

Über die Fluoreszenz des Chlorophylls und ihre Bedeutung beim Assimilationsprozeß.

Von

Kurt Stern.

Mit 4 Abbildungen im Text.

I. Versuchsanordnung.

Die Entdeckung, daß nicht nur alkoholische Chlorophylllösungen, sondern auch lebende grüne Blätter rot fluoreszieren, freilich viel schwächer als jene, rührt von Stokes her. Später haben zahlreiche Forscher, z. B. Simmler, Hagenbach, N. J. C. Müller und Reinke, diese Beobachtung bestätigt. Ich will im folgenden nur die Versuchsanordnung beschreiben, die ich nach längeren Vorversuchen bei den mir zur Verfügung stehenden Hilfsmitteln als die zweckmäßigste zum Studium dieser Fluoreszenzerscheinungen gefunden habe. Das Prinzip ist das der Hagenbachschen Versuchsanordnung. Das weiße Licht einer starken Lichtquelle wird durch ein Blaufilter filtriert und auf die grünen Zellen geworfen. Das von diesen ausgestrahlte Licht wird spektroskopisch untersucht. Da kein rotes Licht auffällt, so ist im Spektroskop auftretendes rotes Licht Fluoreszenzlicht. Als Lichtquelle diente mir eine Auerprojektionslampe (Metallfadenlampe) von 3000 Meterkerzen Lichtstärke (Abb. 1 L), die an die 120 Voltleitung des Instituts angeschlossen war. Sie war eingebaut in einen aus Holz und Blech bestehenden Kasten (K 1), der vorn eine kreisförmige Öffnung von 3 cm Radius trug, durch die das Licht ins Zimmer trat. Durch den starken Luftzug eines elektrisch (VM = Ventilormotor) betriebenen Ventilators V an der Hinterwand des Kastens wurde sie dauernd gekühlt, wodurch ein infolge der hohen Wärmeentwicklung im Kasten leicht mögliches Springen der Glasbirne

verhindert wurde. Das durch die vordere Öffnung austretende Licht wurde durch zwei plankonvexe Linsen von 10 bzw. 7,5 cm Durchmesser und 25 bzw. 19 cm Brennweite (L_1 und L_2) konzentriert, denen eine kreisförmige Blende (Bl) von 1 cm Radius vorgeschaltet war. Unmittelbar hinter der zweiten Linse stand eine Kuvette mit Kupferoxydammoniak (F), dessen Konzentration so gewählt war, daß es gerade keine sichtbare Spur roten Lichtes mehr durchließ, sondern nur Licht etwa im Spektralbereich zwischen E und H. Blenden, Linsen und Kuvette waren mittels Reitern einer optischen Bank aufgeschraubt, und durch schwarzes Tuch und mit mattiertem schwarzen Papier überzogene Pappe wurde ein völlig lichtdichter Kasten (K_2) hinter der zweiten

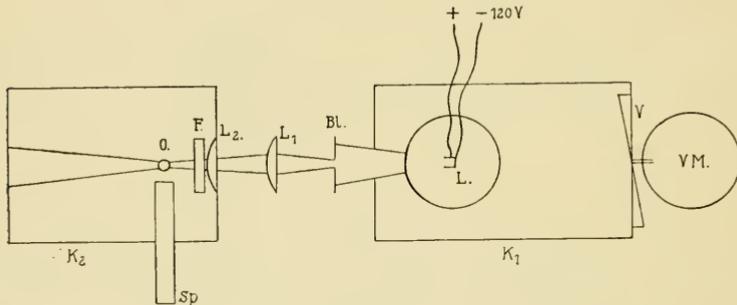


Abb. 1.

Linse hergestellt. In das so filtrierte und konzentrierte Licht, das einen hellen blauen Doppelkegel bildet, in dessen Spitze der Brennpunkt liegt, wurde nun mittels eines Stativs das Objekt (O), z. B. ein lebendes Blatt, gebracht und ein Spektroskop (Sp) rechtwinklig zur Richtung der einfallenden Strahlen so aufgestellt, daß der Spalt in der Entfernung von einem oder wenigen Zentimetern vom Objekt sich befand. Es konnte also in den Spalt nur blaues und grünes, vom Blatt reflektiertes Licht oder etwaiges Fluoreszenzlicht fallen. Auch war das Zimmer während der Beobachtung stets durch eine Verdunklung vom Außenlicht getrennt. Die möglichst vollständige Ausschaltung von Nebenlicht ist bei den beschriebenen Versuchen unerlässlich, erstens, um die Möglichkeit auszuschalten, etwa irgendwelches ins Spektroskop fallende Nebenlicht versehentlich als Fluoreszenzlicht anzu-

sprechen, zweitens, weil möglichst vollständige Dunkeladaption des Auges nötig ist, um die verhältnismäßig schwache Fluoreszenz deutlich hervortreten zu lassen. Zur Beobachtung sehr schwacher Fluoreszenz ist es nötig, das Auge vor dem Okular des Spektroskops einige Minuten geschlossen zu halten. Beim plötzlichen Öffnen ist dann das Auge sehr empfindlich. Es ermüdet aber rasch, so daß bei längerem Fixieren das rote Fluoreszenzlicht immer schwächer und schließlich unsichtbar wird. Das Spektroskop war ein gradsichtiges der Firma Schmidt und Hänsch, Berlin. Fluoresziert der beobachtete Körper rot, so erhält man im Spektroskop außer einem grünblauen Bande zwischen E und H, das vom reflektierten Teil des auffallenden Lichtes herrührt, einen Streifen roten Fluoreszenzlichtes und zwischen grün und rot ein breites, schwarzes Absorptionsband. Die Spaltbreite muß wegen der geringen Intensität des Fluoreszenzlichtes der grünen Zellen möglichst weit gewählt werden, etwa 2,5 mm; denn nur bei so weitem Spalte fällt genügend Fluoreszenzlicht ins Spektroskop, um ein einigermaßen helles Fluoreszenzband zu erzeugen. Aber auch dann ist nur bei sehr hoher Intensität des blauen Lichtkegels die Fluoreszenz der grünen Zellen deutlich wahrnehmbar, erscheint aber bei der von mir erreichten Lichtintensität als sehr helles rotes Band. Das Spektroskop besaß eine Skala, deren Teile in etwa 1 mm Breite erschienen, so daß bis auf $\frac{1}{4}$ Skalenteil genau abgelesen werden konnte. Die Skala wurde geeicht mittels der gelben Doppelinie Na und der roten H-, Li- und K-Linie. Zur Kontrolle wurden auch die Fraunhoferschen Linien a, B und C bestimmt. Die Dispersionskurve (Abb. 2) zeigt, daß in dem uns ausschließlich interessierenden Spektralbereich etwa zwischen B (687) und C (656) auf 7 Skalenteile ($30,6 - 23,6 = 7$) $31 \mu\mu$ ($687 - 656 = 31$) entfallen, also auf einen Skalenteil $4,5 \mu\mu$. Da, wie erwähnt, noch $\frac{1}{4}$ Skalenteil deutlich ablesbar ist, so kann in diesem Spektralbereich bis auf fast $1 \mu\mu$ genau abgelesen werden. Aber diese Genauigkeit gilt nur für scharfe Linien, wie sie nur bei sehr engem Spalt und hoher Intensität zu erreichen sind. Zur Beobachtung des Fluoreszenzlichtes mußte ich aber wegen dessen relativ geringer Intensität die Spaltbreite 2,5 mm verwenden. Dabei entsteht aber natürlich anstatt einer

scharfen Linie ein recht verschwommenes Band, so daß die Genauigkeit der Messung sehr beeinträchtigt wird. Da das Spektroskop einen asymmetrischen Spalt besitzt, und dies ist die Regel für kleinere und mittlere Spektroskope, weshalb ich

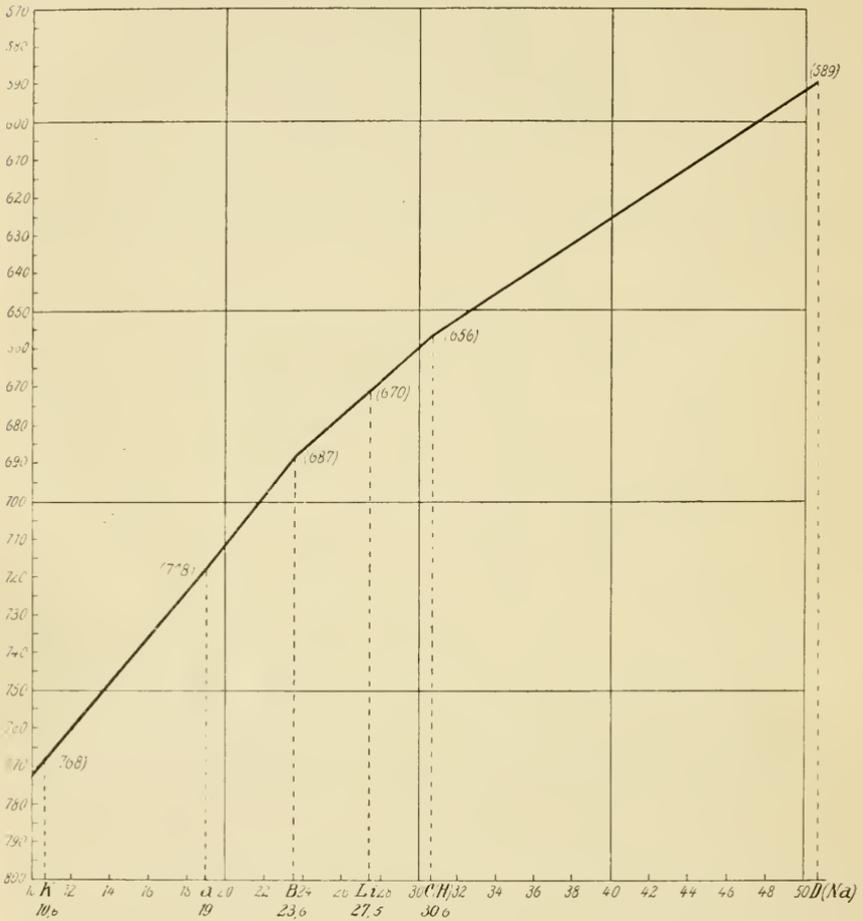


Abb. 2.

auf diesen Punkt besonders eingehe, muß eine Korrektur der bei 2,5 mm Spaltweite abgelesenen Skalenwerte vorgenommen werden. Denn nur bei symmetrischem Spalt würde ja der Mittelwert eines bei dieser Spaltweite bestimmten Bandes zu-

sammenfallen mit dem Werte desselben Bandes bei enger Spaltweite, und bei enger Spaltweite ist ja das Spektroskop geeicht. Zur Ermittlung der Größe der Korrektur verfähre ich folgendermaßen: Zunächst wird die rote Wasserstofflinie bei engem Spalt aufgenommen. Sie fällt auf 30,6. Nunmehr wird die die Spaltbreite regulierende Schraube um 5 volle Umdrehungen gedreht, wobei der Spalt sich auf 2,5 mm erweitert. Dabei verbreitert sich die schmale Wasserstofflinie zu einem breiten Bande, indem die rechte Kante eben wegen der Asymmetrie der Spaltbackenbewegung unverrückt bleibt, während die linke mit zunehmender Erweiterung nach links vorrückt und zwar bis 22. Bei der Spaltweite von 2,5 mm gibt also die Wasserstofflinie ein Band zwischen 30,6 und 22,0, d. h. sie fällt auf 26,3 als Mittelwert. Bei engem Spalt fällt sie auf 30,6, d. h. sie ist bei 2,5 mm weitem Spalt um $30,6 - 26,3 = 4,3$ Skalenteile nach dem langwelligeren Teil des Spektrums verschoben. Umgekehrt muß ich also, um die bei 2,5 mm Spaltweite abgelesenen Werte auf die bei engem Spalt geeichte Skala zu beziehen, zu jedem Werte 4,3 Skalenteile hinzuzählen. Ich muß also, da ich ja das Fluoreszenzlicht bei 2,5 mm weitem Spalte ablese, zu dessen abgelesenem Mittelwerte 4,3, abgerundet 4 Skalenteile zuzählen, um die wahre Lage des Fluoreszenzmaximums zu erhalten.

II. Physikalisches über die Fluoreszenz.

Zum Verständnis der folgenden Versuche müssen einige physikalische Erörterungen vorausgeschickt werden.

a) Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Intensität und Wellenlänge des erregenden Lichtes und vom Brechungskoeffizienten des Lösungsmittels.

Die Intensität des Fluoreszenzlichtes ist im allgemeinen der des erregenden Lichtes proportional. Erregend wirken nur Strahlen, die absorbiert werden, doch muß nicht jedem Absorptionsstreifen ein Fluoreszenzstreifen entsprechen. Das absorbierte Licht erleidet bei seiner Emission als Fluoreszenzlicht eine Veränderung der Wellenlänge und zwar gilt hierfür die Stockessche Regel, daß das Fluoreszenzlicht stets von geringerer Brechbarkeit, also größerer Wellenlänge ist als das erregende. Zwar sind eine Anzahl von Ausnahmen von dieser

Regel bekannt, doch ist es nach den neueren physikalischen Anschauungen über den Mechanismus der Absorption und Emission im Sinne der Quantentheorie strenge Gültigkeit zu erwarten, und dürften sich vielleicht die Ausnahmen als scheinbare erweisen. Für Lösungen fluoreszierender Stoffe gilt: Mit dem Brechungskoeffizienten des Lösungsmittels ändert sich im allgemeinen die Lage des Fluoreszenzbandes, und zwar rückt es analog einer von Kundt für die Absorption gefundenen Regel mit steigendem Brechungskoeffizienten des Lösungsmittels nach der schwächer brechbaren Seite des Spektrums. Am geeignetsten zur Erregung von Fluoreszenz ist im allgemeinen möglichst kurzwelliges ultraviolettes Licht. Dies hat ja zur Einrichtung des sogenannten Fluoreszenzmikroskopes geführt, bei dem mit ultraviolettem Licht durch Quarzlinsen und -objektträger hindurch beleuchtet wird. Die folgenden Angaben beziehen sich natürlich stets auf das, was mit meiner Versuchsanordnung zu sehen ist. Die Angaben bei Beleuchtung mit konzentriertem ultraviolettem Licht werden vermutlich noch in sehr vielen Fällen schwache Fluoreszenz ergeben, in denen ich keine mehr finde. Die Bedeutung der aus meinen Ergebnissen gezogenen Schlüsse wird dadurch in keiner Weise beeinflusst. Denn die relativen Intensitätsunterschiede der Fluoreszenz, auf die es ankommt, sind unabhängig davon, ob ein in meiner Versuchsanordnung nicht mehr fluoreszierender Körper in einer anderen noch schwach fluoresziert.

b) Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration einer fluoreszierenden Lösung.

Diese Abhängigkeit sowie die von der Schichtdecke der Lösung ist sehr kompliziert. Denn es ändert sich ja mit Konzentration und Schichtdecke die Absorption des erregenden wie des Fluoreszenzlichtes durch das fluoreszierende Medium bzw. auch dessen Lösungsmittel. Auch indem der molekulare Zustand der Lösung mit der Konzentration sich ändert (Hydratation, Jonisation usw.), findet eine Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Konzentration statt. Im allgemeinen nimmt die noch in minimalen Konzentrationen wahrnehmbare Fluoreszenzintensität bis zu einem Maximum mit steigender Konzentration zu, um dann mit steigender Konzentration abzu-

nehmen, eine Regel, die, wie mich eigene Beobachtungen lehrten, auch für Lösungen von Chlorophyll gilt. Die Fluoreszenz von Molekülen und Atomen wird bei Dämpfen vernichtet durch einen oder mehrere Zusammenstöße. Obwohl hierüber für fluoreszierende Lösungen noch keine experimentellen Untersuchungen vorliegen, ist mit Sicherheit anzunehmen, daß auch bei ihnen sowohl die Zusammenstöße der fluoreszierenden Moleküle miteinander wie mit Molekülen des Lösungsmittels die Fluoreszenz schwächen bzw. vernichten werden. Und da ja mit zunehmender Konzentration auch der Prozentsatz der Zusammenstöße zunimmt, wird auch dies Moment als schwächender Faktor für die Fluoreszenz von hochkonzentrierten Lösungen fluoreszierender Stoffe mitwirken.

c) Abhängigkeit der Fluoreszenz von Trübungen.

Die Schwächung bzw. Vernichtung der Fluoreszenz einer Lösung durch trübende Beimengungen ist schon lange bekannt, aber die dieser Erscheinung zugrunde liegenden physikalischen Vorgänge werden meist einseitig oder falsch dargestellt. Schüttelt man eine alkoholische Chlorophylllösung mit irgendwelchen trübenden Substanzen, z. B. Stärkekörnchen, Sand oder Öl, so verschwindet die Fluoreszenz für das freie Auge (Kohl, Czapek, Molisch). Die Trübung beruht ja darauf, daß an den trübenden Teilchen sehr viel Licht reflektiert und zerstreut wird. Dieses reflektierte und zerstreute Licht vereinigt sich nun im Auge mit dem Fluoreszenzlicht zu einem einheitlichen Farbeindruck, der infolge der relativ zur hohen Intensität des dispergierten Lichtes geringen Intensität des Fluoreszenzlichtes nicht der Farbe des Fluoreszenzlichtes entspricht, sondern eher der des auffallenden oder einen weißlichen Ton hat. Aber nur für das freie Auge verschwindet das Fluoreszenzlicht; denn man braucht das von solchen getrübten Lösungen emittierte Licht nur spektroskopisch zu untersuchen z. B. mit der beschriebenen Versuchsanordnung, um es sofort im Spektroskop zu erblicken. Das Spektroskop hat ja im Gegensatz zu unserem Auge die Fähigkeit, das gesamte von der trüben Lösung emittierte Licht in die verschiedenen Farbbezirke zu zerlegen. Es trennt das blaue und grüne dispergierte Licht vom roten Fluoreszenzlicht. Wenn aber auch die trübende Substanz das Fluoreszenzlicht

keineswegs, wie es für die Beobachtung mit freiem Auge scheint, vernichtet, so verdeckt sie es auch nicht nur, sondern sie schwächt es auch; denn teils wird die Intensität des fluoreszenzerregenden Lichtes durch Absorption und Reflexion an den trübenden Teilchen geschwächt und damit die ihr proportionale Intensität des Fluoreszenzlichtes, teils wird letzteres direkt durch Dispersion und Absorption an den trübenden Teilchen geschwächt und schließlich dürfte auch hier Fluoreszenzvernichtung durch Erhöhung der Zahl der Zusammenstöße unter Umständen eine Schwächung bedingen. So ist auch folgender, bereits, wenn auch unvollkommen, von Reinke angegebener und theoretisch verwerteter Versuch zu erklären. Löst man festes Chlorophyll in geschmolzenem Paraffin, so fluoresziert es genau so wie in alkoholischer Lösung für das freie Auge sichtbar, sowie aber das Paraffin erstarrt, verschwindet die Fluoreszenz für das freie Auge erst fast völlig, nach einiger Zeit völlig. Im Spektroskop sieht man aber auch noch längere Zeit nach dem Erstarren den Fluoreszenzstreifen in wenig geminderter Intensität. Auch hier ist zunächst das Verschwinden der Fluoreszenz wesentlich nur für das freie Auge vorhanden, und durch die beim Erstarren des Paraffins auftretende Trübung und Lichtzerstreuung desselben bedingt. Hier kommt aber gegenüber dem Fall der Alkohol-Stärke-Chlorophylllösung noch ein zweiter Umstand hinzu. Während nämlich unmittelbar und kurze Zeit nach dem Beginn des Erstarrens die Fluoreszenz des Chlorophylls im Paraffin nur wenig vermindert wird, wird sie im Laufe der Zeit immer schwächer. Das geschmolzene Paraffin gewinnt wegen seines unscharfen Schmelzpunktes beim Erstarren an freier Luft erst sehr langsam die völlig feste Konsistenz, die es bei Zimmertemperatur hat. Je fester es nun wird, um so schwächer wird die Fluoreszenz und erlischt schließlich. Offenbar hat also im festen Zustand das Chlorophyll die Fähigkeit zur Fluoreszenz verloren. Das zeigt übrigens auch ein Parallelversuch mit festem kristallisiertem Chlorophyll.

d) Gegenwärtige Anschauungen über den Mechanismus der Fluoreszenz.

Die gesamten neueren physikalischen Vorstellungen über Lumineszenzerscheinungen im weitesten Sinne des Wortes

gründen sich auf die Rutherford-Bohrschen Atommodelle. Ich kann über sie natürlich nur das zum Verständnis notwendige kurz andeuten. Die Atome werden gedacht als bestehend aus positiven Kernladungen, umkreist von den negativen Elektronen in Bahnen von ganz bestimmten Radien. Dabei ist Absorption bzw. Emission von Licht nur möglich, wenn ein Elektron von einer Bahn in eine andere dem Kern entferntere bzw. näher liegende Bahn übergeht. Zur Entfernung des Elektrons vom positiven Kern muß ja Arbeit geleistet werden und diese leistet eben die Energie des absorbierten Lichtes. Umgekehrt wird die bei der Annäherung gewonnene Arbeit als Lichtenergie emittiert. Die Lichtemission und Absorption findet nicht durch Übergehen in kontinuierlich aneinandergrenzende Bahnen statt, sondern kann nur quantenmäßig stattfinden, indem von allen möglichen nur bestimmte diskontinuierliche Bahnen bei der Absorption und Emission eingenommen werden können, d. h. die Energie wird nicht kontinuierlich, sondern diskontinuierlich nur in bestimmten Quanten absorbiert bzw. emittiert. Aus dieser Vorstellung leitet sich als entsprechende die Vorstellung über die Fluoreszenz ab, daß in dem fluoreszierenden Atom unter dem Einfluß des absorbierten Fluoreszenz erregenden Lichtes Elektronen in Bahnen springen, die dem Kern weiter entfernt sind als im unbelichteten Zustand. Der Lichtzustand ist jedoch instabil und deshalb springt nach einer sehr kurzen Zeit das Elektron wieder in die frühere Bahn. Die Entfernungen der bei diesem Vorgang in Betracht kommenden Bahnen, zwischen denen das Elektron springt, bestimmen die Energie, also die Farbe und Breite des Emissions- bzw. Fluoreszenzspektrums und die außerordentlichen Erfolge, die gerade auf diesem Gebiete die Theorie durch die quantitative Berechnung auch der feinsten Einzelheiten der Emissionsspektren erzielt hat, sind ja einer der Grundpfeiler, auf dem sie ruht.

Für das Verständnis späterer Versuche ist noch die Darlegung der Anschauung wichtig, die sich aus den geschilderten Vorstellungen für den Mechanismus der photochemischen Reaktion ergibt.

Die ursprüngliche Vorstellung, daß die photochemischen

Reaktionen mit Elektronenabspaltungen zusammenhängen, ist ja dadurch einwandfrei widerlegt, daß man bei photochemisch reagierenden Gemischen bei Belichtung keine Vermehrung der elektrischen Leitfähigkeit auffinden konnte, wie dies bei Elektronenabspaltung der Fall sein müßte. Auch die Annahme, daß die primäre Lichtwirkung in der Aufspaltung von Molekülen in elektrisch neutrale Atome bestehe, läßt sich nicht mehr recht mit dem vorliegenden Tatsachenmaterial vereinigen. Vielmehr muß man entsprechend den oben entwickelten Anschauungen über den Atombau annehmen (Stern und Volmer), daß unter dem Einfluß des absorbierten Lichtes in den photochemisch reagierenden Atomen Elektronensprünge bei der Lichtabsorption stattfinden und zwar in der Richtung von der positiven Kernladung weg. Der Vorgang der Lichtabsorption ist im photochemisch reaktionsfähigen Atom derselbe, gleichviel, ob es nachher wirklich chemisch reagiert oder nicht. Der Vorgang der Energieabgabe verläuft als chemische Reaktion, wenn das Atom dazu Gelegenheit hat, zu reagieren, als Lichtemission oder Wärmeabgabe, wenn es diese Gelegenheit nicht hat.

III. Die Fluoreszenz grüner Zellen.

Als Versuchsmaterial dienten lebende oder tote Blätter aus den verschiedensten Ordnungen des Pflanzenreiches, vor allem aber die von O. Warburg für seine Assimilationsuntersuchungen benutzten Chlorellen, die ich der Freundlichkeit von Herrn Prof. O. Warburg verdanke. Sie wurden in Knopscher Nährlösung in Waschflaschen gezüchtet bei Dauerbeleuchtung mit einer elektrischen Lampe von 50 Kerzen in einem Abstände von etwa 10—15 cm von der Lichtquelle. Die Waschflaschen wurden dauernd von einem langsamen Blasenstrom eines 4 proz. Kohlensäure-Luftgemisches durchperlt. Die Vermehrung war sehr stark. Dieses Material gestattet bei allen Versuchen eine sehr bequeme Handhabung und Beeinflussung, da man den in Reagenzgläsern befindlichen Algensuspensionen nur Narkotika oder Gifte in den verschiedensten Konzentrationen zuzusetzen braucht, um sogleich eine alle Zellen treffende Beeinflussung hervorzurufen.

Tote wie lebende grüne Blätter aus den verschiedensten

Familien und Klassen des Pflanzenreiches, seien es Moose, Farne, Mono- oder Dikotyledonen, zeigten ein hellrotes Fluoreszenzband. Ich erhielt in meiner Versuchsanordnung ebenso wie Hagenbach stets nur ein unstrukturiertes Fluoreszenzband, obwohl wegen der verschiedenen Wellenlänge der Fluoreszenzbänder von Chlorophyll a und b ein doppeltes Band zu erwarten war und Tswett auch bei Spirogyren mit dem Fluoreszenzmikroskop ein doppeltes Band gefunden hat. Vielleicht gibt das Fluoreszenzmikroskop auch in den von mir untersuchten Fällen doppelte Bänder. Sehr schöne Fluoreszenz geben hellgrüne Suspensionen von Chlorellen. Läßt man zentrifugierten Chlorellenschleim eintrocknen, wodurch er nach den Beobachtungen Warburgs getötet wird und nimmt den Trockenrückstand mit Wasser wieder auf, so erhält man ebenfalls die typische Fluoreszenz. Betrachten wir nun diese in ihrer Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. Die Helligkeit des Fluoreszenzlichtes nimmt ab mit der Helligkeit des erregenden Lichtes. Je weiter man ein Blatt von dem engsten und hellsten Punkte des Strahlenkegels entfernt, und je mehr man es in die breiteren und lichtschwächeren Teile hineinschiebt, um so geringer wird die Helligkeit des Fluoreszenzstreifens, um schließlich, bei noch recht beträchtlicher Intensität des beleuchtenden Lichtes, zu verschwinden, d. h. unterhalb die Reizschwelle des Auges für rotes Licht zu sinken. Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von Trübungen zeigt sehr schön der Vergleich von zentrifugierten und nichtzentrifugierten Chlorellen. Eine meiner Kultur entnommene Probe enthält außer den Algen noch mannigfache trübende Bestandteile, teils anorganischer Natur, wie z. B. Eisenkarbonat, teils organischer Natur, wie Bakterien. Eine solche Suspension zeigt die Fluoreszenz dem freien Auge unter meinen Versuchsbedingungen nur als rötlichen Schimmer. Reinigt man dagegen die Suspension durch mehrfaches Zentrifugieren und Auswaschen (vgl. Warburg) von diesen trübenden Bestandteilen, so bekommt man auch für das freie Auge eine schöne helle, rote Fluoreszenz der Suspension. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration, die ich für Lösungen angegeben hatte, zeigt sich auch sehr schön an Chlorellensuspensionen verschiedener Konzentration. Nimmt man sie ganz außer-

ordentlich verdünnt, so ist der Fluoreszenzstreifen gar nicht wahrnehmbar, er wird es bei Steigerung der Konzentration und wächst in seiner Helligkeit mit zunehmender Konzentration bis zu einem Maximum, um bei weiterer Erhöhung der Konzentration wieder an Helligkeit zu verlieren. Offenbar sind auch hier zum Teil die gleichen Gründe für die Erscheinung maßgebend wie für die analoge Erscheinung bei Lösungen: Änderung der Absorption des fluoreszenzerregenden- und Fluoreszenzlichtes mit der Konzentration und dadurch bedingte Differenzen in der Schichtdicke, aus der das Fluoreszenzlicht ins Spektroskop gelangt. Das rote Fluoreszenzlicht liegt ja in einem Bezirke starker Absorption durch das Chlorophyll und bei Verwendung dunkelgrüner, konzentrierter Algensuspensionen gelangt infolgedessen nur das Fluoreszenzlicht der obersten, der Reagenzglaswand anliegenden Schichten ins Auge, während das aus den tieferen Schichten kommende von den vorderen Schichten absorbiert wird. Bei sehr verdünnten Suspensionen gelangt dagegen verhältnismäßig viel Fluoreszenzlicht aus den tieferen Schichten ins Spektroskop und Auge, da ja in diesem Falle die Absorption der vorderen hellgrünen Schichten viel geringer ist als die gleichdicker dunkelgrüner. Entsprechende Betrachtungen gelten natürlich auch für das Fluoreszenz erregende Licht. Man kann sich von der Erscheinung, daß mit dem Konzentrationsgrad sich die Schichttiefe und Helligkeit des Fluoreszenzlichtes ändert, leicht an sorgfältig zentrifugierten und gewaschenen Suspensionen überzeugen, die verdünnt durch die ganze Schichtdicke des Reagenzglases fürs freie Auge sichtbar fluoreszieren, konzentriert nur an der Oberfläche sichtbares Fluoreszenzlicht emittieren.

Einige Versuche stellte ich auch mit einer Quecksilberdampfbogenlampe an. Der glühende Quecksilberdampf zeigt kein kontinuierliches Spektrum, sondern ein Linienspektrum aus 7 Linien (eine violette, eine blaue, zwei grüne, zwei gelbe, eine schwache rote). Das Licht erweckt für das Auge den Eindruck außerordentlicher Helligkeit, erweist sich aber zur Erregung der Fluoreszenz nicht sonderlich geeignet. Gerade das Licht der Linien im Grün und Gelb bedingt ja einen wesentlichen Teil der Helligkeit dieser Lichtquelle für das Auge, wird aber

vom Chlorophyll relativ schwach absorbiert und wirkt eben infolgedessen auch nur schwach erregend.

Auch ohne Spektroskop läßt sich die Fluoreszenz unzentrifugierter Algen und von Blättern leicht nachweisen. Man braucht nämlich das Spektroskop nur durch ein Filter zu ersetzen, das das reflektierte blaue und grüne Licht absorbiert, dagegen das Fluoreszenzlicht durchläßt, dann muß die Algensuspension durch dies Filter betrachtet rot aussehen. Ein sehr geeignetes Filter hierfür stellt eine rote Glasscheibe dar, die im Handel als Eisenbahnsignalrotscheibe erhältlich ist. Durch sie betrachtet erscheint die vom blauen Strahlenkegel getroffene Algensuspension blutrot. Weniger gut eignet sich eine durch Silber gelbgefärbte Glasscheibe, wie sie seit Stokes für derartige Beobachtungen oft verwendet und empfohlen worden ist. Sie läßt nämlich noch sehr viel grün durch, und da auch die Kupferoxydammoniaklösung grün durchläßt, so erscheint die Algensuspension an der stark reflektierenden Vorder- und Hinterwand des Reagenzglases grün und nur an seiner Mitte, wo die Intensität des reflektierten Lichtes gering ist, rot. Grüne Blätter erscheinen infolge der starken Reflexion grünen Lichts an ihrer Oberfläche durch das Silberglas betrachtet grün, durch die Eisenbahnsignalrotscheibe rot.

Die Lage des Fluoreszenzbandes lebender Blätter ist bereits von Hagenbach bestimmt worden. Hagenbach benutzt eine willkürliche Skala, die folgendermaßen bestimmt wird $A = 0$, $a = 34$, $B = 63$, $C = 96$, $D = 188$, dann beginnt das Fluoreszenzband bei 49, hat sein Maximum bei 62 und geht bis 79, auf $\mu\mu$ umgerechnet ergibt das Ausdehnung von 701 bis 672 $\mu\mu$, Maximum 688 $\mu\mu$. Bei Tswett finde ich für *Oscillaria* angegeben 630—670 $\mu\mu$, *Spirogyra* hat zwei Bänder 650—660 $\mu\mu$ und 670—685 $\mu\mu$. Meine eigenen Untersuchungsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Abb. 3 II).

	Fluoreszenzband unkorrigiert in Skalenteilen:			Fluoreszenzband korrigiert in Skalenteilen:			Maximum korrigiert in $\mu\mu$:		
	Beginn	Ende	Maximum	Beginn	Ende	Maximum	Beginn	Ende	Maximum
Chlorella	17	25	21	21	29	25	705	664	681
Trades-cantia	16	26	21	20	30	25	711	659	681

Das Maximum liegt also bei 681, während Hagenbach 688 als Maximum für Blätter und Tswett 678 als Mittelwert des zweiten Spirogyrabandes bestimmt hat. Die Übereinstimmung mit den früheren Befunden ist in Anbetracht der Breite und Unschärfe des Fluoreszenzbandes also als nicht unbefriedigend zu bezeichnen. Ob die etwa gleich viel nach rechts und links von meinem Werte liegende Abweichung der Werte von

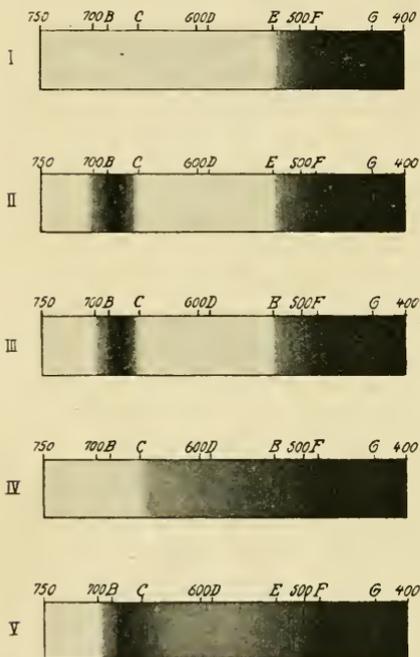


Abb. 3.

Hagenbach und Tswett auf mangelnder Anbringung der bei asymmetrischem Spalt notwendigen Korrektur oder irgendwelchen anderen in der experimentellen Anordnung begründeten Umständen beruht, oder ob ihr reale Verschiedenheiten in der Lage der Fluoreszenzbänder der Objekte zugrunde liegen, vermag ich nicht zu entscheiden. Das Fluoreszenzlicht der grünen Zellen ist nicht polarisiert, denn beim Drehen eines Analysators vor dem Okular des Spektroskopes bleibt die Fluoreszenz in allen Lagen des Analysators in gleicher Intensität erhalten. Für diesen Versuch muß man die Suspensionen in Gefäßen mit planparallelen Wänden beobachten, da durch Verwendung gekrümmter Glaswände (Reagenzgläser) täuschende Polarisationserscheinungen hervorgerufen werden.

IV. Die Fluoreszenz von Chlorophylllösungen.

Bereits bei früheren Autoren z. B. Czapek, Liebalddt, Willsätter findet man die Angabe, daß das kolloide Chlorophyll nicht fluoresziert. Aber offenbar handelt es sich bei allen diesen Angaben stets um Beobachtungen mit freiem Auge.

Die oben mitgeteilten Versuche und Darlegungen haben indessen gezeigt, daß die Beobachtung mit freiem Auge eine bestimmte Antwort darauf nicht geben kann, ob eine Lösung fluoresziert oder nicht fluoresziert, die zahlreiche trübende Teilchen enthält, und das ist ja bei der kolloiden Chlorophylllösung der Fall. Ich habe deshalb kolloide Chlorophylllösungen, die nach den Methoden Willstätters dargestellt waren — einige Versuche wurden mit Rohchlorophyll ausgeführt —, in meiner Versuchsanordnung auf Fluoreszenz untersucht und auch bei der spektroskopischen Untersuchung keine Fluoreszenz gefunden. Das Prinzip der Darstellung dieser Lösungen ist dies, daß man molekulardisperse Chlorophylllösungen z. B. in Azeton stark mit Wasser verdünnt und das echt lösende Lösungsmittel vertreibt. Dieser letztere Punkt, völlige Austreibung des echt lösenden Lösungsmittels, ist von größter Bedeutung, da man sonst noch schwach fluoreszierende Lösungen erhält aus Gründen, auf die ich im weiteren zurückkomme. Die Beobachtung, daß das kolloide Chlorophyll nicht fluoresziert, ist im Zusammenhang mit der oben festgestellten deutlichen Fluoreszenz der lebenden Zellen speziell der genannten Algensuspensionen deshalb von hohem Interesse, weil nach Ansicht zahlreicher Forscher das Chlorophyll in der Zelle in kolloider Lösung enthalten sein soll. Ich sagte mir also, daß wenn diese Anschauung richtig wäre, das kolloide Chlorophyll der Chloroplasten durch irgendwelche in diesen anwesende Substanzen eine derartige Beeinflussung erfahren müsse, daß es in den fluoreszierenden Zustand, in dem es ja in den Zellen enthalten ist, versetzt wird. In Frage kamen Stoffe von Eiweiß-, Kohlehydrat- und Lipoidnatur, wobei ich unter Lipoid nicht im Sinne des organischen Chemikers eine spezielle Gruppe lezithinähnlicher Substanzen verstehe, sondern vielmehr eine überaus weitgefaßte Gruppe, die alle in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten den Fetten, echten Lipoiden und hohen Kohlenwasserstoffen usw. nahestehenden Verbindungen umfaßt, in welchem Sinne z. B. auch Czapek von Lipoiden spricht. In den Versuchen wurde meist so verfahren, daß die kolloide Chlorophylllösung mit den verschiedenen Substanzen kurze oder längere Zeit geschüttelt wurde. Es ergab sich nun, daß weder wäßrige Eiweiß- noch Kohlehydrat-Chlorophyll-

gemische irgendwelche Fluoreszenz ergaben. Sowie man dagegen die kolloide Chlorophylllösung im Reagenzglas mit einigen Tropfen einer lipoiden Substanz schüttelt, — bei flüssigen Lipoiden genügt kürzere Zeit, bei festeren ist längere Zeit des Durchschüttelns erforderlich — so erhält man eine Emulsion, die fluoresziert. Der Vorgang, der sich dabei abspielt, ist, wie schon der Augenschein lehrt, der, daß das Chlorophyll, das in den lipoiden Substanzen leicht löslich ist, in diese übertritt und die Tröpfchen dunkelgrün färbt und in diesen Tröpfchen gelöst nunmehr die Fähigkeit hat zu fluoreszieren. In folgender Tabelle sind einige Versuchsergebnisse aus einer großen Zahl von Versuchen mit den verschiedenartigsten Substanzen zusammengestellt, wobei + fluoreszierend, — nicht fluoreszierend bedeutet.

Kolloide Chlorophyllösungen mit:

Hühnereiweiß	—	Triolein	+
Pepton	—	Oleinsäure	+
Albumin	—	Lezithin	+
Glykokoll	—	Cholesterin	+
Succinamid	—	Lanolin	+
Stärke	—	Walrat	+
Dextrin	—	Seife	+
Traubenzucker	—	Leinöl	+
Rohrzucker	—	Rizinusöl	+
Glyzerin	—	Paraffin flüssig	+

Dabei bedeutet nicht fluoreszierend stets, daß nicht das typische rote Fluoreszenzband des Chlorophylls auftritt. Es zeigen nämlich auch ein Teil der eiweiß- und kohlehydratartigen Substanzen Fluoreszenz, die sich in einer Verbreiterung des bei nichtfluoreszierenden Stoffen nur bis E reichenden Spektrums oft bis ins rote Spektralgebiet hinein äußert. Und ebenso stimmen die Fluoreszenzspektren des Chlorophylls in den lipoiden Substanzen unter Umständen insofern nur wenig mit dem der grünen Zellen überein als sich infolge der Fluoreszenz der lipoiden Substanzen selbst ein mehr oder weniger kontinuierliches Spektrum zeigt, das Summe der Fluoreszenzbänder des Chlorophylls und der Lipode ist. Aber die Stärke, in der sich dieses Auftreten der Fluoreszenz des Eiweiß- oder Lipoidkörpers zeigt, wird bestimmt durch das Verhältnis von Eiweiß- bzw.

Lipoidmenge zur Chlorophyllmenge. Enthält die Emulsion verhältnismäßig viel Eiweiß bzw. Lipoid so tritt deren Fluoreszenzspektrum stark hervor. Je höher jedoch der relative Chlorophyllgehalt wird, umso mehr tritt das Fluoreszenzband des Chlorophylls hervor und umso mehr tritt die Fluoreszenz von Eiweiß bzw. Lipoid zurück. So zeigt z. B. eine Lezithinemulsion in reinem Wasser ein kontinuierliches Spektrum bis 656 $\mu\mu$ (Abb. 3, IV), von Pepton bis 645 $\mu\mu$ während das von einer nicht fluoreszierenden Tonzelle reflektierte Licht nur bis 530 $\mu\mu$ (Abb. 3, I), reicht, sodaß also die auftretende Verbreiterung ausschließlich auf Kosten der Fluoreszenz von Lezithin bzw. Pepton zu setzen ist. Eine chlorophyllarme Lezithin-Wasseremulsion zeigt infolgedessen ein kontinuierliches Spektrum bis 698 $\mu\mu$ (Abb. 3, V). Aber eine Lezithin-Wasseremulsion, bei der das Chlorophyll in den Lezithintröpfchen eine sehr konzentrierte Lösung bildet, zeigt die für die grünen Zellen typische Auslöschung zwischen dem reflektierten Grün (530 $\mu\mu$) und dem roten Fluoreszenzlicht (659—698 $\mu\mu$) (Abb. 3, III). Hier ist also von der Fluoreszenz des Lezithins nichts mehr zu merken. Und das ist ja auch ohne weiteres verständlich, da ja erstens mit dem steigenden Chlorophyllgehalt der Emulsion auch ein steigender Prozentsatz des auffallenden Lichtes vom Chlorophyll absorbiert wird und infolgedessen verhältnismäßig wenig Licht vom Lezithin absorbiert wird, so daß dieses auch nur verhältnismäßig schwach fluoreszieren kann, ferner aber auch weil ja mit dem steigenden Chlorophyllgehalt auch die vom Licht getroffene Lezithinoberfläche immer geringer wird, während die Chlorophylloberfläche immer größer wird. Betrachten wir nun die Lage des Fluoreszenzbandes und -maximums an der Hand der Tabelle.

	Beginn in Sktl.	Maximum in Sktl.	Ende in Sktl.	Maximum korr.	Maximum korr. in $\mu\mu$
Chlorophyll in Alkohol	22	27	32	31	654
Chlorophyll in Lezithin	18	22	26	26	677
Chlorella	17	21	25	25	681

Vergleicht man die Lage des Fluoreszenzmaximums des Chlorophylls in Lezithinemulsionen und lebenden

Zellen so sieht man, daß beide Werte sehr nahe Übereinstimmung zeigen. Chlorophyllezithinemulsionen mit sehr hoher Chlorophyllkonzentration und grüne Zellen zeigen ein nahezu übereinstimmendes Fluoreszenzspektrum.

V. Ultramikroskopische Untersuchungen.

Ultramikroskopische Untersuchungen von Chlorophyllösungen sind bereits verschiedentlich z. B. von Gaidukow und Herlitzka vorgenommen worden. Sie untersuchten eine alkoholische Chlorophylllösung und gaben an, daß man einen optisch leeren roten Fluoreszenzkegel erhält. Meine eigenen Beobachtungen durchgeführt mit einem Spaltultramikroskop von Zeiß nach Siedentopf und Zsigmondy mit Wasserimmersion bestätigen diese Beobachtung. Dasselbe Bild eines optisch leeren, blutroten Fluoreszenzkegels ergeben Chlorophyllösungen in Äther, Paraffinöl, Rizinusöl, Leinöl, Triolein, Oleinsäure. Das Chlorophyll ist also in diesen Lösungen echt gelöst. Dagegen ergab die Untersuchung der kolloiden wäßrigen Chlorophylllösung auch in Ultramikroskop keinerlei Fluoreszenz. Man sieht zahlreiche meist weißliche Mikronen im Gesichtsfeld. Ebenso wenig zeigten irgendwelche Fluoreszenz im Spaltultramikroskop die wäßrigen Lösungen von Chlorophyll + Eiweiß, + Zucker, + Glycerin, + Stärke. Es ergibt sich also, daß in den Lösungsmitteln, in denen das Chlorophyll fluoresziert, es echt gelöst ist, daß es dagegen in den nichtfluoreszierenden Lösungen kolloid gelöst ist. Rählmann hat die »Chlorophylli puri solutio aquosa« von E. Merck, Darmstadt ultramikroskopisch untersucht und gibt an, »die stark verdünnte Lösung zeigt einen sehr intensiven blutroten Kegel, welcher bei starkem Licht sich in zahllose staubförmige, kleinste blutrote Teilchen auflösen läßt«. Meine eigenen Untersuchungen an demselben Präparat bestätigen diese Angaben nicht. Ich finde wohl einen blutroten Fluoreszenzkegel, der aber völlig homogen ist und sich nicht in Einzelteilchen auflösen läßt. Vielmehr ist dieses Merck'sche Präparat, das nebenbei kein reines Chlorophyll ist und sich in Alkohol nicht klar löst, eine typische semikolloide Lösung, da außer dem homogenen roten Fluoreszenzkegel noch

zahlreiche Mikronen meist weißlich und grünlich und höchstens ganz vereinzelt rötlich schimmernd zu sehen sind, mit charakteristischen strahlenförmigen Beugungsbildchen. Es ist auch außerordentlich unwahrscheinlich, daß man im Ultramikroskop Chlorophyllmikronen, selbst wenn sie fluoreszieren würden, bei der gewöhnlichen ultramikroskopischen Anordnung fluoreszieren sehen könnte; denn nach allen meinen Beobachtungen über die Verdeckung des Fluoreszenzlichtes durch reflektiertes und zerstreutes Licht muß man annehmen, daß auch das etwaige Fluoreszenzlicht der kolloiden Chlorophyllteilchen für das Auge völlig von dem grünlich weißen Tyndallicht verdeckt werden würde. Wenn man in den Strahlengang ein Blaufilter einschalten würde und durch ein Spektralkular die ultramikroskopische Beobachtung vornehmen würde, so wäre die Möglichkeit gegeben die Fluoreszenz auch der Chlorophyllmikronen zu sehen, wenn sie überhaupt vorhanden wäre. Dies ist ja aber nach meinen makrospektroskopischen Beobachtungen aller möglichen kolloiden Chlorophylle und Chlorophyllderivate nicht der Fall und demnach auch bei der Chlorophylli puri solutio aquosa, bei der ich den angegebenen Weg mangels eines Spektralkulars nicht beschreiten konnte, nicht anzunehmen. Denn wenn in ihr außer dem echt gelösten Anteil auch der kolloide fluoreszieren würde, so müßte die Helligkeit des Fluoreszenzstreifens im Spektroskop bei meiner Versuchsanordnung bedeutend größer sein, etwa entsprechend der einer alkoholischen Chlorophylllösung von gleichem Gehalt, während sie in Wirklichkeit deutlich schwächer ist. Auch wäre es sehr merkwürdig, daß sich dies seiner chemischen Konstitution nach unbekanntes Chlorophyllpräparat anders verhalten sollte wie das chemisch reine, da doch nach Willstätter die Fluoreszenz des Chlorophylls an die Magnesiumgruppe gebunden ist und deshalb wohl bei allen diese Gruppe enthaltenden Chlorophyllderivaten ein ähnliches Verhalten zu erwarten ist. Die Erwähnung dieser semikolloiden »chlorophylli puri solutio aquosa« führt mich dazu, auch mit einigen Worten auf das Verhalten des Chlorophylls in alkoholischen Lösungen verschiedenen Prozentgehaltes einzugehen. Liebaldt hat sich bemüht, die Grenzkonzentration verschiedener Alkohole aufzufinden, in denen sich Chlorophyll löst und dabei als Kriterium das Auftreten

oder Nichtauftreten von mit freiem Auge erkennbarer Fluoreszenz benutzt. Tatsächlich existiert eine solche scharfe Grenzkonzentration nicht. Vielmehr löst sich von dem in reinem Wasser praktisch nur im kolloiden Zustand enthaltenen Chlorophyll bei Versetzen mit Alkohol von steigendem Prozentgehalt ein steigender Prozentsatz echt. Man kann sich davon auf verschiedene Weise überzeugen. Untersucht man alkoholische Chlorophyllösungen gleichen Chlorophyllgehaltes, aber verschiedener Alkoholkonzentrationen im Spaltultramikroskop, so sieht man in einem homogenen roten Kegel mehr oder weniger weißliche Mikronen, und zwar wächst die Intensität des roten Kegels mit steigender Alkoholkonzentration, während die Zahl der Mikronen abnimmt. Dagegen nimmt bei sinkender Alkoholkonzentration die Zahl der Mikronen zu, und der rote Fluoreszenzkegel verblaßt immer mehr. Man kann den Versuch auch so anstellen, daß man Chlorophylllösung in hochprozentigem Alkohol im Spaltultramikroskop beobachtet und dann in den Trichter der Kuvette allmählich immer mehr Wasser zugibt. Dann beobachtet man, wie sukzessive die Intensität des roten Fluoreszenzkegels abnimmt, während gleichzeitig immer mehr Mikronen auftreten. Als praktische Folgerung ergibt sich daraus, daß zur Darstellung kolloider nichtfluoreszierender Chlorophyllösungen nach der Methode Willstätters das Lösungsmittel völlig vertrieben werden muß, damit nicht Spuren echt gelösten Farbstoffes eine Fluoreszenz des kolloid gelösten vortäuschen. Ähnlich wie gegenüber Alkohol verhält sich das Chlorophyll gegenüber Urethan, auch hier wird es in sehr hohen Konzentrationen echt, in niederen kolloid gelöst und der Bruchteil des echt gelösten Anteils steigt mit der Urethan-konzentration. Ferner untersuchte ich noch einige technische Chlorophyllpräparate. Je 1 cm von Mercks »Chlorophyllum liquidum, wasser- und spritlöslich (löslich in Spiritus unter 20% und destilliertem Wasser)«, wurde mit 25 ccm 96% Alkohol bzw. destilliertem Wasser verdünnt. Die alkoholische Lösung war klar und fluoreszierte stark, auch für das freie Auge sichtbar. Die wässrige Lösung war im durchfallenden Lichte klar, im auffallenden trüb und opaleszierend. Sie fluoresziert weder mit freiem Auge, noch spektroskopisch betrachtet. Ebenso

verhielt sich ein Chlorophyllum purissimum von Dr. Theodor Schuchhardt, Görlitz, eine zähe schwarzgrüne Masse. Zusammenfassend ergibt sich also als Resultat der ultramikroskopischen Beobachtungen: In fluoreszierenden Lösungen ist das Chlorophyll ganz oder teilweise echt gelöst, in nichtfluoreszierenden ist es kolloid gelöst.

VI. Schlußfolgerungen aus den Beobachtungen.

Meine experimentellen Befunde haben folgende drei miteinander vereinbarende Grundtatsachen ergeben:

1. Das Chlorophyll in den lebenden Zellen fluoresziert.
2. Das Chlorophyll fluoresziert in den Lösungen, in denen es echt gelöst ist.

3. Das Chlorophyll fluoresziert nicht in den Lösungen, in denen es kolloid gelöst ist. Daraus folgt: Das Chlorophyll ist in den Chromatophoren echt gelöst. Es entsteht die Frage: In was für einem Lösungsmittel? Diese Frage kann man von zwei Gesichtspunkten aus beantworten. Man kann ausgehen davon, daß in der Zelle im wesentlichen eiweiß-, kohlehydrat- und lipidartige Stoffe vorkommen. Der experimentelle Befund (S. 208) ergibt, daß eiweiß- und kohlehydratartige Stoffe Chlorophyll nicht echt zu lösen vermögen, wohl aber lipide. Man muß also annehmen, daß das Chlorophyll in der Zelle in einem lipoiden Lösungsmittel gelöst ist. Man kann aber auch versuchen, aus der ganzen Reihe der Stoffe, in denen sich Chlorophyll echt löst, und in denen es infolgedessen fluoresziert, diejenigen auszuscheiden, die allein unter den Verhältnissen in der lebenden Zelle in Betracht kommen. Da findet man, soweit bis jetzt untersucht, als echte Lösungsmittel vor allem hochprozentige Alkohole und Urethane, Äther und Lipide, und von diesen Stoffen kommen als Lösungsmittel für das Chlorophyll in der Zelle nur die Lipide in Betracht, die anderen scheiden schon wegen ihrer Giftigkeit aus. Nimmt man noch hinzu, daß lipide Substanzen speziell Phytosterine wie Lezithin überall bei der chemischen Analyse als Begleitstoffe des Chlorophylls aufgefunden werden, und daß die Lage des Fluoreszenzbandes einer grünen Zelle und einer Chlorophyllezithinemulsion sehr nahe Übereinstimmung zeigt, so ergibt sich als der einzige mit allen bekannten Tatsachen verein-

bare Schluß über den Zustand des Chlorophylls in der lebenden Zelle: Das Chlorophyll ist in der lebenden Zelle in einem lipoiden lezithinartigen Lösungsmittel echt gelöst.

Im folgenden will ich nun kurz eingehen auf die Stellung meiner Versuchsergebnisse zu den Anschauungen früherer Autoren. Eine ausführliche Diskussion dieser Anschauungen erscheint mir überflüssig, da ein großer Teil in offenkundigem Widerspruch mit den von mir ermittelten Tatsachen steht und somit die Wahrscheinlichkeitsgründe, aus denen man zu ihnen gekommen war, sich als nicht hinreichend stichhaltig erwiesen haben. Auch würde bei der ungeheuren Literatur, die über den Zustand des Chlorophylls in den Chloroplasten vorhanden ist, eine derartige Erörterung den Rahmen dieser Arbeit weit überschreiten. Die Ansicht, daß das Chlorophyll in der Zelle in festem Zustande erhalten sei, wird vor allem von Reinke vertreten auf Grund der Beobachtung, daß das Chlorophyll im geschmolzenen Paraffin sehr stark, im festen Paraffin sehr schwach etwa der Größenordnung nach ebenso wie die grünen Blätter fluoresziere. Diese letztere Beobachtung ist jedoch nicht vollständig und hat daher Reinke zu einer irrigen Schlußfolgerung geführt. Ich habe oben (S. 200) gezeigt, daß unmittelbar nach dem Erstarren des Paraffins das Chlorophyll noch recht stark fluoresziert und daß, je fester das Paraffin wird, umso mehr die Fluoreszenz abnimmt, um schließlich — nach einer oder einigen Stunden je nach der Höhe der Zimmertemperatur und des Paraffinschmelzpunktes — völlig zu verschwinden. Offenbar hat Reinke nicht eben lange nach dem Zeitpunkt des ersten sichtbaren Erstarrens untersucht; denn für diesen Zeitpunkt stimmt seine Behauptung von der etwa gleichen Intensität der Fluoreszenz von Blatt und erstarrtem Paraffin. Hätte er noch einmal längere Zeit später sein erstarrtes Chlorophyllparaffin untersucht, so hätte er sich davon überzeugen können, daß nunmehr die Fluoreszenz des Paraffins gleich Null ist, und daß demnach die Größenordnung der Fluoreszenz von Chlorophyll in Chloroplasten und in wirklich festem Chlorophyllparaffin — denn da das Paraffin als Gemisch von Kohlenwasserstoffen keinen scharfen Schmelzpunkt hat, so ist es eben kurz' nach dem ersten sichtbaren Erstarren noch

nicht völlig erstarrt — ganz verschieden ist. Wie erwähnt, zeigt auch das feste kristallisierte Chlorophyll keine Fluoreszenz. Je höher die Lichtintensität, je deutlicher also die Chloroplastenfluoreszenz, umso deutlicher ist dieser Unterschied. Es ist also das Chlorophyll in den Chloroplasten zweifellos nicht im festen Zustand enthalten. Man könnte freilich aus dem angegebenen Versuche folgern wollen, daß das Chlorophyll in der Zelle dann also in einem sehr zähflüssigen Lipoide eingebettet sei, eben wegen seiner der Fluoreszenz des flüssigen Chlorophyllparaffins oder der alkoholischen Chlorophylllösung gegenüber verhältnismäßig schwachen Fluoreszenz. Obwohl mir dies durchaus möglich erscheint, wird dieser Schluß vorläufig durch keine bekannten Tatsachen gefordert. Vielmehr scheint mir die hohe Konzentration des Chlorophylls in den Lipoidtröpfchen und die schwächende Wirkung der trüben Zellbestandteile die Schwäche der Fluoreszenz der Chloroplasten ausreichend zu erklären. Auch die Anschauung, daß das Chlorophyll in Chloroplasten kolloid gelöst sei, erweist sich als unhaltbar. Vor allem Willstätter hatte auf Grund der von ihm erhobenen Befunde über die gute Übereinstimmung vom Absorptionsspektrum des lebenden Blattes und kolloider Chlorophylllösung, sowie über eine gute Übereinstimmung im Verhalten von kolloidem Chlorophyll und Chloroplastenchlorophyll gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln diese Auffassung geäußert. Aber mit den von mir neu ermittelten Tatsachen, vor allem der Nichtfluoreszenz der kolloiden Chlorophylllösung auch bei spektroskopischer Beobachtung ist diese Auffassung nicht mehr zu vereinbaren, und die von Willstätter herangezogenen Tatsachen müssen anders gedeutet werden als er es getan hat. Diese Deutung im einzelnen auszuführen ist nicht Aufgabe der vorliegenden Untersuchung. Ich will nur kurz darauf hinweisen, daß vermutlich die vermittelnde Brücke die sein dürfte, daß die lipoide Chlorophyllphase im Chloroplasten vielleicht größtenteils kolloid enthalten ist und daß die kolloiden Lipoidtröpfchen eben wegen ihrer Kolloidnatur nach vielen Richtungen hin ein mit dem kolloiden Chlorophyll übereinstimmendes Verhalten zeigen werden. Z. B.: Die Verschiebung der Absorptionsstreifen des kolloiden Chlorophylls nach dem langwelligen Ende des Spek-

23833

~~12477~~

trums gegenüber der Lage der Absorptionsstreifen alkoholischer Chlorophylllösung, wie sie ja auch die Blätter zeigen, beruht, wie Iwanowski ausgeführt hat, offenbar wesentlich auf der Übereinanderlagerung von Absorptions- und Reflexionsspektrum des Chlorophylls, und diese Übereinanderlagerung tritt natürlich ebenso wie beim kolloiden Chlorophyll auch bei der kolloiden Lipoidchlorophyllemulsion auf. Und auch für das Verhältnis des Zellchlorophylls gegenüber Lösungsmitteln, für das bereits Tswett Absorptionskräfte als erklärendes Moment in Anspruch genommen hatte, werden diese Kräfte sich ähnlich äußern, gleichviel ob wir es mit kolloidem Chlorophyll oder kolloidem Lipoidchlorophyll zu tun haben. Ich möchte noch darauf hinweisen, daß in gewissem Sinne meine Ergebnisse eine Bestätigung der bereits vor vielen Jahrzehnten aufgestellten Granatheorie der Chloroplasten (N. Pringsheim, A. Meyer, Tschirsch, Wiesner) bilden, wofern man unter dieser oft von ein und demselben Forscher in den verschiedensten Varianten aufgestellten Theorie eben nur die Anschauung versteht, daß die Chloroplasten aus einer protoplasmatischen Grundsubstanz mit eingelagerten lipoiden Chlorophylltröpfchen bestehen. Neuerdings sind vor allem Kohl und Liebaldt für diese Anschauung eingetreten. Freilich lassen meine Versuche nicht die Möglichkeit einer Entscheidung darüber zu, ob nicht neben lipoidgelöstem Chlorophyll auch kolloide Chlorophyllteilchen in den Chloroplasten vorhanden sind. Doch bestehen für eine solche Annahme zur Zeit keinerlei positive Anhaltspunkte. Einige Beobachtungen Buders über auffällig geringe Fluoreszenz bei gewissen niederen grünen Organismen lassen es jedoch als nicht ausgeschlossen erscheinen, daß in diesen das Chlorophyll nicht lipoid, sondern kolloid gelöst oder fest enthalten ist¹.

Der Chloroplast ist also eine Emulsion oder ein Emulsionskolloid von Chlorophylllipoidphase und Hydroideiweißphase. Daraus ergibt sich nun einiges Weitere für den Verlauf des Assimilationsprozesses. Dieser Prozeß beginnt mit der Auf-

¹) Von Noack (Zeitschr. f. Bot. 12, 347) ist meine diesbezügliche Anschauung also nicht völlig zutreffend wiedergegeben. Im übrigen konnte diese längere Zeit nach Absendung des Manuskriptes vorliegender Arbeit erschienene wichtige Untersuchung leider nicht mehr berücksichtigt werden.

nahme der CO_2 in die Zelle und endet mit dem Aufbau von Zucker, Stärke oder anderen Assimilationsprodukten, er besteht also aus einer großen Reihe von Teilprozessen. Und diese Kette von Prozessen verläuft nun nicht in einem homogenen Medium, sondern in einem Medium aus Lipoid- und Hydroidphase. Die wahrscheinlichste Annahme dürfte sein, daß Teilprozesse in der Hydroidphase, andere in der Lipoidphase des Chlorophylls vor sich gehen. Darauf weist die Disproportionalität zwischen Chlorophyllgehalt und Assimilationstätigkeit, wie sie von Plester und Willstätter festgestellt worden ist, deutlich hin. Aber selbst wenn man annimmt, daß die gesamte Reaktionskette in der Lipoidphase verläuft, so muß doch die Aufnahme der Kohlensäure bzw. der kohlensäurehaltigen Verbindung, die reduziert wird, und die Abscheidung der Reaktionsprodukte aus der bzw. in die Hydroidphase erfolgen. Mag man sich ferner die Reaktion oder Teilreaktionen in der Grenzfläche zwischen lipoider und hydroider Phase selbst verlaufend oder die Grenzfläche lediglich als notwendige Transportzone für irgendwelche an der Reaktion beteiligte Stoffe vorstellen: eine wichtige Tatsache folgt aus allen Vorstellungen, die grundlegende Bedeutung der Grenzfläche zwischen hydroider und lipoider Phase für den Assimilationsprozeß. Nur solange diese Grenzfläche intakt und normal ist, kann auch der Assimilationsprozeß normal verlaufen und jeder Eingriff in den Chloroplasten, der diese Grenzfläche blockiert und beschlagnahmt, muß notwendig zu einer Schwächung bzw. Aufhebung der Assimilationstätigkeit führen. Eine derartige Blockade der Grenzfläche können wir aber leicht erreichen, wenn wir den Chloroplasten mit Lösungen oberflächenaktiver Stoffe zusammenbringen, deren Eigentümlichkeit ja gerade die starke Anreicherung in Grenzflächen von Medien ist, auch wenn sie in den Medien selbst nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten sind. Die primäre Wirkung dieser oberflächenaktiven Stoffe wird darin bestehen, daß sie durch ihre Ansammlung andere Stoffe aus der Grenzfläche verdrängen und dadurch etwaige normalerweise in der Grenzfläche verlaufende Reaktionen und Diffusionen stören. Die Assimilation muß also äußerst empfindlich gegen solche Stoffe sein und das hat O. Warburg

ja kürzlich gefunden. Er zeigte, daß von allen bekannten Lebensprozessen Atmung, Reizbarkeit usw. der empfindlichste gegen die Wirkung oberflächenaktiver Stoffe der Assimilationsprozeß ist. Und umgekehrt erweist sich die von Warburg gefundene Tatsache als erklärt und zu erklären durch den Verlauf der Assimilation in dem heterogenen System des lipoidhydroiden Chlorophyllkorns; denn gerade die besonders hohe Empfindlichkeit gegen oberflächenaktive Stoffe weist darauf hin, daß es sich nicht um die Hemmung an einer gewöhnlichen protoplasmatischen Grenzfläche handelt, sondern an einer besonderen Grenzfläche, wie sie eben die Grenzfläche der Chlorophylllipoidtröpfchen gegen das protoplasmatische Stroma darstellt. Da die Löslichkeit der oberflächenaktiven Stoffe im allgemeinen in der Lipoidphase größer sein wird als in der Hydroidphase, so werden bei Anwendung höherer Konzentrationen oberflächenaktiver Stoffe die Lipoidtröpfchen sich durch Aufnahme derselben vergrößern, zusammenfließen und dadurch aus dem amikronischen schließlich in einen emulsionsartigen Zustand übergehen (Liebaldt). Dies hat ja auch Liebaldt bei der Einwirkung oberflächenaktiver Stoffe in höheren Konzentrationen gefunden: tropfige Entmischung der Chloroplasten. In ihren Versuchen liegt zugleich ein Beweis dafür, daß der Angriffspunkt der oberflächenaktiven Stoffe im Chloroplasten tatsächlich die Grenzfläche zwischen Hydroid- und Lipoidphase ist.

Gewährt uns so die Erkenntnis, daß das Chlorophyll im Chloroplasten lipoid gelöst ist, ein gewisses Verständnis für manche sonst nicht ohne weiteres verständliche Tatsachen, so reicht sie doch andererseits nicht im mindesten dazu aus, uns irgendeinen Einblick in den Mechanismus des Assimilationsprozesses zu bieten. Sie ist vereinbar mit der alten Annahme, daß wir es mit einer Photoreduktion der CO_2 oder eines CO_2 -Derivates zu tun haben wie mit der neuerdings von Warburg vertretenen, daß der wesentliche Reduktionsprozeß ein rein chemischer sei, bei dem das Licht nur insofern beteiligt wäre, als es den reduzierenden Körper bildet. Sie ist aber ebensogut vereinbar mit Vorstellungen, die lichtelektrischen oder elektrochemischen Vorgängen eine wesentliche Rolle beim Prozeß

der CO₂-Reduktion zusprechen (Baur, Samsonow, Nathanson).

Ein etwas deutlicheres Bild können wir uns dagegen über die biologische Bedeutung der Tatsache machen, daß die Zelle ihr Chlorophyll in lipoider Substanz löst. Diese besteht anscheinend wenigstens teilweise darin, daß die lipoide Lösung dem Chlorophyll einen Oxydationsschutz gewährt, wenn auch freilich die bekannten Tatsachen zu einem exakten Beweis noch durchaus unzureichend sind. Wiesner hat nämlich auf Grund vergleichender Beobachtungen über die Photooxydation des Chlorophylls in der Zelle und in verschiedenen Lösungsmitteln außerhalb der Zelle die Anschauung ausgesprochen, daß das Chlorophyll in der Zelle in einem relativ wenig oxydablen Zustande enthalten sein müsse und als diesen Zustand denjenigen ölarziger Lösung des Chlorophylls bezeichnet. »Ich fand beispielsweise, daß annähernd gleich gesättigte Lösungen von Rohchlorophyll in zylindrischen Glasgefäßen, welche einen inneren Durchmesser von 1 cm besaßen, dem Sonnenlicht bei 23—25° ausgesetzt nach folgenden Zeiten sich zu entfärben begannen:

Lösung in 75%	Alkohol	nach 0,05	Stunden	
„ „	Benzol	„ 0,11	„	„
„ „	Äther	„ 0,20	„	„
„ „	Olivenöl	„ 3,50	„	«.

Hier müßten weitere kritische Untersuchungen einsetzen.

VII. Die Beziehung zwischen Assimilation und Fluoreszenzintensität.

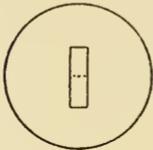
Seit den Untersuchungen Ursprungs wissen wir, daß die von einer grünen Zelle absorbierte Lichtenergie den gleichen Betrag hat, gleichviel ob die Zelle assimiliert oder nicht, daß eine merkliche photochemische Extinktion beim Assimilationsprozeß nicht stattfindet. In welcher Form aber der von der assimilierenden Zelle zur Assimilation verbrauchte Energiebetrag von der nichtassimilierenden Zelle abgegeben wird, darüber wissen wir nichts. Wir wissen nicht, ob er als ungeordnete Wärmeenergie oder in Form von Wärmestrahlung abgegeben

wird, sei es unsichtbarer Strahlung, sei es als Strahlung von der Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes. Letzteres hatte N. I. C. Müller (1873) angenommen in dem Sinne, daß ein Blatt im assimilierenden Zustande schwächer fluoreszieren sollte, als im nichtassimilierenden. Bei CO_2 -Entzug und Aufhören der Assimilation sollte also die nunmehr nicht zu chemischer Arbeit verbrauchte Energie des absorbierten Sonnenlichtes in Fluoreszenzlicht umgewandelt werden. Er suchte diese Ansicht experimentell zu bestätigen, indem er zwei Blätter, deren eines von kohlenstoffhaltiger Luft, deren anderes von einer Wasserstoffatmosphäre umspült wurde, abwechselnd auf die Stärke ihres Fluoreszenzlichtes hin untersuchte. Er konnte aber im Gegensatz zu seiner Erwartung keinen Unterschied finden, wobei er freilich das außerordentlich Primitive seiner Untersuchungsmethode betont. Auch Reinke hat eine »vikarierende« Beziehung zwischen Fluoreszenz und Assimilation angenommen: »Es ist leicht möglich, daß beide sich ausschließen, daß die grüne Zelle nicht assimilieren würde, wenn ihr Chlorophyll fluoreszierte.« In neueren Zeiten sind dann Tswett und Molisch zu verwandten Anschauungen gekommen. Sie nehmen an, daß die vom Chlorophyll absorbierte Lichtenergie als rotes Fluoreszenzlicht wieder ausgestrahlt wird, und dieses rote Fluoreszenzlicht soll dann die Reduktion der CO_2 bzw. eines irgendwie gebundenen oder gelösten Kohlensäurederivates bewirken. Dabei ist der leitende Gesichtspunkt dieser Überlegung, daß das rote Licht besonders stark assimilatorisch wirke und demnach das Chlorophyll »als Fabrik roter Strahlen« in seiner Fluoreszenz eine zweckmäßige Erscheinung zeige, die eine möglichst gute Ausnützung des Sonnenlichtes ermögliche. Diese ökologische Betrachtung ist freilich nicht stichhaltig. Um sie stichhaltig zu machen, müßten wir zunächst einmal genau wissen, welchen Nutzeffekt gleiche Energiemengen der verschiedenen Wellenlängen des auffallenden bzw. absorbierten Sonnenlichtes für die Assimilation haben, und mit welchem Nutzeffekt sie in Fluoreszenzlicht umgewandelt werden. Diese Fragen können wir aber zurzeit noch nicht exakt beantworten. Dagegen wäre eine gewisse experimentelle Prüfung der Tswett-Molischschen Anschauung wenigstens insoweit möglich, als sie ebenso wie

die Müllersche Anschauung das Ergebnis erwarten läßt, daß bei Ausschaltung der Assimilation die Intensität des Fluoreszenzlichtes zunehmen sollte. Auch die oben (S. 202) dargelegten physikalischen Auffassungen legen den Gedanken nahe, daß das Chlorophyll, solange es chemisch reagiert, schwächer fluoreszieren wird als bei Ausschaltung chemischer Reaktion, und demnach wäre umgekehrt eine nachweisbare Intensitätsänderung seiner Fluoreszenz im assimilierenden und nichtassimilierenden Zustand ein starker Beweis für die chemische Arbeitsleistung des Chlorophylls bei der Assimilation.

Zur experimentellen Prüfung dieser Frage bin ich folgendermaßen vorgegangen. Vorn am Spalt des Spektroskops ist ein total reflektierendes Prisma angebracht, dessen außen geschwärzte Hypotenusenfläche nach vorn zeigt und verhindert, daß Licht von vorn in die untere Hälfte des Spaltes fällt, da das Prisma so angebracht ist, daß es gerade die untere Hälfte des Spaltes verdeckt. Dafür erlaubt es aber, rechtwinklig zur Achse des Spektroskops, also seitwärts einfallendem Lichte vermöge der totalen Reflexion an der inneren Hypotenusenfläche ins Spektroskop zu gelangen und so ein zweites Spektrum, ein Vergleichsspektrum, im Gesichtsfeld zu erzeugen. Jedes der Spektren hat die halbe Höhe des Spaltes. Untersucht man z. B. einzellige grüne Algen, so kann man vor den Spalt in den Strahlenkegel der Lampe ein Reagenzglas mit Algensuspension stellen, seitwärts rechtwinklig dazu in den Strahlenkegel eine Vergleichsalgensuspension oder eine Chlorophylllösung. Dann erhält man zwei Spektren übereinander, das eine von der seitlichen Algensuspension oder Chlorophylllösung, das andere von der vorderen Algensuspension herrührend. Durch Verschieben der beiden Suspensionen kann man nun bei einiger Übung nach nicht gar zu langem Probieren eine Stellung derart herausfinden, daß die beiden roten Fluoreszenzstreifen gleich hell sind. Verändert man nun durch irgendwelche Beeinflussung der einen Algensuspension die Intensität der Fluoreszenz, so wird der von ihr herrührende rote Fluoreszenzstreifen dunkler oder heller. Um die Photometrie möglichst bequem und ungestört von etwaigem reflektierten, ebenfalls im Gesichtsfeld sichtbaren grünen und blauen Licht ausführen zu können,

habe ich in das Okular eine kreisförmige Scheibe mit einem länglichen, rechteckigen Ausschnitt (Abb. 4 Bl.) mittels eines federnden, ringförmigen Metallstreifens, eines sog. Sprengringes (Abb. 4 S), leicht herausnehmbar befestigt. Die Breite des Spaltes ist so gewählt, daß er völlig von Fluoreszenzlicht erfüllt ist. Man sieht dann also im Gesichtsfeld des Okulars bei gleicher Intensität des von vorn und durch das Vergleichsprisma einfallenden Fluoreszenzlichtes nur eine einzige gleichmäßige rote Fläche von der rechteckigen Form des Spaltausschnittes, obwohl die obere und untere Hälfte dieser Fläche von verschiedenen fluoreszierenden Körpern, nämlich von der vorderen und von der seitlichen Algensuspension, erzeugt werden. Verringert sich die Fluoreszenz der einen Suspension, so wird die Hälfte des roten Rechteckes, die von ihr herrührt, dunkler. Die Empfindlichkeit dieser Meßmethode



Bl.



S.

Abb. 4.

von Veränderungen des Fluoreszenzlichtes ist also gleich der Unterschiedsempfindlichkeit des Auges für die betreffende Farbe und Intensität. Eine gewisse Fehlerquelle, die man beachten muß, ist darin gegeben, daß unter Umständen

die absolute und auch die relative Helligkeit der beiden Hälften durch die Stellung des Kopfes des Beobachters beeinflußt wird. Die Ursache dieser Erscheinung liegt im Strahlengang des Spektroskops und würde zur Klarlegung eine weitläufige Darstellung desselben erfordern. Ich begnüge mich daher zu bemerken, daß ich diese Fehlerquelle gegebenenfalls dadurch ausgeschaltet habe, daß ich die Handhabungen, die zur Veränderung der Assimilationstätigkeit notwendig waren, von einer Hilfsperson ausführen ließ, während ich selbst mit unveränderter Kopfstellung am Spektroskop beobachtete. Es ist von Wichtigkeit, sich darüber klar zu werden, wie man die Versuchsbedingungen wählen muß, um die größte Aussicht auf Erfolg zu haben, d. h. auf ein Maximum der Intensitätsveränderung des Fluoreszenzlichtes im assimilierenden und nichtassimilierenden Zustand. Die Intensitätsveränderung der Fluoreszenz

wird um so größer sein, je größer die Intensitätsveränderung der Assimilation ist. Um eine maximale Änderung der Assimilationsintensität zu erreichen, muß man zunächst die optimalen Bedingungen für die Assimilation schaffen und dann die Assimilation sistieren. Es wurde deshalb mittels einer bis zum Boden des Reagenzglases reichenden Kapillare durch die Knopsche Nährlösung, in der die Algen suspendiert waren, ein langsamer Strom eines 4proz. Kohlensäureluftgemisches geschickt, und die Temperatur durch Einsenken des unteren Teiles des Reagenzglases in ein Wasserbad auf etwa 25° erhalten. Durch die Vergleichssuspension wurde ein entsprechender Blasenstrom geschickt. Unmittelbar vor jeder photometrischen Bestimmung wurden die Blasenströme abgestellt. Während also CO₂ und Temperatur annähernd in optimalen Ausmaßen den Chlorellen geboten wurden, war dies nicht der Fall mit dem Licht. Anfänglich führte ich zwar einige Versuche auch im hellsten Teil meines blauen Strahlenkegels aus. Als sie negativ ausfielen, ging ich zu schwächeren Intensitäten über und schließlich zu einer so geringen, daß überhaupt gerade noch die Fluoreszenz im Spektroskop erkennbar war. Dafür waren zwei Gründe ausschlaggebend. Einmal ist nämlich die Unterschiedsempfindlichkeit des Auges um so größer, je geringer die von den photometrisch zu vergleichenden Flächen ausgestrahlte Lichtintensität ist, d. h. es ist für den vorliegenden Versuch gar nicht günstig, einen hellen roten Fluoreszenzstreifen im Spektroskop zu haben, sondern vorteilhaft einen möglichst lichtschwachen. Dazu kommt aber noch ein zweiter Grund. Da ja die Chlorellen auch im assimilierenden Zustand fluoreszieren, so wird also ein Teil der auffallenden, nicht zur Assimilation verbrauchten Lichtenergie als Fluoreszenzlicht wieder ausgestrahlt. Und dieser Anteil ist offenbar um so größer, je größer der vorhandene Lichtüberschuß ist, je höher also die Intensität des auffallenden Lichtes. Nun wird natürlich eine Änderung der Fluoreszenzintensität um so deutlicher wahrzunehmen sein, je größer sie im Verhältnis zur vorhandenen Fluoreszenzintensität ist, d. h. bei gleicher Änderung um so deutlicher, je geringer die vorhandene Fluoreszenzintensität und demnach die Intensität des auffallenden Lichtes sein wird.

Die Hemmung bzw. Sistierung der Assimilation wurde mittelst

Äthylurethan ausgeführt. Dieser Stoff eignet sich dazu besonders wegen seiner beträchtlichen Wasserlöslichkeit. Er wurde feingepulvert zu der einen Algensuspension zugegeben und zwar zu einem abgemessenen Volumen derselben derart, daß sich wässrige Lösungen von 200, 300, 400, 500 Millimol bildeten, Konzentrationen, die nach den Erfahrungen Warburgs stark hemmend bis völlig sistierend auf die Kohlensäure-Assimilation wirken. Es war indessen keinerlei Änderung der Fluoreszenzintensität festzustellen. Ebenso negativ fielen Versuche mit einer Reihe anderer Narkotika und Gifte aus. Eine andere Versuchsreihe gründete sich auf die Beobachtung Warburgs, daß nach vorausgehender Verdunkelung die Assimilation der Chlorellen bei Wiederbeleuchtung nur sehr allmählich ansteigt: In Versuchen, in denen als Vergleichslösung eine Chlorophylllösung benutzt wurde, zeigte sich aber wiederum keinerlei Änderung der Fluoreszenzintensität, wenn auf »gleich« eingestellt, dann eine halbe Stunde verdunkelt und dann wieder belichtet wurde.

Bei näherer Überlegung zeigt sich nun, daß der gesuchte und nicht gefundene Effekt bei den in der Zelle vorliegenden Verhältnissen auch gar nicht zu erwarten ist. Die Tatsache nämlich, daß die Fluoreszenz der Chloroplasten erst bei Belichtung mit höchsten Intensitäten überhaupt merklich wird, zeigt, daß das Verhältnis von absorbierter Energie zur Fluoreszenzenergie derart ist, daß die Fluoreszenzenergie nur einen sehr kleinen Bruchteil der absorbierten beträgt. Das ist durchaus nicht immer der Fall, im Gegenteil, Paschen hat für die Fluoreszenz einer Heliumlinie quantitativ den absorbierten Energiebetrag als Fluoreszenzenergie wiedergefunden. Aber ein derartiges Verhältnis ist nur bei sehr verdünnten Gasen zu erwarten, bei denen im Mittel Zusammenstöße der fluoreszierenden Atome erst nach einer Zeit erfolgen werden, innerhalb deren das fluoreszierende Atom bereits die von ihm absorbierte Energie als Fluoreszenzlicht wieder ausgestrahlt hat (etwa 10^{-8} Sekunden nach Stern und Volmer); denn da ja, wie oben erwähnt, die Fluoreszenz der Atome durch Zusammenstöße vermindert oder vernichtet wird, so wird bei höheren Konzentrationen, bei denen die Zusammenstöße verhältnismäßig oft erfolgen werden, bevor

die absorbierte Energie als Fluoreszenzlicht ausgestrahlt ist, nur ein Teil der absorbierten Energie als Fluoreszenzenergie zum Vorschein kommen. Nun sind die Chlorophyllmoleküle in den Lipoidtröpfchen in sehr hoher Konzentration enthalten, wie ja die tiefgrüne Farbe einer konzentrierten Suspension ohne weiteres beweist. Und ein großer Teil der Chlorophyllmoleküle wird also zusammenstoßen, sei es mit anderen Chlorophyllmolekülen, sei es mit Molekülen des Lösungsmittels, bevor er seine Fluoreszenzenergie ausgestrahlt hat und infolgedessen wird auch, wenn das Chlorophyllkorn nicht assimiliert, der Bruchteil, den die Fluoreszenzenergie von der absorbierten Energie bildet, ein sehr geringer sein. Wenn nun das Chlorophyll zu assimilieren beginnt, und zwar in einem chemischen Prozeß, der mit einem Nutzeffekt von z. B. 10% verläuft — von dieser Größenordnung dürfte der Nutzeffekt der Assimilation nach persönlichen Mitteilungen O. Warburgs sein —, so darf man auch vom Standpunkt der oben geschilderten physikalischen Theorie nicht etwa eine Abnahme der Intensität der Fluoreszenz um 10% erwarten. Denn gerade der Bruchteil der Moleküle reagiert ja chemisch, der zusammenstößt, und wenn dieser unter den Bedingungen des assimilierenden und nichtassimilierenden Zustandes konstant ist, so ist auch keine Änderung der Fluoreszenzintensität zu erwarten, gleichviel ob der Chloroplast assimiliert oder nicht, vielmehr wird nur im ersten Falle der ausgenutzte Bruchteil der absorbierten Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt, im zweiten in Wärme. Wie das Verhältnis der Zusammenstöße im assimilierenden und nichtassimilierenden Zustande ist, darüber wissen wir nichts Genaues — es wird ja auch je nach der Art der Assimilationshemmung verschieden sein —, aber jedenfalls haben wir keine Veranlassung, es als wesentlich verschieden von 1 anzusehen, denn auf alle Fälle wird bei der hohen Konzentration der Chlorophyllmoleküle, beim Vorhandensein von Lösungsmittelmolekülen usw. verhältnismäßig die Zahl der Zusammenstöße mit dem in der Assimilation zu reduzierenden Körper gering sein gegenüber der Gesamtzahl der Zusammenstöße. So ergibt sich also, daß das Experiment erstens eine positive Bestätigung der physikalischen Theorie nicht ergibt, aber zweitens eine solche auch gar nicht erwarten läßt, und daß demnach auf dem

Wege der Fluoreszenzphotometrie ein weiteres Eindringen in den Mechanismus des Assimilationsprozesses als aussichtslos erscheint. Ebensovienig ergibt sich eine experimentelle Bestätigung der erörterten Anschauungen von N. L. C. Müller, Tswett und Molisch.

VIII. Schlußbetrachtung und Zusammenfassung.

Trotz der großen Fortschritte, die in den letzten Jahren durch die Arbeiten von Blackmann, Willstätter und Warburg die Erforschung der Kohlensäureassimilation der grünen Zelle gemacht hat, sind wir über den Mechanismus dieses Prozesses noch völlig im Unklaren. Nach der herrschenden auch von Willstätter vertretenen Anschauung soll es sich um einen photochemischen Reduktionsprozeß handeln, nach Warburg soll dagegen der wesentliche Reduktionsprozeß bei der CO_2 -Assimilation ein rein chemischer sein, während das Licht nur den reduzierenden Körper bildet, andere Vorstellungen von Baur, Samsonow und Nathanson nehmen photoelektrische und elektrochemische Prozesse für die CO_2 -Reduktion in Anspruch. Von welcher Vorstellung man auch ausgehen mag, von einer jeden aus wird man mit Notwendigkeit zu der fundamentalen Frage geführt: Welche Rolle spielt bei der CO_2 -Assimilation das Chlorophyll? Die Erfahrung hat gelehrt, daß die Kenntnis dessen chemischer Konstitution und dessen chemischer Reaktionen zur Beantwortung dieser Frage nicht ausreicht. Daraus ergibt sich die Aufgabe, auch seine physikalischen Eigenschaften in und außer der Zelle eingehend zu untersuchen, um vielleicht auf diesem Wege die Möglichkeit eines tieferen Eindringens in den Mechanismus der CO_2 -Assimilation zu erhalten. Unter den physikalischen Eigenschaften des Chlorophylls ist außer der bereits hinreichend untersuchten Absorption seine Fluoreszenz überaus charakteristisch und versprach bei eingehendem Studium noch wertvolle Aufschlüsse zu geben. Diese Erwartung hat sich insofern erfüllt, als die Fluoreszenzanalyse eine Methode darstellt, die es gestattet, mit Sicherheit eine Entscheidung über den Zustand des Chlorophylls in der Zelle zu geben, sie hat sich nicht erfüllt insofern, als sich zeigte, daß ein weiteres Eindringen in die

Rolle, die das Chlorophyll beim Prozeß der Kohlensäureassimilation spielt auch auf dem Wege der Fluoreszenzuntersuchung nicht gewonnen werden kann. Es ergab sich aus spektroskopischen und ultramikroskopischen Befunden, daß echte und nur die echten molekulardispersen Chlorophyllösungen fluoreszieren, nicht aber kolloide oder festes Chlorophyll. Da das Chlorophyll in der grünen Zelle fluoresziert, so folgt daraus, daß es in ihr echt gelöst ist. Da unter den normalen Zellbestandteilen lediglich die Lipide die Fähigkeit haben, Chlorophyll echt zu lösen, und da ferner von den Stoffen, die *in vitro* Chlorophyll echt lösen, lediglich Lipide als Lösungsmittel für Zellchlorophyll in Betracht kommen, folgt weiter, daß das Chlorophyll in der Zelle lipid gelöst ist. Aus der nahen Übereinstimmung zwischen der Lage des Fluoreszenzbandes der grünen Zellen mit der von Chlorophylllösungen in Lezithin folgt schließlich, daß das Chlorophyll in der Zelle in Lezithin oder einem lezithinähnlichen Körper gelöst ist. Es stellt also der Chloroplast ein Emulsionskolloid oder eine Emulsion von Chlorophyll-Lipoid und hydroider protoplasmatischer Grundsubstanz dar. Dies erklärt die außerordentlich hohe Empfindlichkeit, der Assimilation gegen oberflächenaktive Stoffe, da diese sich in der Grenzfläche Chlorophyll-Lipoid gegen Protoplasma ansammeln und dadurch die normalen Reaktionen an dieser Grenzfläche behindern. Eine merkliche Änderung der Fluoreszenzintensität im assimilierenden und nicht assimilierenden Zustand ist nicht vorhanden und auch nicht zu erwarten.

In der Pflanzenzelle sind zahlreiche Stoffe mit höchst charakteristischen Fluoreszenzbändern vorhanden, vor allem Farbstoffe und Alkaloide. Die technischen Hilfsmittel zu ihrer Untersuchung mittelst Fluoreszenzanalyse sind in den sog. »Fluoreszenzmikroskopen« gegeben, können aber auch, wo solche fehlen, wie die vorliegende Untersuchung zeigt, durch einfachere Hilfsmittel ersetzt werden. Meine Ergebnisse lehren, daß die Fluoreszenzanalyse unter Umständen weitgehende Aufschlüsse darüber geben kann, in welchem Zustande ein fluoreszierender Stoff in der Zelle enthalten ist, ob fest, flüssig gelöst, ob kolloid oder echt gelöst, Infolge ihrer außerordentlich hohen Empfindlichkeit dürfte die Methode in vielen Fällen den Nachweis

erlauben, in welchem Entwicklungsstadium die fluoreszierenden Stoffe in den Zellen gebildet werden und welche Wanderungen und Wandlungen sie im Laufe der Entwicklung erfahren. Auch der Systematik dürfte sie noch manche wertvollen Aufschlüsse liefern, wie ein erster Versuch von Lingelsheim auf diesem Gebiete beweist. Vor den Methoden der physiologischen Chemie und Mikrochemie besitzt die physikalische Methode der Fluoreszenzanalyse den großen Vorteil, keinerlei Eingriffe in das normale Leben des Untersuchungsobjektes zu erfordern und dadurch ein sicheres Urteil über die Verhältnisse im völlig intakten Zustand der Zelle zu gestatten.

Für Unterstützung in theoretischen bzw. experimentellen Fragen bin ich den Herrn Prof. O. Stern-Frankfurt a. M. bzw. Dr. P. Knipping-Berlin zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

- Baur, E., Über ein Modell der Kohlensäureassimilation. Zeitschr. f. phys. Chemie. 1908. **63**, 683.
- Buder, J., Chloronium mirabile. Ber. d. d. bot. Ges. 1913. **31**, (80).
- Czapek, F., Biochemie der Pflanze. 2. Aufl. 1913. **1**.
- , Zum Nachweis der Lipoide in Pflanzenzellen. Ber. d. d. bot. Ges. 1919. **37**, 207.
- Frank, J., und Wood, Über die Beeinflussung der Fluoreszenz von Jod- und Quecksilberdampf. Verh. d. d. Phys. Ges. 1911. **13**, 78.
- Gaidukow, N., Über Untersuchungen mit Hilfe des Ultramikroskopes nach Siedentopf. Ber. d. d. bot. Ges. 1906. **24**, 107, 155.
- , Ultramikroskopie und Dunkelfeldbeleuchtung. Jena.
- Hagenbach, E., Fernere Versuche über Fluoreszenz. Pogg. Ann. Jubelband. 1875. S. 303.
- , Untersuchungen über die optischen Eigenschaften des Blattgrüns. Ebenda. **1870**. **141**, 245.
- Herlitzka, Über kolloides Chlorophyll und über einige kolloide Chlorophyllderivate. Kolloidzeitschrift. 1912. **11**, 171.
- , Über den Zustand des Chlorophylls in der Pflanze. Biochem. Zeitschr. 1912. **38**, 321.
- Iwanowski, Über die Ursachen der Verschiebung der Absorptionsbänder im Blatt. Ber. d. d. bot. Ges. 1908. **25**, 416.
- , Über das Verhalten des lebenden Chlorophylls zum Lichte. Ebenda. 1913. **31**, 601.
- , Kolloidales Chlorophyll und die Verschiebung der Absorptionsbänder in lebenden Pflanzenblättern. Biochem. Zeitschr. 1913. **48**, 328.

- Kohl, F. G., Untersuchungen über das Karotin und seine physiologische Bedeutung. Leipzig. 1902.
- , Kohlen säureassimilation und Chlorophyllfunktion. Ber. d. d. bot. Ges. 1906. **24**, 39.
- Konen, Fluoreszenz. Kaysers Handbuch der Spektroskopie. **3**.
- Liebalddt, E., Über die Wirkung von Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner. Zeitschr. f. Bot. 1913. **5**, 65.
- Lingelsheim, A., Die Fluoreszenz wäßriger Rindenauszüge von Eschen. Ber. d. d. bot. Ges. 1916. **34**.
- Lommel, E., Gefärbte Gelatinblättchen als Objekte für das Spektroskop. Pogg. Ann. 1871. **143**, 658.
- Meyer, A., Das während des Assimilationsprozesses in den Chloroplasten entstehende Sekret. Ber. d. d. bot. Ges. 1917. **35**, 586.
- , Die chemische Zusammensetzung des Assimilationssekretes. Ebenda. 674.
- Michaelis, L., Ultramikroskopische Untersuchungen. Virch. Arch. 1905. **179**.
- Molisch, Zur Lehre von der CO₂-Assimilation. Wiss. Erg. d. intern. bot. Kongr. Wien. 1906. S. 184.
- Müller, N. J. C., Untersuchungen über die Sauerstoffausscheidung der grünen Pflanzen. Bot. Unters. 1876. **1**, 1.
- , Beziehungen zwischen Assimilation, Absorption und Fluoreszenz im Chlorophyll. Jahrb. f. wiss. Bot. 1873. **9**, 42.
- , Spektralanalyse der Blütenfarben. Ebenda. 1880. **20**.
- Nathanson, A., Über kapillarelektische Vorgänge in der lebenden Zelle. Kolloidchem. Beih. 1919. **11**, 261.
- Paschen, A., Absorption und Resonanz monochromatischer Strahlung. Ann. d. Phys. 1914. **45**.
- Rählmann, E., Ultramikroskopische Untersuchungen über Farbstoffe. Pharm. Zeitschr. 1903. **4**.
- , Neue ultramikroskopische Untersuchungen über Eiweiß, organische Farbstoffe usw. Pflügers Arch. 1906. **128**, 112.
- Reinke, J., Die optischen Eigenschaften der grünen Gewebe. Ber. d. d. bot. Ges. 1883. **1**, 405.
- , Die Fluoreszenz des Chlorophylls in den lebenden Blättern. Ebenda. 1884. **2**, 265.
- , Photometrische Untersuchungen. Bot. Zeitg. 1886. **44**.
- Samsonow, A., Über den Becquereleffekt. Zeitschr. f. wiss. Photgr. 1913. **2**, 33.
- Schröder, H., Die chemischen Hypothesen über die CO₂-Assimilation. Jena. 1917.
- Simmler, R. Th., Vermischte Mitteilungen. Pogg. Ann. 1862. **115**, 593.
- Stern, O., und Volmer, Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz. Phys. Zeitschr. 1919. **20**, 183.
- , Bemerkungen zum photochemischen Aequivalentgesetz vom Standpunkt der Bohr-Einsteinschen Auffassung der Lichtabsorption. Zeitschr. f. wiss. Photographie. 1920. **19**, 275.
- Stokes, G. G., On the Change of Refrangibility of Light. Philos. Transactions. 1852. S. 463.

- Tswett, M., Eine Hypothese über den Mechanismus der photosynthetischen Energieübertragung. *Zeitschr. f. physik. Chemie.* 1911. **74**, 413.
- , Vorrichtung zur Beobachtung von Fluoreszenz. *Ebenda.* 1901. **36**, 450.
- , Über Reicherts Fluoreszenzmikroskop usw. *Ber. d. d. bot. Ges.* 1911. **29**, 744.
- Ursprung, A., Über das Vorhandensein einer photochemischen Extinktion beim Assimilationsprozeß. *Ebenda.* 1918. **36**, 122.
- Warburg, O., Über die Geschwindigkeit der photochemischen CO₂-Zersetzung. *Biochem. Zeitschr.* 1919. **100**, 230. 1920. **103**, 188.
- Willstätter, R., und Stoll, A., Untersuchungen über das Chlorophyll. Berlin. 1913.
- , Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin. 1918.
- Willstätter, R., und Isler, M., Über die 2 Komponenten des Chlorophylls. *Ann. d. Chemie.* 1912. **390**, 269.
- Wood und Speas, Eine photometrische Untersuchung der Fluoreszenz des Joddampfes. *Phys. Zeitschr.* 1914. **15**, 317.
- 

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Botanik](#)

Jahr/Year: 1921

Band/Volume: [13](#)

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

Artikel/Article: [Über die Fluoreszenz des Chlorophylls und ihre Bedeutung beim Assimilationsprozeß. 193-230](#)