die Aufgabe, den bei der Verbrennung der eigentlichen Betriebstoffe nachgewiesenermaßen frei werdenden Wasserstoff unter Rückbildung zum Chromogen (Leukobase) an sich zu reißen. Näher kann hier nicht auf diese Verhältnisse eingegangen werden; es sei nur noch betont, daß hiermit Klarheit in die früher befremdende Tatsache kommt, daß die überall vorhandenen Oxydationsfermente nicht auf die eigentlichen Betriebstoffe, sondern »nur« auf die Chromogene und andere, nicht in der Pflanze vorkommende, Verbindungen einwirken[1]: Die Oxydationsfermente übertragen den Luftsauerstoff auf das Chromogen, das dadurch unter Bildung von H_2O dehydriert uud so dauernd reaktionsfähig erhalten wird, um die Kontinuität der Verbrennungsprozesse zu gewährleisten.

Daß Chromogene jedoch nicht allgemein als Farbstoffreduktionsstufen aufzufassen sind, hat Verf. an der vitalen Reduktion von Flavonkörpern zu Anthozyanfarbstoffen nachgewiesen[2].

Diese kurze Charakterisierung der Atmungschromogene mag genügen, um deren im folgenden zu beschreibende Oxydation, oder besser Dehydrierung, durch belichtete fluoreszierende Stoffe als eine Erscheinung zu kennzeichnen, der physiologische Bedeutung zukommt.

Zu den Versuchen wurden Pflanzen gewählt, deren Atmungschromogene in den frischen, wäßrigen, ohne Erwärmung gewonnenen Extrakten vorhanden sind, nicht erst durch Autolyse aus Prochromogenen abgespalten werden müssen und ohne Alkalizusatz zum Farbstoff oxydiert werden.

1. Versuche mit Vicia Faba.

Als ein günstiges Objekt in dieser Hinsicht ist Vicia Faba bekannt. Der durch Oxydation der wäßrigen Extrakte ent-

[1]) Z. B. Jost, Vorlesungen über Pflanzenphys. Jena. 1913. S. 281f.

[2]) Noack, Kurt. Zeitschr. f. Bot. **10**, 1918. 561.

stehende schwarze Farbstoff gehört der Gruppe der noch ungenügend erforschten Melanine an, die im Tier- und Pflanzenreich vorkommen und u. a. aus Tyrosin, Tryptophan entstehen können; Melaninbildung in Kartoffeln untersuchte neuerdings Haehn[1].

Die Extrakte wurden durch Zerreiben der Vicia-Organe in Wasser mit Seesand und Abfiltrieren auf der Nutsche hergestellt. Die etwas störende Beimengung kolloidal gelösten Chlorophylls in Filtraten aus grünen Pflanzenteilen konnte durch Versetzen des zu filtrierenden Reibgemisches mit Talkum auf ein Minimum herabgedrückt werden; das Chromogen wird von Talkum nur wenig adsorbiert. Die Filtrate waren in dünner Schicht klar und farblos, höchstens leicht gelblich gefärbt.

Hierauf wurden die Extrakte auf ihr Verhalten gegen fluoreszierende Substanzen bei verschieden starker Belichtung und bei Verdunkelung geprüft. Als Lichtquelle diente Sonnenlicht, diffuses Tageslicht, seltener elektrisches Kohlenbogenlicht. Da sich die fluoreszierenden organischen Stoffe in ihrer physiologischen Wirkung allgemein gleich verhalten, wurde von der Prüfung einer größeren Zahl dieser Substanzen Abstand genommen; meist wurde Eosin G. wasserlöslich (Grübler), Fluoreszein (Merck), Methylenblau rectif. nach Ehrlich (Grübler), daneben auch Methyleosin (Merck), Rose bengale (Merck), Neutralrot (Grübler), Aesculin, Chininsulfat angewandt, also fluoreszierende Stoffe, die den verschiedensten chemischen Gruppen angehören.

Die Vicia-Extrakte wurden in Mengen von 4 ccm in Reagenzgläser gefüllt und mittels Tropfpipette mit den Lösungen der fluoreszierenden Stoffe versehen, derart, daß das Volum in den Gläsern einer Serie dasselbe war. Wenn bei Versuchen im direkten Sonnenlicht eine Erwärmung zu befürchten war, wurde eine mit angesäuerter 7 proz. Ferrosulfatlösung beschickte Küvette als Wärmestrahlenfilter vorgelegt.

Das Resultat der im folgenden zu beschreibenden Versuche ist, daß die fluoreszierenden organischen Substanzen im Lichte eine zum Teil momentan einsetzende Chromogenoxydation be-

[1]) Haehn. Biochem. Zeitschr. **100**, 1919. 114.

dingen, die sich in allmählicher Verfärbung von leichtem Braun über Dunkelbraun, Violett bis zu tiefem Schwarz und schließlichem quantitativen Ausfällen des Farbstoffes in schwarzen Flocken kundgibt. Die verdunkelten Kontrollportionen zeigten während der Versuchszeit keine oder nur eine sehr geringe Farbänderung.

a) Versuche mit Eosin.

Von den angewandten fluoreszierenden Stoffen erwies sich Eosin als wirksamster und hatte außerdem den Vorteil, daß sein Farbcharakter in Anbetracht der geringen Konzentrationen, die zur Erreichung einer Oxydation nötig waren, nicht störend auf die Beurteilung der Chromogenoxydation wirkte.

Ein auf die oben beschriebene Weise gewonnener Vicia-Extrakt wurde in zwei parallelen Reihen in Mengen von je 4 ccm mit 0,05 ccm Eosinlösung in fallenden Konzentrationen versetzt; die Eosinkonzentration im Extrakt bewegte sich zwischen 1 : 200 000 und 1 : 100 000 000. Die eine Serie wurde dem diffusen Nordlicht an einem klaren Oktobertage bei 14° ab 11^h a. m. ausgesetzt, während die andere Serie gleichzeitig bei derselben Temperatur ins Dunkle gestellt wurde. Beiden Serien wurden einige Kontrollportionen ohne Eosin beigegeben.

Die belichtete Serie verhielt sich folgendermaßen: Schon nach 3 Minuten begann in den beiden ersten Gläsern (Eosin 1 : 200 000 und 1 : 400 000) eine deutliche Bräunung aufzutreten, die sich im Laufe von 30 Minuten zu Dunkelbraun verstärkte und weiterhin allmählich in Schwarz überging. Derselbe Prozeß spielte sich in den übrigen Gläsern, mit Ausnahme der letzten, ab in der Weise, daß das Auftreten der ersten Bräunung und das Weiterschreiten der Verfärbung sich um so langsamer vollzog und die schließlich erzielte Farbstoffmenge um so geringer war, je tiefer die Eosinkonzentration lag. Die Verfärbung zeigte sich immer am stärksten in einer unter der Oberfläche liegenden Zone, so daß vor Beurteilung des erreichten Färbegrades die Gläser erst durchgeschüttelt werden mußten. Nach 3- bzw. 6stündiger Belichtung war das Resultat folgendes:

Eosin	a) nach 3 Stunden	b) nach 6 Stunden
1. 1 : 200000	durchsichtig schwarz	tiefschwarz
2. 1 : 400000	„ „	„
3. 1 : 800000	etwas heller als 2a	„
4. 1 : 1600000	„ „ „ 3a	durchsichtig schwarz
5. 1 : 3200000	heller als 4a	etwas heller als 4b
6. 1 : 6400000	lichtschwarz	heller als 5b
7. 1 : 12800000	schwarzstichig	lichtschwarz
8. 1 : 25600000	fast farblos	schwarzstichig
9. 1 : 51200000	farblos	farblos
10. 1 : 102400000	„	„
11. Ohne Eosin	„	„

Die sämtlichen Portionen der im Dunkel gehaltenen Reihe waren noch nach 10 Stunden vollkommen farblos; erst nach 24 Stunden machte sich eine in allen Gläsern gleichstarke schwache Graufärbung in einer oberflächlichen Zone bemerkbar.

Aus diesem Versuch ergibt sich, daß Eosin in sehr geringen Konzentrationen bis herab zu 1 : 25000000 eine photochemische Oxydation des Viciachromogens bewirkt. Da die Farbstoffbildung zunächst in einer oberflächlichen Zone einsetzt, ist die Rolle des Eosins in einer mittelst der Lichtenergie bewirkten Übertragung des Luftsauerstoffes auf das Chromogen zu erblicken.

Noch stärker ist die Eosinwirkung bei Belichtung mit direktem Sonnenlicht. Hier tritt z. B. bei einer Eosinkonzentration 1 : 100000 sofort nach Eintritt der Belichtung eine deutliche Bräunung des Chromogenextraktes auf, der sich in zirka 2 Stunden zu einer undurchsichtig schwarzen Flüssigkeit verfärbt. Wird die Belichtung weiter fortgesetzt, so kommt es nach weiteren 1—2 Stunden zu einer Ausfällung schwarzer Flocken unter Farbloswerden der Lösung. Da auch das Auftreten dieser Fällung um so rascher und vollständiger verläuft, je höher die Eosinkonzentration ist oder je länger belichtet wurde, ist in dieser unlöslichen Form des Farbstoffs wohl eine höhere Oxydationsstufe des Chromogens zu erblicken. Eosinfreie Chromogenextrakte verfärbten sich auch im direkten Sonnenlicht während der Versuchszeit nur wenig oder gar nicht.

Diese Resultate wurden gleichermaßen mit Extrakten aus grünen Vicia-Organen, wie auch mit etiolierten chlorophyll-

freien Teilen und mit Wurzeln erhalten. Ein Versetzen der Extrakte mit $CaCO_3$ zwecks etwaiger Neutralisation hatte keinen merklichen Einfluß auf die Oxydierbarkeit des Chromogens zur Folge. Etwas anders verhielten sich die Extrakte, die aus unreifen Samen samt der grünen Samenschale gewonnen wurden; auch hier trat bei Eosinzusatz im Lichte eine Braunfärbung auf, die jedoch auch nach 8 stündiger Belichtung im direkten Sonnenlicht nicht in Schwarzfärbung überging. Dies spricht für die Vermutung Pfeffers[1], daß in Vicia zwei Chromogene vorhanden sind, von denen das eine braunen, das andere schwarzen Farbstoff liefert, worüber später näheres auszuführen ist.

b) Versuche mit anderen fluoreszierenden organischen Stoffen.

Mit den anderen fluoreszierenden Stoffen wurden im Prinzip dieselben Resultate erhalten; jedoch ist ihre Wirkung etwas schwächer. Eine Beschreibung der Versuche mit anderen Farbstoffen der Fluoreszeinreihe (Fluoreszein, Methyleosin, Rose bengale) erübrigt sich daher.

Dagegen mögen Versuche mit dem grün fluoreszierenden, der Thiazingruppe angehörigen Methylenblau Erwähnung finden, da dieser Farbstoff ja viel zu Vitalfärbungen benutzt wird und wohl manche konträre Angaben über das Verhalten der mit ihm behandelten Objekte in der Nichtbeachtung seiner photodynamischen Wirksamkeit ihren Grund haben.

So findet van Wisselingh[2], daß Methylenblau für Spirogyra giftiger ist als von Pfeffer angenommen wird; über die Lichtverhältnisse bei seinen Versuchen gibt van Wisselingh keine Auskunft, während Pfeffer[3] angibt, im hellen diffusen Licht gearbeitet und dabei dieselben Resultate betreffend Farbstoffspeicherung wie im Dunkeln erhalten zu haben.

Infolge der starken Farbintensität des Methylenblaus wie auch wegen seiner im Vergleich zum Eosin geringeren photo-

[1]) Pfeffer, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen. Abh. d. math.-phys. Kl. d. k. sächs. Ges. d. Wiss. **15**, 1889. 398.

[2]) van Wisselingh. Beih. bot. Centralbl. **32**, 1915. I, 155.

[3]) Pfeffer. Tüb. Unters. II. **88**, 1886. 185.

dynamischen Wirksamkeit bedingten die anzuwendenden Konzentrationen eine ziemlich deutliche Blaufärbung der Vicia-Extrakte; jedoch lag darin keine sonderliche Erschwerung für die Beurteilung der im Lichte eingetretenen Farbstoffbildung aus dem Vicia-Chromogen, zumal auch hier die im Dunkeln gehaltenen Kontrollportionen lange Zeit unverändert blieben. Immerhin ist bei den in folgender Tabelle angeführten Farbtönungen zu berücksichtigen, daß bis herab zur Konzentration 1 : 160000 die Methylenblaukomponente in den Angaben mit enthalten ist. Der folgende Versuch wurde in direktem Dezembersonnenlicht angestellt.

Methylenblau	a) nach 3 Stunden	b) nach 5 Stunden
1. 1 : 40000	undurchsichtig blauschwarz	wie 1a
2. 1 : 80000	blauschwarz	undurchsichtig blauschwarz
3. 1 : 160000	,,	,, ,,
4. 1 : 320000	d'grau	schwarz
5. 1 : 640000	grau	d'grau
6. 1 : 1 280000	hellgrau	grau
7. Ohne Methylenblau	graustichig	hellgrau

Die 8 Stunden lang verdunkelten Kontrollportionen hatten ihre rein blaue Farbe behalten bzw. waren sie — in den niederen Konzentrationen — farblos geblieben. Die Temperatur der belichteten Flüssigkeit stieg im Laufe der Besonnung auf 20°, während die verdunkelten Gläser bei 19° gehalten wurden.

Von fluoreszierenden Substanzen ohne Farbstoffcharakter wurden Aesculin und Chininsulfat untersucht.

Aesculin, das im durchfallenden Licht fast farblos ist und schön lichtblau fluoresziert, verursachte in einer Konzentration von 1 : 5000 im direkten Sonnenlicht innerhalb weniger Minuten starke Bräunung des Vicia-Extraktes, während Kontrollportionen im Dunkeln viele Stunden lang farblos blieben.

Chininsulfat wirkte schwächer: eine Konzentration von 1 : 5000 bewirkte im direkten Sonnenlicht nach 10 Minuten, im diffusen Tageslicht nach 30 Minuten eine deutliche Bräunung, während die Dunkelkontrollen ebenfalls lange Zeit farblos blieben. Da die Fluoreszenz des Chininsulfats erst in schwefelsaurer Lösung deutlich wird, mag seine relativ geringe photo-

dynamische Wirksamkeit in den angeführten Versuchen mit seiner schwachen Fluoreszenz in wäßriger Lösung zusammenhängen.

2. Versuche mit Aloe soccotrina DC.

Ein ebenfalls für photochemische Versuche günstiges Material stellt der Saft dar, der aus den Blättern von Aloe soccotrina gewonnen wird.

Die Aloearten zeichnen sich durch einen reichen Gehalt an Glukosiden aus, die als Aloine bezeichnet werden und bei der Hydrolyse verschiedene Emodine (methylierte Trioxyanthrachinone) abspalten. Eine Aloeart beherbergt mehrere Aloine. Die Aloine finden sich zum größten Teil in großen, lebenden Zellen von schlauchförmiger Gestalt, die die Gefäßbündel begleiten und besonders gut in den Blättern ausgebildet sind (vgl. Molisch[1]). Der Inhalt dieser Aloinschläuche ist farblos oder mehr weniger gelb, bei Aloe soccotrina goldgelb gefärbt.

Die aus den einzelnen Aloearten gewonnenen Aloine zeigen eine verschieden stark ausgeprägte Oxydationsfähigkeit, die sich in Rotfärbung der betreffenden Lösungen bei Sauerstoffzufuhr äußert. Speziell das Chromogen aus den Blättern von Aloe soccotrina läß sich sehr leicht zu einem kirschroten Farbstoff oxydieren. Welche Verbindungen hier im einzelnen vorliegen, ist unbekannt; hier genügt die Feststellung, daß diese Färbung tatsächlich auf einer Oxydation, sei es auf einer Sauerstoffanlagerung, sei es auf einer Dehydrierung, beruht. Letzteres ist nach dem früher Gesagten das wahrscheinlichere. Die Oxydation kann hervorgerufen werden durch längeres Stehenlassen oder Erhitzen des Aloesaftes an der Luft, durch Versetzen mit H_2O_2 + Peroxydase oder $CuSO_4$, nicht jedoch mit H_2O_2 allein. Erwähnenswert ist die wohl noch nicht bekannte Tatsache, daß ein Zusatz von 2 ccm einer ganz schwachen, eben blaßviolett gefärbten $KMnO_4$-Lösung genügt, um innerhalb weniger Minuten in 10 ccm Saft Rotfärbung hervorzurufen.

Wie labil die Oxydationsstufe ist, geht daraus hervor, daß 5 ccm Saft, die im Reagenzglas bei Zimmertemperatur gehalten werden, sich im Laufe von 24 Stunden nur an der Oberfläche

[1]) Molisch, Studien üb. d. Milchsaft u. Schleimsaft. Jena. 1901. S. 105 ff.

röten, wenn sich ein kleines lebendes Aloeblattstück auf dem Boden des Glases befindet, während eine ohne Blattstück angesetzte Kontrolle sich in dieser Zeit gleichmäßig stark rot färbt; eine größere Menge von Blattstücken, im Safte aufgeschwemmt, bewirkt völliges Ausbleiben der Rotfärbung auch bei großer Oberfläche. Da auch schon geröteter Saft durch lebendes Gewebe entfärbt wird, liegt im erstangeführten Fall offenbar eine sofortige Reduktion des eben gebildeten Farbstoffes zum Chromogen vor. Eine Übertragung dieser Verhältnisse auf den intakten Organismus liegt natürlich ganz im Rahmen der Ansichten über die Funktion der Chromogene.

Die Versuche mit fluoreszierenden Stoffen wurden in der bei den Vicia-Untersuchungen beschriebenen Weise vorgenommen. Das Chromogen wird in reichlicher Menge erhalten, wenn ein ausgewachsenes Aloeblatt in dünne Querscheiben zerlegt wird und diese mit zirka 50 ccm Wasser geschüttelt werden; durch Dekantieren wird dann eine gelb gefärbte Lösung erhalten, die sich an der Luft erst in 6—8 Stunden schwach rötet.

Auch hier ergab sich, daß die fluoreszierenden Stoffe eine starke Oxydationswirkung im Lichte ausüben; der Beginn der Verfärbung erfolgte im direkten Sonnenlicht unmittelbar nach Einsetzen der Belichtung.

Am stärksten wirkte wiederum Eosin; die noch eben in 2 Stunden wirksame Grenzkonzentration lag bei zirka 1 : 6 000 000 bei Belichtung in schwacher, durch Nebel verschleierter Sonne, wie folgende Tabelle zeigt:

Eosin	a) nach 40′	b) nach 60′	c) nach 2 Stunden
1. 1 : 100 000	blaßrot	hellrot	schön kirschrot
2. 1 : 200 000	schwächer als 1 a	blaßrot	blaßrot
3. 1 : 400 000	„ „ 2 a	„	„
4. 1 : 800 000	„ „ 3 a	schwächer als 3 b	schwächer als 3 c
5. 1 : 1 600 000	rotstichig	schwach blaßrot	„ „ 4 c
6. 1 : 3 200 000	hellgelb	rotstichig	rotstichig
7. 1 : 6 400 000	„	„	„
8. 1 : 12 800 000	„	hellgelb	hellgelb
9. Ohne Eosin	„	„	„

Die Dunkelkontrollen 1—9 waren nach 3 Stunden sämtlich unverändert hellgelb geblieben; die Temperatur betrug im Licht und Dunkel 18°.

In starkem Sonnenlicht war mit Eosin 1 : 32 000 000 nach 3 Stunden eine schwache Rosafärbung zu konstatieren, die stärker war, als in der ebenso belichteten Kontrolle ohne Eosin.

Ebenso, aber etwas schwächer, wirkte Methylenblau; hier war noch mit einer Konzentration von 1 : 4 000 000 unter denselben Licht- und Temperaturverhältnissen, wie bei dem in der Tabelle mitgeteilten Eosinversuch, nach 2 Stunden blaßrote Färbung zu konstatieren; in höheren Konzentrationen war die Methylenblauwirkung entsprechend stärker. Im Dunkeln war nach 3 Stunden keine Veränderung zu bemerken.

Fluoreszein ist für Versuche mit Aloe weniger geeignet, da sich auch im Dunkeln, sogar bei einer Konzentration von 1 : 80 000, ein Umschlag der hellgelben Farbe in tiefgelb einstellte, während die belichteten Portionen sich nach 2 Stunden intensiv braunrot verfärbt hatten. Dieser merkwürdigen Erscheinung wurde nicht weiter nachgegangen.

3. Versuche an anderen Pflanzen.

Versuche an anderen Pflanzen, die beim Absterben eine starke Verfärbung erfahren, fielen negativ aus. Untersucht wurden: Lupinus, Cytisus nigricans, Melampyrum, Orobanche, ferner Dahliaknollen und Pontederiawurzeln, die sich beim Absterben stahlblau färben. Offenbar sind die Chromogene dieser Pflanzen zum größten Teil wenigstens in einer Bindung vorhanden, die beim Zerreiben und Extrahieren der frischen Organe mit Wasser nicht aufgehoben wird und eine Oxydation nicht zuläßt.

Die Versuche an Vicia und Aloe zeigen, daß die fluoreszierenden organischen Substanzen auf die Chromogene dieser Pflanzen im Licht wie ein Peroxyd wirken, das stärker oxydierend wirkt als H_2O_2 und daß infolge der äußerst geringen Menge, die zur Oxydation beträchtlicher Chromogenmengen nötig ist, die Grundsubstanz dieser Peroxyde sich in reversibler Weise mit Luftsauerstoff beladen muß, d. h. als Katalysator, und zwar als Lichtkatalysator, zu betrachten ist.

Hierbei ist zu bemerken, daß auch Gebhard in seinen früher erwähnten Mitteilungen betont, daß Farbstoffperoxyde auf Farbstoffe stärker bleichend wirken als H_2O_2.

B. Die Hemmung der lichtkatalytischen Chromogenoxydation durch reduzierende Mittel.

Dem Oxydationsvermögen der belichteten fluoreszierenden Substanzen muß natürlich eine Reduzierbarkeit der beeinflußbaren Chromogene entgegenkommen. Um einen gewissen Einblick in die Stärke dieser Reduktionskraft zu erhalten, wie auch um die Bildung peroxydartiger Verbindungen deutlicher zu zeigen, wurde untersucht, inwieweit Substanzen von bekannter Reduktionstärke das belichtete System Eosin + Chromogen beeinflussen.

Als solche Substanz wurde in erster Linie Na_2SO_3 gewählt und zunächst jodometrisch festgestellt, ob und inwieweit belichtetes Eosin usw. Sulfit zu oxydieren vermag. Analog den Versuchen von Tappeiner und Straub (l. c.) mit Pyrogallol, KJ usw. ergab sich, daß Eosin, Fluoreszein, Methylenblau im Lichte Na_2SO_3 in großer Menge zu Sulfat oxydieren und daß dabei die Gegenwart von Luftsauerstoff eine große Rolle spielt.

1. Die Wirkung der fluoreszierenden Farbstoffe auf Na_2SO_3.

Genau gleich weite Reagenzgläser wurden mit 10 oder 5 ccm einer frisch bereiteten, wässerigen Lösung von ca. 0,5 % $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$ beschickt, die gleichzeitig Eosin 1 : 10000 und 1 : 200000 enthielt. Vor Beginn des Versuchs wurde der SO_2-Gehalt der Lösungen titrimetrisch festgestellt. Die Gläser wurden an einem kalten Februartage teils der direkten Sonne ausgesetzt, teils verdunkelt. Die Temperatur der verdunkelten Gläser wurde dauernd der Temperatur der belichteten angepaßt, die sich in den stärkeren Eosinlösungen bis auf 22,5°, in den schwächeren bis auf 20,5° erhöhte.

Nach 6stündiger Belichtung wurde die Titration einer 10 ccm betragenden Sulfitlösung + Eosin 1 : 10000 vorgenommen und sofort daran anschließend die analoge verdunkelte Lösung titriert: es ergab sich, daß, bezogen auf die in der verdunkelten Lösung nach 6 Stunden vorhandene Sulfit-

menge, 49,94 % SO_2 im Lichte durch Eosin zu SO_3 oxydiert worden waren. Eine sofort daran angeschlossene Parallelunter-suchung eines zweiten Paares ergab ein Minus von 48,42 % SO_2 im Licht.

Nach $6^1/_2$stündiger Belichtung wurden die mit Eosin 1 : 200 000 beschickten 10 ccm-Lösungen untersucht: das Minus betrug in zwei Versuchen 53,54 % bzw. 52,31 % SO_2 im Licht.

Die sofort darauf untersuchten nur 5 ccm betragenden Lösungen mit Eosin 1 : 200 000 ergaben ein Minus von 57,48 % bzw. 58,93 % SO_2 im Licht.

10 ccm-Lösungen, die mit Methylenblau 1 : 200 000 versehen waren, ergaben nach 7stündiger Belichtung ein Minus von 45,25 % bzw. 43,12 % SO_2 im Licht.

Kontrollösungen ohne Farbstoffzusatz ergaben im Licht ein Minus von 13,54% bzw. 14,90% SO_2.

Auch im Dunkeln war selbstverständlich eine Oxydation des Sulfits während der 6—8 Stunden eingetreten; sie betrug, gemessen am Anfangstiter vor Beginn der Versuche:

in den 10 ccm-Eosinlösungen	1 : 10 000	: 17,5 % SO_2
„ „ 10 ccm- „	1 : 200 000	: 13,84 % SO_2
„ „ 5 ccm- „	1 : 200 000	: 27,75 % SO_2
„ „ 10 ccm-Methylenblaulösungen	1 : 200 000	: 8,15 % SO_2
ohne Farbstoff		: 7,82 % SO_2

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß Na_2SO_3 von fluoreszierenden Farbstoffen im Licht weitgehend oxydiert wird.

Zu den Methylenblauversuchen ist zu bemerken, daß die verdunkelten Lösungen infolge Bildung der Leukobase ausgebleicht waren; nach Beendigung der Titration kehrte die blaue Farbe wieder. Die belichteten Lösungen wurden nicht entfärbt, nahmen aber eine stahlblaue Farbe an; jedoch geht aus den Versuchen hervor, daß der Farbstoff dadurch seine oxydierende Eigenschaft nicht eingebüßt hat.

Die Tatsache, daß auch die farbstoffreien Sulfitlösungen im Lichte rascher oxydiert werden als im Dunkeln, findet wohl ihre Erklärung in den Mitteilungen von Kernbaum[1] und

[1]) Kernbaum. Compt. rend. Acad. Sc. Paris. **149**, 1909. II, 273.

H. Thiele[1], daß Wasser durch ultraviolettes Licht z. T. in H_2O_2 und H_2 (Thiele) umgewandelt wird.

Eine Besprechung erfordert noch die Tatsache, daß auch in den verdunkelten Eosin-Sulfit-Lösungen eine stärkere SO_2-Abnahme zu verzeichnen war als in den eosinfreien Lösungen. Dies muß wohl größtenteils auf die Belichtung zurückgeführt werden, der die Lösungen beim Ansetzen und beim Titrieren am Ende des Versuchs ausgesetzt waren, wenn auch diese Manipulationen im diffusen Tageslicht mit tunlichster Beschleunigung vorgenommen wurden; eine Nachwirkung vorbelichteten Eosins, wie sie Ledoux-Lebard[2] an Paramaecien studierte, ist ausgeschlossen, da die Eoisinstammlösung dauernd im Dunkeln gehalten wurde.

Entsprechend schwächer war die photochemische Oxydation bei Einwirkung des diffusen Lichts an einem sehr trüben Tag: Eosin 1 : 10000 bewirkte in 5 Stunden eine Oxydation von 16,2% SO_2, bezogen auf die in der Dunkelkontrolle nach dieser Zeit noch vorhandene SO_2-Menge. Fluoreszein 1 : 20000 bewirkte ein Minus von 16,5% SO_2.

Der Einfluß des Luftsauerstoffs ergibt sich deutlich aus einem Versuch, in dem 20 ccm einer Lösung von 1% $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$ + Eosin 1 : 200000 der direkten Sonne in flachen Schalen ausgesetzt wurden, so daß die Flüssigkeitshöhe 0,5 ccm betrug. Nach 4 Stunden war überhaupt kein SO_2 mehr nachweisbar, während im Kontrollversuch ohne Licht in dieser Zeit 75,15% SO_2 oxydiert worden waren.

Der Einfluß der Sulfitkonzentration auf die photochemische Eosinwirkung ist ziemlich bedeutend. So war in Versuchen mit Fluoreszein 1 : 20000 in einer 1proz. $Na_2SO_3 \cdot 7\ H_2O$-Lösung nach 5 Stunden 27,41% SO_2 oxydiert worden, während in einer 0,5proz. Lösung bei denselben Lichtverhältnissen in dieser Zeit 16,31% SO_2 verschwunden waren. Die Sulfitkonzentration wurde niedrig gewählt, da diese Konzentrationen für später zu besprechende Versuche von Belang sind.

Bei diesen Oxydationen entsteht natürlich Na_2SO_4; bei Versetzen der Versuchslösungen mit $BaCl_2$ und HCl läßt sich ohne

[2]) Thiele, H. Ber. chem. Ges. **40**, 1907. 4914.

[1]) Ledoux-Lebard. Ann. Inst. Pasteur. **16**, 1902. 586.

weiteres erkennen, daß um so mehr Sulfat vorhanden ist, je länger oder je stärker die Lösungen belichtet wurden.

Zu erwägen ist noch, ob nicht das Verschwinden des Sulfits zum Teil auf eine Sulfurierung der Farbstoffe am Methankohlenstoff zurückzuführen ist, wie es Hantzsch und Osswald[1] z. B. für Brillantgrün und Fuchsin beschrieben haben. Jedoch wurden diese Verbindungen von den Verf. beim Behandeln der Farbstoffe mit Schwefeldioxyd erhalten und stellen farblose, leicht in den ursprünglichen Farbstoff übergehende Substanzen dar. Die in Gegenwart von Na_2SO_3 belichteten Eosinlösungen blaßten dagegen nur in schwachen Konzentrationen (1 : 200000 z. B.) etwas aus, wobei aber die Fluoreszenzhelligkeit zunahm. Es konnte also die Abnahme des Natriumsulfits nur zum kleinsten Teil auf einer Bindung eines Mols Sulfit an 1 Mol Farbstoff beruhen. Außdem ergibt die stöchiometrische Berechnung, daß unter Zugrundelegung einer Versuchslösung mit 0,01% Eosin (1 : 10000) und 1% $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$ (= 0,43% Na_2SO_3 titriert) auf 1 Mol Eosinnatrium 237,3 Mol Na_2SO_3 kommen; es ist also schon bei der höchsten der in den Versuchen angewandten Eosinkonzentrationen das Sulfit in bedeutendem Überschuß vorhanden.

Aus Gründen, die später ersichtlich werden, mußte auch noch festgestellt werden, ob eine Eosinlösung, nachdem sie in Gegenwart von Sulfit dem Licht ausgesetzt war, ihre sauerstoffübertragende Eigenschaft noch bewahrt hat. Zu dem Zweck wurde eine Eosinlösung 1 : 10000 zusammen mit zirka 1% $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$ so lange (6 Stunden) dem direkten Sonnenlicht in flachen Schalen ausgesetzt, bis die Sulfitreaktion mit Jod negativ war; am andern Tag wurde sie mit einer gleichen Menge frischer 2proz. Sulfitlösung versetzt, so daß sie jetzt Eosin 1 : 20000 und zirka 1% $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$ enthielt. Gleichzeitig wurde eine frische Eosin-Sulfit-Lösung derselben Konzentration angesetzt, worauf beide Lösungen in gleichen Teilen sowohl direkt besonnt als auch verdunkelt wurden. Nach $2^1/_2$-stündiger Besonnung war in den Lösungen mit dem vorbehandelten Eosin 28,04% SO_2 auf photochemischem Wege verschwunden, während in den frischen Kontrollösungen die Verminderung ungefähr denselben Betrag, nämlich 30.02%, erreichte.

[1]) Ber. chem. Ges. **33**, 1900. I, 278.

Hieraus ergibt sich, daß durch die Einwirkung von Na_2SO_3 im Licht die lichtkatalysatorische Eigenschaft des Eosins, gemessen an der Sulfitoxydation, sich nicht verändert hatte.

Es ist im Gegenteil zu betonen, daß Na_2SO_3 eine schützende Wirkung auf belichtetes Eosin ausübt. Wurde nämlich eine Eosinlösung 1 : 10 000 dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, so bleichte sie im Laufe von 6 Stunden stark aus, während eine gleiche, mit 0,2 % oder mehr Na_2SO_3 versetzte Lösung ihre Farbe in dieser Zeit im Lichte beibehielt. Dabei ist zu bemerken, daß gelöstes Na_2SO_3 schwach alkalisch reagiert und durch Alkali $^1/_{200}$ n die Bleichung fluoreszierender Farbstoffe im Licht beschleunigt wird (Dax[1]). Die Hemmung der Bleichung durch das reduzierende Na_2SO_3 steht in Übereinstimmung mit dem Befund von Gros[2], der feststellte, daß die Lichtempfindlichkeit des Fluoreszeins usw. auf Oxydation beruht, die durch den Farbstoff selbst katalytisch beschleunigt wird.

Dies ist auch der Grund, warum bei der Prüfung des Eosins auf Erhaltung der photodynamischen Wirksamkeit in Gegenwart von Sulfit die Belichtung nur so lange einwirken durfte, bis das Sulfit verschwunden war. Denn bei längerem Belichten tritt auch hier eine Ausbleichung und gleichzeitige Abnahme der lichtkatalysatorischen Eigenschaft ein, die eben auf das Verschwinden des Sulfits zurückzuführen ist.

Diese Verhältnisse mußten etwas ausführlicher geschildert werden, da sie als Grundlage für eine Reihe der im folgenden zu beschreibenden Versuche dienten.

2. Versuche mit Chromogenen.

Es wurde nun versucht, mit Hilfe des Natriumsulfits hemmend in die lichtkatalytische Oxydation der Chromogene durch fluoreszierende Stoffe einzugreifen. Dies gelang einwandfrei bei dem Vicia-Chromogen, weniger deutlich mit Chromogen der Aloe soccotrina, da dieses sehr empfindlich gegen Alkali ist und die Alkaleszenz verdünnter Na_2SO_3-Lösungen genügt, um einen

[1]) Dax. Deutsch. Arch. f. kl. Med. **87**, 1906. 365.

[2]) Gros. Zeitschr. f. physik. Chemie. **37**, 1901. 157.

sofortigen, mit der Zeit zunehmenden Umschlag in braun hervorzurufen, der wohl ebenfalls auf Oxydation beruht.

Die folgenden Angaben der Sulfitkonzentration beziehen sich auf den Gehalt an Na_2SO_3, der titrimetrisch in den stets frisch bereiteten Stammlösungen bestimmt wurde; das von Merck frisch bezogene $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$ enthielt durchschnittlich 43 % Na_2SO_3.

Es ergab sich, daß die Oxydation des Chromogens durch Eosin 1 : 10000 während 5stündiger Belichtung gehemmt wurde, wenn Na_2SO_3 in Mengen bis herab zu 0,10 % zugesetzt worden war; erst nach 5 Stunden setzte eine Umwandlung des Chromogens zum Farbstoff ein. Die analogen Dunkelkontrollen blieben über 18 Stunden farblos.

Dieselben Resultate wurden mit den übrigen untersuchten fluoreszierenden Stoffen erhalten.

Bevor nähere Angaben über die quantitativen Beziehungen gemacht werden, sollen Versuche mitgeteilt werden, aus denen hervorgeht, daß die beobachtete Sulfitwirkung nur durch die reduzierende Eigenschaft des Sulfits erklärt werden kann.

Als andere Erklärungsmöglichkeit kommt z. B. in Betracht, daß die Elektrolyteigenschaft des Sulfits eine Hemmung der lichtkatalytischen Fähigkeit der fluoreszierenden Farbstoffe gegenüber den Chromogenen bedingt. Es wurde daher eine Reihe anorganischer Salze der Alkali- und Erdalkaligruppe in dieser Hinsicht geprüft und zwar in Konzentrationen, die den angewandten Sulfitmengen äquimolekular waren, wie auch in höheren und niedrigeren Konzentrationen. Angewandt wurden: $NaNO_3$, $NaCl$, Na_2SO_4, K_2SO_4, $KClO_3$, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)NO_3$, $CaSO_4$, $MgSO_4$.

Keine dieser Substanzen vermochte die katalytische O-Übertragung des Eosins, Fluoreszeins usw. auf die Chromogene zu hemmen und zwar war die Oxydationsgeschwindigkeit in diesen Versuchen dieselbe wie bei den salzfreien Kontrollportionen.

Ebensowenig ist die Hemmung der Chromogenoxydation der Alkaleszenz der Sulfitlösung zuzuschreiben: Salze wie Na_2CO_3, $NaHCO_3$, Natriumazetat, Kalziumazetat bewirkten sogar eine leichte Beschleunigung der Oxydation, wie ja allgemein die Oxydation der Chromogene durch Alkali befördert wird.

Wohl aber war eine Hemmung der Chromogenoxydation mit Salzen zu erzielen, die wie das Natriumsulfit reduzierend wirken können, so z. B. mit K_2SO_3, $Na_2S_2O_4$ (Natriumhydrosulfit), Na_2AsO_3; ohne Wirkung waren dagegen: $NaNO_2$, $Ca(NO_2)_2$ ferner Glukose, Laevulose.

Soweit also das System Sulfit + fluoreszierender Farbstoff in Betracht kommt, ist eine andere, als auf der Reduzierbarkeit beruhende Wirkung des Sulfits ausgeschlossen. Es mußte jedoch noch nachgewiesen werden, daß im System Sulfit-Chromogen am Chromogen selbst keine Veränderungen vor sich gehen, die eine Farbstoffbildung aus anderem Grunde, als er in der Sauerstoffabfangung gegeben ist, unmöglich machen.

Zu diesem Zweck wurde der farblose Vicia-Extrakt mit 0,5 % Na_2SO_3 versetzt und durch die Lösung ein Luftstrom durchgeleitet, um das Sulfit allmählich zu oxydieren. Nach zirka 16 stündigem Durchströmen war eine deutliche Verdunkelung der Lösung zu konstatieren, die weiterhin in tiefes Schwarz überging.

Hieraus folgt, daß das Chromogen durch Na_2SO_3 nicht zerstört wird.

Es fragt sich nun, wie die Wirkung des Sulfits auf das System belichtetes Eosin + Chromogen im näheren aufzufassen ist. Entweder fängt das Sulfit den aktivierten Sauerstoff des Lichtkatalysators direkt ab oder aber wird das Chromogen zunächst oxydiert und durch das Sulfit sofort wieder reduziert. Tatsache ist, das schwarze Vicia-Extrakte sich durch Sulfit stark aufhellen lassen und daß bei der Belichtung des Systems Eosin-Sulfit-Chromogen häufig an der Oberfläche eine braune Zone entsteht, die beim Schütteln wieder verschwindet. Dies ließe darauf schließen, daß das Chromogen in die Reaktion mit einbezogen wird, wenn nicht die Möglichkeit vorläge, daß in den oberen Schichten das Sulfit sehr rasch wegoxydiert wird und das dort vorhandene Chromogen nun der Eosinwirkung schutzlos ausgesetzt ist.

Eine Entscheidung dieser Frage konnte durch Ermittlung der quantitativen Beziehungen zwischen den drei Komponenten getroffen werden:

40 g frische Viciablätter wurden mit 100 ccm Wasser zerrieben; ein Teil des Filtrats wurde direkt in Mengen von je 4 ccm in Reagenzgläser gefüllt (Reihe I), während ein anderer Teil zuvor auf das 10fache mit Wasser verdünnt wurde (Reihe II). Hierauf wurden die einzelnen Portionen unter Gleichhaltung des Volums mit Eosin 1 : 100 000 und Na_2SO_3 in verschiedenen Mengen versetzt; die Sulfitkonzentration bewegte sich in der absteigenden Reihe: 1,72 %, 0,86 %, 0,43 % usw. bezogen auf wasserfreies Na_2SO_3.

Nach 3½ stündiger Belichtung im diffusen Südlicht lag das Sulfitminimum, das eben noch Hemmung der Farbstoffbildung bewirkte, in beiden Reihen gleichmäßig bei 0,10 %, während nach 5 stündiger Belichtung, wieder gleichmäßig in beiden Reihen die mit 0,10 % Na_2SO_3 beschickten Lösungen leicht tintig gefärbt waren und das Sulfitminimum auf die anfänglich 0,21 % Na_2SO_3 enthaltenden Lösungen heraufgerückt war. Die mit geringeren Sulfitmengen versehenen Lösungen waren um so stärker geschwärzt, je weniger sie Sulfit enthielten; selbst in den 0,006 % Na_2SO_3 enthaltenden Lösungen war noch eine Hemmung der Oxydationsgeschwindigkeit gegenüber Sulfitfreien Kontrollösungen zu bemerken.

Hieraus folgt, daß das wirksame Sulfitminimum von der vorhandenen Chromogenmenge unabhängig ist und infolgedessen das Chromogen bei Sulfitgegenwart an der photochemischen Reaktion sich nicht beteiligt, d. h. das Sulfit fängt den aktivierten Sauerstoff des Lichtkatalysators direkt ab.

Andererseits ist aber auch das wirksame Sulfitminimum von den Eosinkonzentrationen bei konstanter Chromogenmenge in weitem Maß unabhängig, wie sich auch schon bei den S. 289ff beschriebenen titrimetrischen Bestimmungen mit Eosinkonzentrationen in 20facher Verschiedenheit ergab. Wurden gleiche Chromogenmengen mit verschiedenen Sulfitmengen und Eosin 1 : 2000, 1 : 100 000 oder 1 : 500 000 versetzt, so lag das hemmende Sulfitminimum nach 5stündiger Belichtung im schwachen diffusen Südlicht in allen 3 Eosinreihen bei 0,10 % Na_2SO_3. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Erhöhung der Oxydationsgeschwindigkeit, die durch eine größere Eosinmenge an

sich bedingt sein könnte, durch die geringere Durchleuchtung der stärker gefärbten Lösungen kompensiert wird.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Tatsache, daß Sulfit keineswegs immer reduzierend im eigentlichen Sinne wirkt, sondern als Sauerstoffaktivator auftreten kann; so kann Indol durch Sulfat in Gegenwart von Luftsauerstoff zur Indigo oxydiert werden (vgl. Engler und Weissberg[1]).

C. Modellversuche mit H_2O_2.

Wenn die Wirkung der belichteten fluoreszierenden Stoffe auf die Chromogene tatsächlich auf einer Sauerstoffaktivierung beruht und hierbei die Annahme einer Farbstoffperoxydbildung die nächstliegende ist, so muß sich mit dem System $H_2O_2 + Na_2SO_3$ eine ähnliche Wirkung erzielen lassen. Keinesfalls ist jedoch diese Reaktion identisch mit der Wirkung fluoreszierender Stoffe, da sich in Eosinlösungen auch nach mehrstündiger Belichtung in direkter Sonne mit der für H_2O_2 spezifischen Chromsäure-Äther-Reaktion kein H_2O_2 nachweisen läßt und schon früher betont wurde, daß eine belichtete Eosinlösung stärker oxydierend wirkt als H_2O_2.

Die Viciaextrakte lassen sich nun tatsächlich, ohne Zusatz eines O-Überträgers durch H_2O_2 zu Farbstoff oxydieren, wenn bestimmte Konzentrationen eingehalten werden. (Über die von Pfeffer [l. c.] bei Vicia mit H_2O_2 erzielte vitale Oxydation wird später zu sprechen sein.)

Die H_2O_2-Lösungen wurden aus Perhydrol (Merck) hergestellt und nach Neutralisation austitriert; die folgenden Angaben beziehen sich auf Gewichtsprozente.

H_2O_2-Konzentrationen von 0,06 % abwärts bewirkten in den Chromogenextrakten sehr rasch eine Bräunung, die sich im Lauf einiger Stunden über Dunkelbraun in Schwarz umwandelte. Hierbei war ein Konzentrationsoptimum vorhanden, das sich aus der Tatsache erklärt, daß höhere H_2O_2-Konzentrationen überhaupt keine Farbstoffbildung bewirken, sondern offenbar stärker in die Chromogenstruktur eingreifen. Wurden z. B. gleiche Chromogenmengen mit H_2O_2 in der Konzentrationsreihe 0,06 %,

[1]) Engler und Weissberg, Kritische Studien über die Vorgänge der Autoxydation. Braunschweig. 1904. S. 59.

0,03% usw. versetzt, so lag das Maximum der Bräunung nach 60 Minuten bei 0,007% H_2O_2, während es nach 2 Stunden bei 0,015% lag, d. h. in dem Maß, in dem überschüssiges H_2O_2 verschwand, rückte das Konzentrationsoptimum scheinbar aufwärts. Daß in den höheren H_2O_2-Konzentrationen eine Reaktion stattfindet, geht aus der Bildung von Gasblasen hervor, die genau bis zu dem Punkt vor sich geht, in dem Farbstoff auftritt; die Oxydation zum Farbstoff erfolgt ohne Gasbildung. Die Gasentwicklung ist also nicht generell einem etwaigen Katalasegehalt des Extrakts zuzuschreiben, sondern muß durch einen nicht zur Farbstoffbildung führenden Eingriff des H_2O_2 in das Chromogen bedingt sein. Damit stehen die Untersuchungen von Rona und Riesser[1] an Hippomelanin (gewonnen aus einem melanotischen Sarkom des Pferdes) in Einklang: mit 3proz. H_2O_2 konnten die Verf. diesen dem Vicia-Melanin nahestehenden Farbstoff entfärben und als Spaltprodukte u. a. Guanidin und Oxalsäure nachweisen.

Auf dieser Grundlage wurden nun Versuche mit $H_2O_2 + Na_2SO_3$ vorgenommen, um einen Vergleichsmaßstab für die Wirkung belichteter Farbstoffe in Sulfitgegenwert zu gewinnen.

Auch hier zeigte es sich, daß Sulfit die Chromogenoxydation durch H_2O_2 hemmt und daß die quantitativen Beziehungen zwischen H_2O_2 und Na_2SO_3 unabhängig von der Chromogenmenge sind. Die Reihenversuche ergaben u. a., daß die Chromogenoxydation durch 0,4% Na_2SO_3 im Minimum während 3 Stunden gehemmt wird, wenn der H_2O_2-Gehalt bei 0,015% lag, gleichviel wie hoch der Chromogengehalt war. Daß die Sulfitmenge, die eben hemmend wirkt, größer ist als bei den Eosinversuchen trotz der stärkeren Oxydationskraft der Farbstoffperoxyde, liegt wohl daran, daß die Farbstoffperoxydbildung erst während der Belichtung auftritt, während das H_2O_2 gleich in größerer Menge vorhanden ist. Infolgedessen war hier natürlich, im Gegensatz zu den Eosinversuchen, auch eine Abhängigkeit des hemmend wirkenden Sulfitminimums von der H_2O_2-Konzentration zu konstatieren.

Ein weiterer Beweis für die Ähnlichkeit der Wirkung be-

[1]) Rona und Riesser. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **57**, 1908. 143. **61**, 1909. 12. **109**, 1920. 16.

lichteter fluoreszierender Farbstoffe und der H_2O_2-Wirkung ist darin gegeben, daß sich ihr Einfluß auf das Chromogen in einer und derselben Lösung addiert. Dies besagt, daß in dem System H_2O_2 + belichtetes Eosin usw. nicht 2 Oxydationsmittel gegeben sind, die sich nach dem Schema $H_2O_2 + KMnO_4$ gegenseitig reduzieren, sondern daß beide gleichen chemischen Charakter besitzen.

In diesem Zusammenhang mag darauf hingewiesen sein, daß das Verhalten der fluoreszierenden Farbstoffe stark an das des Terpentinöls erinnert. Dieses ist ebenfalls ein starker O-Aktivator, dessen oxydierende Wirkung im Licht verstärkt wird. Engler und Weissberg (l. c. S. 72 f.) nahmen hierbei die Bildung eines Peroxyds an, das mit H_2O_2 nicht identisch ist. Für den vorliegenden Fall wesentlich ist nun die Tatsache, daß sich nach Zusatz ganz geringer H_2O_2-Mengen zu aktiviertem Terpentinöl das H_2O_2 mit der Chromsäure-Äther-Reaktion nachweisen läßt und also keine Reaktion mit dem aktivierten Terpentinöl eingeht.

Eine weitere Analogie zwischen belichteten fluoreszierenden Stoffen und H_2O_2 ist darin gegeben, daß das erste Stadium der Oxydation des Viciaextraktes bei beiden Agentien in einer Bräunung besteht; wurde dagegen ein Extrakt ohne jeden Zusatz Licht und Luft ausgesetzt, so konnte niemals eine Bräunung als erstes Oxydationsstadium festgestellt werden: Die erste Veränderung bestand immer in einer grautintigen Verfärbung, die allmählich in Schwarz überging. Es sind also offenbar, gemäß der schon früher gemachten Angabe, zwei Chromogene vorhanden, von denen das eine nur durch aktivierten, peroxydischen Sauerstoff, und damit auch von belichteten fluoreszierenden Farbstoffen, oxydiert wird.

D. Beschleunigung der photochemischen Wirkung fluoreszierender Stoffe durch Sauerstoffüberträger.

Bekanntlich kann eine Reihe von Substanzen, die in verschiedenen Oxydationsstufen auftreten, in Gegenwart von Peroxyden als Sauerstoffüberträger wirksam werden; hierher gehören z. B. Fe-, Mn- und andere Salze der Schwermetalle.

Wenn nun die photochemische Wirkung der fluoreszierenden Stoffe sich auf die Tätigkeit eines Peroxyds zurückführen läßt, so muß diese durch O-Überträger im System fluoreszierender Stoff + Chromogen beschleunigt werden können, vorausgesetzt, daß dies im System H_2O_2 + Chromogen der Fall ist. Für die Aloine ist schon lange bekannt, daß ihre Oxydation zu rotem Farbstoff durch H_2O_2 nur bei Gegenwart eines O-Überträgers ($CuSO_4$) glatt vor sich geht, eine Reaktion, auf der ja ein empfindlicher Nachweis sowohl von Aloinen als auch von H_2O_2, besser wohl von Peroxyden überhaupt, beruht.

Für eine Übertragung dieser Voraussetzung auf die Reaktion im System: belichteter fluoreszierender Farbstoff + Chromogen ist natürlich Bedingung, daß keine dieser beiden Komponenten mit dem Sauerstoffüberträger in einer nicht auf Oxydation oder Reduktion beruhenden Weise reagiert. Unter diesem Gesichtspunkt wurden Versuche mit $FeSO_4$, $MnSO_4$, $CuSO_4$, Cu-Alkalitartrat und Uranylazetat unternommen und zwar mit und ohne Neutralisation der z. T. sauer oder alkalisch reagierenden Salze.

Die besten Resultate wurden mit $MnSO_4$ erhalten: Je 4 ccm eines Viciaextraktes wurden mit Eosin 1 : 10000 versetzt und zu einem Teil der Portionen 0,25 % $MnSO_4$ hinzugefügt. Bei Bestrahlung im direkten Sonnenlicht war gleich beim Beginn ein deutlicher Unterschied zwischen den Mn-freien und den Mn-haltigen Portionen zu erkennen; nach 60-sekundenlanger Bestrahlung waren die Mn-haltigen Lösungen ziemlich stark braun gefärbt, während die Mn-freien sich lichtbraun verfärbt hatten; nach einer $^1/_2$ Stunde waren die Mn-haltigen Lösungen dunkelbraun, die Mn-freien hellbraun. Auch die späterhin eintretende Schwärzung und das Ausfallen des Farbstoffes in schwarzen Flecken vollzog sich in den Mn-haltigen Lösungen wesentlich rascher als in den Mn-freien.

Diese Oxydationsbeschleunigung durch Mn kommt nicht durch einfache Summation der Wirkung belichteten Eosins und einer Mn-Wirkung zustande, da eosinfreie, nur 0,25 % $MnSO_4$ enthaltende Chromogenlösungen, derselben Lichtstärke 2 Stunden lang ausgesetzt, nur leicht tintig und vor allem nicht braun verfärbt waren. (Über das Verhalten des $MnSO_4$ als Lichtkatalysator siehe später.) Kontrollportionen mit Eosin + $MnSO_4$

im Dunkeln blieben während 2 Stunden vollkommen farblos und zeigten, wenn sie hierauf in direktes Sonnenlicht verbracht wurden, sofort dieselben Erscheinungen, wie sie im Hauptversuch aufgetreten waren.

Mit Cu-Salzen, $FeSO_4$, Uranylazetat wurde keine oder nur eine geringe Beschleunigung der photochemischen Eosinwirkung erhalten.

Ebenso verliefen die Versuche mit dem Chromogen von Aloe Soccotrina: 4 ccm einer Lösung, versetzt mit 0,12 % $MnSO_4$ und Eosin 1 : 20000 wurden unmittelbar nach der Besonnung rot und zwar um das Vielfache stärker als eine Mn-freie Eosin-Chromogenkontrollportion; nach 5 Minuten war die Mn-haltige Lösung dunkelrot, die Kontrolle hellrot. Wurde derselbe Versuch im Dunkeln angestellt, so war nach 3 Stunden noch keine Spur einer Rötung wahrzunehmen. Auch hier liegt keine Addition der Eosinwirkung und einer Mn-Wirkung vor, da eosinfreie Chromogenlösungen, mit $MnSO_4$ versetzt, sich erst nach 2 Stunden im Sonnenlicht blaßrot färbten.

Cu-Salze bewirkten auch hier nur eine geringe Beschleunigung, die immerhin etwas stärker war als bei dem Vicia-Chromogen. In Anbetracht der großen Wirksamkeit des Cu im System Aloe-Chromogen + H_2O_2 muß dies auf irgendeiner Alteration des fluoreszierenden Farbstoffes beruhen. Umgekehrt ist $MnSO_4$ im System Aloe-Chromogen + H_2O_2 nicht als O-Überträger geeignet: eine mit 0,12 % H_2O_2 + 0,25 % $MnSO_4$ versetzte Lösung rötete sich innerhalb einer Stunde nur wenig, obwohl sich in demselben Blattextrakt mit $CuSO_4$ + H_2O_2 die Rotfärbung sehr rasch erzielen ließ.

Wenn sich also auch in der Eignung der verschiedenen O-Überträger Unterschiede zwischen den Systemen: belichtetes Eosin-Chromogen und H_2O_2-Chromogen, ergeben, so bleibt davon doch die Tatsache unberührt, daß die katalytische Lichtwirkung der fluoreszierenden Farbstoffe sich durch einen Sauerstoffüberträger deutlich beschleunigen läßt und auch hierin ein Beweis für eine Peroxydwirkung in den belichteten Eosinlösungen gegeben ist. Diesen O-Überträgern kommt eben nach Art der eigentlichen Fermente eine Spezifizität zu.

Diese Analogie mit den Fermenten läßt sich unter Einbeziehung des fluoreszierenden Stoffes noch ein Stück weiter führen: Bekanntlich halten Bach und Chodat[1] die Oxydasen für Gemische von Peroxydasen mit einem Stoff, der an der Luft Peroxyde bildet und von ihnen Oxygenase genannt wird; die Peroxydase beschleunigt nun die O-Übertragung von dem Peroxyd auf den zu oxydierenden Körper. Diese Theorie ist nach Oppenheimer[2] für die Gruppe der Phenolasen so gut wie sichergestellt, für einige andere Oxydationsfermente wahrscheinlich. Wie folgendes Schema zeigt, läßt sich das System: belichtetes Eosin-$MnSO_4$ sehr gut der Theorie von Bach und Chodat einordnen, mit der Besonderheit, daß die Peroxydbildung aus der Oxygenase mit Hilfe der Strahlungsenergie des Lichtes erfolgt:

I. Eosin $\xrightarrow{\text{Licht}}$ Eosinperoxyd — $MnSO_4$ —
Oxygenase — Peroxyd — Peroxydase —
II. Eosin + $MnSO_4$ = Oxydase.

Hiermit soll selbstverständlich nichts über die Fermentnatur im allgemeinen präjudiziert werden, wenn ja auch gerade das Vorkommen von Mn im Organismus schon häufig Anlaß zu Untersuchungen über die Fermentnatur gegeben hat (z. B. Bertrand[3]).

Eine Peroxydasenmitwirkung scheint übrigens in den Viciaextrakten von vornherein gegeben zu sein. Wurde nämlich der Extrakt vor der Eosinzugabe und der Belichtung einige Minuten bei 100° gehalten, so war die photochemische Oxydation merklich verzögert, ging aber in fast normaler Geschwindigkeit vor sich, wenn einige Tropfen unerhitzten Saftes zugegeben wurden. In den Versuchen mit $MnSO_4$ superponiert sich also offenbar das kräftiger wirkende Mn-Salz dem genuinen Oxydationsferment.

[1]) Bach und Chodat. Ber. chem. Ges. **34, 35, 36,** 1902—1904.
[2]) Oppenheimer, Fermente. Leipzig. 1913. II, S. 770.
[3]) Bertrand. Compt. Rend. Acad. sc. Paris. **124,** 1897. 1032, 1355.

II. Kapitel.

Die Beeinflußbarkeit der photodynamischen Wirkung auf das lebende Protoplasma durch reduzierende Mittel und Sauerstoffüberträger.

Die im I. Kapitel dargestellten Untersuchungen dienten als Grundlage für die am lebenden Protoplasma auszuführenden Versuche. Die Schädlichkeit belichteter fluoreszierender Farbstoffe auf die Zelle kann natürlich nicht unmittelbar auf die Störung eines bestimmten Stoffwechselprozesses zurückgeführt werden. Was sich bei der photodynamischen Wirkung auf lebendes Protoplasma feststellen läßt, ist entweder die vollkommene Abtötung oder ein Eingriff in Teilprozesse, die selbst sehr komplexer Natur sind, wie z. B. Beschleunigung und Sistierung der Plasmaströmung (Gicklhorn, l. c.), Auftreten phobophototaktischer Reizbarkeit (Metzner, l. c.), Erhöhung des Muskeltonus (Adler, l. c.) usw. Bei der früher schon betonten Wichtigkeit der Atmungschromogene scheint es daher gerechtfertigt, die im vorigen Kapitel erhobenen Befunde mit der photodynamischen Wirkung auf die lebende Zelle in Beziehung zu setzen, um einen gewissen Anhaltspunkt für den Chemismus dieses Prozesses zu gewinnen Natürlich stellen die Atmungschromogene nicht einen integrierenden Bestandteil des Protoplasmas dar, jedoch haben sie Anteil an den in allen Zellen vor sich gehenden Oxydations- und Reduktionsprozessen, die mit dem Betriebsstoffwechsel verknüpft sind, so daß aus dem Spezialfall der Beziehung zwischen fluoreszierenden Farbstoffen und Atmungschromogenen wohl der Schluß gezogen werden darf, daß auch andere, nicht den Chromogen angehörige Oxydationszwischenprodukte des Betriebstoffwechsels durch photodynamisch wirkende Substanzen an ihrer lebenserhaltenden Funktion gehindert werden. Hier wäre z. B. an die Cannizarosche Umlagerung oder andere gekoppelte Oxydations-Reduktionsvorgänge zu denken, wie sie sich nach den Untersuchungen Neubergs[1] bei der alkoholischen Gärung abspielen.

Die nunmehr zu behandelnde Aufgabe geht also auf die Frage hinaus: kann mit den Mitteln, die auf Grund ihrer Sauerstoffavidität die Wirkung belichteter fluoreszierender Substanzen auf Atmungschromogene hemmen, auch eine Sistierung der

[1]) Vgl. z. B. Neuberg. Zeitschr. f. Bot. **11**, 1919. 180.

photodynamischen Wirksamkeit auf lebende Zellen allgemein erreicht werden und läßt sich durch O-Überträger der entgegengesetzte Erfolg erzielen?

Beides ließ sich durch Anwendung von Na_2SO_3 auf der einen und von $MnSO_4$ auf der anderen Seite verwirklichen, so daß also im Verhalten der lebenden Zelle gegen photodynamisch wirksame Stoffe eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Verhalten von Zellprodukten, den Atmungschromogenen, besteht.

A. Versuche mit Paramäzien.

1. Die Hemmung der photodynamischen Wirkung durch Na_2SO_3.

Sacharoff und Sachs (l. c.) haben festgestellt, daß die in belichteten Erythrosinlösungen eintretende Hämolyse von Kaninchenerythrozyten durch Na_2SO_3 gehemmt wird. Auf andere Zellen wurden derartige Versuche bis jetzt nicht ausgedehnt, auch fehlt bei den Verff. der Nachweis, daß diese Hemmung tatsächlich auf die reduzierende Wirkung des Sulfits zurückgeführt werden muß.

Zunächst wurden nun die für photodynamische Untersuchungen geeignetsten Organismen, die Paramäzien, untersucht. Die in Heuinfus gezüchteten, verschiedenen Stämme von Paramaecium caudatum erwiesen sich als photodynamisch sehr empfindlich, so daß eine Eosinlösung 1 : 10000 im Sonnenlicht eine Abtötung in wenigen Minuten bewirkte, während die Tiere in dieser Lösung bei Verdunkelung 24 Stunden und länger unter Beibehaltung der normalen Beweglichkeit am Leben blieben.

Bemerkenswerter Weise können die Paramäzien, wie offenbar das lebende Protoplasma überhaupt, ziemlich beträchtliche Mengen von Na_2SO_3 ertragen, was um so auffälliger ist, als Na_2SO_3-Lösungen gegen Lakmus deutlich alkalisch reagieren. Angaben hierüber sind wenig vorhanden (vgl. Czapek, Biochemie. 1913. **1**, 192). Neuberg und Reinfurth[1] konnten eine gute Hefegärung in Gegenwart von zirka 7 % Na_2SO_3 (wasserfreies Salz) aufrecht erhalten, wobei allerdings das Sulfit erst im Verlauf der Gärung zugesetzt wurde und eine teilweise Bindung an Gärungsaldehyd erfuhr.

[1]) Neuberg und Reinfurth. Biochem. Zeitschr. **89**, 1918. 365.

Die folgenden Angaben über die angewandte, titrimetrisch bestimmte Sulfitkonzentration beziehen sich auf die wasserfreie Verbindung.

In einer 4 ccm betragenden Lösung mit 0,21 % Na_2SO_3 blieben die Paramäzien im Licht wie im Dunkeln über 2 Tage am Leben, wobei natürlich die allmähliche Oxydation des Sulfits zu Sulfat zu berücksichtigen ist; eine 0,4 proz. Sulfitlösung wirkte nach 10 stündiger Einwirkung schädigend.

Bemerkenswert und für die Gegenwart von Sulfit direkt beweisend ist die Ansammlung der Tiere in einer scharf begrenzten Zone unter der Oberfläche, ohne daß ihre Beweglichkeit verringert ist. Es kann dies nur auf Mangel an Sauerstoff in den tieferen Schichten zurückzuführen sein — verursacht durch die sauerstoffabfangende Wirkung des Sulfits — und nicht auf der den Paramäzien eigenen negativen Geotaxis beruhen, da in sulfitfreien Flüssigkeiten von derselben Höhe nie eine Zonenbildung, sondern meist diffuse Verteilung, seltener ein Niedersinken auf den Boden beobachtet wurde.

Es zeigte sich nun, daß ein Sulfitgehalt von 0,21 % und weniger genügte, um die photodynamische Wirkung der fluoreszierenden Farbstoffe zu hemmen, selbst wenn die Farbstoffe in hohen, an sich noch nicht toxisch wirkenden Konzentrationen geboten wurden. Die Toxizität der fluoreszierenden Farbstoffe für Paramäzien, gemessen an Versuchen im Dunkeln, ist ziemlichen Schwankungen unterworfen; Alter und Disposition der einzelnen Stämme scheinen hierbei eine Rolle zu spielen.

Die im folgenden zu beschreibenden Versuche wurden in Reagenzgläsern angestellt, so daß das Volum der Flüssigkeit stets 4 ccm betrug und in den Versuchen einer Reihe stets gleiche Paramäzienmengen zur Verwendung kamen.

Folgender Versuch wurde bei leicht nebeliger Atmosphäre im Südlicht eines Dezembertages vormittags 11^h angesetzt; die Temperatur der Lösungen stieg nicht über 12^0. Der Vermerk »½ usw. normal« bedeutet, daß schätzungsweise die Hälfte usw. der Tiere noch gut beweglich waren. Der Eintritt des Todes fiel meist mit dem Verlust der Beweglichkeit zusammen und ließ sich mit starker Lupe an Kontraktion des Körpers, Verminderung seiner Durchsichtigkeit, wie auch an Auflösungs-

erscheinungen feststellen; um jedoch nicht einen Starrezustand mit Abtötung zu verwechseln, wurden die Versuchskulturen nach Eintritt der beschriebenen Veränderungen längere Zeit im Dunkeln gehalten und weiter beobachtet, ohne daß dadurch jedoch eine Korrektur des ersten Resultats nötig geworden wäre.

Tabelle I. E = Eosin.

	Nach 10′	Nach 25′	Nach $2^1/_4$ Std.	Nach $2^3/_4$ Std.	Nach $3^3/_4$ Std.	Nach $4^1/_2$ Std.
E 1:3200	meist tot	tot	—	—	—	—
E 1:3200 + 0,4 % Na_2SO_3	normal	normal	$^1/_3$ normal	viele tot	tot	—
E 1:6400	tot	—	—	—	—	—
E 1:6400 + 0,4 % Na_2SO_3	normal	normal	$^1/_3$ normal	viele tot	tot	—
E 1:20000	tot	—	—	—	—	—
E 1:20000 + 0,4 % Na_2SO_3	normal	normal	$^1/_2$ normal	$^1/_2$ normal	$^1/_4$ normal	fast alle tot
E 1:200000	tot	—	—	—	—	—
E 1:200000 + 0,4 % Na_2SO_3	normal	normal	$^3/_4$ normal	$^3/_4$ normal	$^1/_3$ normal	$^1/_4$ normal
0,4 % Na_2SO_3 ohne E	normal	normal	normal	fast normal	fast normal	$^3/_4$ normal

Die analogen Versuche, im Dunkeln ausgeführt, ergaben die vollständige Unversehrtheit der sämtlichen Versuchskulturen nach 8 Stunden.

Um die Wirksamkeit anderer Sulfitkonzentrationen zu zeigen, wurden folgende Versuche im schwachen, direkten Sonnenlicht an einem kalten Dezembertag vorgenommen: die Temperatur der Versuchsflüssigkeit stieg bis 15°.

Tabelle II.

	Nach 8′	Nach 20′	Nach 30′	Nach 2 Stunden	Nach 4 Stunden
E 1 : 5000	meist tot	tot	—	—	—
E 1 : 5000 + 0,2 % Na_2SO_3	normal	normal	normal	tot	—
E 1 : 5000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	fast normal	meist tot	tot
E 1 : 5000 + 0,05 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,,
E 1 : 50000	meist tot	tot	—	—	—
E 1 : 50000 + 0,2 % Na_2SO_3	normal	normal	normal	fast normal	$^1/_3$ normal
E 1 : 50000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	$^1/_2$ normal
E 1 : 50000 + 0,05 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	normal	fast normal
E 1 : 100000	meist tot	tot	—	—	—
E 1 : 100000 + 0,2 % Na_2SO_3	normal	normal	normal	normal	fast normal
E 1 : 100000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,,
E 1 : 100000 + 0,05 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,,

Folgender Versuch wurde in starker Februarsonne ausgeführt unter Vorschaltung eines Wärmefilters:

Tabelle III.

	Nach 3′	Nach 10′	Nach 60′	Nach 70′
E 1 : 10000	tot	—	—	—
E 1 : 10000 + 0,2 % Na_2SO_3	normal	normal	meist tot	tot
E 1 : 10000 + 0,02 % Na_2SO_3	fast normal	tot	—	—

Wesentlich größer war die Hemmung der Eosinwirkung durch Na_2SO_3, wenn die Kulturen in diffusem Nordlicht gehalten wurden. Der folgende Versuch wurde in trüben Dezembertagen ausgeführt; die Kulturen blieben nachts ohne künstliche Belichtung in der alten Stellung:.

Tabelle IV.

12. 12. 19.			13. 12. 19.			14.12.19.
10^{06} h a. m.	11^{46} h a. m.	4^{h} p. m.	9^{h} a. m.	12^{h} mittags	2^{h} p. m.	9^{h} a m.
E 1:10000	tot	—	—	—	—	—
E 1:10000 + 0,1 % Na_2SO_3	normal	normal	normal	normal	fast normal	meist tot
E 1:10000 + 0,05 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,, ,,	tot
E 1:10000 + 0,02 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	$^3/_4$ normal	,,
E 1:10000 + 0,01 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	tot	—	—

Sämtliche der in Tabelle II—IV angeführten Untersuchungen waren von Parallelversuchen im Dunkeln begleitet; in all diesen Kontrollversuchen blieben die Tiere gleichmäßig normal und zwar über die Zeit hinaus, in der im Lichte eine Schädigung erfolgte.

Hieraus geht hervor, daß die photodynamische Wirkung des Eosins auf Paramaecien durch Na_2SO_3 weitgehend gehemmt wird, wobei die Belichtungsstärke eine große Rolle spielt. Auf Grund der im I. Kapitel mitgeteilten Untersuchungen ist dieser Befund darauf zurückzuführen, daß das Sulfit den durch das lichtkatalytisch wirkende Eosin aktivierten Luftsauerstoff an sich reißt und die photodynamische Eosinwirkung nur in dem Maß in Erscheinung tritt, in dem das Sulfit wegoxydiert wird.

Bemerkenswert ist, daß die Abnahme des Sulfits während der Belichtung aus dem Verhalten der noch normalen

Paramäzien erschlossen werden kann. Wie früher erwähnt, sammelten sich die Tiere in Sulfitlösungen unter der Oberfläche an; bei Eosingegenwart verteilten sie sich nun im Lauf der Belichtung allmählich diffus in der Flüssigkeit und zwar um so rascher, je weniger Sulfit anfänglich vorhanden war, bzw. je stärker die Belichtung war. Aus den Sulfit-Eosin-Chromogenversuchen ergab sich, daß unter der Oberfläche das Sulfit so gut wie vollständig im Licht verschwindet (vgl. S. 295); daher läßt sich aus der oberflächlichen Zonenbildung der Paramäzien der Schluß ziehen, daß die Tiere sowohl den molekularen, im Wasser gelösten Luftsauerstoff, wie auch den Peroxydsauerstoff nicht als Sauerstoffquelle verwenden können, so lange Sulfit in größeren Mengen vorhanden ist. Es ist freilich fraglich, ob aktivierter Sauerstoff, so weit er von außen geboten wird, als Betriebstoff überhaupt in Betracht kommt; immerhin könnte die Erhöhung der Reizempfindlichkeit, die z. B. Gicklhorn (l. c.) bei der Plasmaströmung an Vallisneria beobachtete, in diesem Sinne gedeutet werden; auch die Paramäzienbewegung ist unmittelbar nach der Belichtung bei Eosingegenwart gegenüber der Norm beschleunigt.

Wie beim System Eosin-Sulfit-Chromogen war auch hier die Frage zu erledigen, ob das Sulfit nur seiner Reduzierbarkeit wegen die photodynamische Wirkung aufhebt; es mußte also Elektrolytwirkung und Alkaleszenz als etwa wirksamer Faktor ausgeschaltet werden.

Zu diesem Zweck wurden Paramäzien mit Eosin und verschiedenen Salzen sowohl in Konzentrationen, die mit den angewandten Sulfitkonzentrationen isosmotisch waren, als auch in niedrigeren und höheren versetzt. In Anwendung kam NaCl, Na_2SO_4, KCl, KNO_3, $MgCl_2$, $MgSO_4$ bei Sonnenlicht, diffusem Tageslicht und Verdunklung unter gleichzeitiger Ansetzung von Kontrollen mit Eosin + Na_2SO_3 und Eosin allein.

Es zeigte sich, daß keiner dieser Elektrolyte fähig war, die photodynamische Wirkung zu hemmen, während die Kontrollen im Dunkeln viele Stunden unbeschädigt blieben. Hie und da trat bei schwacher Belichtung eine Verzögerung der photodynamischen Wirkung ein, die sich aber nur auf einige Minuten erstreckte.

Nebenbei mag erwähnt werden, daß Mg-Salze einen bestimmten Reiz auf Paramäzien ausüben; die Paramäzien bewegen sich normalerweise in tastender Weise, während auf Mg-Zusatz die Bewegung unter Zunahme der Geschwindigkeit in langer, geradegestreckter Bahn verläuft. Die Reaktion war auch in belichteten Eosinlösungen zu bemerken, bevor die photodynamische Schädigung einsetzte. (Über die eigenartigen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Mg-Salze (vgl. Höber, Physik. Chemie der Zelle, 1914; S. 547). Von höheren Konzentrationen von $MgCl_2$ und $MgSO_4$ (1 %) ist bekannt, daß sie auf Tiere eine narkotisierende Wirkung ausüben (vgl. Lee und P. Mayer, Grundzüge der mikroskop. Technik, 3. Aufl., Berlin, 1907, S. 19, ferner Meyer-Gottlieb, Exper. Pharmakologie, 1914, S, 106).

Auch die Alkaleszenz der Na_2SO_3-Lösung kommt nicht für die Hemmung der photodynamischen Wirkung in Betracht: 0,07 % und 0,15 % $NaHCO_3$ vermochten die Licht-Eosinwirkung auf Paramäzien nicht zu hemmen, während diese Konzentration im Dunkeln bei Eosingegenwart über 24 Stunden lang keine Schädigung zur Folge hatte.

Dagegen konnte mit Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$) eine Hemmung der photodynamischen Wirkung erzielt werden, die jedoch infolge der schwächeren O-Avidität dieser Substanz geringer als mit Na_2SO_3 ausfiel; Paramäzien in Eosin 1 : 10000 + 0,25 % $Na_2S_2O_3$ waren in starkem diffusen Licht erst nach 2 Stunden abgetötet, während die salzfreie Eosinkontrollportion nach 15′ abgetötet war. Allerdings ist das Thiosulfat nicht ohne Wirkung auf das Eosin, da im Lauf von 2 Stunden eine beträchtliche Nachdunklung des Eosins eintritt.

Die schon bei den titrimetrischen Versuchen (S. 289 ff.) nachgewiesene Tatsache, daß die Sulfitwirkung nicht auf einer Zerstörung des Eosins beruht, kann auch an Paramäzien bewiesen werden. Wurde eine Eosinlösung mit 0,25 % Na_2SO_3 versetzt und so lange besonnt, bis die SO_2-Reaktion verschwunden ist, so bewirkte sie auf Zusatz von Paramäzien bei Besonnung immer noch deren Abtötung in 2—3 Minuten, während im Dunkeln keine Wirkung eintrat. Auch hier war darauf zu achten, daß die Belichtung nicht über die Zeit hinaus, die zur

vollständigen Oxydation des Sulfits nötig ist, ausgedehnt wurde, da sonst die jetzt nicht mehr gehemmte Photoautoxydation des Eosins eine Zerstörung der Substanz und ein Aufhören der photodynamischen Wirkung zur Folge hat. Offenbar können übrigens die beiden Prozesse der Sulfitoxydation und der Autoxydation zeitlich ineinander greifen; es wurde beobachtet, daß Paramäzien in Eosin 1 : 10000 + 0,2% Na_2SO_3 noch nach 2tägiger Bestrahlung im direkten Sonnenlicht am Leben waren und daß die Lösung ausgebleicht war. Es scheint daher die letzte Spur Na_2SO_3 wohl die Paramäzien, jedoch nicht mehr den Farbstoff vor der Wirkung des aktivierten Sauerstoffs zu schützen. Im Hinblick auf die Versuche in Tabelle IV (S. 307) ist zu bemerken, daß in diesem Fall, bei der Einwirkung trüben Tageslichts der Farbstoff noch am 3. Tage in fast unverminderter Stärke mit deutlicher Fluoreszenz vorhanden war.

Dieselben Resultate wurden auch mit Fluoreszein usw. erhalten; nur mit Na_2SO_3 oder $Na_2S_2O_3$, nicht mit anderen Elektrolyten konnte Hemmung der photodynamischen Wirkung erzielt werden:

Paramäzien in Fluoreszein 1 : 2000 waren nach 3 stündigem Aufenthalt im schwachen Sonnenlicht abgestorben, während sie in derselben Farbstoffkonzentration + 0,2% Na_2SO_3 nach 8 Stunden bei derselben Beleuchtung noch vollständig normal waren. Fluoreszein-Sulfitlösungen, deren Sulfit im Lichte wegoxydiert worden war, hatte dieselbe photodynamische Wirksamkeit wie frische Fluoreszeinlösungen derselben Konzentration.

Eine Besprechung mögen noch die Versuche mit Methylenblau erfahren. Die Anwendung dieses Farbstoffes hatte wegen seiner durch Sulfit bedingten Alteration (vgl. S. 290) gewisse Schwierigkeiten, die dadurch umgangen wurden, daß während der Belichtung die sulfithaltigen Methylenblaulösungen durch vorsichtiges Zusetzen frischen Farbstoffes dauernd auf dem Farbton der Kontrollen gehalten wurden.

Der folgende Versuch wurde Ende Januar im direkten Sonnenlicht an einem kalten Tage vorgenommen, die Temperatur der Lösungen stieg bis 18°:

	Nach 25′	Nach 50′	Nach 60′	Nach 75′	Nach 3 Std.
M 1 : 80000	viele tot	meist tot	tot	—	—
M 1 : 80000 + 0,1 % Na_2SO_3	normal	1/2 normal	viele tot	tot	—
M 1 : 80000 + 0,05 % Na_2SO_3	fast normal	1/3 normal	,, ,,	,,	—
M 1 : 80000 + 0,12 % Na_2SO_4	viele tot	meist tot	tot	—	—
M 1 : 80000 + 0,06 % Na_2SO_4	,,	,, ,,	,,	—	—
M 1 : 160000	normal	viele tot	meist tot	tot	—
M 1 : 160000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	normal	fast normal	,,	—
M 1 : 160000 + 0,05 % Na_2SO_3	,,	,,	,, ,,	1/2 normal	tot
M 1 : 160000 + 0,12 % Na_2SO_4	,,	viele tot	fast tot	tot	—

M = Methylenblau.

Eine gleiche Serie im Dunkeln gehalten war nach 24 Stunden vollkommen normal geblieben; allerdings waren die sulfithaltigen Methylenblaulösungen ausgebleicht.

Außer Na_2SO_4 wurde auch NaCl, KNO_3 usw. geprüft; auch hiermit konnte keine Hemmung der photodynamischen Wirkung erzielt werden.

Hieraus folgt, daß auch bei dem für vitale Färbungen viel angewandten Methylenblau die Giftigkeit verdünnter Lösungen, die sich nur im Licht bemerkbar macht, durch Na_2SO_3 auf Grund der Reduzierbarkeit dieses Salzes aufgehoben werden kann. Allerdings ist diese Hemmung in ihrer zeitlichen Ausdehnung nicht so weitgehend wie bei den Fluoreszeinfarbstoffen und es ist wohl möglich, daß die allgemeine Giftigkeit des Methylenblaus auch noch in verdünnten Lösungen neben der photodynamischen Wirksamkeit zum Ausdruck kommt, wenn sie mit Belichtung kombiniert wird.

2. Modellversuch mit H_2O_2.

Um hier, wie bei den Chromogenen, die direkte Wirkung des lichtkatalytisch aktivierten Sauerstoffes auf die Paramäzien im Gegensatz zu der Ansicht Tappeiners anschaulich zu machen, wurden Modellversuche mit H_2O_2 + Sulfit angestellt.

In Anwendung kam eine frisch austitrierte neutralisierte Lösung, die aus Perhydrol (Merck) hergestellt wurde. Eine schädigende Wirkung der dem Perhydrol beigegebenen, konservierenden Zusätze war nicht anzunehmen; begreiflicherweise werden diese Zusätze von der Fabrik geheim gehalten; jedoch war die Firma so liebenswürdig, mitzuteilen, daß die Menge der konservierenden Substanz im Perhydrol (30 % H_2O_2) 0,1 %

beträgt und in der hier in Betracht kommenden geringen H_2O_2-Konzentration unmöglich eine physiologische Wirkung ausüben kann. Als konservierende Zusätze werden in der Literatur angegeben: Phenazetin, Antifebrin, Harnstoff, Schwefelsäure, NaCl u. a.

Mit der Ansicht, daß die starke Schädlichkeit belichteter fluoreszierender Substanzen für Paramäzien auf deren großer Empfindlichkeit gegen peroxydischen Sauerstoff beruht, steht die Tatsache im Einklang, daß auf diese Tiere H_2O_2 sehr giftig wirkt. Dies hat schon Paneth[1] 1889 mitgeteilt: er fand, daß ein u. a. Paramäzein enthaltendes Infusoriengemisch in H_2O_2 1 : 10 000 nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde abstirbt.

Und ebenso wie Na_2SO_3 die Giftigkeit belichteter fluoreszierender Farbstoffe für Paramäzien aufhebt, hemmt dieses Salz auch die H_2O_2-Wirkung.

Folgende Tabelle gibt einen derartigen Versuch (im diffusen Tageslicht) wieder mit je 4 ccm Flüssigkeit; selbstverständlich wurden die Paramäzien erst nach Fertigstellung der Lösungen zugegeben.

	Nach 5′	Nach 10′	Nach 15′	Nach 20′	Nach 25′	Nach $1^1/_2$ Std.	Nach 7 Std.	Nach 22 Std.
H_2O_2 1:4000	$^1/_2$ normal	tot	—	—	—	—	—	—
H_2O_2 1:4000 + 0,1 % Na_2SO_3	normal	$^1/_2$ normal	$^1/_4$ normal	meist tot	tot	—	—	—
H_2O_2 1:8000	,,	normal	$^1/_2$ normal	tot	—	—	—	—
H_2O_2 1:8000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	normal	fast normal	fast normal	meist tot	tot	—
H_2O_2 1:16000	,,	,,	,,	normal	normal	tot	—	—
H_2O_2 1:16000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,,	$^1/_2$ normal	meist tot	tot
H_2O_2 1:32000	,,	,,	,,	,,	$^3/_4$ normal	tot	—	—
H_2O_2 1:32000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	normal	fast normal	fast normal	$^3/_4$ normal
H_2O_2 1:64000	,,	,,	,,	,,	,,	$^1/_2$ normal	tot	—
H_2O_2 1:64000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,,	fast normal	fast normal	fast normal
H_2O_2 1:128000	,,	,,	,,	,,	,,	normal	meist tot	meist tot
H_2O_2 1:128000 + 0,1 % Na_2SO_3	,,	,,	,,	,,	,,	,,	fast normal	fast normal

[1]) Paneth. Centralbl. f. Physiologie. 1889. S. 377.

Wie bei den Eosinversuchen sammelten sich auch hier die Tiere in den sulfithaltigen Lösungen in einer scharfen Zone unter der Oberfläche an, derart, daß ihre Verteilung um so diffuser wurde, je mehr Sulfit wegoxydiert war.

Interessant ist, daß in den 3 höchsten, sulfitfreien H_2O_2-Konzentrationen von dem Zeitpunkt an, in dem die meisten Tiere abgestorben waren, sich eine ziemlich starke Gasbildung bemerkbar machte, die zirka 15 Minuten anhielt, während diese in den sulfithaltigen Röhrchen beim Absterben der Tiere ausblieb. Es könnte sich hier um eine erst bei der Autolyse in größerem Umfang ermöglichte Katalase-Wirkung handeln, die in den sulfithaltigen Röhrchen ausbleibt, da Katalase durch alkalische Reaktion in ihrer Wirkung gehemmt wird; oder aber wird der hierbei freiwerdende Sauerstoff gleich an noch vorhandenes Sulfit gebunden. Wenn in den Versuchen mit fluoreszierenden Farbstoffen keine Gasbildung auftrat, so wird dies darauf beruhen, daß organische Peroxyde, hier also die Farbstoffperoxyde, durch Katalase nicht angegriffen werden (Oppenheimer[1]), und nicht darauf, daß die Katalase selbst durch die fluoreszierenden Farbstoffe geschädigt wird, da Tappeiner[2] feststellte, daß Katalasen und Peroxydasen durch fluoreszierende Stoffe im Licht wenig verändert werden.

Aus den Versuchen der Tabelle mit der höchsten H_2O_2-Konzentration ergibt sich im besonderen, daß die Avidität der Paramäzien zum H_2O_2-Sauerstoff größer ist als die des Sulfits, da ja dieses im Überschuß geboten wurde und sich nach dem Absterben der Tiere auch noch nachweisen ließ. Dies mag auch in den Versuchen mit Eosin usw. der Fall sein, kommt aber nicht zum Ausdruck, da das Peroxyd hier erst während der Belichtung entsteht und daher immer nur in Mengen vorhanden ist, die ungefähr den H_2O_2-Mengen in den Versuchen mit niedrigeren H_2O_2-Konzentrationen entsprachen, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß die Farbstoffperoxyde energischer wirken als H_2O_2.

In einigen Versuchen war die H_2O_2-Empfindlichkeit im Sonnenlicht größer als im Dunkeln bei derselben Temperatur;

[1]) Oppenheimer. Fermente. 1913. S. 863.

[2]) Tappeiner. Ergebn. d. Phys. l. c.

woher die Unregelmäßigkeit dieses Befundes kommt, war nicht ersichtlich; die Differenz betrug z. B. bei H_2O_2 1 : 4000 13 Minuten. Es ist wohl nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß dieser Unterschied seinem Wesen nach nichts mit der verschiedenen Wirkung belichteter und verdunkelter fluoreszierender Farbstoffe zu tun hat, da ja bei diesen das Licht Vorbedingung für die Bildung der Peroxyde ist; immerhin könnte die Lichtwirkung im letzten Fall eine Doppelte sein, indem das entstandene Peroxyd in seiner Wirkung durch Licht gefördert wird.

Wie bei den Chromogenen läßt sich auch hier eine Summierung der Wirkung belichteten Eosins und der H_2O_2-Wirkung nachweisen (vgl. die Ausführungen S. 298f.), wie aus dem in diffusem Südlicht im Dezember ausgeführten Versuch unter Berücksichtigung der Tabelle S. 312 hervorgeht:

		Nach 5′	Nach 20′	Nach 30′	Nach 35′	Nach 45′	Nach 1 1/2 Std.	Nach 2 Std.
Eosin 1:10000 +	H_2O_2 1 : 4000	tot	—	—	—	—	—	—
	H_2O_2 1 : 8000	1/2 normal	meist tot	tot	—	—	—	—
	H_2O_2 1 : 16000	normal	1/2 normal	meist tot	tot	—	—	—
	H_2O_2 1 : 32000	,,	normal	normal	1/2 normal	tot	—	—
	H_2O_2 1 : 64000	,,	,,	,,	1/2 normal	1/4 normal	tot	—
Eosin 1 : 10000 ohne H_2O_2		,,	,,	,,	1/2 normal	1/4 normal	meist tot	tot
H_2O_2 1 : 64000 ohne Eosin aus Tabelle S. 312		,,	,,	0	0	0	1/2 normal	0

3. Die photodynamische Wirkung der fluoreszierenden Farbstoffe auf Paramäzien in Gegenwart eines Sauerstoffüberträgers.

Wie früher (S. 299) mitgeteilt wurde, gelingt es, die Wirkung belichteter fluoreszierender Farbstoffe auf Atmungschromogene durch O-Überträger, besonders $MnSO_4$ zu beschleunigen.

In Übereinstimmung damit konnte nun festgestellt werden, daß auch das Protoplasma in seiner Gesamtheit durch Mn-haltige Lösungen fluoreszierender Farbstoffe im Licht rascher geschädigt wird als in Mn-freien Lösungen.

Zunächst wurde die Giftigkeit des $MnSO_4$ für Paramäzien

im Licht und im Dunkeln festgestellt: Die Giftwirkung war in beiden Fällen dieselbe, worauf späterhin noch näher eingegangen werden muß.

In einer 0,25 proz. $MnSO_4$-Lösung waren die Paramäzien nach 2 Stunden fast sämtlich abgestorben, während sie in 0,12 % und weniger sich 22 Stunden vollkommen normal verhielten.

Folgende Tabelle zeigt die beschleunigende Wirkung des Mn-Zusatzes auf Eosin und Methylenblau in diffusem Südlicht im Februar bei leicht verschleierter Sonne.

Tabelle I. E = Eosin, M = Methylenblau.

	Nach 8′	Nach 10′	Nach 12′	Nach 18′	Nach 25′	Nach 40′	Nach 60′
E 1 : 100000	normal	normal	1/2 normal	tot	—	—	—
E 1 : 100000 + 0,12 % $MnSO_4$	meist tot	tot	—	—	—	—	—
E 1 : 100000 + 0,12 % $MnSO_4$ + 0,1 % Na_2SO_3	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
M 1 : 160000	„	„	„	fast normal	1/4 normal	tot	—
M 1 : 160000 + 0,12 % $MnSO_4$	„	„	1/2 normal	1/2 normal	tot	—	—
0,12 % $MnSO_4$	„	„	normal	normal	normal	normal	normal

Derselbe Versuch im Dunkeln angestellt, ergab nach 2 Stunden vollkommene Unversehrtheit der Tiere in allen Portionen; hierauf belichtet ergaben sich dieselben Werte wie oben.

Ein zweiter Versuch wurde bei schwächerer Belichtung an demselben Tag und mit derselben Paramäzienkultur, nämlich im diffusen Nordlicht eine Stunde vor Beginn der Dämmerung angesetzt:

Tabelle II.

	Nach 8′	Nach 10′	Nach 30′	Nach 60′	Nach 75′
E 1 : 100000	normal	normal	fast normal	meist tot	tot
E 1 : 100000 + 0,12 % $MnSO_4$	meist tot	tot	—	—	—
E 1 : 100000 + 0,12 % $MnSO_4$ + 0,1 % Na_2SO_3	normal	normal	normal	normal	normal
M 1 : 160000	„	„	fast normal	1/4 normal	1/4 normal
M 1 : 160000 + 0,12 % $MnSO_4$	„	„	fast normal	1/4 normal	1/4 normal

Aus den Versuchen in Tabelle I und II geht zunächst hervor, daß die beschleunigende Wirkung des $MnSO_4$ von der

Stärke der Belichtung abhängig ist. Die in den stärker belichteten Mn-haltigen und Mn-freien Eosinlösungen gefundenen Tötungszeiten von 10′ bzw. 18′ bedeuten eine Beschleunigung der photodynamischen Wirkung um ca. 44%, die analogen Werte in den schwächer belichteten Lösungen, 10′ bzw. 75′, ergeben eine Beschleunigung der Wirkung um ca 86%. Hierbei ist auffallend, daß die Mn-Wirkung in beiden Fällen die gleichen absoluten Werte für die Tötungszeit annahm. Es scheint demnach, daß im System Eosin-Eosinperoxyd ein Gleichgewichtszustand besteht, der sowohl durch Verstärkung der Belichtung als durch $MnSO_4$ nach rechts verschoben wird, wobei die Lichtwirkung in stärkerer Energiezufuhr, die Mn-Wirkung in der Übernahme des Peroxydsauerstoffs und Weitergabe an die als Akzeptor fungierenden Paramäzien zu suchen wäre.

Bei stärkerer Belichtung oder größerer Eosinmenge (1 : 20000 z. B.) als sie im vorigen Versuch angewandt wurden, tritt die Tötung mit und ohne Mn-Zusatz gleich rasch ein; es wird eben hier sofort nach der Belichtung Sauerstoff in Quantitäten aktiviert, die auch ohne Überträger eine rasche Schädigung bewerkstelligen.

Bei den Methylenblauversuchen war die im stärkeren Licht durch $MnSO_4$ erzielte Beschleunigung nicht viel verschieden von derjenigen der Eosinversuche; sie betrug ca. 37 %, obwohl die Tötungszeiten ganz verschieden waren gegenüber den Eosinversuchen; auch dies spricht für die vorhin vorgetragene Auffassung. Daß bei der schwächeren Belichtung (Tabelle II) kein Unterschied festgestellt werden konnte, liegt offenbar an der gegenüber Eosin geringeren photodynamischen Wirksamkeit des Methylenblaus, die bei diesem schwachen Licht nicht mehr zum richtigen Ausdruck kam.

Bei Fluoreszein konnte keine Beschleunigung der Wirkung durch $MnSO_4$ festgestellt werden; der Ursache dieses negativen Befundes wurde nicht weiter nachgegangen.

Der Annahme, daß $MnSO_4$ auf Grund seiner Eigenschaft als O-Überträger die photodynamische Wirkung beschleunigt, kann entgegengehalten werden, daß evtl. eine mehr oder weniger glatte Summierung einer Peroxydwirkung und einer nicht näher definierbaren toxischen Wirkung des $MnSO_4$ vorliegt, so

wie etwa Alkohol nach Scüzs und Kisch[1] die photodynamische Wirkung beschleunigt. Dagegen ist zu sagen, daß einmal die Schädlichkeit des $MnSO_4$ in den angeführten Konzentrationen gleich Null war und daß die Wirkung des $MnSO_4$ bei Eosingegenwart gerade durch das reduzierende Na_2SO_3 aufgehoben wurde (vgl. Tabelle I), während Salze wie Na_2SO_4, NaCl in nicht angeführten Versuchen die Mn-Wirkung nicht beeinflußten. Eine Ausfällung von Mn war übrigens in den Sulfitlösungen nicht zu konstatieren.

Mit anderen O-Überträgern, wie $FeSO_4$ (neutralisiert) u. a., ließ sich keine Beschleunigung der photodynamischen Wirkung erzielen.

Zusammenfassend ergibt sich also: In fluoreszierenden Farbstofflösungen findet durch Absorption von Lichtenergie eine O-Aktivierung in Form einer Peroxydbildung statt; dieses Peroxyd stellt für Paramäzien, ähnlich wie H_2O_2, ein sehr starkes Gift dar, dessen Wirkung durch reduzierende Mittel gehemmt und durch $MnSO_4$ als O-Überträger beschleunigt werden kann.

B. Versuche mit Pflanzen.

Angesichts der bei Untersuchung der Paramäzien gewonnenen Resultate ist natürlich die Frage von Bedeutung, ob sich diese Versuche auch an Pflanzen verwirklichen lassen, um so mehr, als ja die im I. Kapitel beschriebenen Untersuchungen an Chromogenen sich aufs beste mit den bei den Paramäzien gewonnenen Resultaten decken. Dies war bei sämtlichen untersuchten, den verschiedensten Gruppen angehörigen Pflanzen der Fall.

1. Versuche mit Vallisneria spiralis.

Als sehr geeignet erwiesen sich die Blätter von Vallisneria, bei denen nicht nur das Gesamtverhalten des Protoplasmas, sondern auch eine Teilfunktion, die Plasmaströmung, als Indikator für die photodynamische Wirkung und ihre Beeinflußbarkeit dienen konnte.

Die Mitteilung Gicklhorns (l. c.), daß Vallisneria gegen belichtete fluoreszierende Farbstoffe empfindlich ist, konnte

[1]) Scüzs und Kisch. Zeitschr. f. Biologie. 1912. 58, 558.

bestätigt werden, wie auch die Tatsache, daß diese Stoffe im Licht zunächst eine Beschleunigung, später eine Sistierung der Plasmaströmung verursachen. Immerhin ist die Empfindlichkeit dieser und wohl aller höheren Pflanzen geringer als die der Paramäzien.

a) Die Hemmung der photodynamischen Wirkung durch Na_2SO_3.

Zunächst wurde die Giftwirkung des Na_2SO_3 für Vallisneria bestimmt: Sulfitlösungen mit einem anfänglichen Gehalt von zirka 0,4 % wasserfreien Salzes schädigen Schnitte von Blättern innerhalb 24 Stunden weder im Licht noch im Dunkeln; auch die Protoplasmaströmung blieb in dieser Zeit und darüber hinaus erhalten. Die Reduktionskraft des Na_2SO_3 reicht also nicht aus, um den für die Plasmaströmung nötigen Sauerstoff vollständig von der Zelle abzuhalten. Hierzu ist, besonders im Licht bei Gegenwart von O_2-abscheidenden Chloroplasten, eine stärkere Sauerstoffentziehung nötig, wie zuletzt Schuster[1] an Elodea und Vallisneria durch physikalischen Sauerstoffentzug feststellte. Eine Sistierung der Plasmaströmung durch chemischen Sauerstoffentzug mittels Na_2S konnten Kühne[2] und Jacob[3] nachweisen.

Während also die Giftigkeit der schwefligen Säure im schwach alkalisch reagierenden Neutralsalz aufgehoben ist, starben begreiflicherweise in Natriumbisulfitlösungen gleicher Konzentration die Vallisneriazellen rasch ab.

Zunächst mögen einige Versuche mitgeteilt werden, in denen die Plasmaströmung als Indikator für photodynamische Veränderungen und ihre Hemmung durch Sulfit verwandt wurde.

Die Schnitte wurden unter der Luftpumpe mit Wasser injiziert, hierauf auf normale Plasmaströmung in den langen Zellen des Mesophylls untersucht und auf die Versuchslösungen verteilt. Obwohl die Schnitte in möglichst gleicher Größe angefertigt wurden, war das Verhalten der einzelnen Schnitte

[1]) Schuster, Über den Einfluß der Sauerstoffpressung auf die Protoplasmaströmung. Diss. Leipzig. 1913.

[2]) Kühne. Zeitschr. f. Biologie. 1898. N. F. **18**, 85.

[3]) Jacob, Studien über Protoplasmaströmung. Diss. Jena. 1913.

unter denselben Bedingungen nicht immer ganz gleich, wie auch Gicklhorn betont, so daß das Resultat an einer größeren Anzahl von Schnitten beurteilt werden mußte.

Die angewandte Vallisneria zeigte sich gegen fluoreszierende Farbstoffe im Licht resistenter als es in den Versuchen Gicklhorns der Fall war; um daher nicht zu lange ausgedehnte Versuchszeiten zu erhalten, wurden ziemlich beträchtliche Farbstoffkonzentrationen verwandt, die sich aber im Dunkeln weit über die Dauer der Belichtungsversuche hinaus als unschädlich erwiesen.

Folgender Versuch wurde bei leichter, gleichmäßiger Bewölkung im Südlicht eines Septembertages ausgeführt; je 15 Blattschnitte wurden auf die Versuchslösungen, die sich in unbedeckten, flachen Glasdosen befanden, verteilt:

I, 1. Eosin 1 : 4000:

a) Nach 40 Minuten: In 2 Schnitten vollkommene Sistierung der Strömung; in den übrigen 13 Schnitten war je in einzelnen Zellen stark verlangsamte Strömung vorhanden.

b) Nach 4 Stunden: In 10 Schnitten Strömung vollkommen sistiert; in 5 Schnitten kaum sichtbare Strömung in einzelnen Zellen.

c) Nach 6 Stunden: Strömung in allen Schnitten vollständig sistiert.

I, 2. Eosin 1 : 4000 + 0,2 % Na_2SO_3:
Nach 7 Stunden: In sämtlichen 15 Schnitten normale Strömung in fast allen langen Zellen.

II, 1. Eosin 1 : 10000:
Nach 9 Stunden: In 7 Schnitten Strömung vollkommen in allen Zellen sistiert, in 8 Schnitten in einzelnen Zellen kaum sichtbare Strömung.

II, 2. Eosin 1 : 10000 + 0,2 % Na_2SO_3:
Nach 9 Stunden: In sämtlichen 15 Schnitten normale Strömung in fast allen langen Zellen.

Im analogen Kontrollversuche im Dunkeln zeigten nach 24 Stunden die Schnitte in sämtlichen 4 Lösungen normale Strömung in den meisten langen Zellen.

Im direkten Septembersonnenlicht wurden an je 10 Schnitten folgende Werte erhalten:

I, 1. Eosin 1 : 4000:
Nach 1 Stunde: In allen Schnitten Strömung durchweg und vollständig sistiert.

I, 2. Eosin 1 : 4000 + 0,2 % Na_2SO_3:
Nach 7 Stunden: In sämtlichen 10 Schnitten normale Strömung in fast allen langen Zellen.

Die photodynamische Wirkung des Eosins auf die Plasmaströmung läßt sich also durch Na_2SO_3 vollständig aufheben.

Dasselbe gilt für die tödliche Wirkung belichteten Eosins auf Vallisneria. Es wurde hierbei nicht näher untersucht, innerhalb welcher Zeit nach Sistierung der Plasmaströmung der Zelltod eintritt, sondern nur allgemein mittels der Plasmolyse durch hypertonische Rohrzuckerlösung und auf Grund des Aussehens der Zellen festgestellt, wie sich der Zelltod durch Sulfitzusatz verzögert. Der folgende Versuch wurde im hellen, diffusen Südlicht des Septembers ausgeführt:

I, 1. Eosin 1 : 800:
a) Nach 2 Stunden: In 9 Schnitten Plasmolysierbarkeit in zahlreichen Zellen der Epidermis und des Mesophylls; in 6 Schnitten keine Plasmolysierbarkeit.
b) Nach 5 Stunden: Keine Plasmolysierbarkeit; alle Schnitte durchgefärbt; Kerne und Chloroplasten rot.

I, 2. Eosin 1 : 800 + 0,2 % Na_2SO_3:
Nach 7 Stunden: In allen 15 Schnitten sämtliche Zellen von normalem Aussehen und plasmolysierbar.

Im Kontrollversuch im Dunkeln war nach 18 Stunden in beiden Lösungen keine Schädigung vorhanden.

In all den angeführten Versuchen wurden die Schnitte in den Sulfitlösungen über die angegebene Zeit hinaus beobachtet. Nach Eintritt der Dämmerung wurden sie über Nacht mit einer 1000kerzigen Wotanlampe in 1 m Abstand bestrahlt und am anderen Tage mit Sonnen- oder diffusem Südlicht weiter belichtet, nachdem die Lösungen durch frische ersetzt wurden: Auf diese Weise konnten die Schnitte in Eosinlösung + Sulfit bis zu 48 Stunden unter Fortdauer der Plasmaströmung normal erhalten werden.

Mit Fluoreszein 1 : 1000 und 1 : 5000, ebenso mit Methylenblau 1 : 150 000 wurden dieselben Resultate erhalten; bei den Methylenblauversuchen wurde frischer Farbstoff in dem Maße zugegeben, daß die durch das Na_2SO_3 bedingte Veränderung des Farbtons ausgeglichen wurde.

Bevor noch weitere Versuche mitgeteilt werden, mag die Feststellung erfolgen, daß auch hier die Wirkung des Sulfits auf seiner O-Avidität, nicht auf Hemmung anderer Art, beruht. Statt mit Na_2SO_3 wurden die Eosin- und Methylenblaulösungen mit folgenden Elektrolyten, teils in äquimolekularen, teils in stärkeren oder schwächeren Lösungen versetzt: NaCl, Na_2SO_4, KNO_3, $MgCl_2$. In jedem Fall trat die Sistierung der Plasmaströmung oder der Zelltod in den belichteten Lösungen zur gleichen Zeit ein, wie in reinen Farbstofflösungen bei derselben Lichtstärke, während im Dunkeln noch nach 24 Stunden keine Schädigung zu bemerken war.

Ebenso konnte auch hier festgestellt werden, daß eine mit Sulfit versetzte Eosin- und Fluoreszeinlösung nach Oxydation des Sulfits im Licht ihre photodynamische Wirksamkeit zurückerhielt (vgl. die Ausführungen in Kap. I).

Besonderes Interesse beansprucht das Verhalten von pflanzlichen Objekten, die im Dunkeln mit fluoreszierenden Stoffen vorbehandelt und nach gründlichem Abwaschen in farbstoffreien Lösungen mit und ohne Sulfitzusatz belichtet werden. Versuche in dieser Richtung wurden schon von Tappeiner an Paramäzien angestellt, der damit den Angriffsort der fluoreszierenden Farbstoffe zu bestimmen versuchte. Ob bei der photodynamischen Schädigung eine Innen- oder Außenwirkung stattfindet, kann natürlich nicht aus dem Eintreten einer sichtbaren vitalen Färbung geschlossen werden: ein eingedrungener fluoreszierender Farbstoff braucht nicht von innen zu wirken, da Busck[1] feststellte, daß eiweißhaltige Flüssigkeiten, wie z. B. Serum, wahrscheinlich auf Grund der Bildung einer Eosinalbumin-Verbindung, die photodynamische Eosinwirkung hemmen. Andererseits braucht beim Fehlen einer sichtbaren Vitalfärbung keineswegs eine reine Außenwirkung des fluores-

[1]) Busck. Biochem. Zeitschr. **1**, 1906. 424.

zierenden Farbstoffs vorzuliegen, da ja bei dem katalytischen Charakter der Reaktion ganz geringe Farbstoffmengen zur Erzielung einer Schädigung genügen und bei dem Verhalten der lebenden Zelle gegen Farbstoffe streng zwischen eventuell unsichtbarer Farbstoffaufnahme und Farbstoffspeicherung zu unterscheiden ist (vgl. Pfeffer[1], Ruhland[2]). Für die photodynamische Wirkung bei Paramäzien kommt Tappeiner[3] zum Resultat, daß Eosin in einer zur Sensibilisation fähigen Form höchstens in Spuren aufgenommen wird, während Methylenblau u. a. Farbstoffe eine Innenwirkung entfalten können.

Für die Pflanzenzellen wird die Erledigung dieser Frage noch dadurch erschwert, daß bei Vorbehandlung mit Farbstoff trotz nachherigem Auswaschen nicht entschieden werden kann, wieviel Farbstoff in den Zellwänden zurückbleibt und inwieweit der in dieser Weise gespeicherte Farbstoff photodynamische Wirksamkeit im Sinne einer Außenwirkung besitzt. Nach Gicklhorn (l. c. S. 1248) hat gegenüber Elodeasprossen Methylenblau, Eosin, Neutralrot Innenwirkung, dagegen Magdalarot, Fluoreszein u. a. Außenwirkung. Auffallend ist in den Versuchen Gicklhorns, daß die mit Methylenblau im Dunkeln vorbehandelten Zellen in Wasser belichtet später absterben als frische Sprosse, die in Methylenblaulösung belichtet wurden, um so mehr, als die Farbstoffkonzentration in den Vakuolen der vorbehandelten Zellen sicher stärker war als in den von außen gebotenen Methylenblaulösungen. Gicklhorn gibt die Konzentration seiner Farbstofflösung nicht an; jedoch pflegt die Konzentration des Methylenblaus in Elodeazellen einen solchen Wert zu erreichen, daß sich eine von außen gebotene Lösung gleicher kolorimetrischer Stärke auch ohne Belichtung auf Grund ihrer allgemein toxischen Wirkung als schädlich erweisen würde. Die relative Unschädlichkeit des in den Vakuolen gespeicherten Farbstoffs ist daher wohl im Sinne der Resultate von Busck (l. c.) durch dessen Bindung an Vakuolenbestandteile (Gerbstoff usw.) zu erklären. Dieselbe Erwägung läßt sich natürlich auch betreffs der im Protoplasma selbst in geringer Menge vor-

[1]) Pfeffer. Tüb. Unters. II. 1886—1888. S. 182.
[2]) Ruhland. Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 1912. 376.
[3]) Tappeiner. Biochem. Zeitschr. **12**, 1908. 290.

handenen Farbstoffe anstellen, so daß es also möglich wäre, daß in mit Methylenblau vorbehandelten Organen nur die in den Zellwänden vorhandene, wenn auch geringe Farbstoffmenge photodynamisch wirksam ist und daher auch den fluoreszierenden Vitalfarbstoffen nur eine Außenwirkung bei Belichtung zukäme.

Was hier für die Farbstoffe auseinandergesetzt wurde, gilt natürlich im gleichen Maß für das Na_2SO_3, und so müssen die eben besprochenen Gesichtspunkte bei der Beurteilung der folgenden Versuche im Auge behalten werden.

Junge Blätter von Vallisneria wurden im Dunkeln 14 Stunden lang in Methylenblaulösung 1 : 150000 gehalten; nach gründlichem Abwaschen wurden Schnitte hergestellt. Die Zellen der Epidermis zeigten größtenteils dunkelblau gefärbte Vakuolen, während die langen Mesophyllzellen ungefärbt waren und normale Strömung zeigten. Hierauf wurden die Schnitte nach Abspülen teils in Wasser, teils in 0,2 % Na_2SO_3 und andere Salze übertragen und der direkten Februarsonne ausgesetzt; (dieselben Versuche wurden im Dunkel angesetzt):

I. Wasser:

nach 2 Stunden: alle Zellen, auch die langen, ursprünglich nicht blau gefärbten Mesophyllzellen desorganisiert; blaue Vakuolen verschwunden; keine Plasmolysierbarkeit.

II. 0,2 % Na_2SO_3:

a) nach 3½ Stunden: in zahlreichen langen Mesophyllzellen fast normale Strömung; in zahlreichen Epidermiszellen schön blau gefärbte Vakuolen vorhanden; über die Hälfte sämtlicher Zellen noch plasmolysierbar.

b) nach 6½ Stunden: alle Zellen desorganisiert.

III. 0,2 % Na_2SO_4:

nach 2 Stunden: wie I.

IV. 0,2 % NaCl:

nach 2 Stunden: wie I.

Die Schnitte in denselben verdunkelten Lösungen waren nach 5 Stunden sämtlich normal, nur war die Färbung der Vakuolen in der Sulfitlösung etwas blässer geworden, was durch Exosmose auf Grund der im Dunkeln länger konstant bleibenden

Sulfitalkaleszenz oder durch teilweise Reduktion des Farbstoffes zur Leukobase bedingt sein kann.

Hierauf wurden diese Dunkelkontrollen ebenfalls der direkten Sonne ausgesetzt und zeigten dann dieselben Erscheinungen, wie sie im Hauptversuch aufgetreten waren.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß Vallisneriazellen, die mit Methylenblau im Dunkeln behandelt und nach Möglichkeit von extrazellulärem Farbstoff befreit worden waren, im Lichte rasch abstarben und zwar waren die Epidermiszellen, die viel Farbstoff gespeichert hatten, nicht merkbar empfindlicher als die langen, ganz farblosen Mesophyllzellen. Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß weniger das in den Vakuolen gespeicherte Methylenblau als vielmehr das im Plasma in nicht sichtbarer Menge vorhandene Methylenblau die Schädigung bewirkt, wenn nicht sogar der eventuell in den Zellwänden vorhandene Farbstoff hierbei beteiligt ist, und daß der Farbstoff in den Vakuolen in eine photodynamisch unwirksame Form übergeführt worden ist. Die Hemmung der Schädigung durch Sulfit kann unter diesen Versuchsbedingungen sowohl auf der Reduktion des Farbstoffs zur Leukobase, als auch auf der Abfangung des aktivierten Sauerstoffs beruhen; jedoch ist darauf hinzuweisen, daß in den im Kapitel I beschriebenen Versuchen eine Bleichung des Farbstoffs durch Na_2SO_3 nur im Dunkeln erfolgte; und wenn auch der Farbcharakter im Lichte sich in vitro bei Sulfitgegenwart etwas änderte, so war die photochemische Wirkung des Farbstoffes auf Sulfit doch noch beträchtlich.

Ob das Sulfit intra- oder extrazellular zur Wirkung kommt, hängt natürlich von der nicht entscheidbaren Frage ab, ob im Plasma vorhandenes, oder in der Zellwand absorbiertes Methylenblau photodynamisch schädigt. Wurden ganze Blattstücke nach Vorbehandlung mit Methylenblau im Dunkeln der Belichtung in Sulfitgegenwart ausgesetzt, so war keine Hemmung der photodynamischen Wirkung zu erzielen, auch nicht in den Epidermiszellen. Dies spricht dafür, daß das Sulfit in diesem Fall nicht rasch genug eindringen kann und daher die Reaktion zwischen belichtetem Methylenblau und Sulfit bei Versuchen mit Blattschnitten eine intrazellulare ist.

Diese Verhältnisse liegen etwas einfacher beim Eosin, da dieser Farbstoff wohl vital eindringen kann, aber nicht gespeichert wird (Küster[1], Ruhland[2]) und somit eine bessere Vergleichsmöglichkeit zwischen mit Eosin vorbehandelten, in Wasser belichteten und frischen, in Eosinlösung belichteten Blattschnitten besteht:

Blattschnitte wurden teils in Eosin 1 : 10 000, teils in Wasser 14 Stunden lang im Dunkeln gehalten, hierauf auf die im folgenden ersichtlichen Flüssigkeiten verteilt und der direkten Februarsonne ausgesetzt;

A. Mit Eosin 1 : 10000 im Dunkeln vorbehandelte Schnitte.

I. in Wasser nach Abspülen:

a) nach 2 Stunden: fast alle Zellen nicht mehr plasmolysierbar, in einigen Epidermiszellen ganz schwache Strömung.

b) nach 4 Stunden: alle Zellen desorganisiert.

II. in 0,2 % Na_2SO_3:

a) nach 2 Stunden: alle Zellen normal, starke Plasmaströmung in den langen Mesophyllzellen und einigen Epidermiszellen.

b) nach 5 Stunden: wie nach 2 Stunden.

c) nach 24 Stunden (nachts im elektrischen Licht, Lösung morgens erneuert): fast alle Zellen normal mit guter Strömung in den Mesophyllzellen:

III. in 0,2 % Na_2SO_4:

nach 2 und 4 Stunden wie I.

B. Ohne Eosin im Dunkeln gehaltene Schnitte.

In Eosin 1 : 10000:

a) nach 2 Stunden: Strömung sistiert, jedoch alle Zellen plasmolysierbar.

b) nach 4 Stunden: zahlreiche Zellen plasmolysierbar.

c) nach 5 Stunden: die meisten Zellen tot; einige schwach plasmolysierbar.

Aus A I und B ist ersichtlich, daß mit Eosin im Dunkeln vorbehandelte Schnitte lichtempfindlicher waren als solche, die in Eosin derselben Konzentration nach Vorbehandlung in Wasser

[1]) Küster. Jahrb. f. wiss. Bot. **50**, 1912. 261.

[2]) Ruhland. Ebenda. **51**, 376.

belichtet wurden; eine allgemeine Schwächung der Zellen durch die Eosinvorbehandlung ist, wie aus A II ersichtlich, nicht anzunehmen. In diesem Fall ist wohl auf eine etwaige Farbstoffspeicherung in der Zellwand kein Gewicht zu legen, so daß die Reaktion zwischen Sulfit und Eosin in A II als eine intrazellulare angesehen werden kann.

Um festzustellen, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit Sulfit eine Erhöhung der Resistenz gegen photodynamische Wirkung zur Folge hat, wurden Vallisneriaschnitte 14 Stunden lang in einer mehrmals erneuerten 0,2 proz. Na_2SO_3-Lösung gehalten und nach Abspülen in Eosinlösung 1 : 10000 belichtet: sie starben so rasch ab, wie vorher in Wasser gehaltene Kontrollschnitte. In Anbetracht der katalysatorischen Wirkung der fluoreszierenden Stoffe ist es eben nötig, daß das Sulfit, das die vom Katalysator gebildeten Produkte dauernd abfangen soll, im Überschuß vorhanden ist, da es ja hierbei in irreversibler Weise verändert wird und eine Speicherung in der Zelle natürlich nicht anzunehmen ist.

b) Die Beschleunigung der photodynamischen Wirkung durch $MnSO_4$ als Sauerstoffüberträger.

Auch bei den Vallisneriazellen ließ sich im Licht, genau wie bei den Vicia- und Aloe-Chromogenen und den Paramäzien, eine deutliche Steigerung der Wirkung fluoreszierender Farbstoffe durch Zusatz eines O-Überträgers feststellen und zwar war auch hier $MnSO_4$ geeignet.

Eine 1 proz. $MnSO_4$-Lösung wurde von den Gewebeschnitten im Licht wie im Dunkeln 24 Stunden lang unter Beibehaltung der Plasmaströmung glatt ertragen.

Folgender Versuch wurde in direkter Februarsonne ausgeführt:

	Nach 25′	Nach 35′	Nach 45′	Nach 55′	Nach $1^1/_4$ Std.	Nach $1^1/_2$ Std.
Eosin 1 : 5000	normal	normal	fast normal	Strömung schwach	keine Strömung	meiste Zellen tot
Eosin 1 : 5000 + 1 % $MnSO_4$	Strömung schwach	keine Strömung	tot	—	—	—
Eosin 1 : 5000 + 0,05 % $MnSO_4$	Strömung schwach	keine Strömung	tot	—	—	—

Die Dunkel-Kontrollversuche ergaben folgendes: Der Mn-Zusatz hatte eine Reizwirkung ausgelöst, da die Strömung abnorm stark war; nach 14 Stunden noch waren die Schnitte in allen 3 Lösungen vollkommen normal und zeigten gute Strömung des Plasmas; nur in der mit 1% $MnSO_4$ versetzten Eosinlösung waren einige Zellen in mehreren Schnitten abgestorben.

Das Minimum von $MnSO_4$, das noch eine bemerkbare Beschleunigung der photodynamischen Wirkung in einer Eosinlösung 1:5000 zur Folge hatte, lag bei 0,01% im direkten Sonnenlicht.

Ebenso ließ sich die Wirkung einer belichteten Methylenblaulösung durch $MnSO_4$ steigern und zwar kam diese Beschleunigung auch zum Ausdruck, wenn Schnitte mit Methylenblau 1:150000 im Dunkeln vorbehandelt und in Wasser mit $MnSO_4$-Zusatz dem Lichte ausgesetzt wurden; jedoch war die Beschleunigung in beiden Fällen nicht so stark wie bei Versuchen mit Eosin.

Mit neutralisiertem $FeSO_4$ als O-Überträger konnte auch hier keine Wirkung erzielt werden.

2. Versuche mit anderen Pflanzen.

Die hemmende Wirkung des Na_2SO_3 auf die Schädigung durch fluoreszierende Stoffe im Licht ließ sich an beliebigen Pflanzen, niederen und hohen, Wasser- und Landpflanzen nachweisen. Die Resultate waren im Prinzip dieselben, wie bei Vallisneria spiralis und sollen hier nicht im einzelnen angeführt werden.

Untersucht wurde: Volvox globator, Hydrodictyon, Spirogyra, Elodeablätter, die Blätter des Fruchtfleisches von Symphoricarpus, die, wie Gicklhorn feststellte, photodynamisch sehr empfindlich sind, Vicia Faba, Aloe soccotrina, Rhoeo discolor u. a. Die Differenz der Tötungszeiten in belichteten Eosinlösungen mit und ohne Sulfit konnte bei Elodeablättern über 56 Stunden ausgedehnt werden, wobei nachts die Belichtung mittels 1000-kerziger Wotanlampe fortgesetzt und die Eosinsulfitlösung öfters gewechselt wurde.

Eine Hemmung der photodynamischen Wirkung ließ sich

häufig, wenn auch nicht regelmäßig, an ganzen Trieben von Landpflanzen erzielen, wenn diese in Eosin-Sulfitlösungen und zum Vergleich in sulfitfreie Eosinlösungen gestellt wurden; es mußte nur dafür Sorge getragen werden, daß die Farbstofflösungen mit den eingetauchten Sproßteilen verdunkelt waren.

Wurden ca. 10 cm lange Gipfelsprosse der lebhaft transpirierenden Vicia Faba auf diese Weise in einer Eosinlösung 1 : 1000 mit 0,5% $Na\text{-}SO_3$ und einer anderen ohne Sulfit gehalten und dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, so waren die Sprosse in den sulfitfreien Lösungen nach ca. 3—4 Stunden welk und schwarz gefärbt, während die in Eosin-Sulfitlösung gehaltenen Sprosse, obwohl sie deutliche Rotfärbung in der Nervatur aufwiesen, meist 1—2 Stunden länger frisch und ungeschwärzt blieben.

Daß das Sulfit in den Sprossen tatsächlich aufsteigt, geht aus folgendem Versuch hervor, in dem das im I. Kapitel beschriebene Verhalten des Viciachromogens gegen belichtetes Eosin + Sulfit zum Sulfitnachweis diente: Vicia-Sprosse wurden 1 Tag lang in öfter erneuerte 0,2 proz. Na_2SO_3-Lösung gestellt; hierauf wurde aus den oberen Teilen der Sprosse ein Chromogenextrakt hergestellt und nach Zusatz von Eosin 1 : 100000 belichtet; dasselbe geschah mit nicht vorbehandelten Sprossen. Nach 30 Minuten war der Extrakt aus den mit Sulfit behandelten Sprossen nur leicht braunstichig, während der Kontrollextrakt sich dunkelbraun verfärbt hatte. Es war also eine gewisse Menge Na_2SO_3 in den Sprossen aufgestiegen.

Ein vorheriges Einstellen der Sprosse in Na_2SO_3-Lösungen hatte jedoch keine wesentliche Resistenzerhöhung gegen eine daran anschließende Eosineinwirkung zur Folge gegenüber solchen Sprossen, denen Eosin und Sulfit gleichzeitig geboten wurde.

Liguster ovalifolium Hassk. war das Objekt, mit dem sich am häufigsten durch Sulfit eine Hemmung der Eosinwirkung bei dessen transpiratorischer Aufnahme im Licht erzielen ließ. Zweige mit je 7 Blattpaaren wurden im Dunkeln 15 Stunden lang in 1 proz. Na_2SO_3-Lösung gehalten, ebenso in äquivalenten NaCl- und $MgSO_4$-Lösungen. Hierauf wurden die Sprosse in Eosin-

lösungen 1 : 1000 gestellt, denen 0,5 % Na_2SO_3, bzw. die äquivalenten Mengen NaCl und $MgSO_4$ beigegeben waren und der direkten Septembersonne ausgesetzt: Nach $3^1/_2$stündiger Belichtung waren die Blätter der NaCl- und $MgSO_4$-Sprosse welk und diffus braun verfärbt, während die Sulfitsprosse ganz frische Blätter mit nur wenigen braunen Flecken aufwiesen und auch nach $6^1/_2$ Stunden nur etwas angewelkt waren, obwohl die Blattnervatur eine deutliche Eosinfärbung aufwies.

Warum sich diese Versuche nicht regelmäßig und nicht bei allen Pflanzen ausführen lassen, mag an dem Verhalten von Vicia Faba klargelegt werden. Bei dieser Pflanze kam es häufiger vor, daß auch die Sulfit-Sprosse rasch welkten. Dies scheint darauf zu beruhen, daß an einer für die Wasserversorgung des ganzen Sprosses wichtigen Stelle das Eosin ein Übergewicht über das Sulfit erlangt, denn es färbte sich häufig eine bestimmte Stelle der Sproßachse braun und knickte ein, während alle anderen Teile noch ganz normal waren.

Eine solche Auflösung der Eosinwirkung in eine primäre photodynamische und eine sekundäre Schädigung durch Absperrung der Wasserzufuhr läßt sich sehr deutlich folgendermaßen an Vicia demonstrieren: Werden Blätter auf dem Wege des Transpirationsstromes mit Eosin im Dunkeln rot gefärbt und hernach am Stengel belichtet, so zeigt sich die photodynamische Schädigung zunächst in einer Schwarzfärbung der Nervatur; nach kurzer Zeit ist jedoch das ganze Blatt welk und gleichmäßig schwarz gefärbt. Werden dagegen mit Eosin im Dunkeln beladene Blätter auf Wasser gelegt und belichtet, so bleibt die Schwarzfärbung auf die Gefäßbündel und eine sie begleitende Zone beschränkt, während die übrigen, besonders die am Rande liegenden Partien tagelang frisch grün bleiben und plasmolysierbar sind.

Zellphysiologische Bedeutung kommt den hier mitgeteilten Versuchen nicht zu, da nicht bestimmt werden kann, wo die Abfangung des Eosinperoxyds durch das Sulfit erfolgt. Vermutlich findet es schon in den toten Elementen der Gefäßbündel statt, so daß hier im Grunde dieselben Verhältnisse vorliegen, wie in den Versuchen mit Gewebeschnitten in Eosin-Sulfitlösungen. Immerhin mag auf die Feststellung Küsters

(l. c.) hingewiesen sein, daß die Aufnahme von Eosin in die lebende Zelle auf dem Wege des Transpirationsstromes erleichtert wird, wodurch sich vielleicht die negativen Resultate bei Sulfitzufuhr erklären lassen, wie sie bei Vicia und Liguster hie und da, bei anderen Pflanzen häufig erhalten wurden.

3. Untersuchungen an Vicia Faba und Aloe soccotrina über den Angriffsort photodynamisch wirkender Farbstoffe.

Nach allen im vorigen beschriebenen Versuchen ist wohl nicht daran zu zweifeln, daß die Wirkung der belichteten fluoreszierenden Farbstoffe eine Peroxydwirkung ist. Nun ist nach den Untersuchungen Pfeffers[1] Vicia Faba eine Pflanze, in deren Zellen sich mit H_2O_2 vitale, sichtbare Oxydationen ausführen lassen. Pfeffer stellte fest, daß zahlreiche Zellen dieser Pflanze, besonders die Epidermiszellen der Hauptachse bei Zusatz von H_2O_2 einen braunen Farbstoff bilden. Bei der Beschreibung der Versuche mit Viciaextrakten im I. Kapitel wurde schon erwähnt, daß die erste Veränderung der Extrakte, die bei Gegenwart von Eosin usw. im Licht auftritt, in einer Braunfärbung besteht, die dem mit H_2O_2 in lebenden Viciazellen erzielbaren Farbton vollständig entspricht. Es wurde daher versucht, eine vitale Oxydation auch mit den fluoreszierenden Farbstoffen zu erreichen. Dies gelang jedoch nur in ganz geringem Maße trotz weitgehender Variation der Versuchsbedingungen.

Wurden z. B. Wurzellängsschnitte in Eosin 1 : 1000 dem diffusen Südlicht ausgesetzt, so war nach 5 Stunden das Gewebe noch lebend und zeigte nur in einigen Zellen eine leichte Bräunung, die in ebenso belichteten Kontrollschnitten in Wasser, wie auch in verdunkelten Schnitten in Eosinlösung nicht auftrat und sich nach Ausfall der Plasmolyse als das Resultat einer vitalen Oxydation herausstellte. Eine Verwechslung mit vitaler Eosinfärbung war ausgeschlossen, da in denselben Schnitten einige Zellen vital Eosin aufgenommen hatten und eine rein blaßrote Färbung aufwiesen.

Nicht besser wurden die Resultate, wenn Schnitte 12 Stunden

[1]) Pfeffer, Beitr. z. Kenntnis der Oxydationsvorgänge. l. c.

und länger in Eosin- oder Methylenblaulösungen der verschiedensten Konzentrationen im Dunkel gehalten und hernach in Wasser der Sonne ausgesetzt wurden.

Kontrollversuche mit H_2O_2 ergaben in Schnitten derselben Versuchspflanzen starke vitale Oxydation.

Eine vitale Oxydation in den Aloinschläuchen von Aloe soccotrina gelang überhaupt nicht, weder mit Eosin, noch mit Methylenblau, während sich ja der Inhalt dieser Zellen in vitro sehr wohl durch diese Farbstoffe im Licht oxydieren ließ. Blattlängsschnitte, im Dunkeln mit Methylenblaulösung 1 : 150000 behandelt, zeigten nach 12 Stunden in den Aloinzellen häufig schöne, vitale Methylenblauspeicherung, während die anderen Zellen nur vereinzelt blau gefärbt waren; wurden solche Schnitte hernach in Wasser belichtet, so waren die Aloinzellen abgestorben, ehe eine Rotfärbung eintrat, wobei allerdings das Auftreten einer Rötung durch die Methylenblaufärbung verdeckt sein konnte; jedoch trat auch in schwach oder gar nicht gefärbten Aloinzellen im Lichte nicht häufiger eine vitale Rötung auf, als sie auch in unvorbehandelten Schnitten zu bemerken ist. Diese autonome Rötung ist offenbar das Symptom einer prämortalen Schädigung, worüber Untersuchungen im Gange sind. Dasselbe ist auch von der vitalen Rötung in Gewebeschnitten zu sagen, die aus verdunkelten, in Eosinlösung gehaltenen Aloeblättern hergestellt und in Wasser einige Stunden belichtet wurden.

Tatsache ist also, daß eine vitale Oxydation durch belichtete fluoreszierende Farbstoffe sich bei Aloe und Vicia nicht oder nicht in dem Maße verwirklichen läßt, wie es aus dem Verhalten der wässerigen Extrakte dieser Pflanzen und aus der Einwirkung von H_2O_2 auf lebende Viciazellen geschlossen werden könnte. Dies spricht dafür, daß die Wirkung des belichteten Eosins usw. unter den gegebenen Bedingungen eine Außenwirkung darstellt; die Annahme, daß das Eosinperoxyd ins Plasma eindringt, jedoch vor den chromogenführenden Vakuolen halt macht, ist wohl nicht wahrscheinlich. Das Plasma wird von dem Farbstoffperoxyd sozusagen angeätzt, so daß es zu einer nach innen fortschreitenden Zerstörung kommt und die Chromogene ausfließen, ehe die Farbstoffbildung in der Zelle selbst wahr-

genommen werden kann. In Anbetracht der photodynamischen Wirksamkeit ganz verdünnter fluoreszierender Lösungen würde dies zugleich besagen, daß die Farbstoffperoxyde stärker wirken als H_2O_2, was ja schon aus den Versuchen im I. Kapitel erschlossen werden konnte. Hierbei spielt wohl die Tatsache eine Rolle, daß organische Peroxyde im Gegensatz zu H_2O_2 von Katalase nicht angegriffen werden und bei der Einwirkung von Eosin auf Pflanzen im Lichte ebensowenig wie bei Paramäzien (vgl. S. 313) eine Gasentwicklung beobachtet werden konnte, wie sie sich bei H_2O_2-Gegenwart sofort einstellt. In umgekehrtem Sinn führt Loew[1] die von Chodat und Bach[2] festgestellte Unempfindlichkeit von Schimmelpilzen gegen H_2O_2 auf deren reichen Katalasengehalt zurück.

III. Kapitel.

Die Bedeutung des Chlorophylls unter dem Gesichtspunkt der Peroxydbildung in belichteten fluoreszierenden Farbstofflösungen.

Von mehreren Forschern wurde schon die Fluoreszenzfähigkeit des Chlorophylls in Zusammenhang mit der CO_2-Assimilation gebracht. Als Grundlage diente die von Hausmann[3] mitgeteilte Beobachtung, daß aus Blättern hergestellte, methylalkoholische Chlorophyllösungen, wie auch ebensolche Lösungen chemisch reinen Chlorophylls auf Paramäzien und rote Blutkörperchen eine starke photodynamische Wirkung ausüben. Aus den Versuchen Hausmanns sei folgender angeführt: 0,2 ccm einer Lösung von 0,05 % kristallisierten Chlorophylls in Methylalkohol wurden einer 5 ccm betragenden Paramäzienkultur zugesetzt, worauf die Lösung in direkter Novembersonne belichtet wurde: nach 2 Minuten waren alle Paramäzien tot, während in Kontrollversuchen im Dunkeln nach 72 Stunden noch zahlreiche Tiere am Leben waren; ebenso fielen Versuche im trüben Licht aus, nur daß die Wirkung hier erst nach einigen Stunden eintrat. Eine Schädigung durch Methylalkohol war, wie Kontrollversuche zeigten, auch im Licht ausgeschlossen.

[1]) Loew. Ber. chem. Ges. **35**, 1902. 2487.

[2]) Chodat und Bach. Ebenda. 1275.

[3]) Hausmann. Jahrb. f. wiss. Bot. **46**, 1909. 599. Ber. bot. Ges. **26a**, 1908. 452.

Um diese Versuche nachzuprüfen, unternahm Verf. ähnliche Versuche mit methylalkoholischen, heiß und kalt bereiteten Auszügen aus Selaginella, die tiefgrün waren und stark rot fluoreszierten. Zur Anwendung kamen die verschiedensten Farbstoffmengen; in keinem Fall konnte jedoch eine deutliche photodynamische Wirkung erhalten werden, weder im direkten Sonnenlicht nach 10stündiger Beleuchtung, noch nach 2 Stunden im konzentrierten Licht des elektrischen Projektionsapparates, in dem die Tiere aus derselben Kultur bei Gegenwart von Eosin 1 : 10000 nach 4 Minuten tot waren.

Ebensowenig konnte mit dieser Chlorophyllösung oder mit Auszügen aus anderen Pflanzen eine oxydierende Einwirkung auf wässerige Vicia- und Aloeextrakte im Licht festgestellt werden.

Wie lassen sich damit die Resultate Hausmanns in Einklang bringen? Hausmann betont selbst nachdrücklich[1], daß durch Sonnenlicht vollständig veränderte, chlorophyllhaltige Pflanzenauszüge noch photodynamisch wirken; ferner stellte er fest, daß ein Chlorophyllderivat, das Phylloporphyrin, wie auch Auszüge aus etiolierten Blättern von Triticum, Pisum u. a., in denen spektroskopisch kein Chlorophyll nachweisbar war, photodynamisch wirksam sind (Hausmann und Portheim[2]).

Auf der andern Seite ist zu bemerken, daß das Chlorophyll in wässriger Lösung sich im kolloidalen Zustand befindet und in dieser Form nicht fluoresziert. Da jedoch in den Versuchen Hausmanns eine geringe Menge Methylalkohol vorhanden war, ließe sich die Anwesenheit von molekular gelöstem und damit fluoreszierendem Chlorophyll annehmen, wenn dem nicht die Versuche Liebaldts[3] widersprechen würden. Um festzustellen, bis zu welcher Alkoholverdünnung Chlorophyll molekular gelöst bleibt, stellte sich Liebaldt eine Reihe Alkoholkonzentrationen her und gab nur soviel alkoholischen Chlorophyllextrakt zu, als eben nötig war, um in wasserfreiem Alkohol die Fluoreszenz auftreten zu sehen; dadurch vermied sie, daß überschüssiges Chlorophyll die wasserhaltigen Lösungen trübt

[1]) Hausmann. J. w. B. **46**, 1909. 612.

[2]) Hausmann und Portheim. Biochem. Zeitschr. **21**, 1909. 51.

[3]) Liebaldt. Zeitschr. f. Bot. **5**, 1913. 95.

und eine Fluoreszenz verdeckt. Sie stellte auf diese Weise fest, daß bei 18° die molekulare Lösungsgrenze des Chlorophylls von Selaginella in Methylalkohol bei 59%, in Äthylalkohol bei 44% Alkoholgehalt lag; in geringeren Alkoholkonzentrationen war das Chlorophyll ohne Fluoreszenz kolloidal gelöst. Die Lösungsgrenze verschiebt sich etwas mit der Temperatur. Extrakte aus anderen Pflanzen zeigten nur geringe Abweichungen. Diese Versuche wurden vom Verf. an Extrakten aus mehreren Pflanzen nachgeprüft und konnten bestätigt werden.

In den Versuchen Hausmanns ist nun die Alkoholkonzentration naturgemäß verschwindend gering, so daß das Vorhandensein von molekular gelöstem, fluoreszierendem Chlorophyll so gut wie ausgeschlossen ist. Damit ist nun auch eine photodynamische Wirkung unmöglich gemacht, da, wie in der Einleitung erwähnt, diese Wirkung bei einer und derselben Substanz mit sinkender Fluoreszenzhelligkeit abnimmt. Die Versuche von Hausmann selbst deuten darauf hin, daß es sich hierbei nicht um eine Wirkung des Chlorophylls handelt, sondern teils um die Wirkung der im Licht entstehenden Chlorophyllspaltprodukte, teils um andere fluoreszierende Stoffe (vgl. die oben erwähnten Versuche mit Auszügen aus etiolierten Pflanzenteilen).

Daß in den Untersuchungen des Verf.s mit Selaginellaauszügen keine photodynamische Wirkung erhalten wurde, muß darin begründet sein, daß das Chlorophyll in diesen Extrakten vor einer Zersetzung durch Licht ziemlich geschützt ist, wie sich aus der langen Beibehaltung der grünen Farbe in den Paramäzienversuchen auch bei starker Belichtung ergab.

Dagegen gelang es auf andere, mit der photochemischen Wirksamkeit der übrigen fluoreszierenden Farbstoffe übereinstimmenden Weise eine Wirkung des Chlorophylls oder wenigstens seiner Spaltprodukte im Licht zu erzielen. Das Chromogen von Aloe soccotrina läßt sich auch in 96 proz. Äthylalkohollösung oxydieren und zwar sowohl durch $H_2O_2 + CuSO_4$, als auch durch Eosin 1 : 10 000 im Licht, wenn auch die Oxydation schwächer ist als in wässriger Lösung. Wurden nun 5 ccm einer solchen alkoholischen Chromogenlösung zusammen mit 0,2 ccm einer alkoholischen Chlorophyllösung aus Selaginella

der direkten Sonne ausgesetzt, so trat nach 40 Minuten eine blaßrote Färbung auf, die sich weiterhin zu hellrot verstärkte, während die Dunkelkontrollen wie auch chlorophyllfreie Kontrollen im Licht sich nicht rötеten. Allerdings war die leicht grüne, durch den Chlorophyllzusatz bedingte Färbung der Lösungen im Licht vor Auftreten der Rötung nahezu verschwunden, so daß es sich auch hier um eine Wirkung nicht des Chlorophylls, sondern seiner im Licht entstandenen Spaltprodukte handeln könnte[1].

Hier erhebt sich die Frage, ob überhaupt die Fluoreszenz des Chlorophylls zur Erklärung seiner physiologischen Funktion herangezogen werden darf.

Auf Grund der Übereinstimmung zwischen den Absorptionsspektren einer kolloidalen, wässerigen Chlorophyllösung und eines frischen Blattes kommen Willstätter und Stoll[2] zum Ergebnis, »daß die kolloide Lösung im Wasser diejenige Form des Chlorophylls darstellt, die der Anordnung des Pigmentes im Assimilationsapparat am nächsten kommt«. Hieraus würde sich ergeben, daß das Chlorophyll im lebenden Blatt nicht fluoresziert, da eine kolloidale, wässerige Chlorophyllösung nach Willstätter und Stoll nur Opaleszenz, keine Fluoreszenz aufweist. Die Assimilationstheorie dieser Verf. baut sich nun auch auf dem Verhalten der kolloidalen Chlorophyllösung auf (l. c.):

Eine wässrige Chlorophyllösung absorbiert CO_2; diese Reaktion geht auch mit der des Luft-CO_2 vor sich, jedoch langsamer als bei höherem CO_2-Partiärdruck. Die Aufnahme des CO_2 findet in stöchiometrischer Weise statt und ist beendet bei der Aufnahme von 2 Mol CO_2, nämlich bei der Abspaltung von Mg als Bikarbonat. Diese Zersetzung erfolgt jedoch unter Bildung eines Zwischenproduktes, einer dissoziierbaren CO_2-Chlorophyllverbindung, die sich in Chlorophyll zurückverwandeln kann. Dieses an das Chlorophyll gebundene CO_2-Molekül erleidet nun durch »von außen zugeführte

[1]) Diese Befunde konnten mit chemisch reinem Chlorophyll, das der Verf. dem Entgegenkommen von Herrn Geh. Rat Prof. Dr. Willstätter verdankt, bestätigt und erweitert werden, worüber an anderer Stelle berichtet werden soll.

[2]) Willstätter und Stoll, Unters. über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin. 1918.

Energie« eine Verschiebung der Valenzen derart, daß das CO_2 zu einer peroxydischen Verbindung, entweder Perameisensäure oder Formaldehydperoxyd umgelagert wird. Aus dem so entstandenen peroxydischen Chlorophyll-CO_2-Zwischenprodukt soll nun durch ein katalaseartiges Enzym Sauerstoff abgespalten werden oder aber wird das Zwischenprodukt auf enzymatischem Wege hydrolysiert unter Bildung von H_2O_2; jedoch erscheint den Verf. die erste Annahme wahrscheinlicher.

Die Fluoreszenz des Chlorophylls spielt also in der Willstätterschen Theorie keine Rolle, wie es ja auch gemäß dem als Grundlage dienenden Verhalten kolloidalen Chlorophylls nicht möglich ist.

Auffallen muß jedoch und wurde auch früher schon von verschiedener Seite betont, daß das Maximum der CO_2-Assimilation im Lichte desjenigen Spektralbezirks erzielt wird, dem die Fluoreszenzstrahlen des Chlorophylls angehören: im Rot.

Eine rote Fluoreszenz im Blatt ist nun freilich nicht ohne weiteres zu erkennen, was wohl auf physiologisch-optische Momente zurückzuführen ist; jedoch haben schon früher u. a. Reinke[1] und neuerdings mit besserer Methodik Gicklhorn (l.c.) gezeigt, daß das Chlorophyll auch im lebenden Blatt rot fluoresziert. Gicklhorn untersuchte z. B. frische Moosblätter im Fluoreszenzmikroskop und teilt mit, daß sich jedes Chlorophyllkorn wie ein Blutstropfen vom dunklen Grunde abhebt. Andererseits beobachteten Willstätter und Stoll (l. c. S. 570) rote Fluoreszenz in Lösungen von Chlorophyll in Lezithin mit Wasser; mikroskopisch glich die Flüssigkeit einer Aufschwemmung von Chloroplasten in Wasser, wobei ihr Absorptionsspektrum allerdings nicht mit dem des frischen Blattes übereinstimmte. Lipoide sind nun bekanntermaßen im Chloroplasten vorhanden (vgl. u. a. Biedermann[2]) und werden auch von Willstätter und Stoll[3] für verschiedene Auflösungserscheinungen des Chlorophylls beim Behandeln von Blättern mit Alkohol verantwortlich gemacht.

Alles in allem ist also wohl die Berechtigung vorhanden, die Fluoreszenzeigenschaft des Chlorophylls für die Behandlung

[1]) Reinke. Ber. bot. Ges. 2, 1884. 265.

[2]) Biedermann. Flora, Stahl-Festschrift. 1918. S. 560.

[3]) Willstätter und Stoll, Unters. über Chlorophyll. Berlin. 1913.

der Assimilationsfrage mit heranzuziehen[1]; ein noch aufzuklärender Punkt bleibt jedoch dabei das verschiedene spektroskopische Verhalten frischer Blätter und molekular gelösten, fluoreszierenden Chlorophylls; vielleicht spielen besondere Brechungsverhältnisse im frischen Blatt hierbei eine Rolle.

Hausmann und Gicklhorn begnügen sich mit der Feststellung, daß zwischen der photodynamischen Wirkung der fluoreszierenden Farbstoffe und der Funktion des Chlorophylls ein Zusammenhang bestehen muß. Erst Woker[2] sucht neuerdings unter Hinweis auf den von Straub (l. c.) vermuteten Peroxydcharakter belichteter fluoreszierender Farbstofflösungen eine Analogie zwischen dem Chemismus der Chlorophyllfunktion und der Eigenschaft der photodynamisch wirksamen Substanzen herzustellen. Sie weist darauf hin, daß in der chemischen Literatur übereinstimmend die Bikarbonate als die reaktionsfähigsten CO_2-Verbindungen bezeichnet werden und vermutet, daß in der Pflanze Bikarbonat auf Grund einer Resonanzwirkung des sensibilisierenden Chlorophylls in eine reaktionsfähige Form von Peroxydcharakter, etwa nach der Formel $>C\begin{smallmatrix}-O-OH\\OH\end{smallmatrix}$ gebracht wird. Der hierin enthaltene Sauerstoff soll nun die Rolle spielen, die bei der Wirkung belichteten Eosins der Luftsauerstoff spielt und sich im Lichte an das Chlorophyll unter Bildung eines Chlorophyllperoxyds anlagern. Hierdurch wird die Kohlensäure in die kondensationfähige Gruppe

$$\begin{array}{c} | \\ H-C-OH \\ | \end{array}$$

übergeführt; das Chlorophyllperoxyd würde dann durch freiwilligen Zerfall oder durch Reaktion mit dem peroxydischen Isomeren der Kohlensäure unter Sauerstoffabgabe in Chlorophyll zurückverwandelt.

Nach dieser Ansicht hat das Chlorophyll also zwei Aufgaben: Isomerisation der Kohlensäure auf Grund einer Resonanzwirkung und photochemische Reduktion dieser isomeren Verbindung.

Was die erste Funktion betrifft, so läßt sich dem entgegenhalten, daß es H. Wislicenus[3] gelungen ist, allein mit H_2O_2

[1]) Vgl. auch Nachtrag am Schluß der Arbeit.

[2]) Woker, G. Pflügers Archiv. **176**, 1919. 11.

[3]) Wislicenus, H. Ber. chem. Ges. **51**, 1918. I, 942.

eine Reduktion von Kaliumbikarbonat auszuführen; das Karbonat brauchte also nicht erst durch irgendeine außerhalb der Peroxydwirkung liegende Umwandlung reaktionsfähig gemacht zu werden. Sein Versuch war folgender: Zu 100 ccm 10 proz. $KHCO_3$-Lösung wurden 2 ccm 15 proz. H_2O_2 zugesetzt; schon nach einigen Minuten entwich Gas, das anfangs aus O_2, später aus $O_2 + CO_2$ bestand, während sich in der Lösung Ameisensäure nachweisen ließ.

Auf Grund dieses Versuchs und der in vorliegender Arbeit mitgeteilten physiologischen Befunde über die tatsächliche Peroxydwirkung der belichteten fluoreszierenden Farbstoffe läßt sich eine noch einfachere Möglichkeit der Chlorophyllfunktion denken: Das Chlorophyll wird bei Belichtung unter Absorption von Luftsauerstoff in ein Peroxyd verwandelt, welches Bikarbonat zu einer kondensationsfähigen Gruppe im Sinne Wokers reduziert $\left(-\overset{\overset{\displaystyle OH}{|}}{\underset{\underset{\displaystyle H}{|}}{C}}-\right)$, wodurch der ursprüngliche Farbstoff unter Entweichen von O_2 wieder hergestellt wird. Hierbei ist der Assimilationskoeffizient $\frac{O_2}{CO_2} = 1$, wie übrigens auch bei der Theorie Wokers.

Auf die Tatsache, daß Wislicenus bei seinen Versuchen im System $H_2O_2 + KHCO_3$ Ameisensäure als Reduktionsprodukt erhielt, spricht nicht gegen die Auffassung, da die Reaktion in diesem System je nach den Mengenverhältnissen ganz verschieden verläuft. So erhielt Kasanezky[1] aus $KHCO_3$ und 30proz. H_2O_2 in 10fachem Überschuß $K_2CO_5 + 2^1/_2\ H_2O$ unter Entweichen von CO_2. Außerdem ist auf die in den vorigen Abschnitten nachgewiesene Tatsache hinzuweisen, daß die Peroxyde der fluoreszierenden Farbstoffe physiologisch energischer wirken als H_2O_2.

Die Ansicht Wokers und die hier vorgetragene haben den Vorteil, daß dabei keine Bindung der Kohlensäure an das Chlorophyll nötig ist und die zweite Stufe des Assimilationsprozesses, die Kondensation der durch Reduktion ent-

[1]) Kasanezky, P. Journ. russ. chem. Ges. 1903. **35**, 57 (zit. nach Chem. Centralbl. **74**, 1903. I, 809).

standenen Molekülgruppen zum Kohlehydratskelett gleichzeitig ermöglicht erscheint.

Ein direkter Nachweis des Chlorophyllperoxyds braucht hierbei nicht gefordert zu werden, da ja die Pflanze bei Belichtung zur Assimilation stets bereit ist und infolgedessen das Peroxyd in dem Maß verschwindet, wie es gebildet wird, d. h. das Chlorophyll wirkt als Lichtkatalysator wie die übrigen fluoreszierenden Farbstoffe.

In diesem Sinne können die Versuche mit belichtetem Eosin + Sulfit an Paramäzien usw. als Modellversuch für die hier vorgetragene Anschauung aufgefaßt werden: so wie in diesen Versuchen das reduzierende Sulfit eine Schädigung der untersuchten Objekte verhindert, hemmt die reduzierende peroxydische Form der Kohlensäure eine Schädigung der Chloroplasten durch belichtetes Chlorophyll. Wenn andererseits Bikarbonat die photodynamische Wirksamkeit des Eosins auf Paramäzien usw. nicht hemmen konnte, so kann dies darauf beruhen, daß in Eosin-Bikarbonatlösungen keine Kondensation der aus H_2CO_3 entstandenen Reduktionsprodukte erfolgen kann und dieser Prozeß gleich in seinem Anfangsstadium durch Anhäufung dieser Produkte gehemmt und nun der Peroxydsauerstoff auf die Paramäzien usw. übergeht.

Vor allem wichtig erscheint den Verfasser die Tatsache, daß sich derartige Hypothesen auf Grund des chemischen Verhaltens der Bikarbonate entwickeln lassen; denn gerade diese Verbindungen sind es, mit denen sich im Assimilationsversuch mit Wasserpflanzen eine ausgiebige Assimilation erzielen läßt (vgl. Angelstein[1]). Diese Tatsache wird von Angelstein damit erklärt, daß die Pflanze die Fähigkeit hat, Bikarbonat aktiv zu spalten, während Nathanson[2] die Bedeutung des Bikarbonatzusatzes nur in einer Erhöhung der CO_2-Tension des Wassers erblickt.

Bei allen Ansichten über CO_2-Assimilation erscheint der Zustand der Kohlensäure im Protoplasma selbst nicht genügend gewürdigt. In Anbetracht der alkalischen Reaktion des Protoplasmas erscheint es zum mindesten möglich, daß die Kohlensäure generell in Wasser- und Landpflanzen als Bikar-

[1]) Angelstein. Beitr. z. Biol. d. Pflanz. (Cohn). **10**, 1910. 86.

[2]) Nathanson, Der Stoffwechsel der Pflanzen. Leipzig. 1910. S. 165.

bonat dem Chloroplasten zugeführt wird, wobei natürlich gleichzeitig eine bestimmte Menge physikalisch gebundenes CO_2 vorhanden ist. Es mag darauf hingewiesen sein, daß im Blut die Kohlensäure sich zum größten Teil in dissozierbarer Verbindung, sowohl im Plasma als in den Blutkörperchen vorfindet und hierbei Bikarbonate eine Rolle spielen.

Wenn hier etwas ausführlicher auf die Assimilation der Kohlensäure eingegangen wurde, so war der Anlaß hierzu in einer Beobachtung bei der Assimilation von Elodea gegeben, die wenigstens scheinbar eine große Ähnlichkeit mit den früher beschriebenen Versuchen im belichteten System: fluoreszierender Farbstoff + Sulfit hat.

Elodeasprosse auf die gewöhnliche Weise in 1% $KHCO_3$ gehalten und belichtet, schieden an der Schnittfläche gleichmäßig und reichlich während mehrerer Stunden Blasen aus. Hierauf wurde die Lösung ersetzt durch eine zweite mit 1% $KHCO_3$ + 0,2% Na_2SO_3: nach 2 Minuten hörte die Blasenausscheidung vollkommen auf und blieb, 30 Minuten beobachtet, dauernd sistiert. Wurde dann die Lösung wieder durch die alte, 1% $KHCO_3$ enthaltende ersetzt, so kehrte entweder sofort oder nach einigen Minuten die normale Blasenausscheidung zurück.

Diese Hemmung durch Sulfit kann nicht auf einer Erhöhung der Alkaleszenz beruhen, da ein Zusatz von 2,5% Na-Azetat oder 1% $Na_2S_2O_3$ die Blasenausscheidung nicht alterierte, und sogar neutrales Karbonat im Vergleich zur angewandten Sulfitmenge erst in größeren Konzentrationen hemmt (Nathanson, Angelstein).

Die quantitativen Beziehungen zwischen $KHCO_3$ und hemmend wirkendem Na_2SO_3 waren folgende, die an einer und derselben Serie von 4 Elodeasprossen erhalten wurden:

10^h—12^{10h} in 1% $KHCO_3$: starke Blasenausscheidung.

12^{10h} „ 1% $KHCO_3$ + 0,05% Na_2SO_3: geringere Blasenausscheidung bis:

12^{15h} „ 1% $KHCO_3$ + 0,10% Na_2SO_3: unverändert bis:

12^{27h} „ 1% $KHCO_3$ + 0,20% Na_2SO_3: Sistierung der Blasenausscheidung in allen 4 Sprossen, nach 8 Min. ganz schwache Blasenbildung bis:

3^{35h} in 1 % $KHCO_3$: sofort starke Blasenausscheidung bis:
3^{40h} „ 0,2 % $KHCO_3$: mittelstarke Blasenausscheidung bis:
3^{56h} „ 0,2 % $KHCO_3$ + 0,10 % Na_2SO_3: Sofort Sistierung bis:
4^{56h} „ 0,2 % $KHCO_3$: nach 3—8 Minuten mittelstarke Blasenbildung in allen 4 Sprossen bis:
5^{10h}: Zusatz von abgemessenen Mengen 0,5 proz. Na_2SO_3-Lösung unter Durchmischen in Intervallen von je 3 Minuten: Blasenausscheidung in allen 4 Sprossen sistiert, nachdem die Sulfitkonzentration wieder auf 0,1 % gestiegen war.

Diese Resultate könnten zunächst zur Annahme führen, daß hier tatsächlich Verhältnisse vorliegen, wie bei der Hemmung der belichteten fluoreszierenden Farbstoffe durch Sulfit, indem der aktivierte Sauerstoff des im Licht gebildeten hypothetischen Chlorophyllperoxyds vom Sulfit abgefangen wird und nicht mehr mit der Kohlensäure unter O_2-Abspaltung reagieren kann. In Anbetracht der kurzen Zeit, in der die Sistierung der Blasenausscheidung nach Sulfitzusatz erfolgt, ist jedoch eine direkte Berührung des Sulfits mit den Chloroplasten wenig wahrscheinlich. Aus demselben Grunde ist auch nicht daran zu denken, daß etwa eine Abfangung einer Aldehydzwischenstufe vorliegt, wie sie Neuberg[1] mittels Sulfit bei der Gärung erzielen konnte.

Näher liegt folgende Annahme: Aus dem obigen Versuch ergibt sich, daß zur Hemmung der Blasenausscheidung um so mehr Sulfit nötig ist, je höher die $KHCO_3$-Konzentration liegt. Dies weist darauf hin, daß das Sulfit schon außerhalb der Pflanze mit dem $KHCO_3$ in Reaktion tritt derart, daß analog der Reaktion zwischen H_2O_2 und $KHCO_3$ (Wislicenus, l. c.) das Bikarbonat in Form seines peroxydischen Isomeren vom Sulfit reduziert wird und nicht mehr dem Chloroplasten zugeführt wird.

Betont sei noch, daß das Resultat des oben beschriebenen quantitativen Versuches die Möglichkeit eines asphyktischen Verhaltens der Pflanzen, wie auch ein Ausbleiben der Sauerstoffblasen infolge sofortiger Anlagerung des Sauerstoffes an das Sulfit ausschließt.

Über diese Fragen müssen weitere Versuche unternommen werden, die der Verf. auszuführen gedenkt.

[1]) Neuberg und Reinfurth. Biochem. Zeitschr. 89, 1918. 365.

IV. Kapitel.

Untersuchung metallischer Lichtkatalysatoren auf ihre Wirkung gegenüber lebendem Protoplasma und Chromogenen.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, hat Neuberg mit Hilfe von Schwermetallsalzen im Licht die mannigfachsten Umsetzungen, wie Oxydationen und Spaltungen, an physiologisch wichtigen Substanzen (Kohlehydraten, Eiweißverbindungen usw.) ausgeführt und gleichzeitig festgestellt, daß den photodynamisch wirksamen Stoffen im Sinne Tappeiners mit einziger Ausnahme der Anthracenderivate eine solche Wirkung nicht zukommt.

Diese Feststellung gab den Anlaß, den reziproken Versuch auszuführen und zu prüfen, ob den Lichtkatalysatoren Neubergs, z. B. Fe- und Mn-Salzen, eine photodynamische Wirkung im Sinne Tappeiners zukommt.

Eine solche Wirkung konnte nicht festgestellt werden, so daß also dieses negative Resultat die Befunde Neubergs sinngemäß ergänzt.

Zunächst wurde untersucht, ob sich mit $MnSO_4$ eine Oxydation der Chromogene von Vicia Faba und Aloë soccotrina im Licht ermöglichen läßt, wie es mit den geringsten Mengen fluoreszierender Farbstoffe erreicht werden konnte.

Wurde ein wäßriger Vicia-Extrakt unter Zusatz von 0,5% $MnSO_4$ und weniger der direkten Februarsonne ausgesetzt, so trat erst nach 2 Stunden ohne vorherige Bräunung eine leichte Graufärbung ein; dieselbe Graufärbung, nur etwas schwächer, zeigten Mn-haltige Kontrollösungen im Dunkeln; Mn-freie Lösungen waren im Licht und Dunkel in dieser Zeit farblos geblieben.

Es ist also wohl eine gewisse Beschleunigung der Oxydation durch Mn-Zusatz im Licht eingetreten, jedoch ist diese im Vergleich zu den Eosinversuchen verschwindend gering und durch eine andere Art der Oxydation bedingt, da die bei Belichtung mit Eosin erzielte Bräunung nicht auftrat.

$FeSO_4$ bewirkte nach zweistündiger Belichtung eine schwache grau-olivstichige Färbung der Extrakte, die im Dunkeln ausblieb.

Ebenso verhielt sich das Aloë-Chromogen. Nur mit (0,25%) $MnSO_4$ ließ sich nach 1½ stündiger Besonnung eine leichte rotstichige Färbung erzielen, die nicht viel stärker war, als bei

der Kontrolle im Dunkeln; Mn-freie Lösungen waren farblos geblieben.

Ebensowenig konnte am lebenden Protoplasma eine mit der Schädlichkeit belichteter fluoreszierender Stoffe irgendwie vergleichbare Wirkung erzielt werden.

Paramäzien in starker Februarsonne unter Zusatz von 0,12 % $MnSO_4$ oder 0,03 % neutralisiertem $FeSO_4$ belichtet, waren nach 3 Stunden vollständig normal; ebenso in belichtetem neutralisierten Uranylazetat (0,02 %), obwohl dieses fluoresziert.

Ebensowenig wirkten diese metallischen Lichtkatalysatoren auf Vallisneria schädlich; Plasmaströmung und Lebensfähigkeit blieben auch bei langer, starker Belichtung erhalten.

Hieraus folgt, daß die Umwandlung der Strahlungsenergie des Lichts durch Katalysatoren ganz verschiedene chemische Energiewerte liefern kann und von der Art des Katalysators abhängig ist.

Die Gruppe der fluoreszierenden organischen Stoffe absorbiert Strahlungsenergie unter Bildung von Peroxyden, während die metallischen Lichtkatalysatoren, deren Wirkung nach Neuberg ebenfalls auf Änderung der Oxydationsstufe beruhen muß, den molekularen Sauerstoff nicht in peroxydischer Form auf die von ihnen angreifbaren Substanzen übertragen.

Besonders zu betonen ist folgender Punkt:

Die metallischen Lichtkatalysatoren bewirken tiefgreifende Änderungen im Molekül und scheinen also a priori zu einer photodynamischen Wirkung im Sinne Tappeiners durchaus geeignet, während die fluoreszierenden Farbstoffe auf Grund ihrer Peroxydbildung im Licht nur besonders leicht reaktionsfähige Atomgruppen im Molekül angreifen. — Hiergegen spricht nicht die von Neuberg und Miura[1] festgestellte Tatsache, daß 3proz. H_2O_2 in Gegenwart von Ferrisulfat oder Mn-Salz Glykogen oder Stärke hydrolysiert, da hier eine relativ starke H_2O_2-Konzentration in Anwendung kam. —

Wenn also trotzdem die fluoreszierenden organischen Substanzen im Lichte eine enorme Schädlichkeit für die lebende Substanz besitzen, so kann dies nicht darauf beruhen, daß diese Schädigung in einem tiefen Eingriff in die Konstitution der

[1]) Neuberg u. Miura. Biochem. Zeitschr. **36**, 1911. 37.

lebenden Substanz besteht, sondern sie muß in einer Störung der lebenswichtigen Oxydations- und Reduktionsvorgänge im Protoplasma beruhen. — Die Auflösungserscheinungen, die an Paramäzien nach Abtötung mit belichtetem Eosin bemerkt werden, müssen wohl auf sekundäre autolytische Prozesse zurückgeführt werden, da sie an ebenso abgetöteten Pflanzenzellen nicht oder nicht in diesem Maße beobachtet wurden. —

Wenn andererseits die stärker umsetzenden metallischen Lichtkatalysatoren das Plasma nicht in der Weise der fluoreszierenden organischen Substanzen angreifen, so liegt dies in Anbetracht der Außenwirkung des belichteten Eosins wohl nicht an der Undurchlässigkeit des Plasmas für diese Metallsalze. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die äußerste Plasmaschicht befähigt ist, die Wirkung dieser Lichtkatalysatoren abzuhalten und damit die tiefgreifenden Zersetzungen zu verhindern, denen chemische Zellbestandteile in Gegenwart von Schwermetallsalzen im Licht anheimfallen.

Immerhin gibt es Fälle, in denen diese Lichtkatalysatoren offenbar eine nachweisbare physiologische Rolle spielen. Nach Simon[1] werden mit Eisen- oder Uransalzen vorbehandelte Samen bei Belichtung in der Keimung befördert, was sich aufs beste mit der chemischen Wirkung dieser Salze auf belichtete Kohlehydrate und Amidverbindungen in Einklang bringen läßt, zumal Lehmann und Ottenwälder[2] feststellten, daß Samen, die normalerweise nur im Lichte keimen, auch im Dunkeln mehr oder weniger gut zum Keimen gebracht werden können, wenn sie mit proteolytischen Enzymen behandelt werden.

Schlußbetrachtung.

Die physiologisch wirksamen Lichtkatalysatoren lassen sich in zwei Gruppen von verschiedener Wirkungsweise einteilen. Die eine Gruppe wird von den fluoreszierenden organischen Stoffen, die zweite von den Schwermetallsalzen und den (fluoreszierenden) Anthrazenderivaten gebildet. Letztere gehören also auch der ersten Gruppe an.

[1]) Simon, Fr. Biochem. Zeitschr. **48**, 1913. 410.

[2]) Lehmann und Ottenwälder. Zeitschr. f. Bot. **5**, 1913. 337.

Das Prinzip der Wirksamkeit beruht in beiden Gruppen auf Sauerstoffübertragung.

Betreffs der Wirksamkeit der ersten Gruppe läßt Neuberg zwei Möglichkeiten offen: entweder findet eine Sauerstoffübertragung auf Grund dauernder Umwandlung zweier Oxydationsstufen nach dem Schema Chinon $\rightleftarrows$ Hydrochinon statt oder es liegt eine Peroxydbildung und Übertragung des Peroxydsauerstoffs auf den Akzeptor vor.

In vorliegender Arbeit konnte nun bewiesen werden, daß die chemisch schon festgestellte Peroxydbildung der belichteten fluoreszierenden Farbstoffe deren physiologische Wirksamkeit bedingt.

Die Gruppe der metallischen Lichtkatalysatoren wirkt nach Neuberg auf Grund ständiger Umwandlung nach dem Schema Oxydul $\rightleftarrows$ Oxyd.

In Übereinstimmung hiermit konnte festgestellt werden, daß sich mit dieser Gruppe von Lichtkatalysatoren nicht die physiologischen Wirkungen erzielen lassen, die mit der Gruppe der fluoreszierenden organischen Substanzen möglich sind.

Die Befunde waren im wesentlichen folgende: Atmungschromogene werden im Licht durch fluoreszierende Substanzen wie Eosin, Methylenblau, Chininsulfat u. a. zum Farbstoff oxydiert und zwar in derselben Weise, wie es durch H_2O_2 verwirklicht werden kann. Bei Eosin genügt eine Konzentration von 1 : 25 000 000, um das Chromogen von Vicia Faba in diffusem Tageslicht zu oxydieren.

Diese Wirkung kann durch Natriumsulfit und andere reduzierende Salze, nicht jedoch durch NaCl, Na_2SO_4 $NaHCO_3$ usw. aufgehoben werden. Sie wird dagegen deutlich beschleunigt durch Mangansulfat als Sauerstoffüberträger.

Die bekannte „photodynamische" Wirkung der fluoreszierenden organischen Substanzen auf das lebende Protoplasma, die in Funktionsstörungen und in einer z. T. fast augenblicklichen Abtötung beruht, kann durch Natriumsulfit vollständig gehemmt werden. Auch hier zeigten Kontrollversuche mit zahlreichen anderen Salzen, daß die Wirkung des Sulfits auf seiner reduzierenden Eigenschaft beruht. Und ebenso wie bei

den Chromogenen konnte auch hier durch $MnSO_4$-Zusatz eine deutliche Beschleunigung der photodynamischen Wirkung bewirkt werden, die auf Sauerstoffübertragung beruhen muß und nicht auf eine Additionswirkung zurückgeführt werden kann.

Modellversuche mit $H_2O_2 + Na_2SO_3$ und H_2O_2 allein ergaben eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Wirkung dieses Peroxyds und derjenigen der photodynamisch wirksamen Substanzen.

Die Versuche wurden an den photodynamisch sehr empfindlichen Paramäzien, wie an zahlreichen Pflanzen der verschiedensten systematischen und biologischen Stellung unternommen und ergaben übereinstimmende Resultate. Eine vitale Chromogenoxydation konnte nur in kleinem Maße erhalten werden.

Die Versuche mit den metallischen Lichtkatalysatoren ergaben, daß diese die Chromogene nur in ganz verschwindendem und nicht auf Peroxydwirkung beruhendem Maße zum Farbstoff oxydieren, während am lebendem Protoplasma überhaupt keine Wirkung erzielt werden konnte.

In Anbetracht der auch im lebenden Blatt nachweisbaren Fluoreszenz des Chlorophylls wurden die mit den fluoreszierenden Farbstoffen erhaltenen Befunde als Grundlage einer theoretischen Erwägung über die CO_2-Assimilation benutzt, die auf die Reaktion eines Chlorophyllperoxyds mit peroxydisch isomerisierter Kohlensäure hinausläuft.

Experimentell wurde festgestellt, daß geringe Sulfitmengen die Blasenausscheidung von belichteten Elodeasprossen sofort hemmen, daß jedoch diese Hemmung nicht auf einer Reaktion des Chlorophylls mit Sulfit beruhen kann, wie es auf Grund der oben dargelegten Versuche mit Eosin usw. denkbar wäre, sondern daß hier wohl rein äußerliche, noch näher zu untersuchende Verhältnisse maßgebend sind.

Eine besondere Erwähnung verdient noch das Verhalten des Mangansulfats. Dieses wirkt nach Neuberg als metallischer Lichtkatalysator und bewirkt als solcher in vitro tiefgreifende Umsetzungen an physiologisch wichtigen Stoffen, während es, wie hier gezeigt wurde, auf die lebende Substanz im Licht nicht

schädlich wirkt. Außerdem kann jedoch Mangansulfat als O-Überträger in Gegenwart belichteter fluoreszierender Farbstoffe auftreten und hat in dieser Funktion einen beträchtlichen Einfluß auf das lebende Protoplasma (vgl. die oben erwähnten Befunde).

Es ist denkbar, daß die in der lebenden Zelle normalerweise vorhandenen Mn-Verbindungen in dieser zweifachen Richtung fungieren; eine stimulierende Wirkung durch Mn-Salze ist ja schon öfters beschrieben worden. Was die Rolle des Mangans als O-Überträger (in Gegenwart fluoreszierender Farbstoffe) betrifft, so ist zu erwähnen, daß sich das belichtete System Eosin + $MnSO_4$ sehr gut in das von Bach und Chodat aufgestellte Schema der Oxydasenwirkung einreihen läßt:

I. Eosin $\xrightarrow{\text{Licht}}$ Eosinperoxyd — $MnSO_4$
Oxygenase — Peroxyd — Peroxydase

II. Eosin + $MnSO_4$ = Oxydase
Oxygenase + Peroxydase = Oxydase.

Zu der vorliegenden Untersuchung wurden dem Verfasser in liebenswürdiger Weise Mittel aus der Wetterhahn-Stiftung an der Universität Freiburg i. Br. zur Verfügung gestellt.

Freiburg i. Br., Botanisches Institut. Im März 1920.

Nachtrag.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit erschien eine vorläufige Mitteilung von Stern über den Zustand des Chlorophylls in der lebenden Zelle (Ber. d. d. bot. Ges. 1920. **38**, 28). Stern findet im Licht der elektrischen Metallfadenlampe rote Fluoreszenz in lebenden grünen Zellen; ein Befund, der vor demselben Resultat Gicklhorns (vgl. S. 336) das voraus hat, daß er mit Strahlen im sichtbaren Teile des Spektrums erhalten wurde. Nach Stern ist das Chlorophyll teils in molekularer, fluoreszierender Lipoidlösung, teils in kolloidem, nicht fluoreszierendem Hydroidzustand im lebenden Chloroplasten enthalten (vgl. auch Liebaldt l. c.).