

# Über das Wesen der Vitalfärbung<sup>1)</sup>.

Von

Dr. phil. et med. **Edmund Nirenstein**, Wien.

Mit 1 Textabbildung und Tafel I.

(Eingegangen am 12. Oktober 1919.)

## I. Die einzelnen Erscheinungsformen der Vitalfärbung.

Mit dem Ausdrucke „Vitalfärbung tierischer Zellen“ pflegt man eine Reihe von Phänomenen zu bezeichnen, denen gemeinsam ist, dass es sich um Färbungseffekte an lebenden Zellen handelt. Im übrigen sind diese Phänomene untereinander so verschieden, dass die meisten Autoren, die der Frage nähergetreten sind, die Vermutung ausgesprochen haben, dass es sich um ganz und gar heterogene Vorgänge handeln dürfte.

Die gedachten Phänomene lassen sich zweckmässig in folgende Arten der Vitalfärbung einteilen: in die vitale Diffusfärbung, die vitale Granulafärbung und die Vitalfärbung durch Phagozytose aufgenommener Einschlüsse.

### A. Die vitale Diffusfärbung.

Gibt es überhaupt eine vitale Diffusfärbung? Das heisst, hat man Anhaltspunkte dafür, dass ganze Zellkörper oder grössere Zellkörperabschnitte im lebenden bzw. — um mit dem Ausdruck „lebend“ einen bestimmten Begriff zu verbinden — funktionsfähigen Zustand diffus färbbar sind? Die Erfahrungen bei der vitalen Methylenblaufärbung der Nervenlemente — dem Paradigma der diffusen Vitalfärbung — sind wenig geeignet, zur Entscheidung der Frage beizutragen. Die physiologischen Beweise, die den vitalen Charakter der Methylenblaufärbung dartun sollen, sind durchaus anfechtbar. Wenn angeführt wird, dass ein Muskel, dessen Nervenendplatten sich als gefärbt erwiesen, bei Reizung des zugehörigen Nerven mit einer Zuckung reagierte (M. Wolff [87]), so bleibt immer noch der Einwand bestehen,

1) Die Untersuchungen, die den Gegenstand oben stehender Veröffentlichung bilden, waren bereits im Jahre 1913 abgeschlossen und wurden auf der 85. Vers. d. Ges. Deutsch. Naturf. u. Ärzte ihrem wesentlichen Inhalte nach mitgeteilt. (S. Verh. Ges. D. Naturf. u. Ä. 85. Vers. Wien, II. S. 8—18. 1913.) Äussere Umstände, insbesondere die vierjährige Kriegsdienstleistung des Autors, verzögerten die Veröffentlichung der ausführlichen Mitteilung.

dass nicht zu entscheiden ist, ob nicht noch ungefärbte Endplatten vorhanden waren (Bethe [9]).

Die unmittelbare Beobachtung des Vorganges lehrt, dass die Färbbarkeit der einzelnen bei der vitalen Nervenfärbung den Farbstoff aufnehmenden Strukturteile keine konstante Grösse ist, sondern sich während der Einwirkung des Farbstoffes ändert. In anschaulicher Weise demonstriert dies Verhalten die Beobachtung Dogiels (22) an Nervenzellen. Während der ersten Periode der Farbstoffwirkung treten lediglich gefärbte Körnchen innerhalb des Zellkörpers auf; der Kern und die Grundsubstanz bleiben zunächst ungefärbt. Erst später treten innerhalb der Zelle gefärbte Fibrillen auf, die den Farbstoff ebenso stark aufnehmen wie die chromophilen Körnchen. Die Fibrillen bleiben also während der ersten Periode der Farbstoffwirkung ungefärbt. Dass zu derselben Zeit die Bedingungen für die Färbung intrazellulärer Gebilde vorhanden sind, sofern nur die letzteren Färbbarkeit besitzen, beweist die intensive Färbung der chromophilen Granula. Wenn die Fibrillen trotzdem anfangs ungefärbt bleiben, so kann der Grund nur darin liegen, dass sie zu der Zeit überhaupt nicht färbbar sind. Im Laufe der weiteren Farbstoffwirkung werden die Fibrillen färbbar und färben sich jetzt nicht weniger intensiv als die Körnchen. Diese Änderung der Färbbarkeit kann nur durch eine Änderung des chemisch-physikalischen Zustandes des betreffenden Strukturteiles bewirkt sein. Es liegt nahe, diese Zustandsänderung auf den Vorgang des Absterbens zu beziehen. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, dass die Färbung, wie sie das „gelungene“ Methylenblaupräparat zeigt, sich an absterbenden oder abgestorbenen Strukturteilen des Nervensystems abspielt (Bethe [10]). Andererseits ist es nach der Analogie mit anderen Zellen, die für derartige Beobachtungen geeigneter sind, nicht nur möglich, sondern wahrscheinlich, dass die Farbstoffkonzentration innerhalb der Nervelemente, ohne deren Leben zu gefährden, so weit steigen kann, dass sie sich als deutliche Färbung kund tut. Dafür scheint mir folgende Beobachtung Kolmer's (47) zu sprechen: Bei einer mit Methylenblau vital gefärbten Larve von *Corethra plumicornis* konnte Kolmer feststellen, dass sich die Endigungen der motorischen Nerven vorübergehend andeutungsweise gefärbt hatten.

Geeigneter für die Entscheidung der Frage, inwieweit diffus gefärbte Zellen ihre Funktionsfähigkeit beibehalten können, sind die Beobachtungen an vital gefärbten kontraktile Zellen. Elemente, die sich in ihrer Affinität zum Methylenblau nicht wesentlich von Nervelementen unterscheiden, stellen die Muskelzellen der Platyhelminthen dar (Blochmann und Bettendorf [13], Zerneck [88], Bettendorf [12], Jander [44]). Auch bei anderen Wirbellosen wurde bei Anwendung der vitalen Methylenblaufärbung neben einer Tinktion von

Nervenelementen eine Färbung von Muskelzellen erhalten. (Bei Heteropoden: M. Joseph [45], bei Polychaeten: Retzius [68].) Dass die diffuse Färbung kontraktiler Gebilde ihre Kontraktilität nicht aufhebt, wurde sowohl bei Muskelzellen (Bethe [9], M. Joseph [45]) als bei Flimmern (Bethe [8], Krause) festgestellt.

Ein Objekt, das die Vereinbarkeit von diffuser Färbung und Funktionsfähigkeit in überzeugender Weise demonstriert, sind Echinodermeneier. Bei mit Methylenblau bzw. mit Bismarckbraun gefärbten Eiern von *Strongylocentrotus liv.* bzw. *Echinus microtub.* erfolgt trotz diffuser Färbung des ganzen Zellkörpers die Entwicklung in ungestörter Weise bis zu Pluteusstadien (O. Hertwig [37], Fischel [26]).

### B. Die vitale Granulafärbung.

Unter der Bezeichnung „vitale Granulafärbung“ werden mehrere ihrem Wesen nach völlig verschiedene Phänomene zusammengefasst. Es empfiehlt sich mit M. Heidenhain (35) folgende zwei Fälle auseinanderzuhalten: Der eine Fall betrifft morphologisch wohlcharakterisierte granuläre Gebilde, wie Drüsenkörnchen usw., die schon in der ungefärbt lebenden Zelle mit aller Deutlichkeit zu erkennen sind. Verwickelter liegen die Dinge im zweiten Falle. Hier handelt es sich um die färberische Darstellung von Granula, die auf analoge Gebilde der ungefärbten Zelle nicht ohne weiteres zu beziehen sind, sei es, dass die ungefärbte Zelle überhaupt keine Granula enthält oder dass etwa vorhandene Körnchen in Grösse, Form, Anordnung und insbesondere in ihrer Anzahl von den durch vitale Färbung dargestellten Granula so sehr abweichen, dass die Identität der beiderlei Körnchen keineswegs von vornherein feststeht. Diese Art der Granulafärbung wird im folgenden als vitale Färbungsreaktion der Granula bezeichnet.

Den genannten beiden Arten der vitalen Granulafärbung steht eine dritte Gruppe von Färbungsphänomenen gegenüber — sie wurde seit jeher von der eigentlichen Granulafärbung scharf geschieden —, bei der es sich um folgendes handelt: Farbstoffe, die keine allgemein färbenden Vitalfarben sind, die also die weitaus meisten lebenden Zellen vollkommen ungefärbt lassen, können unter gewissen Bedingungen bei einzelnen ganz bestimmten Zellarten das Auftreten gefärbter Körnchen bewirken.

#### 1. Die vitale Färbungsreaktion der Granula.

Das Phänomen besteht in folgendem: Werden lebende tierische Zellen irgendwelcher Art der Einwirkung bestimmter Farbstoffe ausgesetzt, so treten nach einer gewissen Zeit im Inneren des Zellkörpers körnchen- oder tröpfchenartige Gebilde hervor: die vital gefärbten Granula. Zellkörper und Kern bleiben ungefärbt. Grundbedingung für das Zustandekommen der Erscheinung ist der lebende Zustand

der Zelle. An toten Zellen lässt sich das Phänomen nicht hervorrufen. Wird eine Zelle, die vital gefärbte Granula enthält, abgetötet, so verschwindet sehr rasch die Granulafärbung, und zwar nicht bloss der Farbstoff, sondern auch das gefärbte Substrat. Die vitale Färbungsreaktion der Granula ist ein sämtlichen tierischen Zellen eigentümliches Phänomen und lässt sich nicht nur beim lebenden, sondern auch beim überlebenden Objekt, d. h. bei aus dem Gewebsverband gelösten Zellaggregaten hervorrufen (Arnold [2, 3, 5]). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass das Auftreten gefärbter Granula keine nennenswerte Behinderung der Zellfunktionen zu bewirken scheint (Fischel [27]). Durch Konfluenz gefärbter Granula können grössere tropfenartige Bildungen entstehen (Arnold [4, 1, 6]).

Was die Auswahl der granulafärbenden Stoffe betrifft, so erwiesen sich Fischel (27, 28) unter einer grossen Anzahl von Farbstoffen nur einige wenige als wirksam: Neutralrot, Neutralviolett, Nilblausulfat, Nilblaulorhydrat, Bismarckbraun, Toluidinblau und Methylenblau. Bei dem einen oder anderen Objekt gelang es, noch mit anderen Stoffen Granulafärbung zu erzielen, so mit Brillantkresylblau, Safranin (Höber [39]) u. a. Immerhin war die Zahl der Farbstoffe, die geeignet waren, die vitale Färbungsreaktion der Granula hervorzurufen, auffallend gering.

Die Frage nach der Natur der Gebilde, die sich bei der vitalen Färbungsreaktion der Granula tingieren, gilt als ungeklärt. Folgende Auffassungen stehen einander ziemlich unvermittelt gegenüber: 1. Die vital gefärbten Granula wären ganz in derselben Weise auch vor der Farbstoffspeicherung vorhanden und lediglich infolge ihres optischen Verhaltens in der ungefärbten Zelle unsichtbar (Fischel). 2. Aller kleinste Körnchen, die als solche noch ungefärbt sind, wüchsen zu grösseren Körnern heran, nähmen den Farbstoff auf und vergrösserten sich mit zunehmender Farbstoffspeicherung (Arnold). 3. Die gefärbten Kügelchen wären keine präexistenten Gebilde, sondern entstünden erst infolge der Einwirkung des Farbstoffes (M. Heidenhain).

## 2. Die Vitalfärbung morphologisch wohlcharakterisierter Granula.

Diese Gruppe umfasst alle jene granulären Gebilde, die schon in der ungefärbten bzw. in der mit konservierenden Methoden behandelten Zelle mit voller Deutlichkeit zu erkennen sind, deren Präexistenz also und in der Regel auch deren Natur nicht zweifelhaft ist. Was sie vor anderen, ihnen morphologisch nahestehenden Granulaarten auszeichnet, ist die Fähigkeit, gewisse Farbstoffe vital, d. h. während des Lebens der sie beherbergenden Zelle, aufzuspeichern. Hinsichtlich ihres morphologischen Charakters gehören sie verschiedenen Kategorien an.

Gebilde dieser Art sind die Pigmentkörnchen, die sich in gewissen Hautzellen der Amphibienlarven finden, ferner die Sekretgranula der Leydig'schen Zellen (Fischel [27]). Einzellige Drüsen mit vital färbaren Sekretkörnern sind bei Wirbellosen allgemein verbreitet. Als Beispiel erwähne ich einen Befund, den ich bei *Mesostoma Ehrenbergi* nach Vitalfärbung mit Neutralrot regelmässig erheben konnte: Von den Drüsenzellen des Pharynx waren regelmässig zwei Zellen, je eine rechts und links von der Medianlinie gelegen, von rot gefärbten Körnern dicht erfüllt. Die betreffenden Granula waren schon am ungefärbten Tier zu erkennen. Zu den Körnern von bekanntem morphologischen Charakter, die sich durch vitale Färbbarkeit auszeichnen, gehören auch die Chloragogenkörner der Anneliden. Schliesslich sei unter den vital färbbaren granulären Gebilden bekannter Art das Tigroid der Nervenzellen erwähnt.

So verschieden dem Gesagten zufolge die beiden Arten vitaler Granulafärbung zu beurteilen sind, in einem wesentlichen Punkte besteht zwischen der vitalen Färbungsreaktion der Granula und der vitalen Färbung morphologisch wohlcharakterisierter Granula Übereinstimmung: In beiden Fällen sind es dieselben Stoffe, die Granulafärbung bewirken.

### 3. Granulafärbung nach der Einwirkung von Farbstoffen, die nicht allgemein vital färben.

Die Fortsetzung der Untersuchungen von Chrzonszczewski (17), Wittich (86) und R. Heidenhain (36) über die Ausscheidung von karminsaurem Ammoniak bzw. von indigoschwefelsaurem Natrium durch die Niere führte zunächst zu dem Ergebnis, dass bei der Ausscheidung der genannten Stoffe durch die Niere eine granuläre Farbstoffspeicherung innerhalb gewisser Nierenzellen stattfindet, und dass der Farbstoff in den granulären Gebilden nicht etwa in Form von Farbstoffpartikeln, sondern gelöst enthalten ist. Ferner liess sich feststellen, dass das Vermögen gewisser Nierenzellen, Farbstoffe zu speichern, sich nicht auf die genannten Stoffe beschränkt, sondern für eine grosse Zahl von Farbstoffen gilt, die mit den genannten Stoffen gemeinsam haben, dass sie ebenfalls Säurefarben sind und nicht allgemein vital färben, d. h. nicht bei jeder beliebigen tierischen Zelle Granulafärbung hervorzurufen imstande sind. Es muss betont werden, dass Nierenelemente, die die Fähigkeit haben, die gedachten, nicht allgemein vital färbenden Stoffe zu speichern, daneben, wie jede andere tierische Zelle, das Phänomen der vitalen Färbungsreaktion der Granula zeigen.

Auf die Beziehung zwischen bestimmten physikalischen Eigenschaften der gedachten Säurefarbstoffe und ihrem Vermögen, von ge-

wissen Nierenzellen granulär gespeichert zu werden, sowie auf die Vorstellungen, zu denen man hinsichtlich des Zustandekommens der granulären Speicherung in der Niere gelangt ist, sei hier nicht weiter eingegangen und auf die Arbeiten von v. Möllendorff (56) und Schulemann (78) verwiesen. Nur der eine Punkt sei hier hervorgehoben, dass die naheliegende Annahme, der granulär gespeicherte Farbstoff befinde sich auf dem Ausscheidungswege, nach Möllendorff nicht zutrifft. Nach den Untersuchungen Möllendorff's kann es wohl keinem Zweifel unterliegen, dass die im gelösten Zustande erfolgende Ausscheidung des Farbstoffes durch die Niere und die granuläre Speicherung voneinander unabhängige Vorgänge darstellen.

Die Nierenzellen sind aber keineswegs die einzigen Elemente, die Säurefarben speichern. Bei Wirbeltieren fanden sich nach Einverleibung der in Rede stehenden Säurefarben gefärbte granuläre Gebilde in den Kupfer'schen Sternzellen der Leber, in den Reticulo-Endothelien der Milz, der Lymphdrüsen und des Knochenmarkes, in den Epithelzellen der Leber und der Nebennierenrinde, in den Zellen des Plexus chorioideus und in gewissen Bindegewebszellen; andererseits konnte die Erfahrung gemacht werden, dass zahlreiche Zellarten — die Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute, der Schleimdrüsen, des Pankreas, die quergestreiften und glatten Muskelzellen, die Nerven-elemente usw. — von den gefärbten Granula stets frei bleiben (Ribbert [69], Bouffard [16], Goldmann [33], Schulemann [78], Schlecht [76], Kiyono [46]).

Das Vermögen, Säurefarbstoffe in der beschriebenen Weise zu speichern, findet sich in weiter Verbreitung auch bei Wirbellosen. Derartige Elemente sind: bei Crustaceen die Zellen der Antennen- bzw. Schalendrüse (Kowalewsky [48], Cuénot [18]), ferner gewisse Elemente der Kiemen (Cuénot [18]); bei Insekten und Insektenlarven die Pericardialdrüse (Kowalewsky [48]); bei Oligochaeten gewisse Zellen des Nephridialschlauches (Cuénot [19]). Auch bei den Wirbellosen liegen die Dinge so, dass nur bestimmte Zellen die granuläre Speicherung der sauren, nicht allgemein vital färbenden Stoffe bewirken, während die Mehrzahl der Körperzellen den genannten Farbstoffen gegenüber sich refraktär verhält.

### C. Die Vitalfärbung durch Phagozytose aufgenommener Einschlüsse.

Die Erscheinung, dass durch Phagozytose aufgenommene Zeleinschlüsse bei der vitalen Einwirkung bestimmter Farbstoffe intensiv gefärbt werden, ist schon lange bekannt (B. Hofer [43]). Nach Einführung des Neutralrot in die Technik der Vitalfärbung war es insbesondere Metschnikoff (55), der den Farbstoff bei seinen ausgedehnten Untersuchungen über intrazelluläre Verdauung verwendete.

und in allen Fällen Färbung der Nahrungsvakuolen erhielt, aus deren Ton er auf eine saure Reaktion des Vakuoleninhaltes schloss. Nach Plato (64) stellt die Integrität der Zelle eine unerlässliche Vorbedingung für die Speicherung des Farbstoffes Neutralrot innerhalb der Nahrungsballen dar. Wird ein Tier (Carchesium), das vital gefärbte Nahrungsballen enthält, geschädigt, so verschwindet die Färbung der Nahrungsballen. In toten Zellen färben sich die Kerne, eventuell das Plasma, nie aber die Nahrungsballen.

Bei meinen Untersuchungen über die Verdauungsvorgänge bei Paramaecien (57) konnte ich mich von der intensiven, in den Nahrungsvakuolen stattfindenden Speicherung des als Indikator verwendeten Farbstoffes Neutralrot überzeugen; hierbei ergaben sich zwei Momente, die für das Verständnis der Farbstoffspeicherung in den Nahrungsballen von Belang sind. Erstens liess sich feststellen, dass die Färbung nicht an den korpuskulären Gebilden des Vakuoleninhaltes, sondern an dem von der Vakuolenwand abgesonderten Sekret, dem „Vakuolenschleim“, haftet. Zweitens zeigte es sich, dass die Nahrungsvakuole das Vermögen, Neutralrot zu speichern, nur während jener Periode besitzt, die durch saure Reaktion des Vakuoleninhaltes charakterisiert ist.

## II. Theorien der Vitalfärbung.

### A. Theorien der vitalen Diffusfärbung des Plasmas.

Berücksichtigt man die Gesamtheit der Anschauungen, die im Laufe der Jahre entwickelt wurden, um den Vorgang der vitalen Diffusfärbung des Plasmas unserem Verständnis näherzubringen, und zwar nicht bloss diejenigen, die sich auf eigens zu diesem Zwecke angestellte eingehende Versuche stützen, sondern auch solche Vorstellungen, die, obzwar durch Erfahrungen auf anderen Gebieten gewonnen, wegen gewisser Analogien auch auf den Vorgang der vitalen Diffusfärbung des Plasmas anwendbar scheinen, so gelangt man zu dem Ergebnis, dass es die folgenden drei Grundgedanken sind, die den Kern der einzelnen Theorien ausmachen:

1. Die vitale Diffusfärbung des Plasmas ist das Resultat eines Verteilungsvorganges des Farbstoffes zwischen der wässrigen Lösung einerseits und gewissen fettartigen Bestandteilen andererseits (Lipoidtheorie).

2. Der vitalen Diffusfärbung des Plasmas liegt die chemische Bindung des Farbstoffes an gewisse Bestandteile des Plasmas zugrunde (chemische Theorie).

3. Die vitale Diffusfärbung des Plasmas ist ein Adsorptionsvorgang (Adsorptionstheorie).

## I. Die Lipoidtheorie der vitalen Diffusfärbung des Plasmas.

Zur Erklärung der vitalen Färbung der Nervelemente wurde die Lipoidtheorie lediglich von P. Ehrlich, und dies auch nur in seinen ersten Veröffentlichungen, herangezogen. In den einschlägigen Mitteilungen (23, 24) wird darauf hingewiesen, dass nur solche Stoffe das Hirn grau färben — neurotrop sind —, die in Fetten löslich — lipotrop — sind, und dass Neurotropie und Lipotropie verschwinden, wenn in das Molekül der betreffenden basischen Farbstoffe ein Sulfosäurerest eingeführt wird. In der Folgezeit gab Ehrlich den Gedanken, die Farbstoffspeicherung innerhalb der lebenden Zelle mit deren Lipoidgehalt in Zusammenhang zu bringen, auf und wandte sich Vorstellungen zu, bei denen die chemische Bindung des Farbstoffes an bestimmte Gruppen des Protoplasmas die Hauptrolle spielt.

Wenn in den Arbeiten der letzten Jahre von einer Lipoidtheorie der Vitalfärbung die Rede ist, so handelt es sich weder um eine Erklärung der vitalen Diffusfärbung, noch überhaupt um eine Theorie, der es in erster Linie um eine Erklärung der vitalen Färbungsphänomene zu tun ist, sondern um Bestrebungen, auf Grund des Verhaltens der lebenden Zelle den einzelnen Farbstoffen gegenüber über das Problem der Plasmapermeabilität ins klare zu kommen. Den Ausgangspunkt der Vorstellungen, die den Inhalt der Lipoidtheorie ausmachen, bilden die Versuche Overton's über das Eindringen von Anilinfarbstoffen in lebende tierische und pflanzliche Zellen (60). Über die Art der Färbungsphänomene, aus denen auf das Eindringen eines Farbstoffes geschlossen wurde, fehlen bei Overton Angaben; doch dürfte es sich der ganzen Sachlage nach um Zellsaftfärbung bzw. bei tierischen Zellen um das als vitale Färbungsreaktion der Granula bezeichnete Phänomen gehandelt haben. Das Ergebnis dieser für die Lipoidtheorie der Vitalfärbung bedeutsam gewordener Untersuchungen war folgendes: Sämtliche untersuchte basische Farbstoffe, die in Form ihrer käuflichen Salze zur Anwendung gelangten, drangen sehr rasch in die lebende Zelle ein. Andererseits wurden die Sulfosäurefarbstoffe weder von tierischen noch von pflanzlichen Zellen aufgenommen, mit Ausnahme von Methylorange und Tropäolin 00 und 000, für die in einigen Fällen eine langsame Aufnahme festgestellt werden konnte. Analoge Resultate ergab die Prüfung der Lipoidlöslichkeit. Wurden Cholesterin oder Lecithin oder beide in einer Flüssigkeit gelöst, die an und für sich Anilinfarbstoffe nicht auflöst, wie zum Beispiel Benzol oder Xylol oder Terpentin, so gewann die so erhaltene Flüssigkeit das Vermögen, alle basischen Farbstoffe in Form ihrer käuflichen Salze aufzulösen, während die Sulfosäurefarbstoffe selbst in der Wärme ungelöst blieben, mit Ausnahme von Methylorange, Tropäolin 00 und Tropäolin 000,

die in Cholesterin- oder Lecithin-Benzol spurenweise löslich waren. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse gelangte Overton zur Vorstellung, dass die Grenzschicht des Protoplasmas jeder tierischen und pflanzlichen Zelle mit Cholesterin- bzw. Lecithin imprägniert ist, und dass das auswählende Lösungsvermögen dieser die Grenzschicht imprägnierenden Stoffe es ist, das über das Eindringen bzw. Nichteindringen einer Verbindung entscheidet.

Die Versuche über das Eindringen von Farbstoffen in die lebende Zelle stellen nur einen Teil des Beweismaterials dar, das Overton seiner Theorie zugrunde gelegt hat. Sie erhielten ihre Ergänzung in Versuchen, die auf Grund der mittels anderer Methoden durchgeführten Prüfung der Permeabilität (der plasmolytischen Methode; der Beobachtung von Pflanzenzellen, deren gerbstoffhaltiger Zellsaft beim Eindringen von Verbindungen, die durch Gerbstoff gefällt werden, einen Niederschlag gibt usw.) zu dem gleichen Ergebnis gelangen (Overton [59, 62]).

Eine weitere Stütze fand die Theorie von der Bedeutung der Lipide für die Zellpermeabilität in den Untersuchungen über die Wirkung der indifferenten Narkotika. In einer Reihe von Versuchen konnte sich H. Meyer (53) davon überzeugen, dass zwischen der Wirkungsstärke eines indifferenten Narkotikum und dem Verhältniss der betreffenden Verbindung zwischen Wasser und fettem Öl eine konstante Beziehung besteht: Je grösser die relative Fettlöslichkeit eines indifferenten Narkotikum ist, um so grösser ist seine Wirkungsstärke. Ferner liess sich zeigen, dass in solchen Fällen, in denen sich der Teilungskoeffizient zwischen Öl und Wasser mit der Temperatur änderte, auch die narkotische Kraft der betreffenden Verbindung in gleicher Weise mit der Temperaturänderung stieg oder fiel (54). Auch Overton (61) konnte für eine grosse Zahl indifferenten Narkotika feststellen, dass narkotische Kraft und Teilungskoeffizient zwischen Öl und Wasser zugeordnete Grössen sind.

Nach dem Bekanntwerden der Overton'schen Versuche war der Eindruck allgemein, dass die Aufnahme von Stoffen durch die lebende Zelle oder wenigstens eine gewisse Art der Stoffaufnahme durch die Lipoidtheorie in befriedigender Weise erklärt wird, und dass speziell das Ergebnis der Farbstoffversuche einen festgefügtten Pfeiler im Gebäude der Lipoidtheorie bildet. Sehr bald änderte sich die Sachlage. Gerade gegen die Richtigkeit der Overton'schen Färbungsergebnisse wurde eine Reihe von Einwänden vorgebracht, die geeignet erschienen, die Beweiskraft der Färbungsversuche aufs schwerste zu erschüttern. In einer Reihe von Abhandlungen sucht Ruhland den Nachweis zu führen, dass der Parallelismus zwischen der Lipoidlöslichkeit der Anilinfarbstoffe und ihrem Vermögen, in die lebende Pflanzenzelle ein-

zudringen, durchaus nicht in dem von Overton behaupteten Umfange besteht, ja dass gerade das Verhalten der lebenden Pflanzenzelle Farbstoffen gegenüber gegen die Overton'sche Lipoidhauttheorie spricht. Zur Prüfung der Lipoidlöslichkeit bediente sich Ruhland (71) einer Lösung von Cholesterin in Terpentinöl und beschränkte sich auf die Feststellung der absoluten Löslichkeit. Die Versuche Ruhland's beziehen sich ausschliesslich auf Pflanzenzellen. Folgende Farbstoffe zeigen nach Ruhland ein Verhalten, das der Forderung der Overton'schen Theorie widerspricht: Die basischen Farbstoffe Malachitgrün, Thionin, Bismarckbraun und Methylengrün sollen trotz überaus geringer bzw. vollkommen fehlender Lipoidlöslichkeit in lebende Zellen rasch eindringen (71); das gleiche gilt von den basischen Farbstoffen Azophosphin GO und Neublau R (73). Andererseits sollen folgende Farbstoffe trotz exquisiter Lipoidlöslichkeit in lebende Zellen nicht eindringen: Von Säurefarbstoffen: Tuchrot 3 GA, Oxaminmarron, Echtrot A, Wollviolett S, Cyanosin, Erythrosin, Rose bengale, Gallein, Gallaminblau (71); von basischen Farbstoffen: Nachtblau (72), Viktoria-blau B und 4 R, Baslerblau BB und R (73).

Die Befunde Ruhland's wurden, soweit sie der Theorie Overton's widerstreiten, einer eingehenden Nachprüfung durch Höber (40, 42) unterzogen. In einigen Punkten bestätigt Höber die Angaben Ruhland's. So gelangt auch Höber zum Resultat, dass die basischen Farbstoffe Methylengrün und Thionin trotz Lipoidunlöslichkeit intravital färben. Das gleiche Verhalten zeigt nach Höber das lipoidunlösliche Methylengrün Kristalle I gelbl. Ferner stimmt Höber mit Ruhland darin überein — und auch dieser Befund widerstreitet der Lipoidtheorie Overton's —, dass die leicht lipoidlöslichen Säurefarbstoffe Echtrot A, Wollviolett S, Cyanosin, Erythrosin und Rose bengale nicht vital färben. In allen anderen Punkten hält Höber die Einwände Ruhland's für unberechtigt. Nach Höber entspricht der Satz: „Basische Farbstoffe färben vital, und Säurefarbstoffe färben nicht vital“ den Tatsachen besser als die Overton'sche Beziehung zur Lipoidlöslichkeit.

Auf Grund von Untersuchungen an der Nickhaut von Fröschen gelangt Garmus (32) zu Ergebnissen, die den Forderungen der Lipoidtheorie Overton's vielfach widerstreiten. Die basischen Farbstoffe Thionin und Methylenazur sollen trotz Lipoidunlöslichkeit, Toluidinblau, Bismarckbraun und Brillantkresylblau trotz sehr geringer Lipoidlöslichkeit vital färben. Andererseits bewirkt Tuchrot 3 GA trotz guter Lipoidlöslichkeit keine Vitalfärbung.

Unter den Argumenten gegen die Lipoidtheorie nimmt eine besondere Stellung das Verhalten jener lipoidunlöslichen Säurefarbstoffe ein, die nicht allgemein vital färben, sondern, wie im Abschnitt über Granulafärbung des näheren ausgeführt wurde, nur von ganz bestimmten

Elementen, wie Nierenepithelien, gewissen Zellen des Bindegewebes usw., granulär gespeichert werden. Lange Zeit war man der Meinung, dass Pflanzenzellen den gedachten lipoidunlöslichen Säurefarben die Aufnahme verweigern. Solange man nämlich die Aufnahme von Anilinfarben nach der alten Pfeffer'schen Methode in der Weise untersuchte, dass man Algen, Wurzeln von Wasserpflanzen oder Schnitte von Pflanzenteilen in die entsprechend verdünnten Farbstofflösungen einlegte, hatten sich immer die Pflanzenzellen für weitaus die meisten Säurefarbstoffe undurchlässig erwiesen. Als man jedoch in der Weise vorging, dass man ganze Sprosstteile in die Farblösung tauchen und von den Schnittflächen her die Lösung aufsteigen liess, zeigte es sich, dass zahlreiche lipoidunlösliche Säurefarben eine ausgesprochene Färbung des Zellsaftes bewirken (Küster [50], Ruhland [73]). Übrigens konnte Ruhland (74) unter bestimmten Bedingungen auch an Schnitten das Eindringen lipoidunlöslicher Säurefarben in den Zellsaft feststellen. Von den Gegnern der Lipoidtheorie wird dies Verhalten lipoidunlöslicher Säurefarbstoffe als Argument gegen die Overton'sche Theorie ins Treffen geführt. Demgegenüber stehen die Vertreter der Lipoidtheorie auf dem Standpunkt, dass es sich bei der Aufnahme lipoidunlöslicher Säurefarbstoffe nicht um einen einfachen osmotischen Prozess handelt, wie er der Vitalfärbung mit allgemein färbenden Stoffen zugrunde liegt, sondern dass ein komplizierter, mit der Lebenstätigkeit der Zelle zusammenhängender Vorgang vorliegt, der gar nicht in den Geltungsbereich der Overton'schen Theorie gehört.

Zusammenfassend gelangt Höber, der eingehender als sonst ein Autor das Pro und Contra der Lipoidtheorie der Vitalfärbung studiert hat, zu dem Schlusse, dass angesichts der ungeheuer grossen Zahl von Farbstoffen, deren Verhalten mit den Forderungen der Lipoidtheorie im Einklang sich befindet, das Versagen der Theorie in einigen wenigen Fällen kein zureichender Grund ist, „um einer Theorie, welche sich auf eine Fülle von Tatsachen stützt, den Boden zu entziehen“. Allerdings „muss zugegeben werden, dass man mit einer Revisionsbedürftigkeit der Lipoidtheorie als einer Möglichkeit rechnen muss“ (41).

## 2. Chemische Theorien der vitalen Diffusfärbung des Plasmas.

Eine Theorie, die die Vitalfärbung auf chemische Bindung zurückführt, ist Ehrlich's Chemoreceptorentheorie. Bestimmte chemische Gruppen des Biomoleküls — die Chemoreceptoren — sollen nach Ehrlich die Farbstoffmoleküle festhalten (25). Nicht eine Bindung von Farbstoff an die lebende Substanz, sondern an die im Zellsaft gelösten — also „toten“ — Eiweisskörper betrachtet M. Heidenhain (35) als Ursache der Vitalfärbung. Ausgehend von seinen Erfahrungen über

die Umsetzung zwischen Farbstoffen und Eiweisskörpern (34) nimmt der Autor an, dass zwischen den im schwach alkalischen Zellsaft gelösten Eiweisskörpern und den Salzen basischer Farbstoffe eine Umsetzung stattfindet, bei der die Farbbase mit dem Eiweiss zu einem eiweiss-sauren Salz zusammentritt. Saure Farbstoffe reagieren nach M. Heidenhain erst dann mit in Lösung befindlichen Eiweisskörpern, wenn durch Zusatz von Essigsäure die Farbsäure in Freiheit gesetzt wird. Von einer Vereinigung der sauren Farbstoffe mit den im alalischen Zellsaft gelösten Eiweissstoffen nach Art der Bindung basischer Farbstoffe könne also nicht die Rede sein.

Eine Theorie, die die Färbung bestimmter Strukturteile ebenfalls auf den Prozess einer Salz-bildung zwischen Färbungs-substrat und Farbstoff bezieht, ist Bethe's Fibrillensäuretheorie (10). Sie beschränkt sich auf die Erklärung der Neurofibrillen-färbung, ist also streng genommen keine Theorie der Vitalfärbung. Bei der Erklärung der primären Fibrillen-färbung geht Bethe von der Annahme aus, dass der Neurofibrille eine Substanz angelagert ist — die Fibrillensäure —, die sich primär mit basischen Farbstoffen verbindet, aber unter dem Einfluss verschiedener Fixierungsmittel verändert bzw. gelöst wird. Während des Lebens ist diese Substanz in einer Weise an die Fibrille gebunden, dass keine freie Valenz zur Bindung des basischen Farbstoffes zur Verfügung steht. Beim Absterben löst sich eine (saure) Valenz und ist zur Anlagerung des Farbstoffes disponibel.

### 3. Die Adsorptionstheorie der vitalen Diffusfärbung des Plasmas.

Untersuchungen, denen zu entnehmen wäre, ob die Aufnahme von Farbstoffen in die lebende Zelle die Kennzeichen eines Adsorptionsvorganges besitzt, liegen nicht vor. Wenn im vorstehenden trotzdem die Adsorption unter den Erklärungsprinzipien der vitalen Plasma-färbung angeführt wurde, so geschah es aus zwei Gründen: Erstens weil die Voraussetzungen für Adsorptionsvorgänge bei lebenden Zellen, anscheinend wenigstens, gegeben sind, und zweitens weil für gewisse Verbindungen, deren Aufnahme in die lebende Zelle nicht anders zu beurteilen sein dürfte wie die gewisser Farbstoffe, tatsächlich wahrscheinlich gemacht wurde, dass sie in einer Weise aufgenommen werden, die für Adsorptionsvorgänge als charakteristisch gilt.

Es ist klar, dass die ungeheure Oberfläche, die durch die Gesamtheit der zellbegrenzenden Flächen gebildet wird, und die noch ungezählte Male grössere Oberflächenentfaltung, die der lebenden Substanz als einem Kolloidsystem zukommt, die Vorbedingungen für Adsorptionsvorgänge schaffen. Andererseits wird die Aufnahme von Farbstoffen durch die verschiedensten Substrate, insbesondere auch durch solche

tierischer und pflanzlicher Provenienz, ziemlich allgemein als Adsorption aufgefasst. Es liegt also nahe, auch bei der Farbstoffaufnahme durch die lebende Zelle an Adsorption zu denken.

Was den zweiten Punkt betrifft, besteht bekanntlich zwischen der Menge des adsorbierten Stoffes und der Konzentration des in der Lösung verbliebenen Stoffes im Adsorptionsgleichgewicht eine Beziehung, die durch die Exponentialgleichung:  $\frac{x}{m} = \alpha c^{\frac{1}{p}}$  ausgedrückt

wird. Eine der Adsorptionsisotherme gemässe Aufnahme von Stoffen durch lebende Zellen wurde nun in der Tat in einer Reihe von Fällen gefunden. Von den betreffenden Resultaten — Zusammenfassungen findet man bei Höber (41) und bei Freundlich (30) — interessieren uns hier besonders die auf Alkaloide bezüglichen Angaben, da die Aufnahme der Alkaloide in die lebende Zelle kaum anders zu beurteilen sein dürfte als diejenige basischer Farbstoffe. Nach Straub (79) erfolgt die Verteilung des Alkaloids Veratrin zwischen dem Herzmuskel von *Aplysia* und dem im Herzbeutel enthaltenen Blut in der Weise, dass nach Eintritt des Gleichgewichtes sehr kleinen Konzentrationen in der Flüssigkeit grosse im Herzmuskel entsprechen. Freundlich (29) konnte feststellen, dass die statthabende Verteilung durch die Adsorptionsisotherme mit  $\frac{1}{p} = 0,4$  definiert erscheint. Der Schluss, dass

es sich in diesem und analog zu beurteilenden Fällen um eine Aufnahme durch Adsorption handelt, wird jedoch nicht allgemein als zwingend betrachtet. Höber (41) weist darauf hin, dass mit Exponentialformeln unter Umständen auch andere Vorgänge dargestellt werden können.

Die Verwertung der Adsorption als Erklärungsprinzip der Vitalfärbung erfuhr eine wesentliche Vertiefung durch Bethe. Bethe geht von folgender Erwägung aus: Da Gas Ausmaass, in dem ein Farbstoff adsorbiert wird, in hohem Grade von der Reaktion der Farbstofflösung abhängt — HO-Ionen begünstigen die Adsorption basischer Farbstoffe, H-Ionen diejenige saurer —, so muss die Reaktion der Lösung, aus der die Adsorption des Farbstoffes bei der Vitalfärbung erfolgt — das ist also die Reaktion der Lösung im Zellinnern —, einen ausschlaggebenden Einfluss auf die vitale Speicherung der Farbstoffe ausüben. Auf Grund von Untersuchungen an einer Reihe pflanzlicher und tierischer Objekte (Bethe [11], Rohde [70]) gelangt Bethe zu folgender Auffassung des Vorganges der Vitalfärbung: Alle Farbstoffe, soweit ihre Teilchengrösse nicht zu bedeutend ist, sind imstande, die Plasmahaut zu durchdringen und ins Protoplasma hineinzugelangen. Ihr weiteres Schicksal hängt nun von der Reaktion der Zellen ab. In Zellen mit neutraler und noch mehr in solchen mit alkalischer Reaktion kommt es zu einer Anreicherung der basischen Farbstoffe,

während die Aufnahme saurer Farbstoffe, obwohl sie eindringen können, unter dem Schwellenwert der Sichtbarkeit bleibt. Saure Zellen hingegen nehmen basische Farbstoffe um so weniger auf, je saurer sie sind, während sie saure Farbstoffe über die Sichtbarkeitsgrenze anreichern.

Anschliessend an die Auffassung, die in der Stoffaufnahme seitens der lebenden Zelle einen Adsorptionsvorgang sieht, sei die Haftdrucktheorie von J. Traube erwähnt, die das Eindringen von Stoffen in die lebende Zelle auf den Unterschied der Haftdrücke der betreffenden Verbindungen in der wässrigen und in der „Zellphase“ zurückführt (81, 82). Je mehr ein Stoff die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigt, je geringer also nach Traube's Bezeichnung sein Haftdruck ist, um so mehr wird er sich an der Grenze des Wassers gegen eine zweite Phase konzentrieren und wenn der Haftdruck in der oder an der letzteren hinreichend gross ist, in die zweite Phase übergehen. Die Berechtigung zur Heranziehung der Haftdrucktheorie zur Erklärung des osmotischen Verhaltens der lebenden Zelle ergibt sich nach Traube daraus, dass die Reihenfolge, in der oberflächenaktive Stoffe gewisse Erscheinungen an lebenden Zellen hervorrufen (Narkose, Entwicklungshemmung des befruchteten Seeigeleies, Hämoglobinaustritt usw.), insbesondere aber nach Czapek (20, 21) Exosmose aus Pflanzenzellen bewirken, mit derjenigen Reihenfolge übereinstimmt, in der die betreffenden Verbindungen die Oberflächenspannung des Wassers gegen Luft erniedrigen. Ob analoge Beziehungen zwischen der Speicherung von Farbstoffen im lebenden Plasma und der Oberflächenaktivität der betreffenden Stoffe bestehen, war bis jetzt noch nicht Gegenstand einer Untersuchung.

Eine Theorie, die die Aufnehmbarkeit von Farbstoffen in die lebende Pflanzenzelle ebenfalls auf rein physikalische Momente zurückführt, ist Ruhland's Ultrafiltertheorie. Nach Ruhland (73) ist es ausschliesslich die Dispersität, gemessen nach dem Grad der Diffusion in Gelen, die über die Aufnehmbarkeit der sauren sowohl wie der basischen Farbstoffe entscheidet. Von einer gewissen Teilchengrösse ab sollen Farbstoffe, ob es sich nun um basische oder saure handelt, die nach Art eines Ultrafilters wirkende Plasmahaut nicht mehr passieren können.

### B. Theorien der vitalen Granulafärbung.

Bei der erheblichen Meinungsverschiedenheit, die hinsichtlich der Natur der bei der vitalen Färbungsreaktion der Granula sich tingierenden Gebilde herrscht, kann es nicht wundernehmen, wenn die Anschauungen über das Zustandekommen der Granulafärbung stark divergieren.

Für die Autoren, die auf dem Standpunkt der Altmann'schen Bioplastenlehre stehen, ist die Farbstoffaufnahme der Granula ein

vitaler, d. h. nicht analysierbarer Vorgang. Galeotti (31), dessen Anschauung zufolge die vital färbbaren Granula tote Gebilde darstellen, will die vitale Granulafärbung nicht anders beurteilt wissen als diejenige unbelebter Färbungssubstrate. M. Heidenhain (35), der die Präexistenz der in Rede stehenden vital färbbaren Granula bestreitet, fasst die vitale Färbungsreaktion der Granula als eine Art „innerer Sekretion“ auf. In neuerer Zeit mehren sich die Stimmen, die das Speicherungsvermögen der Granula auf deren Lipoidgehalt beziehen (Höber, Prowazek, Arnold). Gegen die Lipoidnatur der Granula spricht sich E. Herzfeld (38) aus. Nach Herzfeld würde es sich bei der granulären Speicherung der basischen Farbstoffe um chemische Bindung an saure Eiweisskörper handeln.

Unter den vital färbbaren granulären Gebilden von morphologisch gut definiertem Charakter ist es lediglich das Tigroid, dessen Färbung eingehend studiert wurde. Nach Bethe beruht die Färbbarkeit der Tigroidssubstanz auf der Anwesenheit eines Stoffes — der Nisslsäure —, der das Analogon der Fibrillensäure darstellt.

### C. Theorie der Vitalfärbung durch Phagozytose aufgenommener Zelleinschlüsse.

Es liegt nur eine einzige Arbeit vor, die sich mit der Frage der Vitalfärbung durch Phagozytose aufgenommener Einschlüsse experimentell beschäftigt. Es ist dies die Arbeit von Plato (64), der folgende Erklärung des Vorganges gibt: Der vom Leukozyten oder Infusor aufgenommene Farbstoff zirkuliert im Plasma als Leukokörper und ist infolgedessen unsichtbar. Innerhalb der Einschlüsse wird der Farbstoff in die Oxyform überführt und nun sichtbar. Da der Oxykörper viel langsamer diffundiert als der Leukokörper, kommt es zu einer Speicherung des Farbstoffes in den Einschlüssen. Nach M. Heidenhain's (35) Ansicht ist die Farbstoffspeicherung innerhalb der Einschlüsse auf „innere Sekretion“ der Zelle zurückzuführen, d. h. das Plasma scheidet im Umkreis des Fremdkörpers den Farbstoff aus, der auf solche Weise in der den Nahrungskörper bergenden Vakuole gespeichert wird und den Nahrungsballen durchtränkt.

### III. Paramäcien als Untersuchungsobjekt für Vitalfärbungen.

Es dürfte wenig Zellarten geben, die zum Untersuchungsobjekt beim Studium der Erscheinungen der Vitalfärbung in so hohem Maasse geeignet wären wie die Infusorienzelle und im besonderen wie der Zellkörper von *Paramecium caudatum*. Die Verwendung einzelliger Organismen bietet zunächst den Vorteil, dass sie eine genauere Beherrschung der Versuchsbedingungen ermöglicht, als dies bei der Vitalfärbung ganzer Zellverbände der Fall sein kann.

Ein zweiter, nicht hoch genug zu veranschlagender Vorteil ist der, dass die bei anderen Zellen meist kaum zu entscheidende Frage, ob die gefärbte Zelle noch lebt, in bezug auf Paramäcien fast stets mit Sicherheit beantwortet werden kann. An der Fortdauer gewisser leicht zu beobachtender intrazellulärer Vorgänge lässt sich nicht nur ohne weiteres feststellen, ob die Zelle lebt, sondern ob sie noch völlig normal funktioniert. Ein Paramäcium, bei dem die Bildung der Nahrungsvakuolen, die Zyklose und die Pulsation der kontraktiven Vakuolen in unveränderter Weise vor sich gehen, kann mit Sicherheit als völlig ungeschädigt betrachtet werden.

Der dritte Grund, aus dem sich die Verwendung von Paramäcien zur Untersuchung über Vitalfärbung empfiehlt, ist der Umstand, dass alle drei Arten der Vitalfärbung, von denen oben die Rede war, die diffuse Färbung, die Granulafärbung und die Färbung der Nahrungsballen, hier an ein und derselben Zelle zu beobachten sind, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, die Beziehung der drei Färbungstypen zueinander zu studieren.

Die zu den vitalen Färbungsversuchen verwendeten Paramäcien waren von zweierlei Art: erstens normale Tiere, d. h. solche, deren vital färbbaren Granula den für normale Tiere charakteristischen sehr geringen Umfang besaßen, zweitens Paramäcien, deren vital färbbaren Endoplasmakörnchen zu ganz enormen Kugeln vergrößert waren. Am einfachsten und zuverlässigsten ist die gedachte Veränderung zu erzielen, wenn grosse Mengen der Tiere in relativ wenig Flüssigkeit angehäuft werden. Bringt man etwa 1 ccm einer möglichst dichten Paramäciensuspension in eine flache Schale und achtet darauf, dass die Flüssigkeit in Ruhe bleibt, so kann man zuweilen schon nach 4 bis 6 Stunden, ziemlich sicher aber nach 12—24 Stunden an den Tieren folgende Veränderungen feststellen: Der ganze Zellkörper der Paramäcien ist durchsetzt von Vakuolen, von denen es auf den ersten Blick klar ist, dass es sich nicht um Nahrungsvakuolen handelt. Der Inhalt der Vakuolen besteht aus einer klaren Flüssigkeit vom Lichtbrechungsvermögen des Wassers. Die Vakuolen sind entweder vollständig frei von korpuskulären Elementen, oder sie enthalten Gebilde von höchst charakteristischem Aussehen (Abb. 1 A). Diese die Aufmerksamkeit sofort auf sich lenkenden Gebilde stellen homogene, stark lichtbrechende Kugeln dar, die in ihrem optischen Verhalten am ehesten an Fetttropfen erinnern. Ihre Grösse ist sehr verschieden. Die kleinsten sind nicht erheblich grösser als normale Endoplasmakörnchen, während die grössten Kugeln einen Durchmesser von 10  $\mu$  besitzen, somit relativ ansehnliche Gebilde darstellen. In der Regel enthält eine Vakuole nur eine einzige derartige grosse Kugel; gelegentlich finden sich aber auch mehrere in einer Vakuole. Häufig — keines-

wegs immer — liess sich der ganze Vorgang der Vakuolisierung und Entstehung fetttröpfenartiger kugeliger Gebilde von Anfang an unter dem Mikroskop verfolgen, wenn in der Weise vorgegangen wurde, dass ein Tropfen sehr dichter Paramäciensuspension unter dem Deckglas eingeschlossen und das letztere mit Paraffin umrandet wurde. Zunächst stellen die Tiere die Bildung von Nahrungsvakuolen ein. Im ganzen Bereich des Zellkörpers entsteht gleichzeitig eine grosse Zahl sehr kleiner Vakuolen. Meist enthält jede Vakuole von vornherein ein Körnchen von der Grösse eines normalen Endoplasmakörnchens; in anderen Fällen erscheinen die Vakuolen frei von jeglichen Einschlüssen. Die weiteren Veränderungen bestehen darin, dass sowohl die Vakuolen als die eingeschlossenen Körnchen an Grösse zunehmen und die aus den Körnchen hervorgegangenen Kugeln immer mehr das fetttröpfenähnliche Aussehen gewinnen. Es ist klar, dass es sich bei der Grössenzunahme des Granulum nur um eine Vergrösserung durch Wasseraufnahme, also um einen Quellungsprozess handeln kann. Dauern die Bedingungen, die zur Vakuolisierung der Tiere geführt haben, weiter an, so werden die Veränderungen immer hochgradiger. An Stelle des normalen Endoplasmas finden sich einige wenige von Flüssigkeit erfüllte Räume, die durch den Zusammenfluss der einzelnen Vakuolen entstanden sind. Die Kugeln sind verschwunden. Das Endoplasma erscheint auf einzelne, die grossen Vakuolen begrenzende Lamellen reduziert. Infolge der starken Flüssigkeitsansammlung haben die Paramäciens ihre normale Gestalt verloren und eine plumpe, aufgetriebene Körperform gewonnen. Schliesslich gehen die Tiere zugrunde. Haben sich jedoch die Veränderungen nicht bis zu dem eben beschriebenen Grade entwickelt, so können die Tiere, unter normalen Bedingungen versetzt, völlig zur Norm zurückkehren. Ein geringer Grad der Veränderung, gekennzeichnet durch die Entwicklung zahlreicher nicht zu grosser Vakuolen mit eingeschlossenen Endoplasmakörnchen oder auch ohne die letzteren, kann schon nach 5—10 Minuten vollkommen zurückgegangen sein. Aber auch hochgradiger veränderte Tiere mit grossen fetttröpfenähnlichen, in ansehnlichen Vakuolen eingeschlossenen Kugeln können eine Restitutio ad integrum erfahren. Die Erscheinung, dass Paramäciens mit grossen, in ansehnlichen Vakuolen gelegenen Kugeln — also gerade die Tiere, die unsere Versuchsobjekte darstellen — noch völlig zur Norm zurückkehren können, ist für uns insofern von Wichtigkeit, als sie beweist, dass der Zellkörper unserer Versuchstiere keine erheblichere Schädigung erfahren haben kann.

Die beschriebenen Veränderungen, die Vakuolisierung sowohl als auch das Auftreten der fettähnlichen runden Körperchen, sind schon seit längerer Zeit bekannt. Bokorny (14, 15) beobachtete Vakuolisierung des Infusorienkörpers bei Einwirkung basischer Verbindungen,

Verworn (84) bei Nahrungsentziehung. Wallengren (85), der die Erscheinungen bei Hungerparamäcien genauer verfolgte, vermochte bei seinen Tieren die erwähnten fettähnlichen runden Körperchen nach einigen Tagen festzustellen. Die Vakuolisierung des Plasmas trat bei Wallengren's Hungertieren in der zweiten Hungerperiode auf, also etwa nach dem zehnten Tage. In Anbetracht des Umstandes, dass bei meinen Tieren die Vakuolisierung oft schon nach wenigen Stunden begann, erscheint es fraglich, ob die Annahme, dass es sich bei den beschriebenen Veränderungen um Inanitionserscheinungen handelt, allgemeine Geltung beanspruchen darf. Näher liegt die Annahme, dass es sich um das Auftreten einer chemischen Noxe — etwa um toxisch wirkende Ausscheidungsprodukte — handelt. Dafür spricht die Beobachtung, dass häufiges Umrühren der Flüssigkeit mit den Paramäcien die Vakuolisierung verhinderte. Diese Beobachtung ist wohl nur so zu deuten, dass von den Paramäcien abgeschiedene Stoffe sich zunächst im Bereich der Tiere anhäufen, wodurch die Flüssigkeit in der unmittelbaren Umgebung der Tiere an den schädlichen Stoffen so reich wird, dass sie schädigend wirkt. Werden durch Umrühren der Flüssigkeit die schädlichen Stoffe auf die ganze Flüssigkeitsmenge verteilt, so nimmt die Konzentration der einwirkenden Lösung ab und der schädigende Einfluss hört auf. Auch die erwähnten Beobachtungen Bokorny's sprechen im gleichen Sinne.

Mit der Feststellung, dass die grossen fetttröpfenähnlichen Kugeln aus normalen Endoplasmakörnchen durch Quellung hervorgehen, war ein Beobachtungsmaterial gewonnen, das für die Untersuchung der vitalen Granulafärbung sowie für die Beantwortung der Frage nach der Natur der vital färbbaren Granula ein günstigeres Objekt darstellt als die sehr kleinen Granula normaler Tiere. Auf zwei an den ungefärbten Kugeln zu beobachtende Eigentümlichkeiten, die für die Auffassung der Natur der Granula von entscheidender Bedeutung sind, sei schon hier hingewiesen. Gelegentlich lässt sich beobachten, dass nebeneinanderliegende Granula sich zu einer einzigen homogenen Kugel vereinigen, etwa wie zwei Fetttropfchen unter Umständen zu einem einzigen zusammenfliessen. Die angeführte Beobachtung beweist den flüssigen Zustand der grossen Granula. Eine zweite Erscheinung, die für die Beurteilung der Natur der vital färbbaren Granula von Wichtigkeit ist, ist folgende: Die grossen Granula bewahren ihre Integrität nur so lange, als die Vakuolenwand unversehrt ist. Bringt man das Tier durch vorsichtigen Druck in der Weise zum Zerfliessen, dass sich die Vakuolenwand noch eine Zeitlang erhält, so bleiben zunächst auch die Kugeln unverändert. Erst wenn die Vakuolenwand einreisst und die Kugeln der Wirkung des umgebenden Wassers ausgesetzt sind, schrumpfen sie sehr rasch zu einem winzigen Körnchen zusammen.

Erfolgt die Wirkung der umgebenden Flüssigkeit weniger brüsk, wie etwa beim Absterben des nicht zerfliessenden Tieres, dann erfolgt die Schrumpfung der Kugeln viel langsamer; sie verlieren ihre Kugelform, gewinnen einen eckigen Kontur, schliesslich fallen sie ganz zusammen und verschwinden. Der Vorgang der Zerstörung der Granula durch das umgebende Wasser erinnert an das Verschwinden der beim Zerfliessen der Infusorien entstehenden „Sarkodetropfen“. Die Granula stimmen also in zwei wesentlichen Eigentümlichkeiten mit dem Paramäciendoplasma überein. Erstens stellen sie ganz so wie das letztere eine mit Wasser nicht mischbare flüssige Substanz dar; zweitens ist ihre Integrität in der gleichen Weise von der Unversehrtheit einer schützenden Schicht — der Vakuolenhaut — abhängig, wie die Integrität des Endoplasmas von der Unversehrtheit der ektoplasmatischen Randschicht abhängt. Diese Übereinstimmung macht es wahrscheinlich, dass wir es auch bei den Granula mit plasmatischen Gebilden zu tun haben. In dem färberischen Verhalten der Granula findet diese Annahme eine weitere Stütze.

Über die Methodik der Färbungsversuche ist nicht viel zu sagen. Um gleichmässige Versuchsbedingungen herzustellen, wurde in der Weise vorgegangen, dass die Kulturflüssigkeit, die reichlich Paramäcien enthielt, auf das Zwanzigfache mit Leitungswasser verdünnt wurde. Hierdurch wurde erreicht, dass etwaige Unterschiede in der Reaktion und Konzentration der Kulturflüssigkeit ausgeglichen wurden. Zwei Teile dieser die Paramäcien enthaltenden Flüssigkeit wurden nun mit einem Teile der Farbstofflösung vermischt. Von den Farbstoffen wurden, soweit sie wasserlöslich waren, konzentrierte Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt und diese Stammlösungen für den Einzelversuch entsprechend verdünnt. Wasserunlösliche Farbstoffe wurden in 96%igem Alkohol bis zur Sättigung gelöst und für den Versuch die alkoholische Lösung mit Wasser so weit verdünnt, dass nach dem Vermischen der Farbstofflösung mit dem die Paramäcien enthaltenden Leitungswasser der Alkoholgehalt höchstens 2% betrug. Ein Alkoholgehalt bis zu 2% wird von den Tieren anstandslos vertragen.

Bei jedem einzelnen Farbstoff wurde von der verdünntesten Lösung ausgegangen, die noch überhaupt einen Färbungseffekt hervorrief, und die Art der Farbstoffwirkung zunächst für diese bestimmt; sodann wurde die Wirkungsweise konzentrierter Lösungen festgestellt. Neben normalen Tieren wurden in jedem Falle Paramäcien mit den beschriebenen grossen Granula verwendet.

Untersucht wurden insgesamt 120 Farbstoffe. Nach Bezugsquellen geordnet sind es die folgenden:

Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen a. Rh. (B): Äthylviolett, Auramin G., Auramin O., Brillantgrün, Echtröt A., Erythrin X., Erythrosin G., Indoinblau R., Indulin spritl., Indulinscharlach, Lichtgrün SF. bläul., Methylwasserblau, Rose bengale, Rhodamin B., Rotviolett 4 RS., Rotviolett 5 RS., Säureviolett 6 BN., Säureviolett 7 B., Viktoriablau R., Wollgrün S., Wollviolett S.

Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Brüning, Höchst a. M. (M.): Azinscharlach G. conc., Azobraun, Brillantorange G., Brillantorgane R., Chromotrop 8 B., Chrysoidin, Fuchsin Kl. Kr., Indaminblau B. N., Janusblau G., Janusgrün B., Janusrot, Kristallviolett ch. r., Malachitgrün Krist-

- Chlorz. Doppels., Methylengrün extra gelb conc., Methylenviolett RR., Methylenviolett B. ch. r., Patentblau V., Ponceau 5 R., Säureviolett 4 BS.
- Akt.-Ges. f. Anilin-Fabrikation, Berlin (A): Alkaliblau D., Alkaliblau extra I, Alkaliblau extra III, Alkaliblau extra V., Azorubin S., Chinolinrot, Guineagrün B extra, Metanilgelb, Methylblau OO., Methylgrün N. pulv., Nyanzaschwarz B., Safranin extra G., Toluylenorange G., Tuchrot BA., Tuchrot 3 GA., Wasserblau 6 B extra.
- Kalle & Co., Akt.-Ges., Biebrich (K): Alkaliblau B., Benzoazurin G., Biebrich'scher Scharlach B extrafein, Croceinscharlach 3 B., Echtscharlach B., Methylgrün, Rosindulin 2 G., Rosindulin GXF., Tuchscharlach G., Wasserblau OO.
- Leopold Cassella & Co., Frankfurt a. M. (C): Brillantocrocein M., Brillantponceau G., Brillantponceau G. G., Formylviolett S 4 B., Metaphenylenblau B., Neutralviolett, Thiocarmin R.
- Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co., Elberfeld (By): Azofuchsin B., Chromgrün, Echtgrün extra, Echtsäureviolett 10 B., Neupatentblau B., Säureviolett 4 B extra.
- Leipziger Anilinfabrik Beyer & Kegel, Fürstenberg a. Oder (BK): Amarant, Ponceau G., Ponceau R., Säurecarmoisine B.
- Farbwerke, vorm. L. Durand, Huguenin & Co., Hünningen i. Els. (DH): Cyanosin, Indophenol, Muscarin.
- Wilh. Brauns Anilinfarbenfabrik, Quedlinburg: Braun G. 1437, Scharlachrot 1599, Zinnoberrot 1233.
- Farbwerk Mühlheim, vorm. A. Leonhardt & Co., Mühlheim a. M. (L): Acridingelb, Acridinorange.
- Farbenfabriken Wülfing, Dahl & Co., Barmen (D): Kristallorange GG., Säurefuchsin S.
- Gesellsch. f. chem. Industrie, Basel (I): Alkaliblau 6 B., Reinblau BSI.
- G. Grübler & Co., Leipzig: Bismarckbraun, Brillantkresylblau, Eosin w., Eosin spritl., Indigkarmin, Kongorot, Methylenblau rectific., Methylorange, Neutralrot, Nigrosin, Nilblausulfat, Orcein, Rosanilinbase, Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Sudanbraun.
- E. Merck, Darmstadt: Karminsäures Natrium, Magdalarot, Tropäolin 000/1, Tropäolin 000/2.
- Louis Müller, Nachf., Leipzig: Capriblau, Trypanblau.
- Kahlbaum, Berlin: Toluidinblau<sup>1)</sup>.

1) Mit Rücksicht auf die Notwendigkeit, gewisse Angaben einer Nachprüfung zu unterziehen, wurden noch folgende 15 Farbstoffe in den Bereich der Untersuchung gezogen:

- Badische Anilin- u. Sodafabrik: Azophosphin GO., Gallein, Nachtblau, Rhodamin G., Viktoriablauf B., Viktoriablauf 4 R.
- Farbenfabrik, vorm. Fr. Bayer & Co.: Methylgrün I bläulich, Neublau R.
- Farbwerk, vorm. L. Durand, Huguenin & Co.: Baslerblau BB, Baslerblau R.
- Kalle & Co.: Diazingrün S.
- Anilin- u. Extr.-Fabr., vorm. J. R. Geigy, Basel: Gallaminblau.
- G. Grübler: Methylenazur, Thionin.
- Kahlbaum: Dimethylamidoazobenzol.

Den vorgenannten Farbwerken: Bad. An. u. Sodafabr., vorm. Meister, Lucius & Brüning, Akt.-Ges. f. Anilinfabr., Kalle & Co., L. Cassella & Co., vorm. A. Leonhard & Co., Wülfig, Dahl & Co., Ges. f. chem. Ind., die alle meine Wünsche in der bereitwilligsten Weise berücksichtigt haben, sei für ihr freundliches Entgegenkommen bestens gedankt.

### A. Verschiedene Wirkungsart der einzelnen Farbstoffe auf lebende Paramaecien.

Nach der Art ihrer Wirkung auf lebende Paramäcien zerfallen die Farbstoffe in zwei Gruppen: erstens in Stoffe, die bei lebenden Paramäcien bestimmte Färbungserscheinungen hervorrufen (Vitalfarbstoffe) und zweitens in solche, denen jede Wirkung auf lebende Paramäcien abgeht (Avitalfarbstoffe).

#### a) Die Vitalfarbstoffe.

Die Wirkung der Vitalfarben auf lebende Paramäcien ist keine einheitliche, ja in bezug auf die Extreme der Färbungstypen eine dermaassen verschiedene, dass man versucht wäre, auf eine einheitliche Auffassung des vitalen Färbungsvorganges von vornherein zu verzichten. Der Gegensatz besteht in folgendem: Es gibt Farbstoffe, die, in bestimmter Konzentration angewendet, bei normalen Tieren nur die Granula färben, den Zellkörper aber ungefärbt lassen (Granulafarbstoffe) Den direkten Gegensatz zu den genannten Stoffen bilden Farbkörper, die bei normalen Tieren niemals Granula darstellen, sondern in wirksamer Konzentration angewendet, stets nur eine diffuse Färbung des Zellkörpers bewirken (diffus färbende Stoffe). Wohl ergibt eine genauere Analyse der Färbungserscheinungen, insbesondere die Heranziehung der Befunde bei Paramäcien mit den grossen gequollenen Granula, dass der Gegensatz durchaus nicht so unüberbrückbar ist, wie er nach dem Ausfall der Färbungsversuche mit normalen Tieren zu sein scheint; auch liess sich feststellen, dass es eine Reihe von Farbstoffen gibt, die hinsichtlich ihrer Wirkung gewissermaassen zwischen den beiden obengenannten Gruppen von Vitalfarben stehen; immerhin empfiehlt sich im Interesse der Darstellung eine gesonderte Schilderung der beiden gegensätzlichen Färbungstypen.

#### 1. Über die Wirkung von Granulafarbstoffen auf normale Paramäcien.

Je nach der Konzentration der verwendeten Lösung weist das Färbungsbild, das bei der Einwirkung von Granulafarbstoffen auf normale Paramäcien zustandekommt, erhebliche Differenzen auf. Ziemlich ungezwungen lassen sich, der Wirkung verschieden starker Lösungen entsprechend, drei Stufen der Farbstoffwirkung unterscheiden. Diese drei Wirkungsstufen seien im folgenden an einem typischen Vertreter

der Granulafarbstoffe, dem von P. Ehrlich zur Granulafärbung empfohlenen und bei Protozoen zuerst von Prowazek (65) verwendeten Farbstoffe Neutralrot erläutert.

Erste Wirkungsstufe. Bringt man normale Paramäcien in eine Neutralrotlösung, und zwar in die verdünnteste Lösung, die überhaupt einen Färbungseffekt hervorbringt, so erhält man folgendes Bild (Abb. 3 A): Rings um die am Schlundende hängende, also in Bildung begriffene Nahrungsvakuole erscheint, letztere umsäumend, ein schmaler, gleichmässig rot gefärbter Streifen als Ausdruck einer Färbung des die Nahrungsvakuole begrenzenden Plasmabezirkes. Hat sich die Nahrungsvakuole vom Schlunde abgelöst, so bleibt sie noch einige Sekunden lang von dem gefärbten Saum eingefasst; dann verschwindet der gefärbte Ring. Unterdessen hat sich eine neue Nahrungsvakuole gebildet, die sofort bei ihrer Entstehung von dem gleichen Saum gefärbten Plasmas umgeben ist usw.

Das zweite bei der gedachten Verdünnung auftretende Färbungsphänomen ist die Färbung der Nahrungsballen. Unmittelbar nach ihrer Ablösung vom Schlunde ist die Nahrungsvakuole vollkommen ungefärbt. Erst nach einiger Zeit — etwa einer halben Minute — beginnt eine gleichmässige Rotfärbung des Vakuoleninhaltes, die allmählich an Intensität zunimmt und schliesslich, trotz der enormen Verdünnung der Farbstofflösung einen beträchtlichen Grad erreicht. Nachdem die intensive Färbung des Nahrungsballens eine bestimmte Zeit, die in der Regel zwischen wenigen Minuten und einer bis mehreren Stunden schwankt, angedauert hat, erfolgt ziemlich plötzlich eine Entfärbung der Nahrungsvakuole.

Zweite Wirkungsstufe. Lässt man eine um eine Spur konzentriertere Lösung, als diejenige, die der ersten Wirkungsstufe entspricht — die also noch immer enorm verdünnt ist — auf normale Paramäcien wirken, so erhält man ein Färbungsbild, das sich von dem eben beschriebenen durch das Auftreten vital gefärbter Granula unterscheidet (Abb. 3 B). Die ersten gefärbten Granula treten im Umkreis der in Bildung begriffenen Nahrungsvakuole auf. Nach der Ablösung der Nahrungsvakuole vom Schlund fallen einzelne Körnchen von der Nahrungsvakuole ab und werden von der Plasmaströmung fortgeführt. Die meisten bleiben aber an der Oberfläche der Nahrungsvakuole haften, um urplötzlich die Vakuolenhaut zu durchdringen und ins Innere der Vakuole zu gelangen, wo sie sehr auffällige Veränderungen durchmachen: Sie vergrössern sich sehr erheblich und wandeln sich in homogene, stark glänzende, tropfenartige Kugeln um, wobei die Intensität ihrer Färbung stetig zunimmt. Werden die tropfenförmigen, tief dunkelrot gefärbten Granula durch Zerdrücken des Tieres und Zerreißen der die Granula umschliessenden Vakuolenwand der Wirkung

des umgebenden Wassers ausgesetzt, so erfolgt ein plötzliches Zusammenfallen der roten Kugeln unter sofortiger Entfärbung. Bei Anwendung einer genügend verdünnten Lösung bleibt die Zahl der der Vakuole aufsitzenden Körnchen relativ klein; in diesem Falle kann es geschehen, dass selbst bei stundenlanger Dauer der Färbung die Zahl der gefärbten Granula im Endoplasma relativ gering ist, da der weitaus grösste Teil der gefärbten Körnchen in die Nahrungsvakuolen ausgestossen wurde.

Dritte Wirkungsstufe (Abb. 3 C). Für diesen Grad der Farbstoffwirkung ist das Auftreten einer diffusen Färbung des ganzen Zellkörpers charakteristisch. Die Färbung betrifft sowohl das Ekto- wie das Endoplasma. Das erstere erscheint jedoch bedeutend heller gefärbt. Der Grosskern bleibt ungefärbt. Das ganze Endoplasma ist von kleinsten bis etwas grösseren gefärbten Körnchen dicht erfüllt. Auch das Kortikalplasma enthält gefärbte Granula. Ein besonders auffälliges Verhalten zeigen gewisse an der Oberfläche des Tieres gelegene, reihenförmig angeordnete Granula, die zunächst am Vorder-, dann am Hinterende und in der Peristomgegend auftreten und sich von den genannten Regionen über das ganze Tier ausbreiten. Die Reihen entsprechen der Felderung in der Pellicula. Mit der Dauer der Farbstoffwirkung vergrössern sich die Körnchen beträchtlich, so dass sie schliesslich unter Vorbauchung der Pellicula über das Niveau der Zelloberfläche hervorragen und gelegentlich abfallen.

Die reihenförmige Anordnung der Körnchen hat zur Annahme verleitet (Pütter [67]), dass es sich um Basalkörner der Wimpern handelt, ein Irrtum, der von H. N. Maier (52) berichtigt wurde.

## 2. Über die Wirkung diffus färbender Stoffe auf normale Paramäcien.

Die Wirkung diffus färbender Stoffe auf normale Tiere sei im folgenden an den beiden Farbstoffen Acridingelb und Sudan III demonstriert, von denen ein jeder als Repräsentant einer Gruppe analog wirkender Farbstoffe gelten kann.

α) Acridingelb. Beginnt man mit der verdünntesten Lösung, die einen Färbungseffekt hervorzurufen imstande ist, so zeigt es sich, dass der letztere auch hier in einer Färbung der Nahrungsballen besteht. Den bei entsprechender Verdünnung ähnlich wirkenden Granularfarbstoffen gegenüber besteht jedoch der Unterschied, dass der oben erwähnte, die Nahrungsvakuole umsäumende gefärbte Streifen bei der Acridingelbfärbung nicht zu beobachten ist. Der nächste Effekt, den man bei Steigerung der Konzentration der Farbstofflösung erhält, ist der, dass der ganze Zellkörper diffus gefärbt wird. Das ganze Endoplasma nimmt eine zitronengelbe Färbung an; auch das Ekto-

plasma ist gefärbt, aber erheblich schwächer als das Endoplasma. Nur der Grosskern bleibt ungefärbt und hebt sich scharf von dem gelb gefärbten Zelleib ab (Abb. 4 a). Die Färbung beginnt am Vorderende des Tieres und verbreitet sich von da über den ganzen Zellkörper. Da jegliche Granulafärbung fehlt, tritt die diffuse Färbung des Zellkörpers viel klarer zutage, als es bei der Färbung mit Granulafarbstoffen der Fall ist, wo das Auftreten der zahlreichen gefärbten Granula die diffuse Plasmafärbung zum Teil verdeckt. Geht die Konzentration der angewandten Lösung und damit auch die Intensität der diffusen Plasmafärbung nicht über eine gewisse Grenze, so erfolgt keine nachweisbare Schädigung der Tiere: Die Bildung von Nahrungsvakuolen, die Pulsation der kontraktilen Vakuole und die Zyklose können trotz sehr ausgesprochener zitronengelber Färbung des ganzen Zellkörpers durch Tage in völlig normaler Weise vor sich gehen. Eine solche diffus gefärbte *Paramäcium*-zelle mit vollkommen normalem Ablauf einer ganzen Reihe intrazellulärer Vorgänge ist sicherlich das instruktivste Demonstrationsobjekt einer Lebendfärbung.

Geht man zu noch stärker konzentrierten Lösungen über, so tritt die diffuse Plasmafärbung entsprechend rascher auf und ist intensiver, aber gefärbte Granula treten auch jetzt nicht hervor; ja selbst Konzentrationen, die das Tier unter intensiver Färbung des Zellkörpers rasch zum Absterben bringen, bewirken kein Hervortreten gefärbter Granula.

3) Sudan III. Der Farbstoff ist in Wasser unlöslich, kann aber in der Weise zur Vitalfärbung verwendet werden, dass seine konzentrierte alkoholische Lösung mit Wasser so weit verdünnt wird, dass der Alkoholgehalt  $1\frac{1}{2}$ –2% beträgt. Der Farbstoff verträgt die Verdünnung um so eher, als seine Färbekraft, wie gleich gezeigt werden wird, eine geradezu enorme ist.

Eine konzentrierte alkoholische Lösung, die den Farbstoff im Verhältnis von 1 Teil Sudan zu 2083 Teilen 96%igen Alkohols enthielt, wurde zunächst mit 96%igem Alkohol auf das 120fache verdünnt, sodann 0,4 ccm dieser verdünnten alkoholischen Lösung mit 10 ccm Wasser vermischt und zur Mischung weitere 10 ccm *Paramäcium*-enthaltenden Wassers zugefügt. Die Flüssigkeit, in der sich die Tiere befanden, enthielt also den Farbstoff in der Verdünnung von 1:12,498,000. Nach 1 Stunde zeigten die *Paramäcium*-en folgendes Bild (Abb. 5 A): Das Endoplasma ist deutlich ockergelb gefärbt; auch das Kortikalplasma erscheint gefärbt, aber erheblich schwächer; der Grosskern ist ungefärbt. Von all den durch Neutralrot darstellbaren granulären Bildungen, von denen oben die Rede war, ist nichts zu bemerken. Die Bewegung, Nahrungsaufnahme, die intrazellulären Prozesse, kurz

das ganze Verhalten der Tiere unterscheidet sich in nichts von demjenigen ungefärbter normaler Tiere. Den mit Acridingelb gefärbten Tieren gegenüber zeigt das Sudanbild eine Differenz in folgenden zwei Punkten: Der eine Punkt betrifft die Färbung der Nahrungsballen. Sieht man darauf, dass die Lösung, in der sich die Tiere befinden, keinen unlöslich ausgefallenen Farbstoff enthält, so bleiben die Nahrungsballen auch dann völlig ungefärbt, wenn der Zellkörper eine deutliche Färbung angenommen hat, im Gegensatz zum Verhalten des Acridingelb, das die Nahrungsballen stets intensiver färbt als den Zellkörper. Acridingelb wird — in diesem Punkte stimmt es mit dem Neutralrot überein — von den Nahrungsballen gespeichert, Sudan III hingegen nicht.

Der zweite Punkt, in dem sich Sudan III hinsichtlich seiner Wirkung auf normale Paramäcien von Acridingelb unterscheidet, ist der, dass es gewisse Gebilde, die weder von den Granulafarbstoffen noch von den diffus färbenden Körpern vom Typus des Acridingelb gefärbt werden, deutlich tingiert. Diese Gebilde sind, um es gleich zu sagen, Fettkörnchen. In einer früheren Mitteilung (58) habe ich darauf hingewiesen, dass der Zellkörper von Paramäcien regelmässig Fett enthält. Diese Fettkörnchen nun treten bei der Vitalfärbung mit Sudan III deutlich hervor. Sie färben sich, insbesondere bei Anwendung stärkerer Lösungen etwas intensiver als der Zellkörper und fallen schon dadurch, noch mehr aber durch die abweichende, ins Goldgelbe gehende Nuance der Färbung auf. Dass es sich tatsächlich um Fettkörnchen und nicht etwa um die oben abgehandelten vital färbbaren Granula handelt, wird am einfachsten durch das Verhalten der Körnchen nach Zerdücken der Tiere sichergestellt. Die vital färbbaren Granula werden durch die Einwirkung des umgebenden Wassers zerstört, während die Fettkörnchen unverändert bleiben.

Wäre man darauf angewiesen, die Wirkungsweise der diffus färbenden und der Granulafarbstoffe lediglich nach dem Ausfall der Färbungsversuche mit normalen Tieren zu beurteilen, so müsste man sich mit der Feststellung begnügen, dass es einerseits Farbstoffe gibt, die sich durch eine besondere Affinität zu den Granula auszeichnen, andererseits wieder solche, denen diese Affinität fehlt, während ihre Verwandtschaft zum Zellkörper relativ gross ist. Zu einem weitaus tieferen Verständnis der ganzen Frage gelangt man aber durch die Ausdehnung der Färbungsversuche auf vakuolisierte Paramäcien mit den oben beschriebenen grossen gequollenen Granula. Wie sich derartige Tiere den eben abgehandelten drei Farbstofftypen gegenüber verhalten, soll nun im einzelnen besprochen werden.

### 3. Über die Wirkung von Granulafarbstoffen auf vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula.

Lässt man die Lösung eines Granulafarbstoffes, zum Beispiel des Neutralrot, die gerade so weit verdünnt wurde, dass sie bei normalen Tieren keinen Färbungseffekt mehr hervorruft, auf vakuolisierte Paramäcien mit den oben beschriebenen grossen Granula wirken, so tritt nun doch wieder eine Vitalfärbung auf, und zwar sind es die genannten Granula, die den Farbstoff aufnehmen. Das Speicherungsvermögen der grossen Granula Granulafarbstoffen gegenüber ist ein ganz enormes. Es ist grösser als das irgendeines anderen Gebildes innerhalb der Paramäciumzelle. Mit der Grössenzunahme der Granula wächst deren Speicherungsvermögen für Granulafarbstoffe. Es lässt sich leicht abschätzen, dass die Steigerung der Färbbarkeit nicht etwa bloss der Dickenzunahme der gefärbten Schicht entspricht, sondern dass mit der Grössenzunahme des Granulum sein Speicherungsvermögen absolut, und zwar sehr erheblich, zunimmt. Geht man in der Verdünnung der Lösung so weit, dass letztere bei normalen Tieren keine Granulafärbung mehr bewirkt, so erhält man das in Abb 1 B wiedergegebene Bild: die grösseren Granula tief dunkelrot, die mittelgrossen und kleineren Granula entsprechend heller. Selbstverständlich bleibt der Zellkörper bei diesen Konzentrationen ungefärbt.

Mit der Färbung der grossen Granula ist die Reihe der an vakuolisierten Tieren durch Granulafarbstoffe bewirkten Veränderungen nicht erschöpft. Es wurde oben darauf hingewiesen, dass die Vakuolen derartiger Tiere gelegentlich leer sind, das heisst keine Granula enthalten, sondern bloss von einer klaren, wässrigen Flüssigkeit erfüllt sind. Fügt man nun zu einem Deckglaspräparat, das derartige Paramäcien mit leeren Vakuolen enthält, einen Tropfen einer stark verdünnten Lösung von Neutralrot oder einem anderen Granulafarbstoff hinzu, so lässt sich folgender interessante Vorgang beobachten: Die vor dem Experiment von korpuskulären Elementen völlig freie Vakuole beginnt sich mit Granula zu füllen. Diese Granula sind zunächst klein, nicht viel grösser als normale Endoplasmakörnchen, nehmen aber stetig an Grösse zu, so dass sie nach Verlauf von etwa einer halben Stunde bereits zu ansehnlichen Kugeln herangewachsen sein können. Unmittelbar nach ihrem Erscheinen in der Vakuole sind die Granula hellrosarot gefärbt, der Farbenton vertieft sich aber immer mehr und mehr, so zwar, dass nach kurzer Zeit sämtliche Granula, insbesondere aber die grösseren, tief dunkelrot gefärbt sind. Mit der Dauer des Experimentes nimmt ihre Zahl immer mehr zu, und schliesslich ist die ganze Vakuole von einer grossen Zahl verschieden grosser intensiv gefärbter Granula dicht erfüllt (Abb. 2). Solange die Granula nicht

übermässig gross sind, zeigen sie in besonders schöner Weise das Phänomen der Brownschen Molekularbewegung.

Da die Vakuole vor Beginn der Neutralrotwirkung von körperlichen Elementen völlig frei war, so müssen die Granula aus dem umgebenden Plasma in die Vakuole ausgestossen worden sein<sup>1)</sup>.

#### 4. Über die Wirkung diffus färbender Stoffe auf vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula.

Bringt man vakuolisierte Paramäcien mit grossen Granula in eine Lösung von Sudan III, die in der oben angeführten Weise hergestellt wurde, so findet man nach einer Stunde nicht bloss den Zellkörper diffus gefärbt, sondern es haben auch die Granula eine gelbe Farbe angenommen (Abb. 5 b). Dank der Grösse der granulären Gebilde, dank ferner dem Umstand, dass die in Vakuolen eingeschlossenen Granula durch die völlig farblose Vakuolenflüssigkeit vom gelb gefärbten Endoplasma getrennt sind, ist die Färbung der Granula sehr deutlich erkennbar. Hinsichtlich der Intensität der Färbung besteht, soviel sich abschätzen lässt, zwischen der Färbung der grossen Granula und der Färbung des Zellkörpers kein Unterschied. Selbst die grössten Granula erscheinen nicht stärker gefärbt als der Zellkörper.

Dieser Versuch lehrt, dass Sudan sowohl den Zellkörper als die Granula färbt, die letzteren allerdings nicht stärker als den Zellkörper. Da die kleinen, dem Endoplasma direkt eingelagerten Körnchen normaler Tiere von dem Farbstoff auf keinen Fall stärker gefärbt werden als ihre Umgebung, so können sie sich von der letzteren in keiner Weise abheben, und es muss daher der Zellkörper normaler Tiere gleichmässig gefärbt erscheinen, ohne die Spur einer Granulafärbung.

Anders verhalten sich die Farbstoffe vom Typus des Acridingelb. Bringt man vakuolisierte Paramäcien, die in ihren Vakuolen grosse Granula enthalten, in eine Lösung von Acridingelb, die konzentriert genug ist, um den Zellkörper diffus zu färben, so zeigt es sich, dass sie die grossen Granula weitaus intensiver färbt als den Zellkörper. Bei geeigneter Wahl der Konzentration lässt sich die Färbung so durchführen, dass der Zellkörper ungefärbt bleibt, während die grösseren Granula gefärbt werden (Abb. 4 B); allerdings nur die grösseren, die kleineren bzw. kleinsten Granula bleiben bei den Konzentrationen, die den Zellkörper ungefärbt lassen, ebenfalls ungefärbt. Es ist klar, dass auch diese Farbstoffe normale Tiere immer nur diffus färben können, da die normalen Körnchen von den betreffenden Farbstoffen niemals stärker gefärbt werden als der Zellkörper.

1) Über analoge Vorgänge berichtet Küster (49). Bei der Einwirkung von Neutralrot auf Hefezellen liess sich unter gewissen Bedingungen die dichte Erfüllung der Vakuolen mit aus dem Plasma ausgestossenen Körnchen feststellen.

Es zeigt sich also, dass die Gruppe der diffus färbenden Stoffe, die sich insofern einheitlich verhält, als sie normale Tiere immer nur diffus färbt, ohne Granulafärbung zu bewirken, nach ihrem Verhalten vakuolisierten Paramäcien gegenüber aufzulösen ist in zwei Untergruppen: erstens in Farbstoffe, die zwar nicht die kleineren und kleinsten, wohl aber die grösseren unter den gequollenen Granula intensiver färben als den Zellkörper, und zweitens in solche, die selbst die grössten Granula nicht stärker färben als den Zellkörper.

Die oben beschriebene Ausstossung von Granula in das Innere leerer Vakuolen wird weder von den Farbstoffen des Sudantypus noch von denjenigen des Acridingelbtypus bewirkt.

So sind wir also mit Hilfe der Färbungsversuche an vakuolisierten Paramäcien in der Beurteilung des Vorganges der diffusen und der Granulafärbung um einen Schritt weiter gekommen. Wir erkennen jetzt, dass ein Gegensatz zwischen Granulafarbstoffen und diffus färbenden Stoffen in dem Sinne, als ob nur die ersteren Granula färbten, die letzteren aber nicht, nicht besteht. Beide Gruppen von Farbstoffen färben sowohl den Zellkörper als die Granula; was sie unterscheidet, ist lediglich der Umstand, dass die diffus färbenden Stoffe die kleinen Körnchen normaler Paramäcien nicht stärker färben als den Zellkörper, während die Granulafarbstoffe schon die normalen Körnchen um ein so Bedeutendes stärker färben als den Zellkörper, dass sich für sie leicht eine Konzentration treffen lässt, bei der nur die Granula gefärbt werden, der Zellkörper aber ungefärbt bleibt.

Es wurde oben darauf hingewiesen, dass die Granulafarbstoffe und die diffus färbenden Stoffe Extreme der Farbstoffwirkung darstellen, und dass es eine Gruppe von Farbstoffen gibt, die hinsichtlich ihrer Wirkung eine Mittelstellung zwischen den genannten einnehmen. Von dieser Gruppe von Farbstoffen soll jetzt die Rede sein.

5. Über die Wirkung von Farbstoffen, die hinsichtlich ihres Färbungseffektes zwischen den Granulafarbstoffen und den diffus färbenden Stoffen stehen. Die Färbbarkeit normaler Granula ein komplizierter Vorgang.

Als Beispiel eines derartigen Farbkörpers wählen wir den Farbstoff Äthylviolett. Die Wirkung der verdünntesten Lösung, die einen Färbungseffekt zu bewirken imstande ist, besteht lediglich darin, dass sie die Nahrungsballen färbt. Eine etwas konzentriertere Lösung bewirkt eine diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers. Von gefärbten Granula ist zunächst nichts zu bemerken. Solche treten gelegentlich nach längerer Farbstoffwirkung auf. In anderen Fällen vermisst man sie selbst nach stundenlanger Einwirkung. Geht man zu noch stärkeren Konzentrationen über, so erhält man von vornherein das nämliche

Färbungsbild, wie es oben als dritte Wirkungsstufe von Granulafarbstoffen beschrieben wurde. Neben einer diffusen violetten Färbung des ganzen Zellkörpers tritt jetzt eine ziemlich intensive Granulafärbung auf. Die Wirkung auf vakuolisierte Tiere mit gequollenen Granula deckt sich mit derjenigen der Granulafarbstoffe. Das Äthylviolett nimmt also hinsichtlich seiner Wirkung auf Paramäcien eine Zwischenstellung ein zwischen den Granulafarbstoffen vom Typus des Neutralrot und den diffus färbenden Stoffen vom Typus des Acridingelb. In seiner verdünnten Lösung stimmt das Äthylviolett mit dem Acridingelb überein, während es sich in konzentrierter Lösung wie ein Granulafarbstoff verhält. Dem letzteren gegenüber besteht der Unterschied, dass man bei Herabsetzung der Konzentration einer Äthylviolettlösung nie zu einem Punkt gelangt, bei dem der Farbstoff bei normalen Tieren eine reine Granulafärbung ohne gleichzeitige Zellkörperfärbung hervorruft. Verdünnung der Lösung bewirkt vielmehr stets nur reine Diffusfärbung ohne Granulafärbung. Diese Beobachtung erscheint zunächst befremdlich, lehrt doch der Augenschein, dass bei mit Äthylviolett gefärbten normalen Paramäcien, die neben diffuser Zellkörperfärbung gefärbte Granula aufweisen, diese weitaus intensiver gefärbt sind als der Zellkörper. Läge die Sache einfach so, dass sich die Granula nur durch den höheren Grad ihrer im übrigen konstanten Färbbarkeit vom Zellkörper unterschieden, dann müsste sich bei zunehmender Verdünnung der Farbstofflösung eine Konzentration treffen lassen, die nur die Granula färbt, den Zellkörper aber ungefärbt lässt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Dieses anscheinend paradoxe Verhalten findet seine Erklärung darin, dass es sich bei der Färbung normaler Granula nicht einfach um die Anfärbung eines Substrates von konstanter Färbbarkeit handelt, sondern dass die Färbbarkeit des Granulum infolge der Wirkung des Farbstoffes eine Änderung erfährt. Dafür spricht zunächst folgende Erfahrung: Färbt man normale Paramäcien mit irgend einem Granulafarbstoff, zum Beispiel mit Neutralrot, so wird man, mag die Steigerung der Farbstoffkonzentration in noch so vorsichtiger Weise erfolgen, stets die Beobachtung machen, dass, wenn einmal gefärbte Granula auftreten, die letzteren immer von vornherein recht intensiv gefärbt sind. Der unvermittelte sprunghafte Übergang von der Farblosigkeit des Granulums zur intensiven Färbung lässt nur die Deutung zu, dass unter der Wirkung des im Granulum sich anhäufenden Farbstoffes, dessen Konzentration innerhalb der Granulumsubstanz zunächst zu gering war, um sich als Färbung des Körnchens bemerkbar zu machen, plötzlich eine Veränderung in der Granulumsubstanz eintritt, die die Aufnahmefähigkeit des Granulum für den Farbstoff mit einem Schlag ganz bedeutend steigert. Worin diese Veränderung besteht, kann nach dem früher Auseinandergesetzten

nicht zweifelhaft sein. Da bei der Umbildung der normalen Endoplasmakörnchen zu den grossen gequollenen Granula die Färbbarkeit der granulären Gebilde in demselben Maasse wächst, in dem ihre Grösse zunimmt, liegt die Annahme nahe, dass der Beginn dieses mit Quellung einhergehenden Prozesses eben den Vorgang darstellt, der aus einem normalen Granulum plötzlich ein intensiv färbbares macht.

Die Vorstellung, dass es sich schon bei der Granulafärbung normaler Tiere eigentlich nicht mehr um die Färbung normaler, sondern im Sinne einer erhöhten Färbbarkeit veränderter Granula handelt, erklärt das Verhalten der Farbstoffe vom Typus des Äthylviolett. Bei einer bestimmten Konzentration der Aussenlösung tritt diffuse Zellkörperfärbung, aber keine Granulafärbung auf, weil die Konzentration des Farbstoffes innerhalb des Granulum nicht genügend gross ist, um jenen Prozess auszulösen, der die starke Färbbarkeit des Granulum bewirkt. Erst wenn mit der zunehmenden Stärke der einwirkenden Lösung die Konzentration im Granulum denjenigen Grad erreicht, bei dem die gedachte Veränderung in der Granulums substanz vor sich geht, tritt eine intensive Färbung der letzteren ein. Anders bei den eigentlichen Granulafarbstoffen, bei denen die supponierte Veränderung im Granulum schon zu einem Zeitpunkt auftritt, in dem der Zellkörper noch ungefärbt ist.

Durch die hier dargelegte Vorstellung von dem Vorgang der Färbung normaler Granula werden die im vorstehenden entwickelten Ausführungen über das Zustandekommen der reinen Granulafärbung und der diffusen Färbung sowie über den Unterschied zwischen Granulafarbstoffen und diffus färbenden Stoffen nicht berührt; es ist lediglich die Vorstellung von einer einfachen Färbung der normalen Granula zu ersetzen durch die Annahme des eben auseinandergesetzten komplizierten Vorganges.

Der Zellkörper hat die Tendenz, die mit Farbstoff beladenen Granula auszustossen. Bildet das Tier Nahrungsvakuolen, so werden die gefärbten Granula in die letzteren ausgestossen; bei vakuolisierten, keine Nahrungsvakuolen mehr bildenden Tieren erfolgt die Ausstossung der gefärbten Granula in die grossen, nur von wässriger Flüssigkeit gebildeten Vakuolen; ja selbst an den sonst fixen reihenförmig angeordneten subpellikulären Körnchen lässt sich eine Abstossung beobachten, sobald deren Quellung und Beladung mit Farbstoff einen gewissen Grad erreicht hat.

#### b) Die Avitalfarbstoffe.

Der Gesamtheit der bisher besprochenen Vitalfarbstoffe steht die Gruppe derjenigen Farbstoffe gegenüber, denen jede färbende Wirkung auf lebende Paramäcien abgeht. Farbstoffe wie Kristallorange GG,

Chromotrop 8 B, Kongorot usw., mögen in noch so konzentrierter, ja selbst in gesättigter Lösung zur Verwendung gelangen, die Tiere bleiben völlig ungefärbt. Es kommt weder zu einer Granulafärbung, noch zu einer Diffusfärbung, noch zu einer Vitalfärbung der Nahrungsballen. Charakteristisch für die letztere ist der Umstand, dass die Vitalfärbung der Nahrungsvakuole erst zu einer Zeit beginnt, wo die Nahrungsvakuole völlig vom Endoplasma umschlossen ist. Eine derartige Färbung vom Plasma völlig umschlossener Nahrungsvakuolen kann kein Avitalfarbstoff bewirken. Andererseits versteht es sich von selbst, dass in der Lösung des Avitalfarbstoffes enthaltene ungelöste Farbstoffpartikel sowie gefärbter Detritus von den Tieren eingestrudelt werden, und auf solche Weise auch eine Art von Nahrungsballenfärbung zustandekommt. Im Einzelfall unterliegt es keiner Schwierigkeit, diese beiden Arten von Nahrungsballenfärbung scharf zu unterscheiden.

**c) Die vier Gruppen der Vitalfarbstoffe bilden, durch Übergangsglieder verbunden, eine kontinuierliche Reihe.**

Nach der Art ihrer Wirkung auf lebende Paramäcien lassen sich dem Gesagten zufolge die Vitalfarbstoffe folgendermaassen einteilen:  $\alpha$ ) Granulafärber: Sie färben die Granula normaler Tiere.  $\beta$ ) Diffus färbende Stoffe: Sie bewirken bei normalen Paramäcien immer nur diffuse Zellkörperfärbung ohne Granulafärbung. Die Granulafarbstoffe zerfallen in zwei Untergruppen: 1. in die Granula elektiv färbende Stoffe, die, in bestimmter Konzentration angewendet, bei normalen Tieren eine reine Granulafärbung ohne gleichzeitige Zellkörperfärbung hervorrufen und 2. in Farbstoffe, die bei normalen Paramäcien neben der Granulafärbung stets eine diffuse Färbung des Zellkörpers bewirken. Die diffus färbenden Stoffe sind ebenfalls von zweierlei Art: 1. relative Diffusfärber. Sie bewirken wohl bei normalen Tieren stets eine reine Diffusfärbung, bei Paramäcien mit gequollenen Granula färben sie jedoch letztere stets erheblich stärker als den Zellkörper; 2. absolute Diffusfärber. Sie färben selbst bei Paramäcien mit gequollenen Granula letztere niemals stärker als den Zellkörper.

Hält man sich bei der Einteilung der Farbstoffe an die eben angegebenen Kriterien, so erscheint mit der Aufstellung der angeführten Gruppen die Zahl der durch eine bestimmte Wirkung charakterisierten Farbstofftypen tatsächlich erschöpft. Richtet man jedoch seine Aufmerksamkeit auf gewisse Einzelheiten des Färbungsvorganges, so gelangt man zur Erkenntnis, dass auch die Farbstoffe einer Gruppe in ihrem Verhalten nicht völlig übereinstimmen, sondern gewisse Unterschiede erkennen lassen, so zwar, dass sich gewisse Farbstoffe der Gruppe in ihrem Verhalten den Farbkörpern der einen Nachbargruppe nähern, während andere Farbstoffe der nämlichen Gruppe in ihrer Wirkungsart den Farbkörpern der anderen Nachbargruppe näher

kommen. Mit anderen Worten: Die einzelnen Gruppen erscheinen durch Übergangsglieder miteinander verbunden.

In anschaulicher Weise demonstrieren das gedachte Verhalten die diffus färbenden Stoffe vom Typus des Acridingelb. Von diesem Farbstoff, der als das Paradigma der Gruppe gewählt wurde, gilt, dass er in bestimmter Konzentration die grossen und mittelgrossen Granula vakuolisierter Paramäcien färbt, die kleineren hingegen und den Zellkörper ungefärbt lässt. Ein Farbstoff dieser Gruppe, dessen relative (relativ im Verhältnis zur Färbbarkeit des Zellkörpers) Affinität zu den Granula weitaus grösser ist, als dies beim Acridingelb der Fall ist, ist der basische Farbstoff Fuchsin. Werden vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula der Wirkung von Fuchsin ausgesetzt, so zeigt es sich, dass sich die Färbung auf viel kleinere Granula erstreckt, als dies beim Acridingelb der Fall ist, so dass die Gesamtheit der gefärbten Granula hier weitaus grösser ist. Überdies ist die Färbung eine viel intensivere.

Als Beispiele von Farbkörpern, deren relative Affinität zu den grossen Granula geringer ist als beim Acridingelb, mögen die Farbstoffe Indulinscharlach und Safranin angeführt werden. Während es mit Leichtigkeit gelingt, vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula mit Acridingelb derart zu färben, dass die grossen Granula den Farbstoff aufnehmen, der Zellkörper aber ungefärbt bleibt, erhält man mit den beiden genannten Farbstoffen unter den gleichen Verhältnissen stets nur eine gleichmässige Färbung von Zellkörper und Granula ganz in der Weise wie bei der Färbung mit Sudan. Dass die Farbstoffe Indulinscharlach und Safranin nicht dem Sudantypus angehören, sondern in Übereinstimmung mit Acridingelb die grossen, gequollenen Granula stärker färben als den Zellkörper, lässt sich durch folgenden Kunstgriff erweisen: Man setzt der Paramäcienaufschwemmung, die man zum Zwecke der Bildung von Vakuolen und gequollenen Granula aufstellt, den betreffenden Farbstoff, also Indulinscharlach oder Safranin, von vornherein zu. Man erhält dann gefärbte Granula bei farblosem Zellkörper.

Ein Farbstoff der Acridingelbgruppe, bei dem auch der beschriebene Kunstgriff nicht zum Ziele führt, ist Azinscharlach. Dass er trotzdem die Substanz der grossen gequollenen Granula stärker färbt als den Zellkörper, zeigt sich, wenn die Granula nicht mehr die Kugelform unverschrter granulärer Gebilde besitzen, sondern leicht geschrumpft sind. Diese leicht geschrumpften Granula werden von Azinscharlach stärker gefärbt als der Zellkörper. Nun lässt sich aber zeigen, dass während der Schrumpfung der grossen Granula, wobei diese eine spindelförmige oder unregelmässige Gestalt gewinnen, eine beträchtliche Zunahme der Färbbarkeit für sämtliche Granulafarbstoffe statthat.

Aus den angeführten Beobachtungen geht also hervor, dass der Unterschied zwischen der Färbbarkeit des Zellkörpers und der Färbbarkeit der Granula bei den einzelnen Farbkörpern der Acridingelbgruppe sehr verschieden ist. Relativ gross ist dieser Unterschied beim Fuchsin, er nimmt ab beim Acridingelb, noch kleiner ist er beim Indulinscharlach oder Safranin und am kleinsten beim Azinscharlach. Der letztgenannte Farbstoff bildet den Übergang zu den Farbstoffen vom Sudantypus, während andererseits Fuchsin den Anschluss an die Granulafarbstoffe vermittelt. Für die beiden Untergruppen der letzteren konnte gezeigt werden, dass die Verschiedenheit in der Wirkungsart der Neutralrotgruppe und der Äthylviolettgruppe letzten Endes darauf zurückzuführen ist, dass die Differenz zwischen der Färbbarkeit des Granulum und derjenigen des Zellkörpers hinsichtlich der Farbstoffe der Neutralrotgruppe weitaus grösser ist als hinsichtlich der Farbkörper der Äthylviolettgruppe.

So gelangen wir zu dem Ergebnis, dass sich sämtliche Vitalfarben nach der Grösse der Differenz zwischen der Färbbarkeit der Granula und der Färbbarkeit des Zellkörpers in eine kontinuierliche Reihe ordnen lassen, die mit den eigentlichen Granulafarbstoffen beginnt und mit den diffus färbenden Stoffen vom Typus des Sudan abschliesst.

## **B. Worauf beruhen die bei lebenden Paramäcien zu beobachtenden Färbungsphänomene?**

Die im vorstehenden durchgeführte Analyse der Färbungserscheinungen gestattet es, die Fragen nach der Ursache all der geschilderten Färbungsphänomene folgendermaassen zu formulieren:

1. Worauf beruht es, dass gewisse Farbstoffe bei keiner Konzentration den Zellkörper oder Granula färben, während andere Farbstoffe Zellkörper und Granula färben?

2. Worauf beruht es, dass von den Vitalfarbstoffen, die einen Zellkörper und Granula gleichmässig, das heisst die Granula nicht stärker als den Zellkörper färben, während die anderen die Granula intensiver färben als den Zellkörper?

3. Worauf beruht die Erscheinung, dass unter den Farbstoffen, welche die Granula stärker färben als den Zellkörper, einzelne schon die kleinen Granula normaler Tiere weitaus stärker färben als den Zellkörper, während bei anderen Farbkörpern dieser Kategorie das stärkere Färbvermögen sich erst den grossen, gequollenen Granula vakuolisierter Tiere gegenüber geltend macht?

4. Worauf beruht die Farbstoffspeicherung in den Nahrungsbällen?

### a) Der Zellkörper als Lösungsmittel für Farbstoffe.

Wie immer man sich zur Frage der Konsistenz des lebenden Plasmas stellen mag, darüber kann wohl kein Zweifel bestehen, dass das Paramäciendoplasma flüssig ist, und dass dieses flüssige Endoplasma ebensogut Träger vitaler Funktionen ist, wie die als Kortikalplasma bezeichneten zäheren Randpartien des Zellkörpers. Wenn nun in den voranstehenden Abschnitten dargelegt wurde, dass dieses flüssige Plasma, ohne seine normalen Funktionen aufzugeben, in seiner Gänze gefärbt werden kann, und zwar so gleichmässig, dass die Färbung selbst für die stärksten optischen Systeme vollkommen homogen erscheint, so bedeutet dies nichts anderes, als dass bei der Färbung des lebenden Zellkörpers eine Verteilung des Farbstoffes auf zwei miteinander nicht mischbare flüssige Systeme statthat, auf das Wasser der Farbstofflösung einerseits und das lebende Plasma andererseits. Der Ausdruck „Verteilung“ sei hier zunächst in seiner allgemeinsten Bedeutung angewendet, ohne dass mit ihm eine bestimmte Voraussetzung hinsichtlich der Ursache der Verteilung verknüpft wäre. Die nächste Frage ist nun allerdings die nach der Natur der Kräfte, die diese Verteilung der Farbstoffe zwischen wässriger Lösung und Zellplasma bewirken.

Beim Versuch, die Frage der Entscheidung näherzubringen, ging ich von folgender Überlegung aus: Gesetzt den Fall, es gelänge ein mit Wasser nicht mischbares flüssiges System aufzufinden, das sich bei der Ausschüttelung mit wässrigen Farbstofflösungen in allen Belangen so verhielte wie der lebende Zellkörper bei der Vitalfärbung, dann wäre die Annahme wohl gerechtfertigt, dass der Vorgang der Farbstoffaufnahme in beiden Fällen auf analoge Ursachen zurückzuführen ist. Damit ein derartiges flüssiges System als völliges Analogon des lebenden Zellkörpers in bezug auf den Färbungsvorgang gelten könnte, müssten folgende Bedingungen erfüllt sein: Das betreffende flüssige System müsste aus wässrigen Farbstofflösungen beim Ausschütteln alle jene Farbstoffe aufnehmen, die der lebende Zellkörper aufnimmt und andererseits ungefärbt bleiben bei der Ausschüttelung derjenigen Farbstofflösungen, die den lebenden Zellkörper ungefärbt lassen. Es müsste aber auch in bezug auf die quantitativen Verhältnisse der Farbstoffaufnahme mit dem lebenden Zellkörper völlig übereinstimmen, das heisst der zunehmenden Ausschüttelbarkeit müsste auch eine Zunahme der Färbekraft entsprechen. Ferner müsste eine derartige Ausschüttelungsflüssigkeit geeignet sein, das färberische Verhalten der Granula aufzuklären. Schliesslich müsste die chemische Natur der gedachten Ausschüttelungsflüssigkeit derartig sein, dass der Annahme analoger Verbindungen innerhalb des Zellkörpers nichts im Wege stünde. Ein solches flüssiges System würde nun in der Tat ein Modell des lebenden Zellkörpers in bezug auf

den vitalen Färbungsvorgang darstellen. Setzen wir nun weiter den Fall, die gefundene Flüssigkeit wäre ein Körper von wohl determinierten chemisch-physikalischen Eigenschaften, dessen Verhalten bei der Farbstoffaufnahme dem Verständnis keine Schwierigkeiten bereiten würde, dann wäre mit der Auffindung der gedachten Ausschüttelungsflüssigkeit auch das Problem der Farbstoffaufnahme seitens des lebenden Zellkörpers gelöst. Der Auffindung eines derartigen Modells galten nun die nachstehenden Untersuchungen

Bevor auf die einzelnen Versuche eingegangen wird, seien einige Bemerkungen vorausgeschickt, die sich auf die sehr einfache Methodik der Versuche beziehen. Hinsichtlich der Färbungsversuche wurde schon darauf hingewiesen, dass zwecks Erzielung gleichmässiger Versuchsbedingungen die Kulturflüssigkeit mit den Paramäcien zunächst auf das Zwanzigfache mit Leitungswasser verdünnt wurde, worauf zwei Teile dieses die Paramäcien enthaltenden Leitungswassers mit einem Teile der mittels destillierten Wassers hergestellten Farbstofflösung von berechneter Konzentration vermischt wurden. Wasserunlösliche alkohollösliche Farbstoffe wurden derart verwendet, dass die Flüssigkeit, in der sich die Paramäcien schliesslich befanden, nicht mehr als 2% Alkohol enthielt. In jedem Fall bestand die Lösung, in der die Tiere gefärbt wurden, aus zwei Teilen Leitungswasser und einem Teile destillierten Wassers.

Bei der Bestimmung der färbenden Grenzkonzentration, d. i. der stärksten Verdünnung, die den Zellkörper noch deutlich erkennbar färbt, wurde immer nur die Färbung des ganzen Zellkörpers und nicht etwa bloss diejenige des vordersten Körperabschnittes berücksichtigt. Die Beurteilung der Färbung wurde stets mittels Leitz Obj. 5 bei geöffneter Blende und Tageslicht vorgenommen.

Die zur Ausschüttelung bestimmten Farbstofflösungen wurden in Anpassung an die Färbungsversuche ebenfalls durch Auflösen des Farbstoffes in zwei Teilen Leitungswasser und einem Teil destillierten Wassers hergestellt. In bezug auf die Konzentration der Lösung war Folgendes zu beachten: Da von vornherein damit zu rechnen war, dass sich das Teilungsverhältnis der Farbstoffe zwischen den beiden miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln mit der Konzentration der Farbstofflösung ändert, so empfahl es sich, die Konzentration der auszuschüttelnden Lösung so zu wählen, dass sie mit der vital färbenden Konzentration übereinstimmte. Eine genaue Übereinstimmung beider ist allerdings nicht notwendig; es genügt, wenn beide Konzentrationen innerhalb eines Bereiches liegen, in dem sich der Teilungskoeffizient nicht sehr erheblich ändert. Dieser letztere Umstand war insofern von Wichtigkeit, als die zur Bestimmung des Teilungsverhältnisses angewendete kolorimetrische Methode über ein gewisses Maass der Verdünnung hinausgehen nicht gestattete. Dem Umstand, dass es bei unseren Versuchen vielfach darauf ankam, verschiedene Farbstoffe bezüglich ihrer Ausschüttelbarkeit untereinander zu vergleichen, wurde durch Verwendung äquimolekularer Lösungen Rechnung getragen.

Mit Rücksicht auf die angeführten Momente wurde folgender Vorgang eingeschlagen: Die Farbstoffe 1—52 (Tabelle I), von denen die weitaus meisten in stark verdünnter Lösung vital färben, wurden, sofern sie wasserlöslich sind, zu den Ausschüttelungsversuchen in Lösungen verwendet, die mit einer Methylenblaulösung 1:12000 äquimolar waren. Von den wasserunlöslichen Farbstoffen wurden die Lösungen in der Weise hergestellt, dass die konzentrierte alkoholische Lösung mit der entsprechenden Menge Wasser verdünnt wurde. Der Alkoholgehalt der Lösung übte in den in Frage kommenden

Konzentrationen auf das Ausschüttelungsresultat keinen merklichen Einfluss aus. Von den Farbstoffen 53–120, bei denen es sich nur um den Vergleich unter einander und nicht mit den vorangehenden handelte, wurden stärkere Konzentrationen zur Ausschüttelung verwendet, da die vital färbenden Stoffe unter ihnen ebenfalls fast durchweg erst in stärkerer Konzentration vital färbend wirken. Die angewendeten Lösungen waren mit einer Lösung von Brillantorange R. 1:4000 äquimolar.

Zur Bestimmung des Ausschüttelungsresultates wurde ein Kolorimeter verwendet, der aus dem Sahl'schen Hämoglobinometer in der Weise hergestellt worden war, dass das Röhrchen mit der Vergleichslösung durch eine zweite graduierte Epruvette ersetzt wurde. In das eine Röhrchen wurden abgemessene Mengen Farbstofflösung und Ausschüttelungsflüssigkeit (2,4 ccm Farbstofflösung und 0,4 ccm Ausschüttelungsflüssigkeit) eingefüllt und beide Flüssigkeiten bis zur Konstanz der Verteilung des Farbstoffes durchgeschüttelt. In das andere Röhrchen wurde eine bestimmte Menge der nämlichen Farbstofflösung gebracht. Hatten sich im Ausschüttelungs-röhrchen die beiden Flüssigkeiten so weit voneinander getrennt, dass die wässrige Lösung wieder vollständig klar war, dann wurde das Teilungsverhältnis bestimmt. Im allgemeinen waren folgende Ausschüttelungsresultate festzustellen: 1. Die wässrige Farbstofflösung erschien nach der Ausschüttelung vollkommen entfärbt; in diesem Falle hatte der Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ausschüttelungsfl.}}{\text{Wasser}}$  jedenfalls einen sehr hohen Wert. Wir bezeichnen ihn als  $mx = \text{maximal}$ . 2. Die wässrige Lösung erschien nach der Ausschüttelung noch immer deutlich gefärbt. Durch den Vergleich mit der ursprünglichen Lösung im anderen Röhrchen, d. h. durch Verdünnung eben dieser Lösung bis zu dem Grade, dass sie mit der Lösung des Ausschüttelungs-röhrchens im Farbenton übereinstimmte, liess sich die Farbstoffabnahme und aus dieser der Teilungskoeffizient berechnen. 3. Die wässrige Farbstofflösung erschien nach der Ausschüttelung deutlich schwächer gefärbt als die Ausschüttelungsflüssigkeit, aber die Farbstoffabnahme war im Vergleich zur Färbung der ursprünglichen Lösung zu gering, um sich kolorimetrisch berechnen zu lassen. In diesem Falle wurde der Teilungskoeffizient als  $> 1$  bezeichnet. 4. Ausschüttelungsflüssigkeit und wässrige Lösung erschienen nach der Ausschüttelung annähernd gleich gefärbt; Teilungskoeffizient = ungefähr 1. 5. Die Ausschüttelungsflüssigkeit erschien nach der Ausschüttelung schwächer gefärbt als die wässrige Lösung; Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ausschüttelungsfl.}}{\text{Wasser}} = < 1$ . Schliesslich 6. Die Ausschüttelungsflüssigkeit ist vollkommen farblos geblieben; Teilungskoeffiz.  $\frac{\text{Ausschüttelungsfl.}}{\text{Wasser}} = 0$ .

Es gibt Farbstoffe, deren Lösungen bei der Ausschüttelung mit den von uns verwendeten Substanzen ihren Farbenton etwas ändern, wodurch der Vergleich mit der ursprünglichen Lösung erschwert wird. Ferner zeigen einzelne Farbkörper das Verhalten, dass sie bei der Ausschüttelung zum Teil ausgefällt werden; selbstverständlich lässt in diesem Falle die Farbstoffabnahme der wässrigen Lösung keinen Schluss zu auf die Verteilung des Farbstoffes zwischen den beiden Lösungsmitteln. Glücklicherweise sind die beiden angeführten Erscheinungen selten, so dass sie der allgemeinen Anwendung der beschriebenen Methode nicht im Wege stehen. Schliesslich hatten unserer kolorimetrischen Methode als solcher gewisse Ungenauigkeiten an<sup>1)</sup>. Da es sich aber bei unseren Versuchen nur um die Verwertung

1) Die kolorimetrische Bestimmung mittels des angewendeten Apparates gewinnt ganz erheblich an Schärfe, wenn man den Apparat mit einer Platte

grösserer Unterschiede in der Ausschüttelbarkeit handeln konnte, fanden wir mit der Methode, die sich andererseits durch ihre Einfachheit und den Vorteil der Zeitersparnis empfahl, unser Auslangen.

### 1. Flüssiges Neutralfett (Mandelöl) als Ausschüttelungsflüssigkeit.

Die Frage, die wir uns zunächst stellten, lautete: Ist ein flüssiges Neutralfett — etwa Mandelöl oder Olivenöl — die gesuchte Substanz, die sich bei der Ausschüttelung mit wässrigen Farbstofflösungen in allen Stücken so verhält wie der Zellkörper bei der Vitalfärbung? In den Rubriken 1—32 der Tabelle I sind alle diejenigen Farbstoffe zusammengestellt, deren Verteilung bei der Ausschüttelung mit Mandelöl stark zugunsten der Ölphase ausfiel. Die betreffenden Farbstoffe sind

in der Tabelle nach absteigendem Teilungskoeffizienten  $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$  geordnet. Die Reihe beginnt mit Farbstoffen, deren Ausschüttelbarkeit „maximal“ ist und endet mit Farbstoffen, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$  auf 3 geschätzt wurde. Wie verhält sich nun bei all den an-

geführten Farbstoffen das Färbevermögen dem lebenden Zellkörper gegenüber? Ein Blick auf die Spalte 3 der Tabelle zeigt, dass alle die genannten Farbstoffe das Vermögen besitzen, den lebenden Zellkörper des *Paramäcium diffus* zu färben.

Ist somit die Aufnahmefähigkeit des lebenden Zellkörpers für Farbstoffe gleichzusetzen derjenigen des Öls? Dies wäre nur dann statthaft, wenn auch die Umkehrung der eben genannten Regel Geltung hätte, das heisst wenn alle Vitalfarben durch Öl ausschüttelbar wären. Nun, das trifft nicht zu. Verfolgen wir in der Tabelle I die Reihe der Farbstoffe weiter, so begegnen wir in den Rubriken 33—35 einigen

Farbstoffen, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$  etwas grösser ist als 1;

dann folgt eine lange Reihe von Farbkörpern — 36—45 — deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$  ungefähr = 1 ist, das heisst nach der

Ausschüttelung ist die Konzentration der Farbstoffe im Öl ungefähr die gleiche wie in der wässrigen Lösung. Auch diese Farbstoffe besitzen insgesamt das Vermögen, den lebenden Zellkörper zu färben, und zwar in sehr stark verdünnter Lösung. So färbt Acridingelb den ganzen Zelleib von *Paramäcien* noch in einer Verdünnung von 1 : 150000, Auramin O in einer Verdünnung von 1 : 600000, Acridin-

verdeckt, die etwa in ihrer Mitte einen horizontalen ca. 5 mm breiten Spalt besitzt, so dass die beiden Röhren nur innerhalb dieses Spaltes zutage treten.

orange in der starken Verdünnung von 1 : 1000000 usw. Es sind dies Lösungen, die so erheblich verdünnt sind, dass sie in einer Schicht von einigen Millimetern vollkommen farblos erscheinen. Wenn nun andererseits unter der Wirkung der genannten Lösungen der Paramäciumkörper in einer unter dem Mikroskop sehr deutlich erkennbaren Weise gefärbt wird, so beweist dies, dass von einer gleichmässigen Verteilung des Farbstoffes zwischen Zellkörper und wässriger Lösung nicht die Rede sein kann, sondern dass der lebende Zellkörper den Farbstoff in einer ganz erheblich stärkeren Konzentration enthalten muss als die wässrige Lösung. Der lebende Zellkörper verhält sich demnach den genannten Farbstoffen gegenüber ganz anders als das Öl bei der Ausschüttelung. Bei den Farbstoffen 46, 47 und 48 ist der Teilungs-

koefizient  $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$  kleiner als 1, das heisst sie verteilen sich bei der

Ausschüttelung zugunsten der wässrigen Phase, und dennoch besitzen sie die Fähigkeit, den lebenden Zellkörper in ziemlich verdünnter Lösung zu färben, so zum Beispiel Methylgrün N pulv. (A) in einer Konzentration von 1 : 14000. Die Farbstoffe 49, 50 und 51 endlich haben den Teilungskoeffizient = 0, das heisst aus ihren wässrigen Lösungen setzt sich nach der Ausschüttelung das Öl vollkommen ungefärbt ab, und trotzdem besitzen auch sie das Vermögen, den lebenden Zellkörper zu färben. Man sieht also, dass es eine grosse Zahl von Vitalfarbstoffen gibt, die vom Öl bei der Ausschüttelung entweder gar nicht oder nicht in einem Maasse aufgenommen werden, das der Verteilung des Farbstoffes bei der Vitalfärbung entsprechen würde. Daraus folgt, dass flüssiges Neutralfett unmöglich die gesuchte Ausschüttelungsflüssigkeit darstellen kann.

Dass sich flüssiges Neutralfett bei der Ausschüttelung mit wässrigen Farbstofflösungen auch noch in anderer Beziehung anders verhält als der Zellkörper bei der Vitalfärbung, erhellt aus folgender Beobachtung: Eine Anzahl basischer Farbstoffe wird vom Öl mit einer Farbe aufgenommen, die von derjenigen des Farbstoffes in wässriger Lösung erheblich verschieden ist. So wird Neutralrot, das in neutraler wässriger Lösung kirschrot ist, von Öl mit rein gelber Farbe aufgenommen. Das in neutraler wässriger Lösung violette Neutralviolett wird vom Öl ebenfalls mit gelber Farbe aufgenommen; Nilblausulfat und Nilblauchlorhydrat, die in wässriger Lösung rein blau sind, werden vom Mandelöl mit rotvioletter Farbe aufgenommen; das in wässriger Lösung fuchsinrote Rhodamin B entfärbt sich bei der Aufnahme ins Öl usw. Diese Erscheinung hat darin ihren Grund, dass die vom Öl aufgenommene Farbbasis anders gefärbt ist als das Farbsalz. Die freie Basis des Neutralrot und Neutralviolett ist gelb, die der Nilblausalze rotviolett usw. Untersucht man nun, in welcher Weise sich die ge

nannten Stoffe lebenden Paramäcien gegenüber verhalten, so zeigt es sich, dass der lebende Zellkörper nicht im Tone der freien Base gefärbt wird, sondern in der Farbe des Salzes: Neutralrot, Neutralviolett und Rhodamin B färben den lebenden Zellkörper rot, die Nilblausalze rein blau usw. Der lebende Zellkörper des Paramäcium verhält sich also bei der Färbung auch in dieser Hinsicht anders als das Öl bei der Ausschüttelung.

Tabelle I.

Nummer	Farbstoff	Färbt den lebenden Zellkörper?	Grenzkonzentration für die Vitalfärbung des Zellkörpers 1 Teil Farbstoff in Teilen Wasser	Färbt die Granula normaler Tiere?	Färbt bei normal. Tieren Granula ohne gleichzeit. Zellkörperfärbung?	Färbt die grossen Granula vakuolis. Tiere stärker als den Zellkörper	Öl		
							Teil.-Koeff. Wasser	Ölsäure Wasser	Diam. Öls. Wasser
1	Sudan I (G) . . . . .	+	4500 000	—	—	—	mx	mx	mx
2	Sudan II (G) . . . . .	+	1000 000	—	—	—	mx	mx	mx
3	Sudan III (G) . . . . .	+	12500 000	—	—	—	mx	mx	mx
4	Sudan IV (G) . . . . .	+	3600 000	—	—	—	mx	mx	mx
5	Sudanbraun (G) . . . . .	+	1000 000	—	—	—	mx	mx	mx
6	Braun G 1437 (Br) . . . . .	+	1000 000	—	—	—	mx	mx	mx
7	Zinnoberrot 1233 (Br) . . . . .	+	1300 000	—	—	—	mx	mx	mx
8	Scharlach R 1599 (Br) . . . . .	+	1600 000	—	—	—	mx	mx	mx
9	Indophenol (DH) . . . . .	+	70 000	+	—	+	mx	mx	mx
10	Chrysoidin (M) . . . . .	+	1500 000	—	—	—	mx	mx	mx
11	Äthylviolett (B) . . . . .	+	1200 000	+	—	+	mx	mx	mx
12	Viktoriablau R (B) . . . . .	+	800 000	+	+	+	mx	mx	mx
13	Indoinblau (B) . . . . .	+	135 000	—	—	+	mx	mx	mx
14	Indulin spritl. (B) . . . . .	+	125 000	+	—	+	mx	mx	mx
15	Magdalarot (Merck) . . . . .	+	250 000	—	—	+	mx	mx	mx
16	Nilblausulfat (G) . . . . .	+	300 000	+	+	+	mx	mx	mx
17	Kristallviolett ch. r. (M) . . . . .	+	2000 000	+	—	+	mx	mx	mx
18	Janusblau G (M) . . . . .	+	68 000	+	—	+	42	mx	mx
19	Indulinscharlach (B) . . . . .	+	175 000	—	—	+	30	mx	mx
20	Methylviolett B ch. r. (M) . . . . .	+	250 000	+	—	+	30	mx	mx
21	Neutralviolett (C) . . . . .	+	300 000	+	+	+	30	mx	mx
22	Bismarckbraun (G) . . . . .	+	300 000	+	+	+	30	mx	mx
23	Neutralrot (G) . . . . .	+	450 000	+	+	+	24	mx	mx
24	Janusrot (M) . . . . .	+	60 000	—	—	—	18	mx	mx
25	Rhodamin B (B) . . . . .	+	10 000	+	+	+	16	mx	mx
26	Chinolinrot (A) . . . . .	+	150 000	—	—	—	15	mx	mx
27	Metaphenylenblau (C) . . . . .	+	90 000	+	+	+	11	mx	mx
28	Malachitgrün Chl. Znk. Dopps. (M) . . . . .	+	600 000	+	—	+	8	mx	mx
29	Brillantgrün (B) . . . . .	+	850 000	+	—	+	6	mx	mx
30	Janusgrün B (M) . . . . .	+	180 000	+	—	+	3	mx	mx
31	Indaminblau B (M) . . . . .	+	37 000	+	+	+	3	mx	mx
32	Brillantkresylblau (G) . . . . .	+	100 000	+	+	+	3	mx	mx
33	Toluidinblau (Kahlbaum) . . . . .	+	52 000	+	+	+	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	mx	mx
34	Methylenblau rect. (G) . . . . .	+	30 000	+	+	+	1 <sup>1</sup> / <sub>6</sub>	mx	mx

Nummer	Farbstoff	Färbt den lebenden Zellkörper?	Grenzkonzentration für die Vitalfärbung des Zellkörpers 1 Teil Farbstoff in Teilen Wasser	Färbt die Granula normaler Tiere?	Färbt bei normal. Tieren Granula ohne gleichzeit. Zellkörperfärbung?	Färbt die grossen Granula vakuolös. Tiere stärker als den Zellkörper	Teil.-Koeff. Öl	Teil.-Koeff. Wasser	Teil.-Koeff. Ölsäure Wasser	Diam. Öls. Teil.-Koeff. Wasser
35	Azinscharlach D (M)	+	9 000	-	-	+	>1	mx	mx	
36	Capriblau (L. Müller)	+	13 500	+	+	+	1	mx	mx	
37	Safranin extra G (A)	+	20 000	-	-	+	1	mx	mx	
38	Rosanilinbase (G)	+	320 000	-	-	+	1	mx	mx	
39	Fuchsin kl. Kr. (M)	+	27 000	-	-	+	1	mx	mx	
40	Acridinorange (L)	+	1 350 000	+	+	+	1	mx	mx	
41	Acridingelb (L)	+	150 000	-	-	+	1	mx	mx	
42	Auramin O (B)	+	600 000	-	-	+	1	mx	mx	
43	Auramin G (B)	+	125 000	-	-	+	1	mx	mx	
44	Methylviolett RR (M)	+	20 000	-	-	+	1	mx	mx	
45	Muscarin (DH)	+	7 200	+	+	+	1	mx	mx	
46	Methylengrün extra gelbl. conc. (M)	+	60 000	+	+	+	<1	30	30	
47	Methylgrün N pulv. (A)	+	14 000	+	+	+	<1	80	80	
48	Methylgrün (K)	+	6 000	+	+	+	<1	40	40	
49	Chromgrün (By)	+	1 900	+	-	+	0	>1	>1	
50	Echtsäureviolett 10 B (By)	+	400	+	+	+	0	<1	<1	
51	Säureviolett 4 B extra (By)	+	1 000	+	+	+	0	<1	<1	
52	Formylviolett (C)	-	-	-	-	-	0	<<1	<<1	
53	Tuchscharlach G (K)	+	40 000	-	-	-	0	0	mx	
54	Echtrot A (B)	+	30 000	-	-	-	0	0	84	
55	Tuchrot 3 GA	+	18 750	-	-	-	0	0	54	
56	Metanilgelb (A)	+	15 000	-	-	-	0	0	20	
57	Brillantorange R (M)	+	15 000	-	-	-	0	0	12	
58	Tropäolin $\frac{000}{1}$ (Merck)	+	6 000	-	-	-	0	0	9	
59	Tropäolin $\frac{000}{2}$ (Merck)	+	5 000	-	-	-	0	0	8,4	
60	Brillantorange G (M)	+	7 500	-	-	-	0	0	8	
61	Wollviolett S (B)	+	gesätt. Lösung	-	-	-	0	0	>1	
62	Orzein (G)	+	15 000	-	-	-	0	0	>1	
63	Brillant Ponceau GG (C)	+	2 500	-	-	-	0	0	>1	
64	Ponceau G (BK)	+	3 000	-	-	-	0	0	>1	
65	Ponceau R (BK)	+	1 000	-	-	-	0	0	>1	
66	Brillant Ponceau G (C)	+	2 500	-	-	-	0	0	>1	
67	Eosin w. (G)	+	1 000	-	-	-	0	0	>1	
68	Eosin spritl. (G)	+	23 000	-	-	-	0	0	>1	
69	Erythrosin G (B)	+	750	-	-	-	0	0	>1	
70	Cyanosin (DH)	+	2 000	-	-	-	0	0	>1	
71	Rose bengale (B)	+	-	-	-	-	0	0	>1	
72	Toluylenorange G (A)	+	750	-	-	-	0	0	>1	
73	Azobraun (M)	+	1 000	-	-	-	0	0	>1	
74	Brillantocrocin M (C)	+	gesätt. Lösung	-	-	-	0	0	1	
75	Methylorange (G)	-	-	-	-	-	0	0	1	

Nummer	Farbstoff	Färbt den lebenden Zellkörper?	Grenzkonzentration für die Vitalfärbung des Zellkörpers 1 Teil Farbstoff in Teilen Wasser	Färbt die Granula normaler Tiere?	Färbt bei normal. Tieren Granula ohne gleichzeit. Zellkörperfärbung?	Färbt die grossen Granula vakuolisi. Tiere stärker als den Zellkörper	Öl		
							Teil.-Koeff. Wasser	Ölsäure Wasser	Diam. Öls. Wasser
76	Biebrich'scher Scharlach B extraf. (K)	—	—	—	—	—	0	0	<1
77	Croceinscharlach (K)	—	—	—	—	—	0	0	<1
78	Tuchrot BA (A)	—	—	—	—	—	0	0	<1
79	Rosindulin 2 G (K)	—	—	—	—	—	0	0	<1
80	Echtscharlach B (K)	—	—	—	—	—	0	0	<1
81	Rosindulin GXF	—	—	—	—	—	0	0	<1
	Nachfolgende Farbstoffe 82—120 Erythrin X (B), Ponceau 5 R (M) usw. bis Trypanblau)	—	—	—	—	—	0	0	0

82. Erythrin X (B), 83. Ponceau 5 R (M), 84. Azorubin S (A), 85. Säurecarmoisin, 86. Benzoazurin (K), 87. Nigrosin w. (G), 88. Kristallorange GG (D), 89. Azofuchsin B (By), 90. Amarant (BK), 91. Nyanzaschwarz B (A), 92. Chromotrop 8 B (M), 93. Kongorot (G), 94. Lichtgrün SF bläul. (B), 95. Fuchsin S (D), 96. Alkaliblau D (A), 97. Alkaliblau 6 B (J), 98. Methylwasserblau (B), 99. Reinblau BSJ (J), 100. Methylblau OO (A), 101. Alkaliblau extra I (A), 102. Alkaliblau extra III (A), 103. Alkaliblau extra V (A), 104. Alkaliblau B (K), 105. Wasserbal OO (K), 106. Wasserblau 6 B extra (A), 107. Guineagrün B extra (A), 108. Patentblau V (M), 109. Neupatentblau (By), 110. Wollgrün S (B), 111. Säureviolett 4 BS (M), 112. Rotviolett 4 RS (B), 113. Rotviolett 5 RS (B), 114. Thiocarmin R (C), 115. Echtgrün extra (By), 116. Indigocarmin (G), 117. Karminsäures Natrium (Merck), 118. Säureviolett 6 BN (B), 119. Säureviolett 7 B (B), 120. Trypanblau (L. Müller).

## 2. Ölsäure als Ausschüttelungsflüssigkeit.

Die weitere Verfolgung der eben mitgeteilten Beobachtung lehrte, wie gleich näher ausgeführt werden soll, Momente kennen, die geeignet waren, den Gang der weiteren Untersuchung in eine ganz bestimmte Richtung zu lenken. Man kann einem Öl, das die freie, vom gelösten Farbsalz abweichend gefärbte Base aufgenommen hat, sofort die Farbe des Salzes geben, wenn man eine gewisse Menge fettlöslicher Säure, zum Beispiel Capronsäure oder Ölsäure, zusetzt. So ändert das durch Aufnahme der freien Neutralrotbase gelb gefärbte Öl seine Farbe je nach der Menge der zugesetzten Fettsäure in Ziegelrot bis Kirschrot, das die freie Nilblaubase enthaltende rotviolette Öl wird auf den Zusatz einer Spur von Fettsäure rein blau usw. Der gleiche Effekt tritt ein, wenn man von vornherein mit einer Mischung von Öl und Fettsäure ausschüttelt. Das sich absetzende Fettsäure-Ölgemisch

hat jetzt die Färbung des Farbsalzes. Diese Beobachtung legte den Gedanken nahe, die Ausschüttelungsversuche mit einer derartigen Mischung vorzunehmen. Der Einfachheit halber wurde zunächst unvermischte Ölsäure angewendet, und zwar das Merck'sche Präparat „Ölsäure reinst“. Die Ausschüttelungsversuche wurden in der oben beschriebenen Weise ausgeführt; sie ergaben folgendes Resultat:

Alle Farbstoffe, die durch Öl „maximal“ ausgeschüttelt werden — die Farbstoffe 1—17 auf Tabelle I — werden auch durch Ölsäure „maximal“ ausgeschüttelt; desgleichen werden die Farbstoffe, die durch Öl zwar nicht „maximal“ ausgeschüttelt werden, deren Teilungskoeffizient aber stark zugunsten des Öles ausfällt — die Farbstoffe 18 bis 32 — durch Ölsäure „maximal“ ausgeschüttelt. Von den Farbstoffen 33—48, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$  um 1 herum liegt,

wird die Mehrzahl — die Farbstoffe 33—45 — durch Ölsäure ebenfalls „maximal“ ausgeschüttelt; die Farbstoffe 46—48 werden zwar durch Ölsäure nicht so stark gespeichert, dass die Farbstofflösung im Kalorimeterröhrchen entfärbt würde, das Teilungsverhältnis fällt aber auch bei ihnen sehr erheblich zugunsten der Ölsäure aus: Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Öls.}}{\text{Wasser}}$  30, 80, 40. Was schliesslich die Farbstoffe 49—51

anlangt, aus deren Lösung sich das Öl ungefärbt absetzt, so werden auch sie von der Ölsäure aufgenommen, und zwar verteilt sich der Farbstoff Chromgrün — 49 — bei der Ausschüttelung ein wenig zugunsten der Ölsäure, während die Farbstoffe 50 und 51 nach der Ausschüttelung in der wässerigen Lösung in etwas stärkerer Konzentration vorhanden sind als in der Ölsäure.

Wie verhalten sich nun die angeführten Farbstoffe bei der Vitalfärbung des Zellkörpers? Sämtliche genannte Farbstoffe besitzen das Vermögen, den lebenden Zellkörper von Paramäcien zu färben. Der Grad, bis zu dem die Farbstofflösung verdünnt werden kann, ohne ihr Färbvermögen für den Zellkörper einzubüssen, ist bei den einzelnen Farbstoffen sehr verschieden. Im allgemeinen kann gesagt werden, dass die Farbstoffe 1—48 den lebenden Zellkörper schon in stark verdünnter Lösung zu färben vermögen. „In stark verdünnter Lösung färben“ heisst aber nichts anderes, als dass sich eine sehr geringe Konzentration des Farbstoffes in der Aussenlösung mit einer hohen Konzentration innerhalb des lebenden Zellkörpers ins Gleichgewicht setzt. Mit anderen Worten: Der lebende Zellkörper speichert die genannten Farbstoffe stark. Die Farbstoffe 1 bis 48 werden also sowohl von der Ölsäure als auch vom lebenden

Zellkörper stark gespeichert. Anders verhalten sich die Farbstoffe 49 bis 51. Ihr Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Öls.}}{\text{Wasser}}$  liegt nahe bei 1. Sie werden

also von der Ölsäure nur bis zu einem Betrage aufgenommen, der ungefähr der Konzentration der wässrigen Lösung nach der Ausschüttelung entspricht. Von einem analogen Verhalten des lebenden Zellkörpers in Hinsicht auf die genannten drei Farbstoffe wird nur dann die Rede sein können, wenn sich herausstellen sollte, dass auch der lebende Zellkörper die gedachten Farbstoffe nur bis zu einem Grade aufnimmt, der ungefähr der Farbstoffkonzentration in der Aussenlösung entspricht. In diesem Falle müssten verdünnte Lösungen der genannten Farbstoffe ohne Wirkung sein, da die ihnen entsprechenden Konzentrationen der Farbstoffe innerhalb des Zellkörpers zu gering ausfallen würden, um die Zelle unter dem Mikroskop gefärbt erscheinen zu lassen. Nur in stark konzentrierter Lösung könnten die betreffenden Farbstoffe eine Vitalfärbung des Zellkörpers bewirken, denn nur in diesem Falle wäre die vom lebenden Zellkörper aufgenommene Farbstoffmenge gross genug, um sich als Färbung der Zelle bemerkbar zu machen. Dieses Verhalten trifft nun für die genannten Farbstoffe in der Tat zu: die stärkste Verdünnung, mit der noch eine deutlich erkennbare Diffusfärbung des lebenden Zellkörpers zu bewirken ist, beträgt für Chromgrün 1 : 1900, für Echtsäure violett 10 B 1 : 400 und für Säureviolett 4 B extra 1 : 1000. In stärkstem Gegensatz hierzu steht das Verhalten der Farbkörper 1—48, von denen die meisten in Konzentrationen, die geringer sind als 1 : 100000, viele in Verdünnungen von 1 zu Millionen den lebenden Zellkörper färben.

Man wird zugeben, dass schon aus den mitgeteilten Beobachtungen eine höchst beachtenswerte Übereinstimmung zwischen der Farbstoffaufnahme von seiten des lebenden Zellkörpers und der Farbstoffaufnahme seitens der Ölsäure hervorgeht. Um jedoch eine wirkliche Analogie zwischen den beiden Vorgängen annehmen zu können, wäre der Nachweis eines weiter gehenden Parallelismus erforderlich. Es müsste bewiesen werden, dass die Ausschüttelbarkeit eines Farbstoffes durch Ölsäure und sein Färbevermögen für den lebenden Zellkörper tatsächlich zugeordnete Grössen sind. Zur Entscheidung dieser Frage wurde folgendermaassen vorgegangen: Die Farbstoffe wurden nach ihrer Nuance in Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe enthielt somit Farbstoffe der gleichen Farbnuance. Für jeden einzelnen Farbstoff wurde nun einerseits seine Ausschüttelbarkeit durch ein Gemisch von Öl und Ölsäure festgestellt, andererseits wurde die stärkste Verdünnung ermittelt, mit der noch eine eben merkliche Färbung des Zellkörpers zu erzielen war. Je weiter man in der Verdünnung eines Farbstoffes gehen kann,

ohne dass seine Lösung das Färbevermögen für den lebenden Zellkörper verliert, um so grösser ist seine Färbekraft. Die Färbekraft ist somit der reziproke Wert der vital färbenden Grenzkonzentration. Um nun auch Zahlen für den Vergleich der Färbekraft der einzelnen Farbstoffe zu gewinnen, wurde in jeder Gruppe die Grenzkonzentration des am schwächsten färbenden Stoffes = 1 gesetzt, und auf diese wurden die Grenzkonzentrationen der anderen Farbkörper bezogen. Wenn also zum Beispiel die Lösung eines Farbstoffes, die ursprünglich mit der Lösung 1 gleichgestellt war, auf das 16fache verdünnt werden konnte und den Zellkörper noch immer merklich färbte, so betrug die Färbekraft dieser Verbindung = 16.

Wie mitgeteilt wurde, wird die Mehrzahl der bis jetzt betrachteten Farbstoffe von reiner Ölsäure so stark gespeichert, dass die Lösung nach der Ausschüttelung im Kolorimeterröhrchen ungefärbt erscheint. Damit entfällt auch die Möglichkeit, die betreffenden Farbstoffe hinsichtlich ihrer Ausschüttelbarkeit miteinander zu vergleichen. Nun kann man das Ausschüttelungsvermögen der Ölsäure — wenigstens für diejenigen Farbstoffe, die von reiner Ölsäure stärker aufgenommen werden als von reinem Öl — dadurch herabsetzen, dass man der Ölsäure Öl hinzufügt. Je ärmer die Mischung an Ölsäure ist, um so geringer ist ihr Aufnahmevermögen für die gedachten Farbstoffe. Verwendet man nun zur Ausschüttelung eine derartige entsprechend zusammengesetzte Mischung, so werden viele Farbstoffe, die von reiner Ölsäure „maximal“ gespeichert werden, jetzt in erheblich geringerem Maasse aufgenommen, wodurch Unterschiede in der Aufnehmbarkeit der einzelnen Farbstoffe zutage treten, die bei der Verwendung reiner Ölsäure dem Nachweis entgangen waren. Da es sich bei den in Rede stehenden Versuchen nur darum handelt, ob sich der lebende Zellkörper wie eine mit Wasser nicht mischbare Fettsäure verhält und die Frage der Stärke der Säure zunächst ausser Betracht bleibt, so erscheint es im Prinzip gleich, ob als Ausschüttelungsflüssigkeit reine Ölsäure oder eine Mischung von Ölsäure und Öl verwendet wird. Bei den Gruppen 1—8 der Tabelle II wurde eine Mischung verwendet, die auf 1 ccm Öl 5 Tropfen Ölsäure enthielt; bei den Gruppen 9—11 eine Mischung von 1 Tropfen Ölsäure auf 1 ccm Mandelöl. Dass die für die Teilungskoeffizienten ermittelten Zahlen auf absolute Genauigkeit keinen Anspruch machen können, wurde schon oben erwähnt. In Anbetracht der grossen Differenzen, um die es sich bei den zu vergleichenden Werten handelt, fällt diese Ungenauigkeit kaum ins Gewicht. Nachstehend die Resultate (Tabelle II):

Tabelle II.

Zahl	Farbstoff	Vital färbende Grenz- konzentration 1 Teil Farbstoff auf Teile Wasser	Färbekraft	Teil-Koeff. $\frac{\text{Öl. Öl}}{\text{Wasser}}$
I.				
1	Capriblau (By) . . . . .	13 500	1	3
2	Methylenblau rect. (G)	30 000	1,1	3
3	Toluidinblau . . . . .	52 000	1,45	8
4	Brillantkresyl blau (G)	100 000	4,6	21
5	Nilblausulfat (G) . . . .	300 000	16,6	mx
II.				
1	Echtsäureviolett 10 (B)	400	1	<1
2	Indaminblau . . . . .	37 000	74	9
3	Janusblau . . . . .	68 000	210	mx
4	Metaphenylenblau . . . .	90 000	236	mx
III.				
1	Muscarin. . . . .	7 200	1	1
2	Äthylviolett . . . . .	1200 000	29	mx
3	Kristallviolett . . . . .	2000 000	47,8	mx
IV.				
1	Säureviolett 4 B extra	1 000	1	<1
2	Indoinblau . . . . .	135 000	243	mx
3	Indulin spritl. . . . .	125 000	270	mx
4	Methylviolett ch. r. . . .	250 000	216	mx
V.				
1	Chromgrün . . . . .	1 900	1	1
2	Methylgrün (K) . . . . .	6 000	3,9	3
3	Methylgrün N pulv. (A)	14 000	5,4	3
4	Malachitgrün . . . . .	600 000	68,6	mx
5	Brillantgrün . . . . .	850 000	110	mx
VI.				
1	Methylengrün extra gelbl. conc. . . . .	60 000	1	3
2	Janusgrün . . . . .	180 000	1,8	26
VII.				
1	Bismarckbraun . . . . .	300 000	1	30
2	Chrysoidin. . . . .	1500 000	1,5	mx
3	Acridinorange . . . . .	1350 000	4,5	mx
VIII.				
1	Acridingelb . . . . .	150 000	1	24
2	Auramin G. . . . .	125 000	1,5	30
3	Auramin O . . . . .	600 000	3,5	mx
IX.				
1	Fuchsin kl. Kr. . . . .	27 000	1	>1
2	Safranin . . . . .	20 000	1,8	4
3	Chinolinrot. . . . .	150 000	3,8	mx
4	Neutralrot . . . . .	450 000	16	mx

Zahl	Farbstoff	Vital färbende Grenz- konzentration 1 Teil Farbstoff auf Teile Wasser	Färbekraft	Teil.-Koeff. Öls. Öl Wasser
X.				
1	Azinscharlach . . . .	9 000	1	6
2	Janusrot . . . . .	60 000	2,6	mx
3	Indulinscharlach . . . .	175 000	12,7	mx
4	Scharlach R 1599 (Br)	1600 000	102	mx
5	Sudan IV. . . . .	3600 000	127	mx
6	Zinnoberrot 1233 (Br).	1300 000	145	mx
7	Sudan III . . . . .	12500 000	166	mx
XI.				
1	Methylenviolett RR . . .	20 000	1	1,5
2	Rhodamin B . . . . .	10 000	1,8	11
3	Neutralviolett . . . . .		14,25	mx
4	Magdalarot . . . . .	253 000	20,25	mx

Wie man sieht, besteht in den einzelnen Gruppen ein völliger Parallelismus zwischen der Färbekraft eines Farbstoffes und seiner Ausschüttelbarkeit durch das Ölsäuregemisch. Mit zunehmender Ausschüttelbarkeit steigt die Färbekraft. Besonders eklatant ist die Zuordnung von Färbekraft und Ausschüttelbarkeit, wenn die Anfangs- und die Endglieder der einzelnen Gruppen betrachtet werden:

I. Gruppe: Nilblausulfat wird von der Ölsäuremischung „maximal“ gespeichert. Seine Färbekraft ist 16mal so gross als diejenige des Capriblau oder Methylenblau, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure Öl}}{\text{Wasser}} = 3$  ist.

II. Gruppe: Echtsäureviolett 10 B wird von der Ölsäuremischung in minimaler Menge aufgenommen. Die Ölsäuremischung ist nach der Ausschüttelung bedeutend schwächer gefärbt als die wässrige Lösung. Dieser minimalen Aufnehmbarkeit entspricht die sehr geringe Färbekraft des Farbstoffes. Die vital färbende Grenzkonzentration ist 1:400, also eine Lösung, die in der 8 mm weiten Epruvette des Kolorimeters schwarzblau erscheint. Schon das Indaminblau, dessen Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure Öl}}{\text{Wasser}} = 9$  ermittelt wurde, färbt 74mal so stark, während das Endglied der Reihe Metaphenylblau, dessen Ausschüttelbarkeit durch die angewendete Ölsäure-Ölmischung „maximal“ ist, eine 236mal so starke Färbekraft besitzt als Echtsäureviolett 10 B.

III. Gruppe: Die Ausschüttelbarkeit des Kristallviolett, des Endgliedes der Gruppe ist „maximal“, seine Färbekraft fast 50mal so gross als diejenige des Anfangsgliedes Muscarin, dessen Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure Öl}}{\text{Wasser}} = 1$  ist.

IV. Gruppe: Hier liegen die Verhältnisse ähnlich wie in der II. Gruppe. Die Ausschüttelbarkeit des Säureviolett 4 B extra durch die Ölsäuremischung entspricht etwa derjenigen des Echtsäureviolett 10 B, ist also minimal. Die Färbekraft ist dementsprechend sehr gering: vital färbende Grenzkonzentration 1:1000. Die drei anderen Farbstoffe der Gruppe werden von der Ölsäuremischung „maximal“ gespeichert. Die Färbekraft eines jeden von ihnen ist mehr als 200mal so gross als die des Säureviolett 4 B extra.

V. Gruppe: Die Färbekraft des Brillantgrün, das durch die Ölsäuremischung „maximal“ ausgeschüttelt wird ist 110mal so gross als jene des Chromgrün dessen Teilungskoeffizient zugunsten der wässrigen Lösung ausfällt.

VI. Gruppe: Der Parallelismus zwischen Ausschüttelbarkeit und Färbekraft ist vorhanden, aber wenig ausgesprochen.

VII. Gruppe: Sämtliche Farbstoffe der Gruppe werden von der Ölsäuremischung stark gespeichert; immerhin gelangt der Unterschied in der Ausschüttelbarkeit des Bismarckbraun und des Acridinorange auch in der Färbekraft der betreffenden Verbindungen zum Ausdruck.

VIII. Gruppe: Hier liegen die Verhältnisse ähnlich wie in der vorangehenden Gruppe.

IX. Gruppe: Neutralrot, das durch die Ölsäuremischung „maximal“ ausgeschüttelt wird, färbt 16mal so stark als Fuchsin, dessen wässrige Lösung nach der Ausschüttelung nur wenig schwächer gefärbt ist als die Ölsäuremischung.

X. Gruppe: Die vier letzten Glieder der Gruppe sind wasserunlösliche, alkohollösliche Fettfarbstoffe, die, wie schon oben angeführt, in maximalster Verdünnung den lebenden Zellkörper färben. Die färbenden Grenzkonzentrationen betragen für Scharlach R (1599): 1 600 000, für Sudan IV: 3 600 000, für Zinnoberrot (1233): 1300 000, für Sudan III: 12500 000. Dieser starken Färbekraft entspricht eine „maximale“ Ausschüttelbarkeit. Jeder dieser Farbstoffe färbt mehr als 100mal so stark als das Anfangsglied der Gruppe Azinscharlach, dessen Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure Öl}}{\text{Wasser}} = 6$  ist.

XI. Gruppe: Magdalarot, das maximal gespeichert wird, färbt 20mal so stark als Methylenviolett RR, dessen Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure Öl}}{\text{Wasser}}$  nur wenig grösser ist als 1.

Als die Untersuchungen bis zu diesem Punkte gediehen waren, hatte es den Anschein, als ob eine derartige Ölsäure-Ölmischung tatsächlich das gesuchte Modell darstellen würde, konnte doch nachgewiesen werden, dass sämtliche durch Ölsäure bis zu einem gewissen Betrage aufnehmbaren Farbstoffe das Vermögen besitzen, den lebenden Zellkörper zu färben, und dass zwischen der Färbekraft einer Verbindung und ihrer Ausschüttelbarkeit durch eine Ölsäure-Ölmischung ein weitgehender Parallelismus besteht. Um nun diesen Parallelismus auch nach der negativen Seite zu erweisen, das heisst um zu zeigen, dass Farbstoffe, die von der Ölsäure nicht aufgenommen werden, auch nicht vital färben, wurde eine grosse Anzahl saurer Farbstoffe in den Kreis der Untersuchung gezogen. Da stellte es sich aber heraus, dass sich unter den untersuchten Verbindungen eine ganze Anzahl von Körpern befand, die weder von einer Ölsäure-Ölmischung noch von reiner Ölsäure aufgenommen werden und trotzdem den lebenden Zellkörper in sehr ausgesprochener Weise diffus färben. Die betreffenden Verbindungen finden sich in den Rubriken 53 bis 74 der Tabelle I. Da in dem Abschnitte über die Wirkungsart der einzelnen Vitalfarben die Besprechung der in Rede stehenden

Farbkörper unterblieben ist, sei zunächst im folgenden die Wirkung eines derartigen Farbstoffes auf lebende Paramäcien an einem Beispiel beschrieben.

Lässt man eine Lösung von Brillantorange R (ca. 1 : 12000) eine halbe Stunde auf normale Paramäcien wirken, so bieten die Tiere das folgende Bild: Der ganze Zellkörper erscheint gleichmässig hell-ocker gelb gefärbt. Der Kern bleibt ungefärbt und hebt sich in der schon mehrfach erwähnten Weise als helles Oval vom gelben Grunde scharf ab. Von gefärbten Granula ist nichts zu bemerken. Die Tiere zeigen ein durchaus normales Verhalten. Wenn etwas auf eine Alteration der Tiere hinweist, so ist es höchstens der Umstand, dass die Bildung der Nahrungsvakuolen sistiert. Anwendung stärkerer Lösungen veranlasst allerdings leicht pathologische Erscheinungen: die pulsierenden Vakuolen verlieren die Fähigkeit der Kontraktion und dehnen sich immer mehr aus, die Cyklose gelangt zum Stillstand, die Bewegungen der Tiere werden torkehend usw. Werden derartige Tiere in reines Leitungswasser gebracht, so pflegen die geschilderten Erscheinungen sehr rasch zurückzugehen.

Setzt man vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula der Einwirkung einer Lösung von Brillantorange R aus, so nimmt nur der Zellkörper die Färbung an; auf keinerlei Weise — auch nicht bei Anwendung der oben beschriebenen Kunstgriffe — gelingt eine Färbung der grossen Granula. Brillantorange R schliesst sich somit insofern an die Farbkörper vom Sudantypus an, als es, wie diese, normalen Tieren immer nur eine diffuse Färbung verleiht und die grossen Granula vakuolisierter Paramäcien auf keinen Fall stärker färbt als den Zellkörper.

Die übrigen Farbstoffe der Gruppe zeigen im grossen und ganzen das gleiche Verhalten. Mit zahlreichen Verbindungen, wie mit Echtrot A, Orzein, Tuchrot 3 GA, Metanilgelb und Tuchscharlach gelingt es, bei Anwendung entsprechender Konzentration, die Tiere ohne jede Alteration zu färben, so zwar, dass selbst die Bildung von Nahrungsvakuolen ihren normalen Fortgang nehmen. Am schwierigsten gestaltet sich der Nachweis, dass die Färbung tatsächlich den lebenden Zellkörper betrifft, bei den Farbkörpern der Eosin Gruppe, da Lösungen der letzteren, die stark genug sind, um Färbung zu bewirken, selbst beim Arbeiten mit gedämpftem Licht die Tiere hochgradig schädigen und bald abtöten. Immerhin konnte für sämtliche untersuchten Farbstoffe der genannten Art (Tabelle 1: 67—71) festgestellt werden, dass die Färbung das noch funktionierende Plasma betrifft. Verhältnismässig am leichtesten gelingt dieser Nachweis beim Eosin spritl., mit dem sich bei einiger Vorsicht eine Färbung des ganzen Zellkörpers erzielen lässt, ohne dass es zum Aufhören der Zyklose oder zum Stillstand der Pulsation der kontraktile Vakuolen kommt.

Wie verhalten sich die in Rede stehenden sauren Vitalfarbstoffe (Tabelle I: 53—74) der Ölsäure gegenüber? Schüttelt man Lösungen der angeführten Farbstoffe mit reiner Ölsäure aus, so zeigt es sich, dass sich letztere vollkommen klar und ungefärbt absetzt. Trotz ihres Vermögens, den lebenden Zellkörper zu färben, werden die genannten Farbstoffe von Ölsäure auch nicht in Spuren aufgenommen,

Mit der Feststellung, dass es Farbstoffe gibt, die von Ölsäure nicht aufgenommen werden und trotzdem das lebende Plasma diffus färben, entfällt die Berechtigung von einer völligen Analogie in dem Verhalten des lebenden Zellkörpers und der Ölsäure Farbstoffen gegenüber zu sprechen. Die Dinge liegen vielmehr folgendermaassen: Wohl verhält sich der lebende Zellkörper insofern wie die Ölsäure, als alle diejenigen Farbstoffe, welche die Ölsäure aufnimmt, auch vom lebenden Zellkörper aufgenommen werden und die Aufnehmbarkeit dieser Farbstoffe in beiden Fällen vollkommen parallel geht; aber andererseits verhält sich der lebende Zellkörper doch wieder abweichend von der Ölsäure, da er gewisse Farbstoffe aufnimmt, die in die Ölsäure nicht übergehen. Auf keinen Fall kann somit die Ölsäure das gesuchte Modell der Vitalfärbung darstellen.

### 3. Diamylamin-Ölsäure als Ausschüttelungsflüssigkeit.

Um über die erörterte Schwierigkeit hinwegzukommen, ging ich von folgender Überlegung aus: Wenn ein flüssiges Neutralfett dadurch zu einem Lösungsmittel für ö unlösliche bzw. in flüssigem Neutralfett nur sehr wenig lösliche basische Farbstoffe wird, dass es eine gewisse Menge Fettsäure enthält, so erscheint es denkbar, dass Mandel- oder Olivenöl ein Lösungsvermögen für gewisse ö unlösliche saure Farbstoffe dadurch gewinnen könnten, dass dem Öl ein gewisser Betrag einer fettlöslichen Base zugesetzt würde. Als solche wurde Diamylamin versucht. Diese Verbindung stellt eine farblose, klare, mit Wasser nur äusserst wenig mischbare Flüssigkeit dar, die sich mit fetten Ölen in allen Verhältnissen mischen lässt. Eine Mischung von Diamylamin und Öl setzt sich nach der Ausschüttelung mit wässrigen Lösungen ziemlich leicht und klar ab, ist also für derartige Versuche geeignet. Sämtliche in den Rubriken 53—120 der Tabelle I angeführten sauren Farbkörper — durchwegs Stoffe, die von reinem Öl absolut nicht aufgenommen werden — wurden nun mit einer derartigen Diamylamin-Ölsäuremischung ausgeschüttelt und hierbei folgendes Ergebnis erzielt: Für eine Anzahl von Farbstoffen liess sich feststellen, dass der Zusatz von Diamylamin zum Öl tatsächlich die Wirkung hatte, dass die betreffenden Farbkörper nunmehr von letzterem aufgenommen wurden. Der Grad der Aufnehmbar-

keit der gedachten Farbstoffe durch eine Diamylamin-Ölmischung richtet sich nach der Menge des beigemischten Diamylamins. Je mehr das Öl von dem letzteren enthält, um so stärker speichert es den Farbstoff. So bewirkt — um ein Beispiel herauszugreifen — schon ein Zusatz von 1 % Diamylamin zum Öl, dass sich das letztere nach dem Schütteln mit einer wässrigen Lösung von Brillantorange R deutlich gefärbt absetzt. Ein Öl, das 2 % Diamylamin enthält, erscheint nach der Ausschüttelung bereits deutlich stärker gefärbt als die wässrige Lösung des Brillantorange R. Bei einem Gehalt von 10 % Diamylamin verschiebt sich das Teilungsverhältnis bereits so stark zugunsten der Diamylamin-Ölmischung, dass diese nach der Ausschüttelung im gleichen Raumteil 16mal so viel Farbstoff enthält als die wässrige Lösung.

Neben dem Gehalt der Mischung an Diamylamin ist es die Natur des Farbstoffes, die im Einzelfalle das Maass seiner Aufnehmbarkeit durch die Diamylamin-Ölmischung bestimmt. Verwendet man nämlich bei der Ausschüttelung der durch Diamylamin aufnehmbaren Farbstoffe eine Mischung von konstantem Diamylamingehalt, so zeigt es sich, dass die Aufnehmbarkeit der einzelnen Farbstoffe eine verschiedene ist. Nach dem Grade ihrer Aufnehmbarkeit durch eine Diamylamin-Ölmischung von bestimmter Zusammensetzung lassen sich die betreffenden Farbstoffe — ganz in derselben Weise, wie es oben für die Aufnehmbarkeit basischer Farbstoffe durch Ölsäure gezeigt wurde — in eine Reihe bringen, die mit den am stärksten speicherbaren Farbstoffen beginnt und mit den am schwächsten speicherbaren endet.

In scharfem Gegensatz zu den besprochenen Farbstoffen steht eine zweite Gruppe saurer Farbkörper, in Hinsicht auf welche der Zusatz von Diamylamin ohne jede Wirkung bleibt. Mag man in diesen Fällen den Gehalt des Öles an Diamylamin noch so sehr steigern, ja selbst reines Diamylamin als Ausschüttelungsflüssigkeit verwenden, die Diamylamin-Ölmischung bzw. das reine Diamylamin setzen sich stets ungefärbt ab.

Wie verhalten sich die in Rede stehenden Farbstoffe dem lebenden Zellkörper gegenüber? Nach dieser Richtung liess sich folgendes bemerkenswerte Resultat feststellen: Von sämtlichen Farbstoffen, die von der Diamylamin-Ölmischung gar nicht aufgenommen werden, aus deren Lösung sich also die Diamylamin-Ölmischung vollkommen farblos absetzt, färbt kein einziger den lebenden Zellkörper. Andererseits erwiesen sich alle jene Farbstoffe, die von der Diamylamin-Ölmischung bis zu einem gewissen Betrage aufgenommen werden, als Vitalfarben. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass zwischen dem Vermögen der sauren Farbstoffe, den lebenden Zell-

körper zu färben, und ihrer Ausschüttelbarkeit durch eine Diamylamin-Ölmischung eine konstante Beziehung besteht.

Bevor wir daran gehen, diese Beziehung weiter zu verfolgen, ist noch folgende Schwierigkeit zu beseitigen: Die früher angeführten Versuche hatten ergeben, dass sich der lebende Zellkörper den basischen und indifferenten Farbstoffen gegenüber verhält wie ein Ölsäure-Ölgemisch. Nach dem eben Dargelegten verhält sich der lebende Zellkörper in bezug auf die sauren Farbstoffe wie ein Diamylamin-Ölgemisch. Das lebende Plasma würde somit das einmal das Verhalten einer durch Neutralfett verdünnten Fettsäure, das andere Mal dasjenige einer durch Neutralfett verdünnten fettlöslichen Base zeigen. Es entsteht nun die Frage, ob angesichts dieses zwiefältigen Verhaltens des lebenden Zellkörpers der Versuch, die gesamten Erscheinungen der Vitalfärbung mittels eines einzigen Modells darzustellen, noch Aussicht auf Erfolg hat. Die Beantwortung des Frage erledigt sich in der einfachsten Weise, wenn die Verdünnung des Diamylamin nicht mit Öl, sondern mit Ölsäure vorgenommen wird. Mit der letzteren ist Diamylamin in allen Verhältnissen mischbar und bildet mit ihr vermengt eine völlig homogene, klare, bei der Ausschüttelung mit wässrigen Lösungen sich leicht absetzende Flüssigkeit. Wird eine derartige Mischung von Diamylamin und Ölsäure zur Ausschüttelung wässriger Farbstofflösungen verwendet, so zeigt es sich, dass sich in einer solchen Mischung die Ölsäure und das Diamylamin völlig unabhängig voneinander verhalten und einander hinsichtlich der Farbstoffaufnahme in keiner Weise beeinträchtigen. Basischen Farbstoffen gegenüber verhält sich die Mischung so, als ob sie nur die Ölsäure enthielte und gar kein Diamylamin anwesend wäre. Weder die Aufnehmbarkeit der Farbstoffe noch die Farbe, mit der die Farbkörper aufgenommen werden, erfahren durch die Anwesenheit des Diamylamin irgendeine Änderung. Auf der anderen Seite verhält sich die Mischung sauren Farbstoffen gegenüber so, als ob der entsprechende Betrag Diamylamin mit einem in differenten fetten Öl verdünnt wäre und die Ölsäure gar nicht anwesend wäre. Weder die Aufnehmbarkeit der betreffenden Farbstoffe noch die Färbung der Mischung nach der Ausschüttelung werden durch die Anwesenheit der Ölsäure irgendwie beeinträchtigt.

Nachdem in solcher Weise festgestellt werden konnte, dass die Ölsäure und das Diamylamin ihr charakteristisches Verhalten Farbstoffen gegenüber auch nach ihrer Vermischung zu einem einheitlichen System beibehalten, war der nächste Schritt der, sämtliche Farbstoffe in Hinsicht auf ihre Ausschüttelbarkeit durch eine Diamylamin-Ölsäuremischung zu untersuchen, um dann weiter die Beziehung zwischen Ausschüttelbarkeit und vitalem Färbevermögen zu prüfen.

Alles, was über die Ausschüttelbarkeit der basischen und auch der indifferenten Farbstoffe durch Ölsäure bzw. ein Ölsäure-Ölgemisch gesagt wurde, gilt selbstverständlich auch für den Fall, als die betreffenden Ausschüttelungsflüssigkeiten einen gewissen Betrag Diamylamin enthalten, da ein solcher das Resultat der Ausschüttelung in keiner Weise beeinträchtigt.

Bezüglich der sauren Farbstoffe (Tabelle I: 53—120) hatten die Ausschüttelungsversuche mit der Diamylamin-Ölmischung ergeben, dass zwischen der Ausschüttelbarkeit der gedachten Farbstoffe durch Diamylamin und ihrem vitalen Färbevermögen eine gewisse Beziehung besteht; jetzt handelt es sich darum, an der Hand der Diamylamin-Ölsäuremischung zu prüfen, wie weit diese Beziehung geht, im besonderen, ob der Parallelismus ein so durchgreifender ist, wie es bei der Beziehung zwischen der Ausschüttelbarkeit basischer Farbstoffe durch Ölsäure und vitalem Färbevermögen der Fall ist.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden sämtliche saure Farbstoffe (Tabelle I: 53—120) mit einer Diamylamin-Ölsäuremischung ausgeschüttelt, die 1 Teil Diamylamin auf 6 Teile Ölsäure und 18 Teile Mandelöl enthielt. Der Grund, der für die Wahl gerade dieses Mischungsverhältnisses maassgebend war, wird weiter unten zur Sprache kommen. Die Ausschüttelungsergebnisse finden sich in der Spalte 10 der Tabelle I. Die Farbstoffe erscheinen daselbst nach sinkendem Teilungskoeffizienten Diam. Öls.

Wasser geordnet.

Das Anfangsglied der Reihe Tuchscharlach G wird von unserer Diamylamin-Ölsäuremischung „maximal“ gespeichert, das heisst die wässrige Lösung erscheint nach der Ausschüttelung im Kalorimeter-röhrchen völlig entfärbt. Die beiden folgenden Farbstoffe Echtröt A und Tuchrot 3 GA werden von Diamylamin-Ölsäure sehr stark gespeichert. (Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  84 und 54.) Es folgt dann eine Anzahl von Farbstoffen (Tabelle I: 56—60), deren Teilungsverhältnis zwischen Diamylamin-Ölsäure und Wasser stark zugunsten des ersteren ausfällt. (Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  20—8.) Bei den Farbstoffen Wollviolett S und Orzein stösst die kolorimetrische Bestimmung des Teilungskoeffizienten auf Schwierigkeiten, da die blauviolette Lösung nach der Ausschüttelung ihren Farbenton in Rotviolett ändert und auch die Diamylamin-Ölsäuremischung rot gefärbt wird. Immerhin lässt sich mit Sicherheit behaupten, dass die genannten Farbstoffe nach der Ausschüttelung in der Diamylamin-Ölsäuremischung in erheblich stärkerer Konzentration vorhanden sind als in der wässrigen Lösung. Die Ponceaufarbstoffe (Tabelle I: 63—66) werden aus der

scharlachroten wässerigen Lösung von Diamylamin-Ölsäure mit orange-roter Färbung aufgenommen; eine unmittelbare Beurteilung der Verteilung des Farbstoffes durch Vergleichung der wässerigen Lösung und der Ölmischung in bezug auf ihre Färbungsintensität ist daher ausgeschlossen; aber auch die Berechnung des Teilungskoeffizienten aus der Färbungsabnahme der wässerigen Lösung hat mit der Schwierigkeit zu kämpfen, dass die rote Färbung der wässerigen Lösung bei der Ausschüttelung ihren Ton um ein geringes ändert. So viel lässt sich aber auch hier sagen, dass die Verteilung der genannten Farbstoffe zugunsten der Diamylamin-Ölsäuremischung ausfällt, das heisst der Teilungskoeffizient

$\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  ist für die gedachten Stoffe grösser als 1.

Auf das gleiche Hindernis stösst die genaue Ermittlung des Teilungskoeffizienten bei der folgenden Gruppe saurer Farbstoffe aus der Familie der Phthaleine (Tabelle I: 67—71). Die äusserst geringe Menge Ölsäure, die sich bei der Ausschüttelung in Wasser löst, genügt, um die rote Lösung der betreffenden Farbstoffe heller zu färben. Es wäre also falsch, aus dem Grade der Entfärbung der Lösung auf die Farbstoffabnahme in der wässerigen Phase schliessen zu wollen. Der Vergleich der Färbung der Diamylamin-Ölsäuremischung mit derjenigen der ursprünglichen wässerigen Lösung lässt es jedoch zweifellos erscheinen,

dass der Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  bei den in Rede stehenden Farbkörpern erheblich grösser sein muss als 1. Die Reihe der Farbstoffe,

deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  grösser als 1 ist, beschliessen

Toluylenorange G und Azobraun. Bei den beiden Farbstoffen Brillantcrocein M und Methylorange erscheinen nach der Ausschüttelung die Diamylamin-Ölsäuremischung und die wässrige Lösung annähernd gleich

stark gefärbt; der Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  ist also ungefähr 1.

Es folgt dann eine Anzahl von Farbkörpern (Tabelle I: 76—81), deren Verteilung zwischen Wasser und Diamylamin-Ölsäure erheblich zu-

gunsten des ersteren ausfällt; ihr Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  ist also

erheblich kleiner als 1. Den Schluss der Reihe endlich bilden Farbstoffe (Tabelle I: 82—120), aus deren wässriger Lösung sich die Diamylamin-Ölsäuremischung völlig ungefärbt absetzt (Teilungs-

koeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}} = 0$ ).

Über das Verhalten der angeführten Farbstoffe bei der Vitalfärbung gibt die Spalte 3 der Tabelle I Aufschluss. Man sieht, dass

sämtliche Farbstoffe, deren Verteilung zwischen Wasser und unserer Diamylamin-Ölsäuremischung zugunsten der letzteren ausfällt, den lebenden Zellkörper färben. Andererseits färbt von den Stoffen, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  kleiner ist als 1 oder die von der Diamylamin-Ölsäuremischung überhaupt nicht aufgenommen werden, kein einziger vital. Von den beiden Farbstoffen, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  annähernd 1 ist, färbt der eine vital, der andere nicht.

Die oben ermittelte Beziehung zwischen dem vitalen Färbevermögen der in Rede stehenden Farbstoffe und ihrer Ausschüttelbarkeit durch eine Diamylamin-Ölmischung gilt also auch für die Ausschüttelbarkeit durch eine Diamylamin-Ölsäuremischung. Farbstoffe, die von einer Diamylamin-Ölsäuremischung bis zu einem gewissen Betrage aufgenommen werden (Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}} > 1$  bei Einhaltung der von uns gewählten Versuchsbedingungen) färben durchgehends vital; Farbstoffe, deren Aufnehmbarkeit durch unsere Diamylamin-Ölsäuremischung ein bestimmtes Maass nicht erreicht oder die von der Mischung überhaupt nicht aufgenommen werden, sind ausnahmslos ausserstande, den lebenden Zellkörper zu färben. Dass von den Farbstoffen, deren Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  in unseren Versuchen zu ungefähr 1 gefunden wurde, die einen den lebenden Zellkörper färben, die anderen nicht, ist ohne weiteres verständlich: Ein Farbstoff, dessen Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls.}}{\text{Wasser}}$  kleiner als 1 ist, vermag die lebende Zelle nicht mehr zu färben; fällt nun für einen Farbstoff der genannte Teilungskoeffizient etwas grösser aus, ist also ungefähr 1, dann wird es von der absoluten Wasserlöslichkeit des betreffenden Farbstoffes abhängen, ob er noch vital färbt oder nicht. Ist er in Wasser leicht löslich, die Möglichkeit also gegeben, ihn in stark konzentrierter Lösung auf die Tiere einwirken zu lassen, dann wird die vom lebenden Zellkörper aufgenommene Farbstoffmenge ausreichen, um die Zelle gefärbt erscheinen zu lassen; der betreffende Farbstoff färbt vital. Ist der Farbstoff nicht genügend wasserlöslich, dann wird selbst bei Anwendung einer gesättigten Lösung der vom lebenden Zellkörper aufgenommene Betrag zu gering sein, um sich als Vitalfärbung bemerkbar zu machen; der betreffende Farbstoff färbt nicht mehr vital. Während also der Reagensglasversuch in beiden Fällen das gleiche Teilungs-

verhältnis ergibt, verhalten sich die Stoffe bei der Vitalfärbung verschieden: der eine färbt vital, der andere nicht.

Für die durch Ölsäure ausschüttelbaren Farbstoffe liess sich der Nachweis erbringen, dass vitales Färbevermögen und Ausschüttelbarkeit durch ein Ölsäure-Ölgemisch zugeordnete Grössen sind: Der zunehmenden Ausschüttelbarkeit entspricht immer eine Zunahme der Färbekraft. Lässt sich das gleiche Verhalten auch für die durch Diamylamin ausschüttelbaren Farbstoffe feststellen? Zur Entscheidung der Frage wurde eine Anzahl saurer Farbstoffe der gleichen Nuance zusammengestellt. Für jeden Farbstoff wurde einerseits seine Ausschüttelbarkeit durch unsere Diamylamin-Ölsäuremischung, andererseits die Färbekraft in der früher beschriebenen Weise ermittelt. Nachstehend die Resultate (Tabelle III):

Tabelle III.

Zahl	Farbstoff	Färbekraft	Teil.-Koeff.
			Diam. Öls. Öl Wasser
1	Brillanterocein M	1	1
2	Tuchrot 3 G A .	120	54
3	Echttrot . . . . .	120	84
4	Tuchscharlach G.	3192	mx

Mansicht, dass mit der Zunahme des Teilungskoeffizienten  $\frac{\text{Diam. Öls. Öl}}{\text{Wasser}}$

die Färbekraft ansteigt.

Solange wir uns beim Versuche, eine dem lebenden Zellkörper analog sich verhaltende Ausschüttelungsflüssigkeit zu finden, auf die basischen Farbstoffe und auf die indifferenten Farbkörper vom Typus des Sudan beschränkt haben, fanden wir mit der Ölsäure unser Auslangen. Wir sahen, dass sie den genannten Farbstoffen gegenüber sich so verhält wie die lebende Paramäciumzelle. Die Analogie versagte aber völlig, als wir die sauren Farbstoffe in den Kreis unserer Untersuchungen zogen. Durch die Vereinigung der Ölsäure und des Diamylamin ist es uns jedoch gelungen, eine Ausschüttelungsflüssigkeit zu erhalten, die sich nicht bloss hinsichtlich der basischen und indifferenten Farbstoffe, sondern auch hinsichtlich der sauren Farbkörper, also der Gesamtheit der untersuchten Farbstoffe gegenüber so verhält wie der lebende Zellkörper. Von dieser Mischung gilt nicht nur der Satz, dass alle von ihr gespeicherten Farbstoffe den lebenden Zellkörper färben, sondern es gilt auch die Umkehrung: alle Farbstoffe, die den lebenden Zellkörper färben, werden von dieser Mischung auf-

genommen. Diamylamin-Ölsäuremischung und lebender Zellkörper decken sich also in ihrem Verhalten Farbstoffen gegenüber vollkommen. Eine solche Diamylamin-Ölsäuremischung stellt somit ein veritables Modell des lebenden Zellkörpers in Hinsicht auf seine Färbbarkeit dar.

Wenn unsere Diamylamin-Ölsäuremischung als Modell des lebenden Zellkörpers bezeichnet wird, so ist dies nicht so zu verstehen, als ob diese Mischung Fettsäure und organische Base in denselben Mengenverhältnissen enthielte wie der lebende Zellkörper des *Paramäcium*. Maassgebend für die Zusammensetzung unseres Modells waren lediglich Gründe der Zweckmässigkeit, die sich aus der speziellen Versuchsanordnung ergeben haben.

Statt unseres Modells hätte auch jede andere Fettsäure und organische Base in einem beliebigen Verhältnis enthaltende Ölmischung dazu verwendet werden können, die Farbstoffe nach dem Grade ihrer Ausschüttelbarkeit zu ordnen. Die einzelnen Farbstoffe wären von der Mischung in einem anderen Ausmaasse aufgenommen worden, die Reihenfolge wäre dieselbe geblieben. Auch von einer Fettsäure und organische Base in einem anderen Verhältnis enthaltenden Mischung wären die Farbstoffe in derselben Reihenfolge gespeichert worden wie vom lebenden Zellkörper.

4. In welcher Weise ist der Vorgang der Farbstoffaufnahme seitens der Diamylamin-Ölsäuremischung bei der Ausschüttelung der wässrigen Farbstofflösungen aufzufassen?

Die Farbstoffaufnahme seitens unseres Modells stellt keinen einheitlich zu beurteilenden Vorgang dar. Bei der Aufnahme der wasserunlöslichen, in flüssigem Neutralfett leicht löslichen, indifferenten Farbstoffe von der Art der Sudanfarbstoffe — ihnen schliesst sich das sehr schwach basische, nur mit starken Säuren Salze bildende Dimethylamidoazobenzol an — spielt weder der Ölsäure- noch der Diamylamingehalt unseres Modells eine Rolle. Die genannten Stoffe werden von jedem flüssigen Neutralfett ganz in derselben Weise aufgenommen wie von unserem Modell. Das letztere verhält sich also den genannten Farbstoffen gegenüber wie ein chemisch indifferentes lipoides Lösungsmittel.

Anders liegen die Dinge hinsichtlich der basischen Farbstoffe. Von den Bestandteilen unseres Modells ist es lediglich die Ölsäure, die für das Maass der Aufnehmbarkeit basischer Farbstoffe in Betracht kommt. Dass es sich bei der Aufnahme basischer Farbstoffe durch Ölsäure um die Bildung ölsaurer Farbsalze und Auflösung der letzteren im Überschuss des lipoiden Lösungsmittels handeln muss, ist klar. Im einzelnen ist der Vorgang komplizierter. Die wässrige Lösung eines

basischen Farbsalzes enthält folgende Lösungsbestandteile: erstens ungespaltene Moleküle des Farbsalzes, zweitens elektrolytisch dissoziierte Ione, drittens durch hydrolytische Spaltung entstandene freie Farbstoffbase und freie Säure, viertens Komplexe von Farbsalzmolekülen. Von den angeführten Lösungsbestandteilen der wässrigen Farbsalzlösung kommt für die Verteilung zwischen wässriger Phase und Ölsäure lediglich die im Wasser im allgemeinen schwer lösliche freie Farbstoffbase in Betracht. Sie wird von der Ölsäure unter Bildung des betreffenden Oleates aufgenommen. Infolge des gestörten Gleichgewichtes zerfallen ungespaltene Farbsalzmoleküle durch hydrolytische Dissoziation in freie Base und Säure; dadurch wird wieder das Gleichgewicht zwischen den einfachen und zusammengesetzten Farbsalzmolekülen gestört, ein entsprechender Betrag der letzteren muss dissoziieren usw., bis schliesslich im ganzen System Gleichgewicht herrscht.

Die sauren Vitalfarbstoffe endlich (Tabelle I: 53—74) verdanken ihre Aufnehmbarkeit seitens unseres Modells ausschliesslich dem Gehalt des letzteren an Diamylamin, da die gedachten Farbstoffe weder von reinem Neutralfett noch von Ölsäure aufgenommen werden. Bei ihrer Aufnahme seitens des Modells kommen analoge Verhältnisse in Betracht, wie bei der Aufnahme basischer Farbstoffe, nur dass hier die Farbsäure es ist, die unter Bildung des betreffenden farbsauren Diamylaminsalzes von der lipoiden Phase aufgenommen wird.

##### 5. Die Vitalfärbung des Zellkörpers und die Aufnehmbarkeit von Farbstoffen durch die Ölsäure-Diamylaminmischung — in ihrer Abhängigkeit von der Reaktion der wässrigen Farbstofflösung.

Zur Untersuchung gelangten von basischen Farbstoffen Indulinscharlach und Acridingelb, von sauren Farbstoffen Brillantoranger und Tropacolin 000/1. Die Versuche mit den basischen Farbstoffen wurden folgendermaassen angestellt: Die Flüssigkeit mit den Paramäcien wurde in zwei Portionen geteilt und jede Portion auf das Zwanzigfache mit Leitungswasser verdünnt, das in dem einen Falle  $K_2CO_3$  im Verhältnis von 1 : 3000, im anderen Falle Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 6000 enthielt. Die Färbung wurde in der Weise vorgenommen, dass zwei Teile der Kaliumkarbonat bzw. Zitronensäure enthaltenden Paramäciensuspension mit einem Teile Farbstofflösung von berechneter Konzentration vermischt wurden. Zur Herstellung der Farbstofflösung war destilliertes Wasser verwendet worden. Die Färbung der Tiere erfolgte also einerseits in einer alkalischen Lösung mit einem Gehalt von ungefähr 1 : 4500  $K_2CO_3$ , andererseits in einer sauren Lösung mit einem Gehalt von ungefähr 1 : 9000 Zitronensäure.

In welcher Weise der Unterschied in der Reaktion — bei gleichbleibender Konzentration des Farbstoffes — den Färbungsvorgang beeinflusst, zeigt die nachfolgende Gegenüberstellung:

#### Indulinscharlach.

Farbstoffkonzentration 1 : 60000.

Saure Lösung.	Alkalische Lösung.
Nach 30 Min. ungefärbt. Nach 45 Min. hellrote Diffusfärbung des ganzen Zellkörpers. Normales Verhalten.	Sofort intensive Diffusfärbung des ganzen Zellkörpers.

Farbstoffkonzentration 1 : 90000.

Tiere dauernd ungefärbt.	Sofort intensive Diffusfärbung des ganzen Zellkörpers.
--------------------------	--

Farbstoffkonzentration 1 : 300000.

Tiere dauernd ungefärbt.	Nach 10 Min. intensive Diffusfärbung des ganzen Zellkörpers.
--------------------------	--

Farbstoffkonzentration 1 : 1500000.

Tiere dauernd ungefärbt.	Nach 35 Min. hellrote Diffusfärbung des ganzen Zellkörpers.
--------------------------	---

Farbstoffkonzentration 1 : 2500000.

Tiere dauernd ungefärbt.	Tiere dauernd ungefärbt.
--------------------------	--------------------------

Wie man sieht, ist der Einfluss der Reaktion auf den Färbungsvorgang ein ganz bedeutender. Während bei saurer Reaktion die Lösung 1 : 60000 die färbende Grenzkonzentration, das heisst die stärkste Verdünnung darstellt, die noch eine deutlich wahrnehmbare Färbung des ganzen Zellkörpers zu bewirken imstande ist, liegt für die alkalische Lösung die färbende Grenzkonzentration bei 1 : 1500000. Eine alkalische Lösung von 1 : 1500000 färbt also den lebenden Zellkörper ebenso stark wie eine saure Lösung von 1 : 60000. Die erstere besitzt also ein 25mal so starkes Färbevermögen.

#### Acridingelb.

Saure Lösung.	Alkalische Lösung.
---------------	--------------------

Farbstoffkonzentration 1 : 18000.

Nach 30 Min. Diffusfärbung des Zellkörpers.	Tötet sofort unter intensiver Gelbfärbung des Zellkörpers.
---	--

Farbstoffkonzentration 1 : 80000.

Nach 60 Min. Diffusfärbung des ganzen Zellkörpers.	Sofortige intensive Färbung des ganzen Zellkörpers.
--	---

Farbstoffkonzentration 1 : 120 000.

Tiere dauernd ungefärbt.                      Sofortige intensive Färbung des  
ganzen Zellkörpers.

Farbstoffkonzentration 1 : 1 600 000.

Tiere dauernd ungefärbt.                      Nach 12 Min. Diffusfärbung des  
ganzen Zellkörpers. Normales Ver-  
halten.

Farbstoffkonzentration 1 : 3 200 000.

Tiere dauernd ungefärbt.                      Tiere dauernd ungefärbt.

Acridingelb zeigt also das analoge Verhalten wie Indulinscharlach. In saurer Lösung ist die färbende Grenzkonzentration 1 : 80 000. In alkalischer Lösung ist die färbende Grenzkonzentration 1 : 1 600 000. Im Vergleich zur alkalischen Lösung bedarf also die saure Lösung zur Erzielung des gleichen Färbungseffektes einer zwanzigfachen Konzentration.

Der Einfluss der Reaktion des Aussenmedium auf die Farbstoffspeicherung innerhalb des lebenden Zellkörpers muss in der nämlichen Weise zum Ausdruck kommen, wenn statt der färbenden die toxisch wirkende Grenzkonzentration bestimmt wird.

Die Beziehung zwischen der Giftigkeit wässriger Lösungen basischer Farbstoffe und der Reaktion der Lösung war schon wiederholt der Gegenstand von Untersuchungen. v. Prowazek (66) fand, dass die Giftigkeit gewisser basischer Farbstoffe durch Alkalizusatz gesteigert, durch Säurezusatz herabgesetzt wird. Nach J. Traube (83) wird die Giftigkeit von Methylblau, Toluidinblau, Methylgrün und Kristallviolett durch Zusatz von Kaliumcarbonat erhöht.

Anschliessend an die mitgeteilten Färbungsversuche war für Indulinscharlach und Acridingelb Folgendes festzustellen:

Tabelle IV.

Farbstoff	Konzentration der Farbstofflösung. 1 Teil Farbstoff zu Teilen Wasser	Bei einem Gehalt von Zitronensäure 1 : 9000	Bei einem Gehalt von Kaliumcarbonat 1 : 4500
Indulinscharlach.	60 000	Nach 45 Min. normal. Nach 115 Min. sämtliche Tiere bis auf zwei tot.	Nach 5 Min. sämtliche Tiere tot.
Indulinscharlach.	90 000	dauernd normal.	Nach 8 Min. sämtliche Tiere tot.
Indulinscharlach.	450 000	dauernd normal.	Nach 35 Min. 50% der Tiere tot. Nach 90 Min. bis auf ein Indi- viduum sämtl. Tiere tot.

Farbstoff	Konzentration der Farbstofflösung, 1 Teil Farbstoff zu Teilen Wasser	Bei einem Gehalt von Zitronensäure 1:9000	Bei einem Gehalt von Kaliumcarbonat 1:4500
Indulinscharlach.	900 000	dauernd normal.	Nach 120 Min. bis auf drei Individuen sämtliche Tiere tot.
Indulinscharlach.	1 500 000	dauernd normal.	Tiere dauernd normal.
Acridingelb . . .	18 000	Nach 30 Min. Tiere normal. Nach 75 Min. sämtliche Tiere tot.	Sofortiger Tod sämtlicher Tiere.
Acridingelb . . .	54 000	Nach 8 Stunden alle lebend. Mehrzahl normal.	Nach 4 Min. sämtliche Tiere tot.
Acridingelb . . .	80 000	Tiere dauernd normal.	Nach 6 Min. sämtliche Tiere tot.
Acridingelb . . .	800 000	Tiere dauernd normal.	Nach 30 Min. die meisten Tiere hochgradig pathologisch. Nach 60 Min. fast alle Tiere tot.
Acridingelb . . .	1 600 000	Tiere dauernd normal.	Tiere dauernd normal.

Eine Lösung von Indulinscharlach, die Zitronensäure im Verhältnis von 1:9000 enthält tötet also Paramäcien bei einer Konzentration von 1:60,000 erst nach zwei Stunden. Eine gleich starke Farbstofflösung mit einem Gehalt von Kaliumcarbonat im Verhältnis von 1:4500 tötet die Tiere schon nach 5 Minuten. Die gleiche Giftigkeit wie die erwähnte saure Lösung 1:60 000 entfaltet eine  $K_2CO_3$  haltige Lösung schon bei einem Farbstoffgehalt von 1:900 000. Die  $K_2CO_3$  haltige Farbstofflösung erweist sich somit 15mal so giftig als die saure Lösung.

Analoge Resultate ergibt Acridingelb. Eine Acridingelblösung mit einem Gehalt von 1:9000 Zitronensäure tötet Paramäcien bei einer Konzentration von 1:18000 nach 75 Minuten; eine  $K_2CO_3$  im Verhältnis von 1:4500 enthaltende Lösung von der gleichen Farbstoffkonzentration tötet die Tiere augenblicklich. Bei einem Gehalt von  $K_2CO_3$  1:4500 muss die Farbstoffkonzentration auf mehr als das 45fache herabgesetzt werden, um zu einer Lösung von annähernd gleicher Wirksamkeit zu gelangen, denn selbst die alkalische Lösung 1:800 000 erweist sich noch immer etwas giftiger als die saure Lösung 1:18 000. Die  $K_2CO_3$  haltige Lösung des basischen Farbstoffes Acridingelb ist somit mindestens 45mal giftiger als die saure.

Die Versuche mit den sauren Farbstoffen wurden ganz in derselben Weise angestellt, nur dass, um den Unterschied in der Reaktion der sauren und alkalischen Farbstofflösung etwas zu erhöhen, zur Herstellung der Farbstofflösung, die zur Färbung der Paramäcien in alkali-

scher Lösung bestimmt war, Leitungswasser mit einem Gehalt von  $K_2CO_3$  im Verhältnis von 1 : 3000 verwendet wurde, während zur Herstellung der Farbstofflösung, die zur Färbung der Paramäcien in saurer Lösung dienen sollte, destilliertes Wasser mit einem Gehalt von Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 6000 genommen wurde.

## Brillantorange R.

Saure Lösung.

Alkalische Lösung.

Farbstoffkonzentration 1 : 20000.

Nach 60 Min. diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers. Normales Verhalten.

Nach 60 Min. diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers.

Farbstoffkonzentration 1 : 25000.

Nach 60 Min. diffuse Färbung des Zellkörpers.

Nach 75 Min. völlig ungefärbt.

Farbstoffkonzentration 1 : 30000.

Nach 60 Min. einzelne Tiere schwach gefärbt; die Mehrzahl ungefärbt.

Tiere dauernd ungefärbt.

## Tropäolin 000/1.

Saure Lösung.

Alkalische Lösung.

Farbstoffkonzentration 1 : 4000.

Nach 45 Min. diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers; normales Verhalten.

Nach 60 Min. gerade deutlich erkennbare Färbung des Zellkörpers. Normales Verhalten.

Farbstoffkonzentration 1 : 6000.

Nach 60 Min. deutliche diffuse Färbung des Zellkörpers.

Tiere dauernd ungefärbt.

Farbstoffkonzentration 1 : 8000.

Tiere dauernd ungefärbt.

Tiere dauernd ungefärbt.

Auch bei den sauren Farbstoffen ist also ein gewisser, wenn auch wenig erheblicher Einfluss der Reaktion auf den Vorgang der Farbstoffaufnahme festzustellen. Er äussert sich in entgegengesetztem Sinne wie bei den basischen Farbstoffen. Hier ist es die saure Reaktion, die die Farbstoffaufnahme begünstigt, während die alkalische Reaktion die Farbstoffaufnahme hemmt.

Der Einfluss der Reaktion der wässrigen Farbstofflösung auf die Ausschüttelbarkeit der Farbstoffe durch Diamylamin-Ölsäure.  $\alpha$ ) Basische Farbstoffe. Eine Lösung von Indulinscharlach in destilliertem Wasser im Verhältnis von 1 : 4000 wurde in dem einen Falle mit zwei Teilen reinen Leitungswassers, in

dem anderen Falle mit zwei Teilen Leitungswasser, das Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 600 enthielt, verdünnt. Die beiden Lösungen, die den Farbstoff im Verhältnis von 1 : 6000 enthielten, unterschieden sich also nur dadurch, dass in der einen überdies Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 9000 enthalten war. Von den beiden Flüssigkeiten wurden je 15 ccm mit 2,5 ccm einer Mischung von Ölsäure und Mandelöl im Verhältnis von 1 : 20 ausgeschüttelt. Um genauere Werte zu erhalten, wurde die kolorimetrische Bestimmung nicht mittels des Sahli'schen Kolorimeters, sondern mittels des Apparates von Dubosque vorgenommen. Das Resultat war folgendes: Bei der Lösung, die keine Zitronensäure enthielt, betrug der Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure-Öl}}{\text{Wasser}} = 786$ ;

die Raumeinheit der Ölsäuremischung enthielt also nach der Ausschüttelung 786mal so viel Indulinscharlach als die Raumeinheit Wasser. Bei der zitronensäurehaltigen Lösung war die Ölsäuremischung nach der Ausschüttelung etwa annähernd gleich stark gefärbt wie die wässrige Lösung. Der kolorimetrisch ermittelte Teilungsquotient  $\frac{\text{Ölsäure-Öl}}{\text{Wasser}}$  war um ein geringeres kleiner als 1. Hier hatte also ein

Zusatz von Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 9000 den Teilungsquotienten  $\frac{\text{Ölsäure-Öl}}{\text{Wasser}}$  fast auf den achthundertsten Teil des ursprünglichen Wertes herabgedrückt.

Analoge Resultate ergab Acridingelb.

Eine Lösung des Farbstoffes in destilliertem Wasser im Verhältnis von 1 : 2000 wurde einerseits mit zwei Teilen Leitungswasser, andererseits mit zwei Teilen Leitungswasser, das Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 6000 enthielt, vermischt. Von den beiden Lösungen wurden je 15 ccm mit 2,5 ccm 1 Ölsäure : 20 Mandelöl ausgeschüttelt.

Bei der Farbstofflösung, die keine Zitronensäure enthielt, betrug der Teilungsquotient  $\frac{\text{Ölsäure-Öl}}{\text{Wasser}} = 24$ . Bei der Farbstofflösung, die

Zitronensäure enthielt, war nach der Ausschüttelung die Abnahme der Farbstoffkonzentration in der wässrigen Lösung so gering, dass sie sich kolorimetrisch nicht nachweisen liess. Da sich bei einer Acridin-gelblösung von der betreffenden Konzentration mittels der angewendeten kolorimetrischen Methode eine 15%ige Farbstoffabnahme bereits deutlich nachweisen lässt, so muss die Farbstoffabnahme im gedachten Falle geringer gewesen sein, das heisst der Teilungsquotient  $\frac{\text{Ölsäure-Öl}}{\text{Wasser}}$  kann 1 nicht überschritten haben. Der Zusatz von Zitronen-

säure im Verhältnis von 1 : 9000 bewirkte also, dass der Teilungs-

quotient  $\frac{\text{Ölsäure-Öl}}{\text{Wasser}}$  auf den 24. Teil seines ursprünglichen Wertes sank.

β) Saure Farbstoffe. Brillantorange R: Von einer Lösung des Farbstoffes in destilliertem Wasser im Verhältnis von 1 : 2000 wurde einerseits ein Teil mit zwei Teilen reinen Leitungswassers, andererseits ein Teil mit zwei Teilen Leitungswassers, das Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 6000 enthielt, vermischt. Je 15 ccm dieser Lösung wurden mit 2,5 ccm einer Mischung, bestehend aus 1 Diamylamin, 6 Ölsäure und 18 Mandelöl ausgeschüttelt. In beiden Fällen betrug der Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öls. Öl}}{\text{Wasser}} = 12$ .

Tropacolin 000/1: 15 ccm einer Lösung des Farbstoffes in zwei Teilen Leitungswasser und einem Teil destilliertem Wasser im Verhältnis von 1 : 6000, geschüttelt mit 2,5 ccm der oben erwähnten Diamylamin-Ölsäure-Ölmischung: Teilungsquotient  $\frac{\text{Diam. Öls. Öl}}{\text{Wasser}} = 9$ .

15 ccm der gleichen Lösung mit einem Zusatz von Zitronensäure (1 : 9000), geschüttelt mit 2,5 ccm Diamylamin-Ölsäure-Ölmischung: Teilungsquotient ebenfalls = 9.

Der Zusatz von Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 9000 bewirkt also bei keinem der beiden sauren Farbstoffe einen kolorimetrisch nachweisbaren Unterschied im Ausschüttelungsresultat. Stärkerer Säurezusatz steigert allerdings die Aufnahme der Farbstoffe seitens der Diamylamin-Ölsäure-Ölmischung ganz erheblich: 15 ccm einer Lösung von Brillantorange R (1 : 6000) in zwei Teilen Leitungswasser und einem Teil destillierten Wassers mit einem Zusatz von Zitronensäure im Verhältnis von 1 : 150, geschüttelt mit 2,5 ccm der oben genannten Diamylamin-Ölsäure-Ölmischung: Teilungsquotient  $\frac{\text{Diam. Öls.-Öl}}{\text{Wasser}} = 60$ .

#### b) Die Granulumsubstanz als Lösungsmittel für Farbstoffe.

Da die vital färbbaren Granula den mitgeteilten Beobachtungen zufolge die Konsistenz des Paramäcienendoplasmas besitzen, das heisst flüssig sind, so lässt sich analog der vitalen Zellkörperfärbung auch die Granulafärbung als die Verteilung eines Farbstoffes auf die beiden miteinander nicht mischbaren flüssigen Medien, das Wasser und die Granulumsubstanz, auffassen. Dass das Modell der vitalen Zellkörperfärbung nicht ohne weiteres auch für die Granulumsubstanz gelten kann, geht aus der Tatsache hervor, dass eine grosse Zahl von Farbstoffen die Granula intensiver färbt als den Zellkörper. Es ergibt sich somit die Aufgabe, zu untersuchen, worin sich das Lösungsvermögen der Granulumsubstanz von dem des Zellkörpers unterscheidet.

Wir wählen als Untersuchungsobjekt die grossen gequollenen Granula vakuolisierter Paramácien und nehmen zum Ausgangspunkt unserer Betrachtungen die Erscheinung, dass die Vitalfarbstoffe in bezug auf die genannten Granula zweierlei Verhalten zeigen: Die einen färben selbst die grössten Granula nicht stärker als den Zellkörper, die anderen färben entweder sämtliche Granula oder zum mindesten die grossen unter ihnen intensiver als den Zellkörper. Untersucht man nun, von welcher Art die Farbstoffe sind, die die Granula stärker färben als den Zellkörper, so zeigt es sich, dass es durchwegs Farbstoffe sind, deren Ausschüttelbarkeit durch eine Ölsäure-Ölmischung mit dem Gehalt der letzteren an Ölsäure zunimmt.

Dass bei einer Reihe von Farbstoffen, die die Granula stärker färben als den Zellkörper, in der Tabelle die Ausschüttelbarkeit durch reines Öl ebenso als maximal bezeichnet wird wie die durch Ölsäure (Tabelle I: 9—17), darf nicht irremachen. Wird ein Farbstoff aus seiner wässrigen Lösung schon durch Öl soweit aufgenommen, dass die Lösung im Kolorimeterröhrchen ungefärbt erscheint, so ist die Feststellung, ob bei der Ausschüttelung mit einer Ölsäure-Ölmischung eine Zunahme der Speicherung seitens der Ölphase erfolgt, eben mittels dieser Methode nicht mehr zu erzielen. Verwendet man jedoch zur Ausschüttelung grössere Mengen von Farbstofflösung als bei unseren Versuchen, so lässt sich durch den Vergleich der ausgeschüttelten Lösungen feststellen, dass alle die genannten Farbstoffe (Tabelle I: 9—17) von Ölsäure stärker aufgenommen werden als von reinem Öl.

Die eben gegebene Formulierung entspricht den Tatsachen besser als etwa der Satz, dass es durchwegs basische Farbstoffe sind, die die Granula stärker färben als den Zellkörper; denn unter den Farbstoffen, die von den Granula stärker gespeichert werden als vom Zellkörper, finden sich die ausgesprochen sauren Farbstoffe Echtsäureviolett 10 B (By) und Säureviolett 4 B extra (By), deren Molekül zwei Sulfosäuregruppen enthält; andererseits färbt der basische Farbstoff Dimethylamidoazobenzol die Granula nicht stärker als den Zellkörper. Zieht man jedoch die Ausschüttelungsversuche zu Rate, so ergibt sich, dass die genannten sauren Farbstoffe von flüssigem Neutralfett auch nicht in Spuren, wohl aber von Ölsäure aufgenommen werden, während Dimethylamidoazobenzol von Ölsäure ganz in derselben Weise aufgenommen wird wie von säurefreiem Öl, das heisst als freie Base, die, wie die Gelbfärbung der Ölsäure nach der Ausschüttelung beweist, mit der Ölsäure keine Salzbildung eingeht.

Die Erscheinung, dass die Granulums substanz nur solche Farbstoffe stärker speichert als der Zellkörper, deren Ausschüttelbarkeit durch eine Ölsäure-Ölmischung mit dem Gehalt der letzteren an Öl-

säure ansteigt<sup>1)</sup>, kann nur darin ihren Grund haben, dass die Granulums substanz an Säure reicher ist als der Zellkörper.

Ein zweiter Unterschied gegenüber der Farbstoffaufnahme seitens des Zellkörpers ist der, dass die sauren Vitalfarbstoffe (Tabelle I: 53—74), die den lebenden Zellkörper diffus färben, die grossen Granula ungefärbt lassen. Es kann dies nur darin begründet sein, dass die Aufnahme der genannten Stoffe seitens des lebenden Zellkörpers bedingenden fettlöslichen Basen in der Substanz der grossen Granula nicht vorhanden sind, sei es, dass die in den Lipoiden des normalen Endoplasmakörnchens etwa anwesenden organischen Basen während der enormen Vergrösserung des Körnchens eine derartige Konzentrationsverminderung erfahren, dass ihr Aufnahmevermögen für die genannten Stoffe minimal wird, oder dass die gedachten organischen Basen den Plasmalipoiden normaler Endoplasmakörnchen von vornherein fehlen.

Wir gelangen somit zu folgender Auffassung des Lösungsvermögens der Granulums substanz: Gleich dem Zellkörper verhält sich auch die Granulums substanz Farbstoffen gegenüber wie ein flüssiges Neutralfett, das eine gewisse Menge Fettsäure enthält; jedoch besteht der Unterschied, dass wir der Granulums substanz einen höheren Grad an Fettsäure zuschreiben müssen als dem Zellkörper.

Die Hand in Hand mit der Quellung der Granula einhergehende Zunahme ihrer Färbbarkeit für alle diejenigen Farbstoffe, welche Granula stärker färben als den Zellkörper, kann dem Gesagten zufolge nur darin ihren Grund haben, dass während der Quellung des Granulum in seiner Substanz Veränderungen vor sich gehen, die zu einer Zunahme der Säure in der Substanz des Granulum führen.

Zu dem nämlichen Resultat, d. i. zu dem Ergebnis, dass es tatsächlich der Säuregehalt des Granulum ist, der das charakteristische Verhalten des letzteren bei der Färbung bedingt, konnten wir noch auf einem ganz anderen Wege gelangen. Dieser Weg war das Studium der Vitalfärbung der Nahrungsballen.

### c) Die Vitalfärbung der Nahrungsballen.

Wie an anderer Stelle (57) ausführlich dargelegt wurde, lassen sich die an den Nahrungsvakuolen von Paramäcien zu beobachtenden Vorgänge in zwei scharf geschiedene Perioden sondern. Das Ereignis, das die scharfe Scheidung der beiden Perioden bedingt, ist ein plötz-

1) Dass die Umkehrung des Satzes gilt, lässt sich nicht mit Sicherheit behaupten. Chinolinrot und Janusrot färben die Granula nicht merklich stärker als den Zellkörper, trotzdem sie von Ölsäure stärker aufgenommen werden als von neutralem Öl.

lich in die Nahrungsvakuole erfolgender Flüssigkeitserguss, der zu einer erheblichen Vergrößerung der Vakuole führt. Hinsichtlich der in den beiden Perioden an der Nahrungsvakuole zu beobachtenden Vorgänge sei auf die eben angeführte Mitteilung verwiesen und hier nur folgendes Moment hervorgehoben: Die beiden Perioden unterscheiden sich durch die Reaktion der Nahrungsvakuole, die während der ersten Periode sauer, während der zweiten alkalisch ist. Mit Hilfe empfindlicher Indikatoren lässt sich zeigen, dass nach der Ablösung der Vakuole vom Schlunde eine saure Reaktion der Vakuolenflüssigkeit beginnt und sehr bald, wie der positive Ausfall der Reaktion mit Dimethylamidoazobenzol und Kongo beweist, freie Säure in der Nahrungsvakuole auftritt. Mit dem Erscheinen des Flüssigkeitsergusses rings um den Nahrungsballen, der die zweite Periode einleitet, schlägt die saure Reaktion plötzlich in eine schwach alkalische um; die abgesonderte Flüssigkeit reagiert demnach schwach alkalisch. Von da ab behält die Nahrungsvakuole ihre schwach alkalische Reaktion bis zum Schlusse bei.

Wie verhält sich nun die Nahrungsvakuole bei der Vitalfärbung? Vermischt man die Flüssigkeit, in der Paramäcien sich befinden, mit einigen Tropfen der entsprechend verdünnten Lösung eines derjenigen Farbstoffe, die das Vermögen besitzen, Nahrungsballen vital zu färben, wie zum Beispiel Neutralrot, und beobachtet nun an einem ruhig haltenden, etwa thigmotaktisch an einem Bakterienballen haftenden Tier das Verhalten der Nahrungsvakuole, so lässt sich folgendes feststellen: Solange die Vakuole am Schlunde haftet und noch unmittelbar nach ihrer Ablösung ist die Vakuolenflüssigkeit vollkommen ungefärbt. Erst einige Sekunden nach der Ablösung vom Schlunde beginnt eine Rötung der Vakuolenflüssigkeit, die an Intensität immer mehr zunimmt und ihr Maximum nach erfolgter Nahrungsballenbildung und Resorption des überschüssigen Vakuolenwassers erreicht. Die Färbung betrifft gleichmässig den ganzen Vakuoleninhalt. Dass es sich nicht einfach um einen durch die saure Reaktion bedingten Umschlag des in alkalischer Lösung schwach gelblichen Farbstoffes in Fuchsinrot handeln kann, wie seinerzeit von Metschnikoff (55) bei seinen Untersuchungen über intrazelluläre Verdauung angenommen wurde, beweist schon der Umstand, dass der Färbung eine ganz kolossale Farbstoffspeicherung zugrunde liegt. Man greift nicht zu hoch, wenn man die Konzentration des Farbstoffes in den Nahrungsballen auf das Vieltausendfache der Konzentration in der umgebenden Flüssigkeit schätzt. Überdies zeigen Farbstoffe, deren Nuance von der Reaktion der Lösung unabhängig ist, wie Methylenblau, Nilblausulfat usw., die gleiche Farbstoffspeicherung. Es ergibt sich also die Frage: Worauf beruht die Farbstoffspeicherung in den Nahrungsvakuolen? Verfolgt man die Färbung der Nahrungsvakuole während

der beiden oben gekennzeichneten Perioden, so zeigt es sich, dass die Färbung mit dem ersten Auftreten der sauren Reaktion beginnt und genau so lange andauert wie die saure Reaktion in der Nahrungsvakuole. Tritt nämlich am Beginn der zweiten Periode mit dem Auftreten des Flüssigkeitsergusses in die Vakuole der plötzliche Umschlag der sauren Reaktion in eine schwach alkalische ein, dann erfolgt sehr rasch, meist sogar plötzlich, die Entfärbung der Nahrungsvakuole, und zwar ganz unabhängig davon, ob der betreffende Farbstoff seinen Farbenton mit der Reaktion ändert oder nicht. Vom Moment des Verschwindens der sauren Vakuolenreaktion bleibt die Nahrungsvakuole ungefärbt bis zu ihrer Ausstossung aus dem Paramäcienkörper. Danach kann es also keinem Zweifel unterliegen, dass die Farbstoffspeicherung in der Nahrungsvakuole in der sauren Reaktion der letzteren ihre Ursache hat.

Mit der Feststellung der Tatsache, dass die Nahrungsvakuole die betreffenden Farbstoffe nur insolange speichert, als sie sauer reagiert, erscheint die Frage der Farbstoffspeicherung in den Nahrungsballen in befriedigender Weise aufgeklärt. Es leuchtet ja ohne weiteres ein, dass der saure, bei Paramäcien sogar freie Säure enthaltende Vakuoleninhalt im Vergleich zum Zellkörper des Paramäcium und im Vergleich zur schwach alkalischen oder neutralen Aussenlösung das weitaus bessere Lösungsmittel für den Farbstoff darstellt. Während die protoplasmatische Begrenzung der Vakuole für basische Farbstoffe jederzeit nach beiden Richtungen durchgängig ist, muss für die die saure Reaktion bedingenden H-Ionen die Vakuolenhaut wenigstens zeitweise undurchgängig sein, sonst käme es ja gar nicht zur Anreicherung der H-Ionen im Vakuoleninhalt. Dem hohen Teilungskoeffizienten zugunsten des sauren Vakuoleninhaltes entsprechend muss sich also der Farbstoff in der Nahrungsvakuole in bedeutender Konzentration ansammeln. Erfolgt der plötzliche Umschlag der sauren Vakuolenreaktion in eine schwach alkalische, dann ändert sich das Teilungsverhältnis des Farbstoffes zugunsten des Zellkörpers: Die Nahrungsvakuole entfärbt sich. Hat man einmal die Ursache der Farbstoffspeicherung in den Nahrungsballen erkannt, dann macht das Verständnis des ganzen Vorganges der Vitalfärbung der Nahrungsvakuolen keine Schwierigkeit. So versteht man jetzt, warum die Färbung der Nahrungsballen beim toten Tier niemals in gleicher Weise gelingt. Beim Absterben verliert das Protoplasma, also auch die Vakuolenwand, die Durchlässigkeitsverhältnisse, die sie im Leben besass; die in der Nahrungsvakuole enthaltene Säure diffundiert in die Umgebung, und damit verschwindet das den Farbstoff speichernde Moment aus den Nahrungsvakuolen. Aus dem gleichen Grunde entfärben sich vital gefärbte Nahrungsballen beim Tode des Tieres.

**d) Analogien zwischen der Vitalfärbung der Nahrungsballen und der vitalen Granulafärbung.**

Ein Umstand, der bei der Vitalfärbung von Paramäcien sehr bald auffallen muss, ist das Bestehen gewisser Analogien zwischen der Vitalfärbung der Nahrungsballen und der Vitalfärbung der Granula normaler und vakuolisierter Tiere. In beiden Fällen erfolgt die Färbung in sehr stark verdünnten Farbstofflösungen; in beiden Fällen ist der Eintritt der Färbung an den lebenden Zustand der Zelle gebunden usw. Es fragt sich nun, ob ein tieferer, im Wesen der Sache beruhender Zusammenhang zwischen den beiden Färbungsvorgängen besteht.

Zur Entscheidung der Frage wurde in der Weise vorgegangen, dass für eine Anzahl von Farbstoffen die stärkste Verdünnung festgestellt wurde, die einerseits Granula, andererseits Nahrungsballen färbt, worauf dann geprüft wurde, inwieweit die beiden Reihen übereinstimmen. Es empfahl sich, Farbstoffe der gleichen Nuance zu wählen, da bei solchen die Entscheidung, ob das betreffende Gebilde noch deutlich gefärbt ist, gleichmässiger ausfällt als bei Stoffen, die in ihrem Farbenton verschieden sind. Die untersuchten Farbstoffe waren: Capriblau, Methylenblau, Neumethylenblau und Nilblausulfat. Zur Färbung der Nahrungsballen wurden normale Paramäcien aus der nämlichen Kulturflüssigkeit verwendet, denen als Nahrung Bakterien zur Verfügung standen. Zu 1 ccm Paramäcien enthaltender Flüssigkeit wurden 38 ccm Leitungswasser und 1 ccm der berechneten Farbstofflösung hinzugefügt. Die Granulafärbung wurde an vakuolisierten Paramäcien mit sehr grossen, in Vakuolen eingeschlossenen Granula vorgenommen und lediglich die Färbung der grossen Granula berücksichtigt. Die Tiere stammten aus demselben Versuchsglas. Hier wurde  $\frac{1}{2}$  ccm der die Paramäcien enthaltenden Flüssigkeit mit 38,5 ccm Leitungswasser verdünnt und 1 ccm der berechneten Farbstofflösung hinzugefügt. Die Prüfung des Färbungsergebnisses erfolgte nach einer Stunde mittels Leitz Obj. 7 bei Tageslicht und offener Blende. Als Grenzkonzentration des betreffenden Farbstoffes wurde die maximalste Verdünnung angenommen, die noch eine deutlich erkennbare Blaufärbung zu bewirken imstande war.

Nachstehend die Resultate:

Farbstoff	Stärkste Verdünnung, die noch deutliche Blaufärbung der Nahrungsballen bewirkt. 1 Teil Farbstoff in Teilen Wasser	Stärkste Verdünnung, die noch deutliche Blaufärbung der grossen Granula bewirkt. 1 Teil Farbstoff in Teilen Wasser
Capriblau . . . .	225 000	1 000 000
Methylenblau . . .	600 000	3 000 000
Neumethylenblau .	3 000 000	30 000 000
Nilblausulfat . . .	5 750 000	90 000 000

Wie man sieht, ist die Reihenfolge der Farbstoffe in beiden Färbungsreihen die nämliche, das heisst je stärker ein Farbstoff vom Vakuoleninhalt aufgenommen wird, um so stärker wird er auch von der Substanz der Granula ausgeschüttelt. Daraus kann also gefolgert werden, dass dasselbe Moment, das die Ursache der Farbstoffspeicherung in den Nahrungsbällen bildet, auch bei der Farbstoffspeicherung in den Granula maassgebend ist. Als Ursache der Farbstoffspeicherung in den Nahrungsbällen erkannten wir deren Säuregehalt. Demnach hinge auch die Speicherung von Farbstoffen in den Granula mit dem Säuregehalt der letzteren zusammen. Die vergleichende Untersuchung der Vitalfärbung der Nahrungsbälle und der vitalen Granulafärbung unterstützt also die oben entwickelte Theorie, derzufolge sich die Granulumsubstanz bei der Vitalfärbung wie ein lipoides Lösungsmittel verhält, das einen gewissen Betrag Fettsäure gelöst enthält.

#### IV. Die modifizierte Lipoidtheorie.

Unsere Versuche haben ergeben, dass sich der lebende Zellkörper Farbstoffen gegenüber so verhält, als ob er ein flüssiges Neutralfett wäre, das einen gewissen Betrag fettlöslicher Säure und fettlöslicher Base gelöst enthält. Bevor wir nun daran gehen, diese Erkenntnis bei der Deutung der eingangs beschriebenen Färbungsbilder zu verwenden, soll vorerst die Frage erörtert werden, inwiefern die Bedingungen für das postulierte Lösungsvermögen im lebenden Zellkörper tatsächlich realisiert sind. Wir stellen also die Frage: Welche an dem Aufbau des lebenden Zellkörpers beteiligten Stoffe sind es, die das oben definierte Lösungsvermögen tatsächlich bedingen? Dass von sämtlichen Konstituenten des Plasmas hierfür ausschliesslich die lipoiden Zellbestandteile in Frage kommen können, bedarf keines weiteren Beweises, hingegen fragt es sich: Welches ist die spezielle Natur der für die Erklärung des färberischen Verhaltens des lebenden Zellkörpers in Betracht kommenden Lipoiden, und zweitens, welches ist ihre Lokalisation innerhalb der lebenden Zelle?

Bezüglich beider Punkte macht die Hypothese Overton's ganz bestimmte Annahmen. Nach Overton ist die Verteilung der Lipoiden innerhalb der Zelle keine gleichmässige. Seiner Annahme zufolge befinden sich die Lipoiden hauptsächlich in der Grenzschicht des Plasmas, und zwar in einem Zustande, der zur Folge hat, dass die mit den Lipoiden imprägnierte Grenzschicht sich wie ein fettartiges Lösungsmittel verhält. Im Gegensatz hierzu wären die Lipoiden des Zellinnern stark gequollen und daher ausserstande, fettlösliche Verbindungen zu speichern.

Unsere Versuche zeigen, dass die Overton'sche Annahme hinsichtlich der Verteilung der Lipoiden nicht zutrifft. Bei Anwendung diffus färbender Stoffe (Sudan, Indulinscharlach, Aeringelb usw.),

wobei das die Beurteilung der Gleichmässigkeit der Färbung störende Auftreten von gefärbten Granula wegfällt, lässt sich auf das allerdeutlichste erkennen, dass der ganze Zellkörper gleichmässig gefärbt wird. Meist erscheint das Kortikalplasma sogar etwas heller gefärbt als das Endoplasma. Von einer stärker gefärbten Grenzmembran ist niemals auch nur das geringste zu entdecken, und doch könnte eine nur einigermaassen intensivere Färbung einer noch so dünnen Grenzschicht bei wechselnder Einstellung des Zellkonturs unmöglich der Beobachtung entgehen. Wie die gleichmässige und selbst für die stärksten optischen Systeme nicht weiter auflösbare Färbung des ganzen Zellkörpers beweist, ist die Beziehung der Lipide zu den Konstituenten des lebenden Zellkörpers eine sehr innige. Sicher ist diese Beobachtung geeignet, jene immer mehr an Boden gewinnende Anschauung zu stützen, derzufolge die Lipide im Verein mit den Eiweisskörpern an dem Aufbau der lebenden Substanz selbst teilnehmen. Die Verbindung zwischen Lipiden und Eiweisskörpern müsste allerdings derartig sein, dass trotz der Bindung der Lipide an Eiweiss das charakteristische Lösungsvermögen der ersteren keine Änderung erfährt.

Wichtiger als die Art der Verteilung der Lipide erscheint für eine Theorie, welche die Durchlässigkeitsverhältnisse der lebenden Zelle auf das Lösungsvermögen der Zelllipide bezieht, eine genaue Definition eben dieses Lösungsvermögens. Die Theorie Overton's bezeichnet Cholesterin und Lecithin als die Stoffe, deren Anwesenheit in der Grenzschicht des Plasmas das auswählende Lösungsvermögen des letzteren bedingt. Auf Grund unserer Versuchsergebnisse müssen wir auch in diesem Punkte Overton widersprechen. Dass Cholesterin der fragliche Körper nicht sein kann, geht daraus hervor, dass Cholesterin, in organischen Lösungsmitteln gelöst, bei Ausschüttelung mit wässrigen Farbstofflösungen sich vielfach anders verhält wie der lebende Zellkörper bei der Färbung. Nachstehend einige Beispiele: Der basische Farbstoff Methylengrün extra gelbl. conc. färbt den lebenden Zellkörper des *Paramäcium* noch in einer Verdünnung von 1:60000; schüttelt man die wässrige Lösung des Farbstoffes mit einer konzentrierten Lösung von Cholestrin in Benzol; so bleibt letztere vollkommen ungefärbt. Aus einer wässrigen Lösung des basischen Farbstoffes Methylgrün Kr. 1 setzt sich Cholestrin-Benzol nach der Ausschüttelung minimal gefärbt ab; an dieser sehr geringen Farbstoffaufnahme ist das Cholesterin auf keinen Fall beteiligt, da reines Benzol bei der Ausschüttelung mit einer wässrigen Lösung von Methylgrün Kr. 1 die gleiche Farbstoffmenge aufnimmt. Andererseits färbt Methylgrün in der gedachten Konzentration den lebenden Zellkörper intensiv in diffuser Weise. Ein weiteres Beispiel: Wird eine wässrige Lösung von Neutralrot, die gradeso weit alkalisch gemacht wurde,

dass ein Umschlag der roten Farbe in gelb erfolgt ist, mit einer Lösung von Cholesterin in Benzol geschüttelt, so setzt sich die letztere rein gelb gefärbt ab. Der lebende Zellkörper verhält sich anders; ihn färbt die gedachte gelbe Neutralrotlösung rosarot. Ähnlich verhält sich Nilblausulfat. Die ganz schwach alkalisch gemachte Lösung des Farbstoffes färbt das Cholesterin-Benzol bei der Ausschüttelung rotviolett, den lebenden Zellkörper hingegen blau. Nicht minder zahlreich sind die Inkongruenzen im Verhalten der sauren Vitalfarbstoffe. Der saure Farbstoff Tuchscharlach — unter sämtlichen untersuchten sauren Farbstoffen der bestfärbende saure Vitalfarbstoff, der noch in einer Verdünnung von 1 : 40000 Paramäcien deutlich diffus färbt — wird bei der Ausschüttelung seiner wässerigen Lösung mit Cholesterin-Benzol von letzterem überhaupt nicht aufgenommen. Ebenso wenig wird Orzein, ein lebende Paramäcien leicht färbender saurer Farbstoff, von Cholesterin-Benzol aufgenommen usw.

Schwieriger gestaltet sich die Beantwortung der Frage, inwiefern die Behauptung, dass das „auswählende Lösungsvermögen“ der lebenden Zelle mit ihrem Lecithingehalt zusammenhängt, in dem Verhalten des käuflichen Lecithins Farbstoffen gegenüber eine Stütze findet. Durch Ausschüttelungsversuche mit einer Lösung von Lecithin in Benzol ist die Frage nicht zu entscheiden, da sich das Lecithin-Benzol aus den wässerigen Farbstofflösungen als trübe, auch nach Tagen sich nicht klärende Emulsion absetzt, die eine Entscheidung, ob und inwieweit eine Farbstoffaufnahme stattgefunden hat, unmöglich macht. Eher gelangt man zum Ziele, wenn man festes Lecithin in die betreffende wässrige Farbstofflösung einbringt und die Färbung des in der wässerigen Lösung aufquellenden Lecithins unter dem Mikroskop beobachtet. Hierbei lässt sich folgendes feststellen:

Mit einigen wenigen, gleich zu erwähnenden Ausnahmen stimmt käufliches Lecithin in seinem Verhalten Farbstoffen gegenüber mit unserem Modell, folglich auch mit dem lebenden Zellkörper ziemlich vollkommen überein. Es entsteht also die Frage: Sind es die Phosphatide des Plasmas, die das charakteristische Verhalten der lebenden Zelle bei der Vitalfärbung bedingen?

Bei der Beantwortung der Frage ist zunächst zu beachten, dass nach allem, was über die Aufnahme von Farbstoffen durch Ölsäure und Diamylamin ausgeführt wurde, das geschilderte Verhalten des Lecithins von vornherein zu erwarten war; denn das käufliche Lecithin ist ein unreines Präparat, das infolge teilweiser Zersetzung sowohl Fettsäure wie organische Base gelöst enthält. Es hat also ungefähr die Zusammensetzung unseres Modells und muss sich wie dieses verhalten. Es wäre aber voreilig, aus dem Verhalten des käuflichen Lecithins auf eine analoge Rolle der Phosphatide im lebenden Plasma

zu schliessen. Ferner muss darauf hingewiesen werden, dass die Übereinstimmung zwischen käuflichem Lecithin und unserem Modell — also auch der lebenden Zelle — Farbstoffen gegenüber zwar eine sehr weitgehende, aber keine vollständige ist. So werden die Farbstoffe Guinea-grün, Patentblau V, Echtgrün extra und einige andere, weder von unserem Modell noch vom lebenden Zellkörper, wohl aber vom Lecithin gespeichert, trotzdem sie selbst in die konzentrierteste Diamylaminmischung nicht übergehen.

Wenn wir nun auch das Verhalten der genannten Farbstoffe, das immerhin eine Ausnahme bildet, nicht zu hoch einschätzen, wenn wir uns ferner auf den Standpunkt stellen, dass sich die Phosphatide des lebenden Plasmas — was bei ihrer amphoterer Natur denkbar wäre — Farbstoffen gegenüber so verhielten wie käufliches Lecithin, so kämen wir bei der Erklärung der vitalen Färbungsphänomene doch nicht zu recht, wollten wir bestimmte Lipide der Zelle für das Verhalten des lebenden Plasmas Farbstoffen gegenüber verantwortlich machen. Wir erinnern hier nochmals an die bei den aufquellenden Granula zu beobachtende Erscheinung, dass die Färbbarkeit der Granula mit zunehmender Quellung ansteigt. Würde es sich bei der Granulumfärbung lediglich um eine Färbung der Phosphatide des Granulum handeln, dann müsste die Färbbarkeit des Granulum in demselben Maasse abnehmen, in dem die Quellung zunimmt. Wir sahen, dass das Gegenteil der Fall ist. Wie oben ausgeführt wurde, hat die Erscheinung darin ihren Grund, dass mit fortschreitender Quellung, offenbar infolge Zerfalles lipoider Verbindungen, die Menge der lipoidlöslichen Säure vermehrt wird. Zur Erklärung der angeführten Färbungsercheinung ist also die Heranziehung des wechselnden Gehaltes des Substrates an löslichen Säuren unerlässlich.

Ein Färbungsphänomen, das die Bedeutung des eben angeführten Momentes für das Verständnis des vitalen Färbungsvorganges noch anschaulicher vor Augen führt, weil ihm ein durchaus physiologischer Vorgang zugrunde liegt, ist das bei Anwendung bestimmter basischer Farbstoffe zu beobachtende Auftreten eines gefärbten Saumes rings um die in Bildung begriffene, noch am Schlunde hängende Nahrungsvakuole, die nach der Ablösung der Vakuole vom Schlunde sehr rasch verschwindet. Sich vorzustellen, dass jedesmal um die sich bildende Nahrungsvakuole eine Anhäufung von Lipoiden stattfindet, die nach der Ablösung der Vakuole vom Schlunde verschwindet, wäre absurd; hingegen erscheint die Annahme sehr plausibel, dass der betreffende Plasmabezirk rings um die Vakuole sich durch stärkeren Säuregehalt vor seiner Umgebung auszeichnet, zumal wenn man bedenkt, dass unmittelbar nach dem Verschwinden dieser Färbung im Inneren der Nahrungsvakuole saure Reaktion auftritt.

Aus den angeführten Gründen scheint es richtiger, die charakteristische Farbstoffspeicherung im lebenden Plasma nicht auf bestimmte Lipoiden, etwa auf die Phosphatide des Plasmas, zu beziehen, sondern ganz allgemein auf ein lipoides Lösungsmittel, das infolge seines Gehaltes an Fettsäure bzw. fettlöslicher Base jenes spezifische Lösungsvermögen besitzt, das unser Modell veranschaulicht.

Der Ausdruck „lipoides Lösungsmittel“ ist hier im Sinne J. Bang's (7) angewendet, der als Lipoiden alle Zellbestandteile bezeichnet, die in organischen Solventien wie Äther, Chloroform, Benzol löslich sind. Für das Verständnis der Farbstoffspeicherung im Plasma erscheint eine chemische Charakterisierung dieses lipoiden Lösungsmittels ebenso entbehrlich, als es überflüssig ist, hinsichtlich der Natur der im Lipoid gelösten Fettsäure bzw. organischen Base bestimmte Annahmen zu machen. Zum Teil mag es sich wohl um die salzbildenden Gruppen von Phosphatiden handeln, zum Teil aber sicher um fettlösliche, in den Plasmalipoiden gelöste organische Säuren und Basen, deren Natur und Menge von Zelle zu Zelle und je nach dem funktionellen Zustand der Zelle auch innerhalb ein und derselben Zelle wechseln dürfte. Das, worauf es bei der uns hier interessierenden Frage ankommt, ist die Charakterisierung der besonderen Art des Lösungsvermögens des Plasmas bzw. seiner Lipoiden, und dieser genügt die oben gegebene Definition.

Während Overton an den Plasmabestandteilen, von denen er das osmotische Verhalten der lebenden Zelle abhängig sein liess, die Fettähnlichkeit — das Lipoiden — hervorhob, zeigten uns unsere Versuche, dass sich das lebende Plasma hinsichtlich seines Lösungsvermögens nicht wie ein indifferentes Fett verhält, sondern wie eine Fettsäure bzw. fettlösliche organische Base, die in einem indifferenten fettartigen Lösungsmittel gelöst ist. Für Overton ist das Lösungsvermögen des Plasmas eine einheitliche Grösse; wir haben diese Grösse gewissermassen in drei Faktoren zerlegt: in ein Lösungsvermögen nach Art eines neutralen Fettes, in ein Lösungsvermögen nach Art einer mit Wasser nicht mischbaren flüssigen Fettsäure und schliesslich in ein Lösungsvermögen nach Art einer mit Wasser nicht mischbaren flüssigen organischen Base. Eine solche Analyse erleichtert nicht nur das Verständnis der vitalen Färbungserscheinungen, sondern scheint mir für die Beurteilung der Wirkung aller vom lebenden Plasma gespeicherten Stoffe von Wichtigkeit zu sein. Denn ob ein vom Plasma gespeicherter Stoff in dem letzteren wie in einem indifferenten fettartigen Solvens gelöst ist, oder ob er die in den Zelllipoiden gelösten Säuren absättigt, oder ob er die basischen Gruppen der Zelllipoiden mit Beschlag belegt, kann hinsichtlich der Wirkung auf die lebende Zelle unmöglich dasselbe bedeuten.

Wir gelangen zur folgenden Formulierung der Lipoidtheorie der Vitalfärbung: Der Vorgang bei der Färbung des lebenden Zellkörpers ist genau so zu beurteilen wie die Verteilung des betreffenden Farbstoffes bei der Ausschüttelung seiner wässerigen Lösung mit einer Mischung von Fettsäure und fettlöslicher organischer Base. Der lebende Zellkörper verhält sich Farbstoffen gegenüber genau so, als ob er ein lipoides Lösungsmittel wäre, das einen gewissen Betrag Fettsäure und fettlöslicher organischer Base gelöst enthält. Der Parallelismus zwischen dem Plasma und einer derartigen Ölmischung ist ein vollständiger: Alle Farbstoffe, die vom lebenden Zellkörper gespeichert werden, werden von einer derartigen Ölmischung gespeichert, und umgekehrt färben alle Farbstoffe, die von der Ölmischung bis zu einem gewissen Betrage aufgenommen werden, den lebenden Zellkörper.

Je stärker ein Farbstoff von der Ölmischung gespeichert wird, um so stärker wird er vom Zellkörper gespeichert.

Bedingungen, die die Speicherung der Farbstoffe seitens der Ölmischung begünstigen oder erschweren, begünstigen oder erschweren in gleichem Maasse die Aufnahme seitens des lebenden Zellkörpers.

Als Vitalfarben sind nur solche Stoffe zu bezeichnen, die das Plasma selbst färben.

Die in der genannten Weise definierte Aufnahmefähigkeit des lebenden Zellkörpers für Farbstoffe ist bedingt durch die an seinem Aufbau beteiligten Lipide (d. i. die Gesamtheit der in Äther, Alkohol, Benzol und ähnlichen organischen Solventien löslichen Zellbestandteile), die infolge der in ihnen gelösten organischen Säuren und Basen, vielleicht auch zum Teil infolge der im Molekül gewisser Lipide enthaltenen sauren bzw. basischen Gruppen das oben definierte „Lösungsvermögen“ besitzen. Die Verteilung der Lipide im Plasma des lebenden Zellkörpers ist eine gleichmässige.

Die vital färbbaren Granula — die bei der vitalen Färbungsreaktion der Granula sich tingierenden Körner — sind plasmatische Gebilde, die hinsichtlich ihres Lösungsvermögens mit dem lebenden Zellkörper übereinstimmen und sich von letzterem nur insofern unterscheiden, als ihre Lipide mehr Säure gelöst enthalten.

#### **A. Erklärung der bei Paramácien beobachteten vitalen Färbungserscheinungen auf Grund der modifizierten Lipoidtheorie.**

Die Analyse der an Paramácien zu beobachtenden vitalen Färbungserscheinungen hat zu dem Ergebnis geführt, dass der Gesamtheit der zu erklärenden Färbungsphänomene Rechnung getragen wird durch die Formulierung einer Reihe von Fragen. Die erste dieser Fragen

lautete: Worauf beruht es, dass gewisse Farbstoffe bei keiner Konzentration Zellkörper oder Granula färben, während andere Farbstoffe Zellkörper und Granula färben? Vom Standpunkt unserer Theorie lautet die Antwort folgendermaassen: Der Zellkörper und die Granulumsubstanz verhalten sich wie ein fettes Öl, das eine gewisse Menge Fettsäure bzw. fettlösliche Base enthält. Es müssen somit sämtliche Farbstoffe, die von einer derartigen Mischung, also unserer Ölsäure-Diamylaminmischung bis zu einem gewissen Grade aufgenommen werden, vital färben, andererseits darf kein Farbstoff den lebenden Zellkörper des Paramäciums färben, der von der Ölsäure-Diamylaminmischung gar nicht aufgenommen wird, oder dessen Aufnahme einen bestimmten Mindestbetrag nicht erreicht. Wie schon ausgeführt wurde, und wie ein Blick auf die Tabelle I zeigt, trifft dies Verhalten tatsächlich vollkommen zu.

Die zweite Frage lautete: Worauf beruht es, dass von den Vitalfarbstoffen die einen Zellkörper und Granula gleichmässig, das heisst die Granula nicht stärker färben als den Zellkörper, während die anderen die Granula intensiver färben als den Zellkörper? Unserer Theorie zufolge unterscheidet sich die Granulumsubstanz in Hinsicht auf ihr Lösungsvermögen nur darin vom Zellkörper, dass ihre Lipide mehr Fettsäure gelöst enthalten. Es werden somit nur solche Farbstoffe, deren Ausschüttelbarkeit durch eine Ölsäure-Ölmischung mit dem steigenden Gehalt der letzteren an Ölsäure zunimmt, die Granula stärker färben als den Zellkörper, während alle diejenigen Farbstoffe, deren Ausschüttelbarkeit vom Gehalt der Ölmischung an Ölsäure unabhängig ist, die Granula niemals stärker färben können als den Zellkörper. Wir konnten uns in den vorangehenden Abschnitten davon überzeugen, dass theoretische Forderung und Beobachtung vollkommen übereinstimmen.

Die dritte Frage lautete: Worauf beruht die Erscheinung, dass unter den Farbstoffen, welche die Granula stärker färben als den Zellkörper, einzelne schon die kleinen Granula normaler Tiere weitaus stärker färben als den Zellkörper, während bei anderen Farbkörpern dieser Kategorie das stärkere Färbevermögen sich erst den grossen gequollenen Granula vakuolisierter Tiere gegenüber geltendmacht? Antwort: Während der Umwandlung der kleinen Endoplasmakörnchen zu den grossen gequollenen Granula erfolgt mit der Zunahme der Quellung — vielleicht die letztere bedingend — eine Zunahme des Säuregehaltes der Granulumsubstanz. Je grösser ein Granulum ist, um so höher ist sein Säuregehalt, um so stärker wird es also alle diejenigen Farbstoffe speichern, deren Ausschüttelbarkeit durch eine Ölsäure-Ölmischung mit dem Gehalt der Mischung an Ölsäure steigt (Granulafarbstoffe, diffus färbende Stoffe vom Typus des Acridingelb.)

Andererseits ist es selbstverständlich, dass für die in Rede stehenden Farbstoffe die Differenz zwischen der Ausschüttelbarkeit durch die stärker saure Granulums substanz und der Ausschüttelbarkeit durch den weniger sauren Zellkörper von Farbstoff zu Farbstoff eine andere ist. Ist diese Differenz klein, dann kann es geschehen, dass der betreffende Farbstoff selbst die grössten Granula nicht merklich stärker färbt als den Zellkörper. Ist die gedachte Differenz sehr gross, so tritt das Verhalten ein, dass bei einer bestimmten Konzentration der Aussenlösung die Farbstoffspeicherung innerhalb der normalen Endoplasmakörnchen so gross werden kann, dass es zum gefärbten Hervortreten der Granula kommt, während der Zellkörper — eben wegen der grossen Differenz zwischen der Färbbarkeit des Zellkörpers und derjenigen der Granula — ungefärbt bleibt.

Bei ihrer Wirkung auf Paramäcien sind die letztgenannten Stoffe vor allen anderen Farbkörpern durch die Besonderheit ausgezeichnet, dass sie eine Färbung des Plasmabezirkes rings um die in Bildung begriffene Nahrungsvakuole in der Form eines die Vakuole umsäumenden Streifens bewirken. Von diesem Plasmabezirk gilt das nämliche wie von der Granulums substanz: er besitzt einen höheren Säuregehalt als der übrige Zellkörper. Es ist daher leicht zu verstehen, warum es nur die gedachten Farbstoffe sind, die das erwähnte Färbungsphänomen bewirken. Nur bei den gedachten Farbstoffen lässt sich die Konzentration der Aussenlösung so treffen, dass bloss der Bezirk um die sich bildende Nahrungsvakuole gefärbt erscheint, während das übrige Plasma ungefärbt bleibt. Bei allen anderen Vitalfarbstoffen müssen Konzentrationen, die den gedachten Plasmabezirk färben, das übrige Plasma entweder ebenso stark (Typus Sudan) oder nur um wenig schwächer (Typus Acridingelb) färben als die Region um die in Bildung begriffene Nahrungsvakuole. Dass in dem letzteren Falle die nur um ein geringes intensiver gefärbte sehr dünne Plasmaschicht um die Nahrungsvakuole in der Masse der übrigen ebenfalls gefärbten Plasmas verschwinden muss, liegt auf der Hand.

Die vierte Frage lautete: Worauf beruht die Farbstoffspeicherung in den Nahrungsballen? Antwort: Die Speicherung der Farbstoffe in den Nahrungsvakuolen beruht auf dem Säuregehalt der letzteren. Da sowohl bei den Nahrungsballen als bei den Granula die Ursache der Farbstoffspeicherung in dem Säuregehalt der betreffenden Gebilde zu suchen ist, so muss zwischen der Färbung der Nahrungsballen und der Granulafärbung ein gewisser Parallelismus bestehen. Wie oben dargelegt wurde, ist eine solche Analogie tatsächlich vorhanden. Andererseits besteht zwischen beiden Gebilden folgender wichtiger Unterschied: Bei den Nahrungsballen handelt es sich um die wässrige Lösung einer starken Säure, bei den Granula hingegen um eine in einem lipoiden

Lösungsmittel gelöste Fettsäure. Es ist daher zu erwarten, dass in allen jenen Fällen, in denen sich die wässrige Lösung einer stärkeren Säure und etwa Ölsäure Farbstoffen gegenüber verschieden verhalten, dieser Unterschied auch bei der Vitalfärbung der Paramäciumzelle zum Ausdruck kommen wird. Dies ist nun tatsächlich der Fall: Aus einer verdünnten wässrigen Lösung von Indophenol (hergestellt durch Verdünnung einer konzentrierten alkoholischen Lösung mit viel Wasser) wird der Farbstoff durch Ölsäure mit dunkelblauer Farbe ausgeschüttelt. Andererseits wird eine wässrige Indophenollösung durch Spuren einer starken Säure entfärbt. Bei der Einwirkung einer stark verdünnten Indophenollösung auf Paramäcien bleiben die Nahrungsballen ungefärbt, während sich die Granula dunkelblau färben. Ein zweites Beispiel: Eine wässrige Lösung von Dimethylamidoazobenzol (hergestellt durch Verdünnung eines Tropfens der konzentrierten alkoholischen Lösung mit viel Wasser) wird durch Spuren einer starken Säure fuchsinrot gefärbt. Durch Ölsäure wird eine wässrige Lösung von Dimethylamidoazobenzol mit gelber Farbe ausgeschüttelt, da lediglich die gelbe Base von der Ölsäure aufgenommen wird. Dem Reagensglasversuch entspricht das Tierexperiment. Normale Paramäcien werden von einer wässrigen Dimethylamidoazobenzollösung diffus gelb gefärbt; handelt es sich um Tiere mit gequollenen Granula, so erscheinen letztere in dem nämlichen gelben Ton gefärbt. In grösstem Kontrast hierzu erscheint die Färbung der Nahrungsballen, die während des Stadiums der sauren Reaktion eine intensiv fuchsinrote Färbung zeigen.

In solcher Weise ermöglicht es unsere Theorie, für die Beurteilung der mannigfaltigen und anscheinend zusammenhanglosen Erscheinungen der Vitalfärbung bei Paramäcien einen einheitlichen Gesichtspunkt zu gewinnen, von welchem aus die betreffenden Phänomene auf relativ einfache chemisch-physikalische Vorgänge reduziert, das heisst wirklich erklärt werden können.

## **B. Wie verhalten sich die an anderweitigen tierischen Objekten gewonnenen Erfahrungen über Vitalfärbungen zu den Forderungen der modifizierten Lipoidtheorie?**

Die diffuse Färbung der Paramäciumzelle ist meines Erachtens ebenso das Prototyp einer diffusen Plasmafärbung, wie die vitale Färbung der Paramäciumgranula ein typisches und überdies sehr instruktives Beispiel jenes bei allen tierischen Zellen hervorzuhehenden Phänomens darstellt, das im vorstehenden als „vitale Färbungsreaktion der Granula“ bezeichnet wurde. Diese Behauptungen legen nun allerdings die Pflicht auf, die bei der Vitalfärbung tierischer Objekte gesammelten Erfahrungen darauf zu prüfen, ob sie mit den Forderungen unserer Theorie übereinstimmen.

Da die diffuse Plasmafärbung vorher niemals Gegenstand systematischer Untersuchung war, müssen wir uns darauf beschränken, zu konstatieren, dass, soweit Angaben über diffuse Färbung vorliegen, sie sich durchweg auf Farbstoffe beziehen, mit denen auch wir diffuse Färbung erzielt haben. Über eine diffuse Plasmafärbung mit einem lipoidunlöslichen Farbstoff ist noch nie berichtet worden.

Weitaus geeigneter für die Erprobung der allgemeinen Verwendbarkeit unserer Theorie sind die Erfahrungen, die über die vitale Färbungsreaktion der Granula vorliegen. Was die Frage nach der Natur der sich vital färbenden Gebilde betrifft, so geben die an Paramäcien beobachteten Erscheinungen der Auffassung Arnold's recht, der zufolge die vital färbbaren Granula aus kleinsten Körnchen hervorgehen, die mit zunehmender Farbstoffspeicherung an Grösse gewinnen und mit analogen Körnern häufig zu tropfenartigen Gebilden konfluieren.

Auf viele Einzelheiten der Beobachtungen über vitale Granulafärbung, die erst im Lichte unserer Theorie verständlich erscheinen, versagen wir uns hier einzugehen, nur auf eine Reihe von Erscheinungen, die bei den interessanten Untersuchungen Fischel's — die grosse Zahl der geprüften Farbstoffe sowie die minutiöse, auf alle Einzelheiten des Färbungsbildes Bedacht nehmende Art der Untersuchung verleiht den Ergebnissen dieser Arbeit einen besonderen Wert — zutage trat, sei hier hingewiesen. Unter den angewandten Farbstoffen liess sich ein gewisser Gegensatz zwischen dem Methylenblau und allen übrigen Farbstoffen (Neutralrot, Nilblausulfat, Bismarckbraun, Toluidinblau) feststellen, so zwar, dass gewisse Zellen resp. ihre Granula von sämtlichen Farbstoffen, die Granula anderer Zellen hingegen nur von den Farbstoffen mit Ausschluss des Methylenblau gefärbt werden. Ferner zeigte es sich, dass die Zellen, die von Methylenblau gefärbt werden, auch von den übrigen Farbstoffen leichter gefärbt werden als die anderen Elemente. Dies Verhalten macht ganz den Eindruck, als ob sowohl die Granula nach ihrer Färbbarkeit als auch die Farbstoffe nach ihrem Färbevermögen abgestuft wären. Unsere Versuche haben uns gezeigt, dass eine derartige Abstufung tatsächlich besteht, und worauf sie beruht: bei den Granula auf dem verschiedenen Säuregehalt, bei den Farbstoffen auf der verschiedenen Ausschüttelbarkeit durch unsere Ölsäuremischung. Die Granula verschiedener Zellen verhalten sich in bezug auf ihre Färbbarkeit so wie die verschieden stark gequollenen Granula ein und derselben Paramäciumzelle.

Dass granuläre Gebilde von morphologisch wohl definiertem Charakter, wie gewisse Drüsengranula, Pigmentkörner usw., sich bei der Vitalfärbung genau so verhalten wie die eben abgehandelten Granula, bereitet der Erklärung keine Schwierigkeit. Wenn so heterogene Gebilde wie Nahrungsballen und die bei der vitalen Färbungsreaktion

sich tingierenden Granula bloss wegen des gemeinsamen Momentes des Säuregehaltes sich analog verhalten, dann ist es selbstverständlich, dass ein gleiches auch für die verschiedensten anderen granulären Gebilde gelten muss, sofern letztere nur den entsprechenden Säuregehalt besitzen. Gerade die Tatsache, dass die in Betracht kommenden Gebilde, wie Drüsengranula, Pigmentkörner usw., untereinander die denkbar grösste Verschiedenheit aufweisen, passt sehr gut in den Rahmen unserer Theorie, die lediglich in dem Säuregehalt der betreffenden Gebilde das für die vitale Granulafärbung bestimmende Moment sieht.

### C. Bestehen die der Overton'schen Lipoidtheorie der Vitalfärbung gemachten Einwände auch der modifizierten Lipoidtheorie gegenüber zu Recht?

Unter den Einwänden gegen die Lipoidtheorie nimmt die zunächst zu besprechende Aufnehmbarkeit lipoidunlöslicher Säurefarben seitens gewisser Zellen die wichtigste Stelle ein, ja, sie ist, wie die weiteren Ausführungen zeigen werden, meines Erachtens der einzige Einwand, der der Lipoidtheorie der Vitalfärbung mit dem Anschein einer gewissen Berechtigung entgegeng gehalten werden kann.

Eine Frage, die sich jedem aufdrängen muss, ist die folgende: Woher kommt es, dass die Aufnehmbarkeit lipoidunlöslicher Säurefarbstoffe seitens bestimmter Zellen, die schon vor den Untersuchungen Overton's bekannt war, weder den genannten Forscher noch die Autoren, die ihm gefolgt sind, wie Höber, verhindert hat, die Idee von dem Zusammenhang zwischen Lipoidlöslichkeit und vitalem Färbvermögen zu fassen und weiter zu entwickeln? Offenbar deshalb nicht, weil es für alle diejenigen Forscher, die sich ihr Urteil über Stoffwanderungen im Organismus hauptsächlich auf Grund der Untersuchung tierischer Objekte gebildet hatten, von jeher selbstverständlich war, dass die Vitalfärbung im eigentlichen Sinne und die Speicherung lipoidunlöslicher Säurefarbstoffe in bestimmten Zellen verschieden zu beurteilende Vorgänge darstellen.

Nach der Auffassung der genannten Autoren handelt es sich im ersten Falle lediglich um das Resultat osmotischer Vorgänge, die sich ohne aktive Beteiligung des Plasmas abspielen, im zweiten Falle hingegen um komplizierte dzt. nicht analysierbare Prozesse, die auf eine vorläufig nicht erklärbare Tätigkeit des Plasmas zurückgeführt werden müssen. Nur für die erste Art des Stofftransportes gilt der Zusammenhang von Lipoidlöslichkeit und Aufnehmbarkeit in die lebende Zelle, der den Inhalt der Overton'schen Lipoidtheorie ausmacht. Die beiden eben besprochenen Arten der Stoffaufnahme seitens der lebenden Zelle werden von Höber in überaus treffender Weise folgendermaassen

charakterisiert: Für lipoidlösliche Verbindungen ist die lebende Zelle, und zwar jede Zelle, jederzeit offen: dem Medium, das die Zellen umspült, zugesetzt, dringen lipoidlösliche Verbindungen in die lebende Zelle jederzeit ein, ohne dass sich die letztere ihrer erwehren könnte. Für die lipoidunlöslichen Verbindungen ist die lebende Zelle zuzeiten geschlossen. Die Eröffnung erfolgt nur unter bestimmten Verhältnissen und beruht auf einem bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse nicht analysierbaren Transportvermögen der lebenden Zelle. Dieses verschiedene Verhalten der lebenden Zelle bei den beiden Arten der Stoffaufnahme bezeichnet Höber in sehr zutreffender Weise als physikalische und physiologische Permeabilität.

Gerade die Farbstoffe bieten Beispiele für jede der angeführten Arten von Permeabilität. Es gibt Farbstoffe — die lipoidlöslichen —, die in jede lebende Zelle eindringen. Mit Neutralrot, Nilblausulfat, Bismarckbraun usw. ist jede lebende tierische Zelle zu färben. Die betreffenden Stoffe färben also allgemein vital. Mit lipoidunlöslichen Säurefarben ist aber nur in ganz bestimmten tierischen Zellen unter bestimmten Verhältnissen Färbung zu bewirken.

Küster und Ruhland sind allerdings anderer Meinung. Auf Grund ihrer Erfahrungen über die Aufnahme lipoidunlöslicher Säurefarben in den Zellsaft von Pflanzenzellen glauben sie den Unterschied in der Art der Aufnahme lipoidlöslicher und lipoidunlöslicher Farbstoffe sowie überhaupt die Annahme von zweierlei Arten der Stoffaufnahme, also die Unterscheidung einer physikalischen und physiologischen Permeabilität im Sinne Höber's bestreiten zu müssen. Nach Ruhland beherrscht dieselbe Gesetzmässigkeit die Aufnahme lipoidlöslicher und lipoidunlöslicher Farbstoffe; der Unterschied läge lediglich in der Art der Speicherung, die bei den basischen Farbstoffen auf einer Salzbildung, bei den Säurefarben auf einer Dispersionsverminderung beruhen soll.

Den Ausführungen Küster's und Ruhland's ist aber folgendes entgegenzuhalten: Wenn die Autoren die Sache so darstellen, als ob die Annahme der beiden Arten von Stofftransport lediglich der Lipoidtheorie zuliebe konstruiert worden wäre, so beruht dies auf einer nicht genügenden Berücksichtigung zahlreicher Erfahrungen auf tierphysiologischem Gebiet; denn dass zwischen der Aufnahme des Zuckers, der im osmotischen Experiment in den Muskel nicht eindringt und unter anderen Bedingungen vom Muskel doch wieder aufgenommen wird, und der Aufnahme eines indifferenten Narkotikums, das zu jeder Zeit und unter allen Verhältnissen eindringt, ein grundsätzlicher Unterschied besteht, ist keine irgendeiner Theorie zuliebe erfundene Konstruktion, sondern eine Tatsache, von der jede theoretische Erwägung auszugehen hat. Unseres Erachtens bedeutet die Unterscheidung der

beiden Arten der Stoffaufnahme im Sinne Overton's und Höber's keine Irreführung, wie Küster und Ruhland meinen, sondern einen Fortschritt, da sie die grundsätzliche Verschiedenheit scheinbar gleichartiger Phänomene hervorhebt und erst dadurch deren Erforschung ermöglicht.

Was nun die spezielle Frage betrifft, ob durch die Versuche Küster's und Ruhland's tatsächlich der Nachweis erbracht wurde, dass zwischen der Aufnahme lipoidlöslicher und lipoidunlöslicher Farbstoffe kein Unterschied besteht, so ist zunächst daran zu erinnern, dass selbst bei pflanzlichen Objekten die Sache noch immer so steht, dass lipoidlösliche Farbstoffe allgemein färben, während Säurefarben viele Elemente, wie Algen und Wurzelzellen von Wasserpflanzen nicht färben. Noch viel auffallender ist der Unterschied, wie oben ausgeführt wurde, bei Tieren, bei denen Säurefarben nur von bestimmten Zellen gespeichert werden, während die lipoidlöslichen Farbstoffe jede Art von Zellen färben.

Nimmt man noch hinzu, dass die zahlreichen Versuche über die Wirkung der Narkotika, ferner die bei einer so grossen Zahl von Verbindungen angestellten plasmolytischen und sonstigen osmotischen Experimente ein so grundsätzlich verschiedenes Verhalten der lebenden Zelle lipoidlöslichen und lipoidunlöslichen Verbindungen gegenüber ergeben haben, so kommt man zum Schlusse, dass der Ausfall der Versuche Küster's und Ruhland's über die Aufnahme von Säurefarben durch Pflanzenzellen die genannten Autoren noch keineswegs berechnigen durfte, über die Lipoidtheorie der Vitalfärbung den Stab zu brechen.

Was beweisen diese Versuche? Nur so viel, dass lipoidunlösliche Farbstoffe in den Zellsaft von Pflanzenzellen hineingelangen können. Auf welche Weise sie hineingelangen, darüber sagen die Versuche nichts aus. Die Lipoidtheorie behauptet aber im Gegensatz zu Küster und Ruhland, dass der Weg, auf dem lipoidunlösliche Farbstoffe in die lebende Zelle hineingelangen, von demjenigen lipoidlöslicher Stoffe verschieden ist. Diese Frage ist auf Grund der Küster'schen Versuche nicht zu entscheiden.

Hingegen lehrten uns die Versuche über die Färbung des lebenden Zellkörpers von Paramäcien Tatsachen kennen, denen eine gewisse Bedeutung für die Beurteilung des fraglichen Problems nicht abzuspüren ist. Die weitaus meisten unter den Farbstoffen, die in den Versuchen Küster's und Ruhland's von den Zellen aufgenommen wurden, gehören zu den Farbstoffen, die den Zellkörper der Paramäcien ungefärbt lassen. Säurefuchsin, Lichtgrün FS, Orange G, Patentblau V, Azorubin, Biebrich'scher Scharlach, Guineagrün B usw., durchwegs Stoffe, die sich bei den Versuchen Küster's und Ruhland's als

vital aufnehmbar erwiesen haben, können zur Flüssigkeit, in der sich Paramäcien befinden, bis zur Sättigung hinzugefügt werden — die Tiere bleiben selbst nach tagelangem Aufenthalt in der Lösung völlig ungefärbt. Der Einwand, dass die Farbstoffe vielleicht doch eindringen und nur mangels einer Speicherung unsichtbar bleiben, entfällt hier, da wir ja bei unseren Versuchen die Farbstoffaufnahme nicht nach dem sekundären Vorgang der Speicherung, sondern nach der Konzentration in der lebenden Substanz selbst beurteilen. Wenn der Zellkörper in einer maximal konzentrierten Farbstofflösung ungefärbt bleibt, so ist eben seine Konzentration im Plasma = 0 oder fast 0. Damit ist die Frage, ob lipoidlösliche und lipoidunlösliche Stoffe in der gleichen oder in verschiedener Weise von der lebenden Zelle aufgenommen werden, auch schon entschieden. Lipoidlösliche Farbstoffe müssen sich jederzeit ihrem Teilungskoeffizienten zwischen wässriger Lösung und Plasmalipoiden entsprechend im Plasma ansammeln. Der Zellkörper kann sich ihrer gewissermaßen nicht erwehren. Sie sind die eigentlichen Vitalfarbstoffe. Lipoidunlösliche Farbstoffe können, wie gerade ausgeführt wurde, niemals in gleicher Weise ins lebende Protoplasma eindringen. Wenn sie aber trotzdem, wie in den zahlreichen angeführten Beispielen, innerhalb von Zellen in granulären Bildungen, im Zellsaft usw. angetroffen werden, so können sie nur auf einem Wege hingelangt sein, der von der Verbreitungsart lipoidlöslicher Stoffe im Plasma grundverschieden ist. Dieser andere, vorläufig noch unaufgeklärte Weg ist eben das, was Höber als physiologische Permeabilität bezeichnet.

Wir wenden uns nun zur Besprechung der übrigen Einwände gegen die Lipoidtheorie der Vitalfärbung. Wie schon mitgeteilt, war es Ruhland, der den grössten Teil des Beweismaterials gegen die Lipoidtheorie der Vitalfärbung gesammelt und in einer Reihe von Abhandlungen nachdrücklichst verwertet hat. Die Ruhland'schen Befunde wurden insgesamt von Höber nachgeprüft und teils bestätigt, teils aber bestritten. In seiner letzten Veröffentlichung zu diesem Gegenstand hat Ruhland (75) alle seine Einwände in übersichtlicher Weise tabellarisch zusammengestellt, wobei er seine ursprünglichen Angaben trotz des Widerspruches von Höber fast durchwegs aufrecht erhält. Ruhland teilt seine der Lipoidtheorie widersprechenden Befunde in zwei Gruppen: Die erste umfasst basische Farbstoffe, von denen die einen trotz Lipoidunlöslichkeit vital färben, während die anderen trotz leichter Lipoidlöslichkeit in die lebende Zelle nicht eindringen. Die zweite Gruppe enthält saure Farbstoffe, die, obwohl leicht lipoidlöslich, in lebende Zellen nicht aufgenommen werden. Die drei ersten Spalten einer jeden der folgenden Tabellen sind der Ruhland'schen Arbeit entnommen. In der Ruhland'schen Tabelle bedeuten die Zeichen

+++ sehr leicht, ++ etwas weniger, + wenig lipoidlöslich; unter Permeabilität bedeuten die Zeichen 0 nicht, + schwer und langsam, ++ schneller, +++ sehr rasch (fast augenblicklich) permeierend. Die Befunde, die auch nach Höber der Lipoidtheorie widersprechen, sind in den folgenden Tabellen mit einem \* hinter der Bezeichnung des betreffenden Farbstoffes versehen. Das Fehlen dieses Zeichens bedeutet also, dass die betreffende Angabe von Höber bestritten wird. Die beiden letzten Spalten einer jeden Tabelle enthalten die Resultate, die die Prüfung der betreffenden Farbstoffe nach den in dieser Arbeit entwickelten Grundsätzen ergab. Die Lipoidlöslichkeit der Farbstoffe wurde nach ihrer Ausschüttelbarkeit durch unsere Ölsäure-Diamylaminmischung bestimmt, während die Frage des vitalen Färbemögens ausschliesslich darnach beurteilt wurde, ob der betreffende Farbstoff den lebenden Zellkörper diffus färbt oder nicht.

Tabelle V.

Zahl	Farbstoff	nach Ruhland		nach dem Verfasser	
		Lipoidlöslichkeit	Permeabilität	Teil.-Koeff. Öls. Diam. Wasser	Vitales Färbemögen
1	Methylgrün Kristalle I *	unlöslich	+++	84	+
2	Methylengrün *	"	+++	30	+
3	Thionin *	"	+++	mxm	+
4	Neublau R.	"	++	mxm	+
5	Azophosphin GO.	"	+++	7,2	+
6	Malachitgrün	"	+++	mxm	+
7	Bismarckbraun	"	+++	mxm	+
8	Viktoriablau 4 R.	+++	0	mxm	+
9	Viktoriablau B	+++	0	mxm	+
10	Nachtblau	+++	0	mxm	+
11	Baslerblau BB.	+++	0	mxm	+
12	Baslerblau R	++(+)	0	mxm	+
13	Rhodamin G.	+++	+	mxm	+
14	Diazingrün	+++	+	mxm	+
15	Viktoriablau R	+++	+	mxm	+

Tabelle VI.

Zahl	Farbstoff	nach Ruhland		nach dem Verfasser	
		Lipoidlöslichkeit	Permeabilität	Teil.-Koeff. Öls. Diam. Wasser	Vitales Färbemögen
1	Erythrosin B	+++	0(+)	>1	+
2	Cyanosin	+++	0	>1	+
3	Rose bengale	++	0(+)	>1	+
4	Echtrot A *	+++	0	84	+
5	Tuchrot 3 GA.	+++	0	54	+
6	Oxaminmarron	++	0	?	?
7	Gallein	++	0	0	0
8	Gallaminblau	++	0	0	0

Basische Farbstoffe. Die Farbstoffe 1—7 (Tabelle V) sollen der Lipoidtheorie insofern widersprechen, als sie trotz vitalen Färbvermögens nicht lipoidlöslich sind. Beschränkt man sich jedoch nicht, wie es bisher immer geschehen ist, auf die Feststellung der absoluten Löslichkeit in Cholesterin-Terpentin, sondern ermittelt die für die Beurteilung des vitalen Färbungsvorganges allein maassgebende relative Lipoidlöslichkeit in der Weise, wie wir es bei unseren Versuchen getan haben, so zeigt es sich, dass die Dinge ganz anders liegen. Für sämtliche sieben Farbstoffe lässt sich feststellen, dass beim Ausschütteln ihrer wässrigen Lösung mit unserer Ölsäure-Diamylaminmischung der Teilungskoeffizient sehr stark zugunsten der Ölmischung ausfällt. Thionin, Neublau R, Malachitgrün und Bismarckbraun werden von Ölsäure so stark gespeichert, dass die Lösung nach der Ausschüttelung im 8 mm weiten Reagensglase vollkommen farblos erscheint. Die Speicherung ist also nach unserer Bezeichnungsweise maximal. Bei den übrigen Farbstoffen ist die Speicherung durch Ölsäure geringer, aber selbst bei dem am schwächsten gespeicherten Stoff Azophosphin noch immer so stark, dass die Farbstoffkonzentration in der Ölsäure mehr als siebenmal so gross ist wie in der wässrigen Lösung. Ihrer weitgehenden Ausschüttelbarkeit durch Ölsäure entsprechend, färben Malachitgrün und Bismarckbraun den Zellkörper lebender Paramäcien schon in sehr stark verdünnter Lösung. Für Bismarckbraun wurde als vital färbende Grenzkonzentration 1 : 300 000, für Malachitgrün 1 : 600 000 gefunden. Die durch Ölsäure weniger speicherbaren Farbstoffe Methylengrün und Methylgrün färben erst bei stärkeren Konzentrationen, das erstere in einer Lösung von 1 : 60 000, das letztere in einer solchen von 1 : 14 000. Für Thionin, Neublau R und Azophosphin liess sich die vital färbende Grenzkonzentration nicht genau ermitteln, da die genannten Stoffe, offenbar infolge anhaftender Beimengung, stark giftig wirken. Immerhin liess sich mit Sicherheit feststellen, dass die in Rede stehenden Stoffe den lebenden Zellkörper färben. Das Verhalten der genannten sieben Farbstoffe entspricht also vollkommen den Forderungen der Lipoidtheorie.

Die folgenden acht Farbstoffe sollen nach Ruhland der Lipoidtheorie deshalb widersprechen, weil sie trotz guter Lipoidlöslichkeit teils (die ersten fünf) gar nicht, teils (die letzten drei) schwer in lebende Zellen eindringen. Diese Angaben wurden schon von Höber bestritten. Auch unsere Versuche ergaben, dass sämtliche der genannten Stoffe den lebenden Zellkörper färben. Die Farbstoffe Baslerblau wirken stark toxisch und töten bei längerer Einwirkung die Paramäcien schon in Dosen, die noch keine Vitalfärbung bewirken. Untersucht man jedoch die Tiere sehr bald nach Hinzufügung der entsprechend konzentrierten Farbstofflösung, so lässt sich ohne Schwierigkeit konstatieren, dass

eine Färbung des lebenden Zellkörpers eintritt. Die Farbstoffe Viktoria-blau B, 4 R und Nachtblau zeichnen sich durch hohe Färbekraft aus, da sie alle schon in stark verdünnter Lösung (über 1 : 100 000) diffuse Plasmafärbung bewirken. Ihre Färbekraft entspricht also vollkommen der starken Ausschüttelbarkeit durch Ölsäure. Rhodamin G gehört in die Gruppe der Granulafärber, das heisst bei entsprechender Konzentration der Lösung färbt es nur Granula ohne gleichzeitige Zellkörperfärbung; bei Zunahme der Konzentration bewirkt es neben der Granulafärbung eine diffuse Färbung des Zellkörpers. Diazingrün gehört zu den Stoffen, die neben einer Granulafärbung stets eine diffuse Zellkörperfärbung hervorrufen. Viktoria-blau R, das von Ruhland als schwer permeierend bezeichnet wird, gehört zu den stärkst färbenden unter den basischen Farbstoffen. Es färbt den lebenden Zellkörper noch bei einer Verdünnung von 1 : 800 000. Seine Ausschüttelbarkeit durch ölsäurehaltiges Öl ist eine entsprechende: Es wird schon durch eine Mischung, die auf acht Teile Öl einen Teil Ölsäure enthält, maximal gespeichert.

Wir sehen also, dass die von Ruhland behauptete Inkongruenz von Lipoidlöslichkeit und vitalem Färbevermögen auch hinsichtlich der zuletzt angeführten acht basischen Farbstoffe nicht besteht. Das gerade Gegenteil trifft zu. Zwischen der relativen Lipoidlöslichkeit der genannten Stoffe und ihrem vitalen Färbevermögen besteht völliger Parallelismus. Damit wären die auf basische Farbstoffe bezüglichen Einwände Ruhland's widerlegt.

Saure Farbstoffe. Als weiteres Argument gegen die Lipoidtheorie führt Ruhland die auf Tabelle VI zusammengestellten sauren Farbstoffe an, die trotz guter Lipoidlöslichkeit nicht vital färben sollen. Ordnet man die betreffenden Farbstoffe nach ihrer relativen Lipoidlöslichkeit, das heisst nach ihrer Ausschüttelbarkeit durch unsere Ölmischung, die 1 Teil Diamylamin auf 24 Teile enthält, und zwar in abfallender Reihenfolge, so erhält man folgende Serie: Echtrot A, Tuchrot 3 GA, Erythrosin, Cyanosin, Rose bengale, Gallcin, Gallaninblau<sup>1)</sup>. Wie erinnerlich, haben uns unsere Versuche ergeben, dass das Mindestmaass an Ausschüttelbarkeit, das bei unserer Versuchsanordnung ein durch Diamylamin aufnehmbarer Farbstoff besitzen muss, um noch vital zu färben, einer Verteilung entspricht, bei der wässrige und Ölphase ungefähr gleich gefärbt sind. Wendet man diese Regel auf unsere Reihe an, dann ergibt sich, dass die Farbstoffe Echtrot A, Tuchrot 3 GA, Erythrosin, Cyanosin, Rose bengale vital färben müssen, da sie nach der Ausschüttelung in der Diamylaminmischung in stärkerer

---

1) Oxaminmarron konnte ich mir nicht verschaffen. Nach Höber ist der Farbstoff ganz lipoidunlöslich.

Konzentration vorhanden sind als in der wässrigen Lösung, während die Farbstoffe Gallein und Gallaminblau den lebenden Zellkörper nicht zu färben hätten, da nach der Ausschüttelung der gedachten Farbstoffe die Diamylaminmischung sich vollkommen ungefärbt absetzt, der

Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Ölmischung}}{\text{Wasser}}$  für die genannten Verbindungen

also = 0 ist. Die genannten Farbstoffe zeigen in der Tat das geforderte Verhalten: Echtrot A, Tuchrot 3 GA, Erythrosin, Cyanosin, Rose bengale färben den lebenden Zellkörper von Paramäcien; Gallein und Gallaminblau lassen ihn ungefärbt.

Die Behauptung Ruhland's, das Verhalten der angeführten Säurefarbstoffe spreche gegen die Lipoidtheorie, ist also ganz und gar unzutreffend. Auch hier gilt das genaue Gegenteil: Zwischen relativer Lipoidlöslichkeit und vitalem Färbevermögen besteht die von der Theorie geforderte Übereinstimmung. Damit wäre auch die zweite Gruppe der Ruhland'schen Einwände erledigt.

Wir wenden uns nun zu den von Garmus (32) gegen die Lipoidtheorie vorgebrachten Argumente. Von basischen Farbstoffen, die trotz Lipoidunlöslichkeit färben sollen, nennt Garmus Thionin, Methylgrün und Methylenazur. Die Lipoidlöslichkeit der beiden ersteren wurde schon besprochen. Auch hinsichtlich des Methylenazur lässt sich feststellen, dass es durch Ölsäure maximal gespeichert wird. Das vital färbende Brillantkresylblau soll nach Garmus nur ganz schwach lipoidlöslich sein und Toluidinblau nur in so geringem Maasse, dass es praktisch als lipoidunlöslich bezeichnet werden müsste. Beides ist so unzutreffend wie nur möglich. Beide Farbstoffe werden von Ölsäure maximal gespeichert. Tuchrot 3 GA soll trotz guter Lipoidlöslichkeit nicht vital färben. Es wurde oben dargelegt, dass der Farbstoff selbst in ziemlich verdünnter Lösung den lebenden Zellkörper färbt.

Wie man sieht, sind die aus der Untersuchung tierischer Objekte hergeleiteten Argumente gegen die Lipoidtheorie genau so haltlos wie das bei der Untersuchung pflanzlicher Objekte gesammelte Beweismaterial.

Von sämtlichen gegen die Lipoidtheorie der Vitalfärbung angeführten Argumenten bleibt somit nicht ein einziges übrig. Bedenkt man, dass dieses Beweismaterial im Laufe von Jahren zusammengetragen wurde, so gelangt man zu dem Schlusse, dass kaum etwas mehr zugunsten der Lipoidtheorie der Vitalfärbung sprechen könnte als dies Versagen sämtlicher gegen die Lipoidtheorie erhobener Einwände.

Fragt man, woher es kommt, dass die angeführten Befunde so lange als Argumente gegen die Lipoidtheorie gelten konnten, so ist die Antwort folgende: Bei der Prüfung des Zusammenhanges zwischen

Lipoidlöslichkeit und vitalem Färbevermögen verfielen die Untersucher in einen zweifachen Fehler. Der eine betraf die Art der Bestimmung der Lipoidlöslichkeit. Ganz abgesehen davon, dass Cholesterin nicht der in Betracht kommende Körper sein konnte, war es unrichtig, die absolute Lipoidlöslichkeit zu bestimmen. Da die Lipoidtheorie die Voraussetzung macht, dass bei der vitalen Färbung eine Verteilung des Farbstoffes zwischen dem wässrigen Medium und den Zelllipoiden statthat, so konnte nur die relative Lipoidlöslichkeit, das heisst das Teilungsverhältnis zwischen Wasser und Lipoiden, in Frage kommen. Man muss Höber die Gerechtigkeit widerfahren lassen, dass er auf diesen schwachen Punkt der Methodik hingewiesen hat.

Der zweite, womöglich noch verhängnisvollere Fehler war der, dass die Aufnahme der Farbstoffe ins Plasma nicht direkt durch Feststellung der Färbung des lebenden Plasmas ermittelt, sondern aus dem sekundären Vorgang der Speicherung erschlossen wurde. Bei tierischen Zellen war es die Speicherung in den Granula, bei pflanzlichen die Speicherung im Zellsaft, nach der man das Eindringen oder Nicht-eindringen eines Farbstoffes beurteilte. Nun haben wir schon bei der Besprechung der Granulafärbung gezeigt, dass von den lipoidlöslichen Farbstoffen, die den lebenden Zellkörper färben, nur diejenigen von den Granula gespeichert werden, für die die Löslichkeit mit der Zunahme des Säuregehaltes der Ölmischung wächst. Dies sind in erster Linie die basischen Farbstoffe. Saure oder indifferente oder sogar einzelne sehr schwach basische Farbstoffe (Dimethylamidoazobenzol) werden von den Granula naturgemäss nicht gespeichert. Vom Zellsaft der Pflanzenzellen dürfte ähnliches gelten. Wenn es sich nun um Zellen handelt, die ungeeignet sind, eine eventuelle Plasmafärbung erkennen zu lassen, sei es, dass die Plasmaschicht zu dünn oder die Färbung zu schwach ist — dann wird die Aufnahme eines derartigen Farbstoffes, der von den Granula bzw. dem Zellsaft nicht gespeichert wird, der Wahrnehmung entgehen müssen. Dies war nun in der Tat oft der Fall, und daher kommt es, dass auf der Liste der gegen die Lipoidtheorie geführten Beweise eine Reihe gut lipoidlöslicher, angeblich nicht vital färbender saurer Farbkörper figuriert. Andererseits gewöhnte man sich, da die diffuse Plasmafärbung niemals Gegenstand systematischer Untersuchungen war, daran, die vitale Färbbarkeit fast immer nur nach dem Auftreten gefärbter Granula oder nach der Zellsaftfärbung zu beurteilen, das heisst man identifizierte die Begriffe Vitalfärbung und Granulafärbung bzw. Zellsaftfärbung. Da es in erster Linie immer nur basische Farbstoffe sind, die von den Granula gespeichert werden, so musste die Meinung entstehen, dass der Satz „basische Farben sind vitale Farben, saure nicht“, den Tatsachen besser entsprechen soll als die Overton'sche Formel. Wir

sahen, dass dies nicht richtig ist. Es gibt eine ganze Anzahl vitalfärbender Säurefarbstoffe, die ihre Aufnahme in den lebenden Zellkörper den in den Plasmalipoiden gelösten organischen Basen zu danken haben. Das die vitale Färbbarkeit, d. i. die Färbbarkeit des lebenden Zellkörperplasmas, allein und ausschliesslich bestimmende Moment ist eben die Lipoidlöslichkeit in unserem Sinne, das heisst die Ausschüttelbarkeit durch eine Ölmischung, die einen bestimmten Betrag Fettsäure und fettlöslicher Base enthält.

**D. Lassen sich die bei Paramäcien zu beobachtenden vitalen Färbungserscheinungen mit den Forderungen der chemischen Theorie, bzw. der Adsorptionstheorie in Einklang bringen — mit anderen Worten: vermag eine der genannten Theorien bei der Erklärung der gedachten vitalen Färbungsphänomene mit der modifizierten Lipoidtheorie in Wettbewerb zu treten?**

Die vorstehenden Ausführungen haben den Beweis erbracht, dass die modifizierte Lipoidtheorie nicht bloss zu einem vollen Verständnis der mannigfaltigen, an der lebenden Infusorienzelle zu beobachtenden vitalen Färbungserscheinungen führt, sondern auch bei Heranziehung des gesamten, die Vitalfärbung tierischer Zellen betreffenden Tatsachenmaterials einer Prüfung auf ihre Eignung zur Erklärung der vitalen Färbungsphänomene standhält. Diese Tatsache kann uns jedoch nicht der Pflicht entheben, die eingangs angeführten anderen Erklärungsversuche der Vitalfärbung an der Hand unserer Ergebnisse einer Prüfung zu unterziehen.

Beruhet die Färbung des lebenden Zellkörpers bzw. des Granulums auf einer chemischen Verbindung des Farbstoffes mit dem Zellsafteiweiß bzw., nach der Ansicht M. Heidenhain's, auf der Bildung eiweissaurer Farbsalze? Der Reagensversuch lehrt, dass nur dann, wenn die zur Albuminlösung zugefügte Farbstoffmenge sehr gering ist, die erstere unverändert bleibt; weiterer Zusatz von Farbstofflösung bewirkt Fällung. Vergegenwärtigt man sich jedoch das Verhalten der betreffenden Farbstoffe bei der Vitalfärbung, so gelangt man zu dem Schluss, dass es sich keineswegs mit der Wirkung auf eine Albuminlösung deckt, denn trotzdem die basischen Farbstoffe im lebenden Zellkörper bis zu einer beträchtlichen, im Granulum sogar bis zu einer maximalen Konzentration gespeichert werden, bleiben die betreffenden Gebilde gleichmässig gefärbt, ohne ihre homogene, durchsichtige Beschaffenheit zu verlieren. Von einer Fällung der Farbstoffe kann keine Rede sein. Einen noch stärkeren Widerspruch zur Theorie Heidenhain's bildet das Verhalten der schwachen Farbbasen. Nach Heidenhain sind nur die Salze der stärkeren Farbbasen befähigt,

mit Eiweisskörpern in der früher beschriebenen Weise zu reagieren, keineswegs aber die schwachen Farbbasen. Als typisches Beispiel einer solchen führt Heidenhain das Dimethylamidoazobenzol an, das sich mit Eiweisskörpern in keiner Weise vereinigt. In schroffem Widerspruch zu diesem nach der Heidenhain'schen Theorie zu erwartenden Verhalten stehen die tatsächlich an der lebenden Zelle zu beobachtenden Erscheinungen: Das Dimethylamidoazobenzol wird nämlich, wie wir sahen, von der lebenden Zelle maximal gespeichert. Zwischen sauren Farbstoffen und Eiweiss findet nach den Beobachtungen Heidenhain's eine chemische Umsetzung erst dann statt, wenn die Farbsäure durch Säurezusatz in Freiheit gesetzt wurde. Nun sahen wir aber, dass gewisse saure Farbstoffe — die lipoidlöslichen — den lebenden Zellkörper dennoch färben. Woher es kommt, dass diese Säurefarben, und zwar auch aus alkalischer Lösung vom lebenden Zellkörper gespeichert werden, darauf vermag die Theorie Heidenhain's keine Antwort zu geben.

Beruhet die Vitalfärbung des lebenden Zellkörpers bzw. des Granulum auf einer Adsorption des Farbstoffes? Die Adsorptionstheorie der Vitalfärbung stützt sich auf zwei Momente, erstens auf die Tatsache, dass die Aufnahme von Farbstoffen durch die verschiedensten Substrate, speziell durch solche tierischer oder pflanzlicher Herkunft, allgemein als Adsorptionsvorgang betrachtet wird, zweitens auf den Umstand, dass die Aufnahme gewisser, den Farbstoffen nahestehender Verbindungen in die lebende Zelle in einer Weise erfolgt, die für Adsorptionsvorgänge als charakteristisch gilt.

Ad 1. Die Adsorption der Farbstoffe ist in weitgehendem Maasse von der Natur des Adsorbens abhängig. Je nachdem es sich um ein chemisch indifferentes oder differentes Adsorbens handelt und in dem letzteren Falle je nach dem chemischen Charakter des adsorbierenden Substrates verläuft die Farbstoffaufnahme qualitativ und quantitativ verschieden. Unter diesen Umständen kann die Frage, ob es sich bei der Farbstoffspeicherung in der lebenden Zelle um einen Adsorptionsvorgang handelt, nur in dem Sinne gestellt werden, dass man zu entscheiden sucht, mit welchem der angeführten Adsorbentien das lebende Plasma in eine Parallele zu stellen wäre. Mit der Adsorption durch indifferente Substrate ist die Farbstoffaufnahme seitens der lebenden Zelle nicht zu vergleichen, da erstere sowohl basische als saure Farben betrifft, während vom lebenden Plasma, wie wir sahen, die sauren Farbstoffe, mit Ausnahme der lipoidlöslichen, nicht aufgenommen werden. Der gleiche Unterschied besteht gegenüber der Adsorption durch Substrate von basischem Charakter. Am ehesten erinnert die Farbstoffaufnahme der lebenden Substanz an diejenige saurer Substrate, da in beiden Fällen sämtliche basische Farbstoffe aufgenommen werden,

doch besteht hier wieder die Differenz, dass Substrate von ausgesprochen saurem Charakter, wie Kieselsäure usw., nur die basischen Farbstoffe adsorbieren, während das lebende Plasma daneben auch noch die lipoidlöslichen Säurefarbstoffe aufnimmt. Die Eiweisskörper schliessen sich in ihrem Verhalten insofern an die indifferenten Substrate an, als sie ihrem amphoterem Charakter gemäss, sowohl basische als saure Farbstoffe adsorbieren.

Wie man sieht, ist die Auswahl der von der lebenden Zelle gespeicherten Farbstoffe eine derartige, dass sich die Farbstoffaufnahme durch das lebende Plasma keiner der genannten Adsorptionen anreihen lässt.

Dass zwischen der Aufnehmbarkeit in die lebende Zelle und der Adsorbierbarkeit konstante Beziehungen nicht bestehen, zeigt deutlich das Verhalten der sauren Farbstoffe. So gehört der saure Farbstoff Echtrot A zu den vom lebenden Plasma am stärksten gespeicherten sauren Vitalfarbstoffen, da er schon aus relativ verdünnter Lösung den lebenden Zellkörper färbt. Seine Adsorbierbarkeit ist aber gering. So fand Ruhland (73) bei seinen Versuchen über Kapillardiffusion von Farbstoffen in Fliesspapier, bei denen er einen Tropfen der betreffenden Lösung auf Fliesspapier sich ausbreiten liess und das Verhältnis des Durchmessers des gefärbten Kreises zu dem des Wassers als Maass der Adsorbierbarkeit notierte, dass dieser Kapillarquotient für Echtrot A 0,86 beträgt. Andererseits lassen zahlreiche Säurefarbstoffe, deren Adsorbierbarkeit eine viel grössere ist, zum Beispiel Chicagoblau R mit einem Kapillarquotienten von 0,41, Chicagoblau B mit einem Kapillarquotienten von 0,44, Heliotrop B mit 0,57, Kongoechtblau B mit 0,46, Azoblau mit 0,64, Benzoazurin mit 0,63 und andere das lebende Plasma völlig ungefärbt.

Wie man sieht, stösst der Versuch, die Farbstoffspeicherung im lebenden Plasma auf Adsorptionsvorgänge zurückzuführen, von vornherein auf unüberwindliche Hindernisse, gar nicht zu reden davon, dass eine derartige, auf alle Einzelheiten des vitalen Färbungsvorganges sich erstreckende Analyse der Färbungsphänomene, wie sie unsere modifizierte Lipoidtheorie ermöglicht, mittels der Annahme von Adsorptionsvorgängen, wenigstens bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse von der Adsorption, in keiner Weise durchführbar ist.

Ad 2. Als Beweis, dass bei der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle Oberflächenkräfte in Betracht kommen, wird vielfach die Erscheinung angeführt, dass die Aufnahme von Alkaloiden in die lebende Zelle, die nicht anders zu beurteilen wäre als diejenige basischer Farbstoffe, der Adsorptionsisotherme folgt. Nun wurde von S. Löwe (51)

die für die Beurteilung der Frage bedeutsame Tatsache festgestellt, dass zahlreiche Stoffe, die in die lebende Zelle aufnehmbar sind, darunter Nikotin und das uns hier besonders interessierende Methylenblau, sich zwischen wässriger Phase und Lipoidphase (in Chloroform gelöstes Kephalin oder Cerebrosid bzw. „Restlipide“ = Gehirnlipide ohne die beiden vorgenannten Lipide) nicht dem Henry'schen Adsorptionsgesetz gemäss verteilen, sondern von der Lipoidphase der Adsorptionsgleichung gemäss aufgenommen werden. Daraus ergibt sich nun zunächst, dass die der Adsorptionsisotherme folgende Aufnahme von Alkaloiden in die lebende Zelle nicht nur keinen Beweis gegen die Lipoidtheorie als solche bilden kann, sondern im Gegenteil gerade für die Beteiligung von Lipiden bei der vitalen Stoffaufnahme spricht. Mit der Overton'schen Auffassung des Verteilungsvorganges stehen die Loewe'schen Ergebnisse bloss insofern im Widerspruch, als den letzteren zufolge die Zelllipide nicht als Lösungsmittel der vital aufnehmbaren Stoffe, sondern als Adsorbens zu betrachten wären.

Vom Standpunkt unserer Lipoidtheorie entsteht nun die Frage: Widerspricht der Nachweis einer der Adsorptionsgleichung folgenden Aufnahme von Alkaloiden in die lebende Zelle dem Grundgedanken unserer Lipoidtheorie, der die Aufnahme von Farbstoffen seitens der lebenden Zelle in völlige Analogie setzt zur Aufnahme durch unsere Ölsäure-Diamylaminmischung, mit anderen Worten: Gilt das durch die Adsorptionsgleichung definierte Gleichgewicht auch für die Aufnahme basischer Farbstoffe durch Ölsäure?

Zur Entscheidung dieser Frage wurde Methylenblau in 6 Konzentrationen gegen reine Ölsäure (Acid. olein. purissimum Merck) geschüttelt und die  $\frac{x}{m}$  (=  $C_1$ ),  $C_2$ -Kurve bestimmt. Anschliessend an die früher mitgeteilten Ausschüttelungsversuche sowie an die Färbungsversuche mit lebenden Paramäcien, wurde eine Methylenblaulösung verwendet, die den Farbstoff in einer Mischung von zwei Teilen Leitungswasser und einem Teil destillierten Wassers enthielt. Auch das Mengenverhältnis von wässriger Lösung und Ölsäure war das gleiche, wie bei den früheren Versuchen (6:1). An Stelle des für genauere Bestimmungen wenig geeigneten Sahli'schen Kolorimeters wurde der Kolorimeter von Dubosc zur Ermittlung der Farbstoffkonzentration in der wässrigen Lösung verwendet. Die mittels des genannten Apparates ermittelten Werte können bis auf 3,5% genau gelten<sup>1)</sup>.

Nachstehend das Ergebnis:

1) Die Titrationmethode von Pelet und Garuti konnte nicht in Betracht kommen, da sie sich nach Loewe für Konzentrationen, die erheblich geringer sind als 0,2%, als unzulänglich erwies.

Tabelle VII.

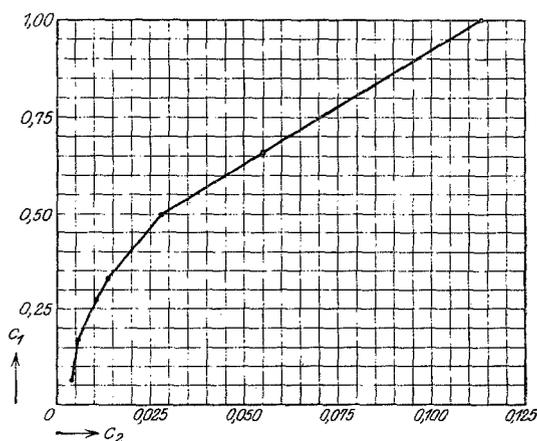
Je 12 ccm Methylenblau, gelöst in 2 Teilen Leitungswasser und 1 Teil destilliertem Wasser, in 6 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,034 und 0,283 g Farbstoff im Liter geschüttelt gegen je 2 ccm Ölsäure.

Zahl	a	c <sub>1</sub>	c <sub>2</sub>	$\frac{1}{n}$	K für $1/n = 0,61$
				berechnet aus:	
1	0,034	0,170	0,0057	} 0,76 } 0,69 } 0,58 } 0,41 } 0,60	3,99
2	0,056	0,276	0,0106		4,42
3	0,068	0,329	0,0137		4,50
4	0,113	0,493	0,0274		4,43
5	0,170	0,658	0,0548		3,11
6	0,283	1,020	0,1133		3,85

a = ursprüngliche Konzentration des Methylenblau in der wässrigen Phase (Gramm im Liter);

c<sub>1</sub> = Konzentration des Methylenblau in der Ölsäure (Gramm im Liter) nach Eintritt des Gleichgewichtes.

c<sub>2</sub> = Konzentration des Methylenblau in der wässrigen Phase (Gramm im Liter) nach Eintritt des Gleichgewichtes.



Die graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit lässt erkennen, dass gleichen Zuwächsen von c<sub>2</sub> immer kleinere Zuwächse von c<sub>1</sub> entsprechen, dass also der

Quotient  $\frac{c_1}{c_2}$  immer kleiner wird.

Prüft man nun, inwiefern die dargestellte c<sub>1</sub>c<sub>2</sub>-Kurve der durch die Adsorptionsgleichung c<sub>1</sub>

= KC<sub>2</sub><sup>1/n</sup> definierten Isotherme entspricht, so findet man folgendes:

Setzt man die zusammenhängenden Werte c<sub>1</sub> und c<sub>2</sub> der beiden ersten Versuche (Nr. 1 und 2) in die Adsorptionsgleichung ein und löst die Gleichung nach  $\frac{1}{n}$  auf, so erhält man für

$\frac{1}{n}$  den Wert 0,76. In analoger Weise erhält man aus Nr. 2 und 3 für

$\frac{1}{n}$  den Wert 0,69, aus Nr. 3 und 4 den Wert 0,58, aus Nr. 4 und 5 den

Wert 0,41, aus Nr. 5 und 6 den Wert 0,60. Die  $\frac{1}{n}$ -Werte liegen zwischen

0,41 und 0,76, stimmen also untereinander gut überein und liegen innerhalb der Grenzen, in denen sich der Exponentialfaktor der Adsorptionsgleichung zu bewegen pflegt. Setzt man den Mittelwert der

einzelnen gefundenen  $\frac{1}{n}$ -Werte = 0,61 in die Adsorptionsgleichung ein,

so erhält man für die untersuchten Konzentrationen die Werte für die Konstante K, die eine gute Übereinstimmung zeigen.

Die Aufnahme des Methylenblau durch Ölsäure folgt also der Adsorptionsgleichung. Dazu kommt, dass das Gleichgewicht, wie es für Adsorptionsvorgänge als charakteristisch gilt, sich rasch einstellt.

Ob aber der beschriebene Verlauf der  $C_1C_2$ -Kurve tatsächlich einen zwingenden Beweis dafür bietet, dass die Verteilung des Farbstoffes durch die Wirkung von Oberflächenkräften zustande kommt, ist eine andere Frage, die noch erst der Prüfung bedarf.

Dass an der Grenzfläche Wasser-Ölsäure Oberflächenkräfte in Wirksamkeit treten, ist ja zweifellos, fraglich ist bloss, wieweit das endgültige Verteilungsergebnis auf ihre Rechnung zu setzen ist. Zunächst ergibt sich die Frage, welche Grenzfläche als adsorbierende Oberfläche in Betracht kommt. Die Oberfläche der einzelnen bei der Ausschüttelung entstehenden relativ grossen Ölsäuretropfen kann in bezug auf das definitive Verteilungsverhältnis nicht wesentlich in Frage kommen, da mit dem Verschwinden dieser Oberfläche bei der sehr bald eintretenden Vereinigung der Tropfen die Adsorption zurückgehen müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall. Von einer Adsorption lediglich an der Oberfläche der einzelnen Ölsäuretropfen kann also keine Rede sein. Es bliebe also nur der Ausweg, die Ölsäure selbst als zweiphasisches System aufzufassen, das aus einem Dispersionsmittel und einer dispersen Phase besteht, eine Annahme, die, wenn es sich um chemisch reine Ölsäure oder die sich analog verhaltende Capronsäure oder sonst irgendeine mit Wasser nicht mischbare, chemisch reine Fettsäure handelt, sicherlich von vornherein auf die grössten Bedenken stossen muss.

Andererseits haben unsere Ausschüttelungsversuche eine Reihe von Tatsachen kennen gelehrt, die dafür sprechen, dass chemische Wirkungen zwischen Farbstoff und lipoider Phase die Hauptrolle bei der Verteilung spielen. Es sei daran erinnert, dass viele basische Farbstoffe die von Ölsäure gespeichert werden, von dem in rein physikalischer Hinsicht der Ölsäure nahestehenden flüssigen Neutralfett auch nicht in Spuren aufgenommen werden, ebenso wie zahlreiche saure Farbstoffe,

die von Diamylamin gespeichert werden, weder von flüssigem Neutralfett noch von Ölsäure aufgenommen werden.

Einer einfachen Anreicherung des Farbstoffes an der Grenzfläche einer dispersen Ölsäurephase kann also die Aufnahme des Methylenblau durch Ölsäure auf keinen Fall entsprechen; meines Erachtens handelt es sich bei der Ausschüttelung basischer Farbsalze durch Ölsäure um die Aufnahme der infolge hydrolytischer Spaltung in der Lösung vorhandenen freien Farbbase, die mit der Ölsäure das betreffende Oleat bildet, während infolge des gestörten Gleichgewichtes zwischen freier Farbbase und ungespaltenem Farbsalz ungespaltene Farbsalzmoleküle zerfallen und freie Farbbase nachliefern, die wieder von der Ölsäure aufgenommen wird usw. bis zum Eintritt eines Gleichgewichtes einerseits zwischen der von der Ölsäure aufgenommenen und der in der wässrigen Lösung verbliebenen freien Farbbase, andererseits zwischen der letzteren und den ungespaltenen Farbsalzmolekülen. Ferner ist von einer bestimmten Konzentration der Farbstofflösung an mit einem Gleichgewicht zwischen einfachen Farbsalzmolekülen und Molekülkomplexen zu rechnen, denn selbst in einer Lösung von Methylenblau, das nach Teague und Buxton (80) zu den am wenigsten kolloidalen Farbstoffen gehört, konnte Pelet-Jolivet (63) bei Beleuchtung mittels Sonnenlichtes das Vorhandensein von Submikronen nachweisen. Dem Massenwirkungsgesetz zufolge bestehen somit folgende Beziehungen: für den Grad der Hydrolyse in Säure und freie Farbbase die Beziehung  $\frac{(\text{Farbbase})^2}{\text{Farbsalz}} = K_1$  und für das Gleichgewicht zwischen einfachen Farbsalzmolekülen und Molekülkomplexen die Beziehung:  $\frac{(\text{Farbsalz})^n}{(\text{Farbsalz})_n} = K_2$ . Mit zunehmender Konzentration der wässrigen Farbstofflösung muss sich also das Verhältnis zwischen der durch Hydrolyse entstandenen freien Farbbase und den ungespaltenen Farbsalzmolekülen immer mehr zuungunsten der ersteren und das Verhältnis zwischen den Molekülkomplexen des Farbsalzes und den einfachen Farbsalzmolekülen immer mehr zuungunsten der letzteren verschieben. Demzufolge muss die Zunahme der Farbstoffkonzentration in der wässrigen Lösung die Wirkung haben, dass der Quotient  $\frac{C_1}{C_2}$  immer kleiner wird, das heisst dass die  $C_1C_2$ -Kurve sich immer mehr der Abszissenachse nähert.

Für das Verständnis des Verteilungsvorganges basischer Farbstoffe zwischen wässriger Phase und Ölsäure wäre noch die Kenntnis erforderlich, in welchem Molekularzustande sich das in der Ölsäure gelöste ölsäure Farbsalz befindet. Hierüber ist jedoch nichts bekannt.

Wenn die gegebene Darstellung sicher noch in manchen Punkten der experimentellen Stütze bedarf, so geht zumindest so viel hervor, dass die der Adsorptionsisotherme folgende Aufnahme von basischen Farbstoffen durch Ölsäure kein zureichender Grund ist, diese Aufnahme lediglich als das Resultat der Wirkung von Oberflächenkräften aufzufassen und die näherliegende Deutung, dass es sich um das Resultat der chemischen Reaktion zwischen Ölsäure und Farbbase handelt, abzulehnen.

Zum Schluss noch einige Bemerkungen über Ruhland's Ultrafiltertheorie. Nach Ruhland ist es ausschliesslich die Dispersität, beurteilt nach dem Grade der Diffusion in Gelen, die über die Aufnehmbarkeit der basischen sowohl wie der sauren Farbstoffe entscheidet. Da uns unsere Versuche in die Lage versetzt haben, die einzelnen Farbstoffe nach ihrem vitalen Färbvermögen zu ordnen, ergab sich die Möglichkeit, die Beziehung zwischen der vitalen Färbekraft und der Geldiffusion zu untersuchen. Der Vergleich der Werte für die vitale Färbekraft der betreffenden Farbstoffe mit den von Ruhland für die Diffusion in 20%igem Gelatinegel angegebenen Zahlen zeigt, dass von einer Zuordnung der beiden Grössen nicht die Rede sein kann. Nachfolgend einige Beispiele:

Nach Ruhland (73) gehört das Methylenblau zu den best diffusiblen Farbstoffen. Der Tropfen der Farbstofflösung, der unmittelbar nach dem Aufsetzen 2,5 mm misst, hat sich nach 2 Stunden innerhalb des Gels so stark ausgebreitet, dass der Durchmesser des gefärbten Bezirkes nunmehr 9 mm beträgt. Erheblich geringer ist die Diffusibilität des Nilblausulfats. Hier beträgt der Durchmesser des gefärbten Bezirkes unter gleichen Verhältnissen nach 2 Stunden 6,5 mm. Wie verhält sich nun bei den beiden, wegen des übereinstimmenden Farbtones zum Vergleich sehr geeigneten Farbstoffen die vitale Färbekraft? Ein Blick auf Tabelle II lehrt, dass das Färbvermögen des langsamer im Gel diffundierenden Nilblausulfat 16mal so stark ist als das des rascher diffundierenden Methylenblau.

Noch krasser ist der Widerspruch zur Ultrafiltertheorie in folgendem Falle: Viktoriablau R gehört nach Ruhland unter den vital färbenden basischen Farbstoffen zu den im Gel am schwersten beweglichen. Der Durchmesser des Diffusionsbezirkes beträgt nach 2 Stunden bloss 4 mm. In schroffem Widerspruch hierzu steht das starke vitale Färbvermögen. Wie schon erwähnt, färbt Viktoriablau R den lebenden Zellkörper noch in Verdünnungen von 1 : 800000. Es gehört also zu den bestfärbenden basischen Stoffen.

In völligem Widerspruch zur Ultrafiltertheorie steht auch das Verhalten der Farbstoffe Viktoriablau 4 R und B sowie der Farbstoffe Baslerblau und Nachtblau. Die genannten Stoffe zeigen keine Gel-

diffusion, färben aber alle den lebenden Zellkörper, und zwar schon aus stark verdünnten Lösungen.

Als Verbindungen, die der Ultrafiltertheorie ebenfalls nicht folgen, sind ferner die an der Spitze der Tabelle I angeführten indifferenten Farbstoffe vom Typus des Sudan zu nennen. Die betreffenden Verbindungen sind in Wasser unlöslich. Durch Verdünnen der konzentrierten alkoholischen Lösung mit viel Wasser erhält man kolloidale Solutionen, was aber nicht hindert, dass die betreffenden Verbindungen unter sämtlichen Farbstoffen weitaus am stärksten gespeichert werden: Sudan III zum Beispiel noch aus einer Lösung von 1 : 12000000!

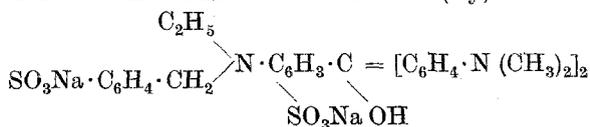
Unter den Säurefarbstoffen gehören Patentblau V, Orange G, Rotviolett 4 R S, Rosindulin 2 G zu den im Gel diffusibelsten. Für den zuletzt genannten Farbstoff beträgt der Durchmesser des gefärbten Gelatinebezirktes nach 2 Stunden 6,5 mm, für die übrigen 6 mm. Von den genannten Farbstoffen färbt aber kein einziger den lebenden Zellkörper der Paramäcien. Andererseits zeigt Tuchrot 3 G A gar keine Geldiffusion, denn es bleibt auf den ursprünglichen Tropfenumriss beschränkt; nichtsdestoweniger gehört es, wie schon erwähnt, zu den bestfärbenden unter den Säurefarbstoffen, da es den lebenden Zellkörper schon aus ziemlich stark verdünnten Lösungen (1 : 18000) färbt.

Wie man sieht, besteht zwischen dem Verhalten der Farbstoffe bei der Geldiffusion und ihrem vitalen Färbevermögen — wenigstens soweit es sich dem lebenden Plasma des Infusorienzellkörpers gegenüber äussert — auch nicht die allermindeste Beziehung.

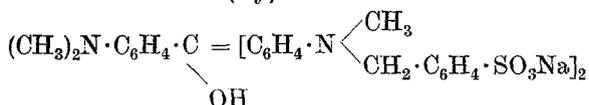
## V. Über die Beziehung von chemischer Konstitution und vitalem Färbevermögen.

Da die Aufnehmbarkeit durch unsere Ölsäure-Diamylaminmischung als dasjenige Moment anerkannt wurde, das ausschliesslich darüber entscheidet, ob ein Farbstoff vital zu färben vermag oder nicht, kann die Beziehung zwischen der chemischen Konstitution eines Farbstoffes und seiner Fähigkeit, vital zu färben, nur eine mittelbare sein, das heisst Änderungen der Konstitution eines Farbstoffes können nur insofern das vitale Färbevermögen beeinflussen, als hierdurch die Aufnehmbarkeit durch unser Modell eine Änderung erfährt.

Dass basische Farbstoffe durch Einführung des Schwefelsäurerestes in ihr Molekül ihr vitales Färbevermögen verlieren, wurde von P. Ehrlich (23) schon im Jahre 1887 mitgeteilt und trifft im grossen und ganzen zu. Im einzelnen bedarf der Satz mancher Einschränkung. Die beiden Farbstoffe Echtsäureviolett 10 B (By):



und Säureviolett 4 B extra (By):



sind Beispiele von Triphenylmethanfarbstoffen, die trotz Eintrittes von zwei Sulfogruppen in das Farbstoffmolekül weder ihr vitales Färbvermögen noch die Aufnehmbarkeit durch Ölsäure völlig eingebüßt haben. Allerdings hat der Eintritt der beiden Schwefelsäurereste sowohl die Färbkraft als die Ausschüttelbarkeit durch Ölsäure ganz enorm herabgedrückt. (Vital färbende Grenzkonzentration für Echtsäureviolett 10 B I : 400, für Säureviolett 4 B extra 1 : 1000; Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Ölsäure}}{\text{Wasser}}$  in beiden Fällen < 1).

Andererseits gibt es eine Anzahl von Farbstoffen, und zwar Mono- und Disulfosäuren von Azofarbstoffen, bei denen die Anwesenheit des Schwefelsäurerestes wohl zur Folge hat, dass eine nachweisliche Aufnehmbarkeit durch Neutralfett oder Ölsäure nicht mehr besteht, hingegen bewirkt wird, dass die gedachten Farbstoffe — eben wegen ihrer Sulfogruppe — vom Diamylamin unserer Mischung aufgenommen werden und dementsprechend auch vital färben. Nachfolgend einige Beispiele:

Aus dem Farbstoff Sudan I:  $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{N} = \text{N}\cdot\text{C}_{10}\text{H}_6\cdot\text{OH}$ , der von flüssigem Neutralfett „maximal“ gespeichert wird und ein hohes vitales Färbvermögen besitzt, entsteht durch Substitution eines Naphthalin H durch die Sulfogruppe der Körper  $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{N} = \text{N}\cdot\text{C}_{10}\text{H}_5\overset{\text{OH}}{\text{SO}_3\text{H}}$ . Das Natriumsalz dieser Verbindung stellt den Farbkörper Brillantorange G (M) dar. Der Farbstoff wird weder von flüssigem Neutralfett noch von Ölsäure aufgenommen, wohl aber von unserer Diamylaminmischung.

Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öl.}}{\text{Wasser}} = 8$ ; vital färbende Grenzkonzentration 1 : 7500. Bei Substitution eines zweiten H durch die  $\text{HSO}_3$ -Gruppe entsteht die Verbindung  $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{N} = \text{N}\cdot\text{C}_{10}\text{H}_4\overset{\text{OH}}{(\text{SO}_3\text{H})_2}$ . Ihr Natriumsalz ist der Farbstoff Brillant Ponceau GG (C). Der Eintritt der zweiten Sulfogruppe drückt die Aufnehmbarkeit durch die Diamylaminmischung und das vitale Färbvermögen herunter: Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Öl.}}{\text{Wasser}}$

etwas grösser als 1; vital färbende Grenzkonzentration 1 : 2500.

Ganz die gleichen Beziehungen zeigen die homologen Xylidin-derivate: Sudan II  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3\cdot\text{N} = \text{N}\cdot\text{C}_{10}\text{H}_6\text{OH}$  wird von flüssigem Neutralfett „maximal“ gespeichert; vital färbende Grenzkonzentration

1 : 1000000. Das Natriumsalz der Monosulfosäure  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_5 \frac{\text{OH}}{\text{SO}_3\text{Na}}$ , ist der Farbstoff Brillantorange R (M). Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Ölm.}}{\text{Wasser}} = 12$ ; vital färbende Grenzkonzentration 1 : 15000.

Das Natriumsalz der Disulfosäure  $(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_4 \frac{\text{OH}}{(\text{SO}_3\text{Na})_2}$  ist der Farbstoff Ponceau G (BK). Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Ölm.}}{\text{Wasser}} > 1$ ; vital färbende Grenzkonzentration 1 : 3000.

Der Farbstoff Brillantcrocein M (C), der letzte in der Reihe der vital färbenden Säurefarbstoffe (Tabelle I), hat die Konstitution  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_4 \frac{\text{OH}}{(\text{SO}_3\text{Na})_2}$ . Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Ölm.}}{\text{Wasser}} = 1$ ; sein vitales Färbevermögen ist sehr gering: er färbt nur in gesättigter Lösung; das Natriumsalz der entsprechenden Trisulfosäure  $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_3 \frac{\text{OH}}{(\text{SO}_3\text{Na})_3}$  ist der Farbstoff Erythrin X (B). Teilungskoeffizient  $\frac{\text{Diam. Ölm.}}{\text{Wasser}} = 0$ ; vitales Färbe-

vermögen = 0. Der Eintritt der dritten Sulfogruppe hat also die Aufnehmbarkeit seitens unserer Diamylaminmischung und damit das vitale Färbevermögen völlig aufgehoben.

Dass bei anderen Azofarbstoffen schon der Eintritt einer zweiten Sulfogruppe den zuletzt erwähnten Effekt hat, beweist folgender Fall: Der Farbstoff Tuchscharlach G (K) hat die Konstitution  $\text{SO}_3\text{Na} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_6\text{OH}$ . Seine Speicherung durch unsere Diamylaminmischung ist „maximal“; seine vital färbende Grenzkonzentration ist 1 : 40000. Der Eintritt einer zweiten Sulfogruppe —  $\text{SO}_3\text{Na} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} = \text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_5 \frac{\text{OH}}{\text{SO}_3\text{Na}}$  — liefert je nach dem Orte der Substitution die Farbkörper Echtscharlach B (K), Croccin-scharlach 3 B (K) und Biebrich'scher Scharlach. Alle drei Farbkörper werden von unserer Diamylaminmischung auch nicht in Spuren aufgenommen und färben bei keiner Konzentration vital.

Die angeführten Beispiele zeigen, dass die Konstitutionsformel eines Farbstoffes keinen Aufschluss darüber gibt, ob ein Farbkörper vital zu färben vermag oder nicht. Von einem Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und vitalem Färbevermögen kann nur in dem Sinne gesprochen werden, dass letzten Endes die chemische Konstitution

eines Farbkörpers es ist, von der seine Aufnehmbarkeit durch unsere Ölsäure-Diamylaminmischung abhängt.

### Zusammenfassung.

Die lebende Substanz des Zellkörpers von *Paramäcium caud.* verhält sich Farbstoffen gegenüber, als ob sie ein flüssiges Neutralfett wäre, das einen gewissen Betrag Fettsäure und fettlöslicher organischer Base enthält. Vitales Färbvermögen, d. i. das Vermögen, den lebenden Zellkörper zu färben und Aufnehmbarkeit durch ein derartiges, Fettsäure und organische Base enthaltendes flüssiges Neutralfett (in den Modellversuchen eine Ölsäure-Diamylamin-Ölmischung) sind Begriffe, die sich völlig decken: Alle Farbstoffe, die von einer derartigen Mischung bis zu einem gewissen Betrag aufgenommen werden, färben vital, und jeder Farbstoff, der vital färbt, wird von der Mischung aufgenommen. Der Parallelismus beschränkt sich nicht bloss auf die Auswahl der Farbstoffe, sondern betrifft auch die quantitativen Verhältnisse: In je höherem Maasse ein Farbstoff von der Mischung aufgenommen wird, um so stärker ist seine vitale Färbekraft.

Die in der genannten Weise definierte Aufnahmefähigkeit des lebenden Zellkörpers für Farbstoffe ist bedingt durch die an seinem Aufbau beteiligten Lipide, die infolge der in ihnen gelösten organischen Säuren und Basen, vielleicht auch zum Teil infolge der im Molekül gewisser Lipide enthaltenen sauren bzw. basischen Gruppen das oben definierte „Lösungsvermögen“ besitzen. Die Verteilung der Lipide im Plasma des lebenden Zellkörpers ist eine gleichmässige.

Hinsichtlich der in jeder tierischen Zelle bei der Einwirkung bestimmter Farbstoffe gefärbt hervortretenden Granula (im Gegensatz zu anderen Arten der vitalen Granulafärbung als „vitale Färbungsreaktion der Granula“ bezeichnet) war folgendes festzustellen: Die Granula sind plasmatische Gebilde. Die Speicherung bestimmter Farbstoffe in den Granula beruht darauf, dass die Granulums substanz, in ihrem Lösungsvermögen Farbstoffen gegenüber mit dem Zellkörper sonst übereinstimmend, sich von dem letzteren in dem Punkt unterscheidet, dass die an ihrem Aufbau beteiligten Lipide mehr Fettsäure gelöst enthalten, als dies beim Zellkörper der Fall ist. Diese Annahme findet unter anderem eine Stütze in der weitgehenden Übereinstimmung, die zwischen der Färbung der Granula und der Aufspeicherung von Farbstoffen in den Nahrungsvakuolen besteht. Für die letztere wird der Nachweis erbracht, dass es die während einer bestimmten Verdauungsperiode auftretende saure Reaktion des Vakuoleninhaltes ist, die die Speicherung der Farbstoffe in der Vakuole bedingt.

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Hofrat Prof. Dr. B. Hatschek, in dessen Institut vorstehende Untersuchungen ausgeführt wurden, für die weitgehende Förderung meiner Arbeiten an dieser Stelle von ganzem Herzen zu danken.

### Nachtrag während des Druckes.

Während der Drucklegung obenstehender Abhandlung war Prof. W. v. Moellendorff so freundlich, mich auf seine im Jahre 1918 veröffentlichte Arbeit (Die Bedeutung von sauren Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in den Zellen. Arch. mikr. Anat., Bd. 90 Abt. I) aufmerksam zu machen, die sich mit den gleichen Fragen befasst, und zu meinen in obenstehender Abhandlung niedergelegten Anschauungen mehrfach Stellung nimmt, insoweit diese Anschauungen in der Wiedergabe meines Vortrages (Verh. Ges. D. Naturforscher u. A. 85 Vers. Wien 1913) bereits ihren Ausdruck gefunden haben.

Hinsichtlich der durch basische Farbstoffe bedingten vitalen Diffusfärbung kommt auch v. Moellendorff zu dem Schlusse, dass Färbevermögen und Lipoid- bzw. Lezithinlöslichkeit der Farbstoffe zugeordnete Grössen sind. In diesem Punkte kommen sich also unsere Auffassungen sehr nahe.

In Hinsicht auf die durch basische Farbstoffe bedingte vitale Granulafärbung besteht zwischen unseren Anschauungen in folgendem Punkte Übereinstimmung: Wir sind beide der Überzeugung, dass der Säuregehalt des Granulum es ist, der die Besonderheiten des mit basischen Farbstoffen zu erzielenden Färbungsbildes bedingt. Zu dieser Auffassung sind wir auf ähnlichen Wegen gelangt. Ausgehend von der Tatsache, dass die von Nierenzellen granulär gespeicherten sauren Farbstoffe, also saure Farbstoffgranula sich basischen Farbstoffen gegenüber ganz analog verhalten, wie die durch basische Farbstoffe vital darstellbaren Granula, kommt v. Moellendorff zu dem Schlusse, dass es sich auch bei diesen um granulär abgelagerte saure Substanzen (vermutlich Eiweiss) handelt. Mir hinwiederum hat die weitgehende Analogie zwischen vitaler Granulafärbung und vitaler Nahrungsballenfärbung den Weg gewiesen, der zur Lösung des Problems der vitalen Granulafärbung geführt hat; liess sich doch für die Nahrungsballen der Nachweis erbringen, dass der Säuregehalt der Nahrungsvakuole es ist, der die vitale Speicherung der basischen Farbstoffe bedingt.

v. Moellendorff vermutet nun, dass die Säure, der die Granula ihr charakteristisches Verhalten bei der Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen verdanken, innerhalb des Granulum in wässriger Lösung vorhanden ist. Solange sich meine Untersuchungen lediglich auf Paramaecien mit kleinen, vom Zellkörper dicht umschlossenen Granula beschränkten, war auch ich geneigt, die Bedingungen, unter denen die vitale Nahrungsballenfärbung erfolgt, ohne weiteres auf die vitale Granulafärbung zu übertragen, d. h. auch für die Granula, ebenso wie es evidentere Weise für die Nahrungsvakuolen gilt, eine wässrige Säurelösung anzunehmen. Als ich jedoch meine Untersuchungen auf Paramaecien mit gequollenen, in Vakuolen eingeschlossenen Granula ausdehnte, also auf Zellen, deren enorm grossen und überdies von stets ungefärbt bleibenden Flüssigkeitshöfen umgebenen Granula ihre Färbung auch dann erkennen liessen, wenn diese die Zellkörperfärbung an Intensität nicht übertraf, stiess ich auf Befunde, die mit der Vorstellung einer wässrigen Säurelösung innerhalb des Granulum nicht zu vereinigen waren. Als wichtigsten dieser Befunde hebe ich das Verhalten der Sudanfarbstoffe hervor. Diese schwach sauren, in Wasser unlöslichen,

hingegen in Fetten und Lipoiden leicht löslichen Farbkörper färben schon in enorm verdünnter Lösung die Granula genau in der gleichen Weise, wie den Zellkörper (Fig. 5, B). Die Färbung der Granula durch Sudanfarbstoffe beweist, dass an dem Aufbau der Granula Lipide genau so beteiligt sind wie an dem Aufbau des Zellkörpers. Stellt aber die Granulums substanz, nach ihrem Verhalten Farbstoffen gegenüber zu urteilen, gleich dem Zellkörper ein lipoides System dar, dann erscheint es nicht angängig, zwar die Speicherung basischer Farbstoffe durch den Zellkörper auf eine lipide Säure oder — was auf dasselbe hinauskommt — auf Lecithin zu beziehen, für die Granulums substanz hingegen eine in Wasser gelöste Säure anzunehmen. Das Verhalten der Granula den typischen Fettfarbstoffen gegenüber zwingt vielmehr zur Annahme, dass es sich auch bei den Granula um eine in einem lipoiden Lösungsmittel gelöste Säure handelt. Dass die Granula basische Farbstoffe stärker speichern als der Zellkörper, beruht demnach nicht auf der Anwesenheit einer wasserlöslichen Säure im Granulum, wie v. Moellendorff annimmt, sondern auf dem relativ höheren Gehalt des Granulum an lipoider Säure. Allerdings macht hier v. Moellendorff den Einwand, dass es basische Farbstoffe gibt, die den Zellkörper diffus färben, die Granula aber ungefärbt lassen, ein Befund, der tatsächlich gegen die Annahme einer lipoiden Säure im Granulum sprechen würde. Nun lässt sich aber bei den kleinen, vom Plasma dicht umschlossenen Granula gewöhnlicher Zellen eine Färbung begreiflicherweise nur dann erkennen, wenn sie erheblich intensiver ist als diejenige des Zellkörpers, anders, wie schon hervorgehoben, bei den grossen, in Flüssigkeitsvakuolen eingeschlossenen Granula. In der Tat, konnte ich mich an der Hand des genannten Objektes davon überzeugen, dass unter 43 basischen Farbstoffen (Tab. I) 41 Farbstoffe — darunter auch die in der Moellendorff'schen Tabelle als Granula nicht färbend bezeichneten Farbstoffe Saffranin G extra und Fuchsin Kl. Kr. — die Granula stärker färben als den Zellkörper, während nur bei zwei Farbstoffen — Janusrot und Chinolinrot — die Färbung der Granula nicht merklich stärker war, als diejenige des Zellkörpers. In keinem Falle aber — und dies ist das Wesentliche — stiess ich auf einen basischen Farbstoff, der nicht die Granula mindestens so stark gefärbt hätte wie den Zellkörper. In der Auswahl der basischen Farbstoffe besteht also zwischen den Granula und dem Zellkörper kein Unterschied. Es ist klar, dass dieses Verhalten für und nicht gegen die Annahme einer lipoiden Säure auch in der Granulums substanz spricht.

Für die Annahme, dass die Granula aus Lipoiden aufgebaute Gebilde und nicht „Tröpfchen einer wässrigen Lösung“ darstellen, spricht nicht nur das färberische Verhalten, sondern auch die sonst an den Granula zu beobachtenden Erscheinungen. Wie sich an den grossen, in Vakuolen eingeschlossenen Granula leicht feststellen lässt, bestehen die Granula gleich dem Infusorienendoplasma aus einer flüssigen, mit Wasser nicht mischbaren und im Verhältnis zu diesem stärker lichtbrechenden Substanz, die der Wirkung des umgebenden Wassers ausgesetzt in ähnlicher Weise zerstört wird, wie es bei der als „Zerfliessung“ bekannten Zerstörung des Infusorienplasmas der Fall ist.

Angesichts dieser Befunde muss ich bei der Auffassung bleiben, dass die Granula plasmatische Gebilde darstellen, an deren Aufbau Lipide beteiligt sind, und dass es die in diesen Lipoiden gelösten Säuren sind, die das charakteristische Verhalten der Granula bei der vitalen Färbung mit basischen Farbstoffen bedingen.

Sehe ich von der differenten Beurteilung ab, die die Frage nach der Natur der Granula und nach der Art der Granulumsäure bei v. Moellendorff und mir findet, so kann ich nur feststellen, dass meine Auffassung

vom Vorgange der Vitalfärbung in den Ergebnissen v. Moellendorff's eine neue starke Stütze gefunden hat, die mir um so wertvoller erscheint, als v. Moellendorff ohne Kenntnis meiner Versuche sowohl in der Frage der vitalen Diffusfärbung als in der Bewertung des Säuregehaltes der Granula für das Zustandekommen der vitalen Granulafärbung an ganz andersartigem Material und mittels anderer Methoden zu den gleichen Grundanschauungen gelangt ist.

### Literaturverzeichnis.

1. Arnold, J., Weitere Beobachtungen über vitale Granulafärbung. *Anat. Anz.* Bd. 16. 1899. 2. Derselbe, Über Granulafärbung lebender und überlebender Leukozyten. *Virch. Arch.* Bd. 157. 1899. 3. Derselbe, Über „vitale“ Granulafärbung in den Knorpelzellen, Muskelfasern und Ganglienzellen. *Arch. mikr. An.* Bd. 55. 1900. 4. Derselbe, Über Granulafärbung lebender und überlebender Gewebe. *Virch. Arch.* Bd. 159. 1900. 5. Derselbe, Zur Kenntnis der Granula der Leberzellen. *Anat. Anz.* Bd. 20. 1902. 6. Derselbe, Plasmosomen, Granula, Mitochondrien, Chondriomiten und Netzfiguren. *Anat. Anz.* Bd. 31. 1907. 7. Bang, J., Chemie und Biochemie der Lipoide. Wiesbaden 1911. 8. Bethe, A., Der subepitheliale Nervenplexus der Ctenophoren. *Biol. Centralbl.* Bd. 15. 1895. 9. Derselbe, Eine neue Methode der Methylenblaufixation. *Anat. Anz.* Bd. 12. 1896. 10. Derselbe, Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems. Leipzig 1903. 11. Derselbe, Gewebespermeabilität und H-Ionenkonzentrationen. *Wiener med. Wochenschr.* Nr. 14. 1916. 12. Bettendorf, H., Über Muskulatur und Sinneszellen der Trematoden. *Zool. Jahrb.* Bd. 10. Abt. f. *Anat.* 1897. 13. Blochmann, F., und Bettendorf, H., Über Muskulatur und Sinneszellen der Trematoden. *Biol. Centralbl.* Bd. 15. 1895. 14. Bokorny, Th., Einige vergleichende Versuche über das Verhalten von Pflanzen und niederen Tieren gegen basische Stoffe. *Pflüger's Arch.* Bd. 59. 1895. 15. Derselbe, Vergleichende Studien über die Giftwirkung verschiedener chemischer Substanzen bei Algen und Infusorien. *Pflüger's Arch.* Bd. 64. 1896. 16. Bouffard, G., Injection des couleurs de Benzidine aux animaux normaux. *Annal. de l'Inst. Pasteur.* t. 20. 17. Chszczonszewski, N., Zur Anatomie der Niere. *Virch. Arch.* Bd. 31. 1864. 18. Cuénot, L., Etudes physiologiques sur les Crustacés Decapodes. *Arch. de Biol.* t. 13. 1895. 19. Derselbe, Etudes physiologiques sur les Oligochètes. *Arch. de Biol.* t. 15. 1898. 20. Czapek, F., Versuche über Exosmose aus Pflanzenzellen. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.* Bd. 28. 1910. 21. Derselbe, Über die Oberflächenspannung und den Lipoidgehalt der Plasmahaut in lebenden Pflanzenzellen. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.* Bd. 28. 1910. 22. Dogiel, A. S., Die Struktur der Nervenzellen der Retina. *Arch. mikr. An.* Bd. 46. 1895. 23. Ehrlich, P., Zur therapeutischen Bedeutung der substituierenden Schwefelsäuregruppe. *Therap. Monatsh.* 1887. 24. Derselbe, Über die Beziehungen von chemischer Konstitution, Verteilung und pharmakologischer Wirkung. *Festschr. f. Leyden.* Berlin 1902. 25. Derselbe, Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.* Bd. 42. 1909. 26. Fischel, A., Über vitale Färbung von Echinodermeneiern während ihrer Entwicklung. *Anat. Hefte*, H. 37. 1899. 27. Derselbe, Untersuchungen über vitale Färbung. *Anat. Hefte.* Bd. 16. 1901. 28. Derselbe, Untersuchungen über vitale Färbung an Süßwassertieren, insbesondere bei Cladoceren. *Int. Rev. d. ges. Hydrobiol. u. Hydrogr.* Bd. 1. 1908. 29. Freundlich, H., *Kolloidzeitschr.* 1907. 30. Derselbe, Capillarchemie und Physiologie. 2. Aufl. Dresden u. Leipzig. 1914. 31. Galeotti, G., Ricerche sulla colorabilità delle cellule viventi. *Zeitschr. wiss. Mikr.*

- Bd. 11. 1894. 32. Garmus, A., Fortgesetzte Untersuchungen über die physiologische Permeabilität der Zellen. Zeitschr. f. Biol. Bd. 58. 1912. 33. Goldmann, E., Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Licht der vitalen Färbung. Beitr. z. klin. Chir. Bd. 64. 1909. 34. Heidenhain, M., Über chemische Umsetzungen zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben. Bonn 1902. 35. Derselbe, Plasma und Zelle. Jena 1907. 36. Heidenhain, R., Versuche über den Vorgang der Harnabsonderung. Pflüger's Arch. Bd. 9. 1874. 37. Hertwig, O., Experimentelle Studien am tierischen Ei vor, während und nach der Befruchtung. Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 24. 1890. 38. Herzfeld, E., Über die Natur der am lebenden Tiere erhaltenen Färbungen bei Verwendung basischer und saurer Farbstoffe. Anat. Hefte. Bd. 54. 1917. 39. Höber, R., Über Resorption im Darm. Pflüger's Arch. Bd. 86. 1901. 40. Derselbe, Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoffe. Biochem. Zeitschr. Bd. 20. 1909. 41. Derselbe, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig 1911. 42. Höber, R., und Nast, O., Weitere Beiträge zur Theorie der Vitalfärbung. Biochem. Zeitschr. Bd. 50. 1913. 43. Hofer, B., Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss des Kerns auf das Protoplasma. Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 24. 1890. 44. Jander, R., Die Epithelverhältnisse des Tricladenpharynx. Zool. Jahrb. Bd. 10. Abt. f. An. 1897. 45. Joseph, M., Die vitale Methylenblau-Nervenfärbungsmethode bei Heteropoden. Anat. Anz. Bd. 3. 1888. 46. Kiyono, K., Die vitale Karminspeicherung. Jena 1914. 47. Kolmer, W., Eine Beobachtung über vitale Färbung bei *Corethra plumicornis*. Biol. Centralbl. Bd. 24. 1904. 48. Kowalevsky, A., Ein Beitrag zur Kenntnis der Excretionsorgane. Biol. Centralbl. Bd. 9. 1889. 49. Küster, E., Zur Kenntnis der Bierhefe. Biol. Centralbl. Bd. 18. 1898. 50. Derselbe, Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 50. 1911. 51. Löwe, S., Zur physikalischen Chemie der Lipide. Biochem. Zeitschr. Bd. 42. 1912. 52. Maier, H. N., Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. Arch. f. Protokde. Bd. 2. 1903. 53. Meyer, H., Zur Theorie der Alkoholnarkose. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 42. 1899. 54. Derselbe, Zur Theorie der Alkoholnarkose. 3. Mitteilung. Der Einfluss wechselnder Temperatur auf Wirkungsstärke und Teilungskoeffizient der Narkotica. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 46. 1901. 55. Metschnikoff, E., Immunität bei Infektionskrankheiten. Übers. v. J. Meyer. Jena 1902. 56. Möllendorff, v. W., Die Dispersität der Farbstoffe, ihre Beziehungen zu Ausscheidung und Speicherung in der Niere. Anat. Hefte. Bd. 53. 1915. 57. Nirenstein, E., Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Protisten. Zeitschr. f. allg. Phys. Bd. 5. 1905. 58. Derselbe, Über Fettverdauung und Fettspeicherung bei Infusorien. Zeitschr. f. all. Phys. Bd. 10. 1909. 59. Overton, E., Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. Vierteljahresschr. d. Naturf. Ges. in Zürich 1899. 60. Derselbe, Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 34. 1900. 61. Derselbe, Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Jena 1901. 62. Derselbe, Über den Mechanismus der Resorption und der Sekretion. In Nagels Handb. d. Phys. d. Menschen. Bd. 2. 1907. 63. Pelet-Jolivet, L., Die Theorie des Färbeprozesses. Dresden 1910. 64. Plato, J., Über die vitale Färbbarkeit der Phagozyten des Menschen und einiger Säugetiere mit Neutralrot. Arch. mikr. An. Bd. 56. 1900. 65. Prowazek, S., Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 63. 1897. 66. Derselbe, Giftwirkung und Protozoenplasma. Arch. f. Protokde. Bd. 18. 1910. 67. Pütter, A., Studien über Thigmotaxis bei Protisten. Arch. f.

An. u. Phys. (Phys. Abt.) Suppl. B. 1900. 68. Retzius, G., Biologische Untersuchungen N. F. Bd. 12. 1905. 69. Ribbert, H., Die Abscheidung intravenös injizierten gelösten Karmins in den Geweben. Zeitschr. f. allg. Phys. Bd. 4. 1904. 70. Rohde, K., Untersuchungen über den Einfluss der freien H-Ionen im Inneren lebender Zellen auf den Vorgang der vitalen Färbung. Pflüger's Arch. Bd. 168. 1917. 71. Ruhland, W., Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 46. 1908. 72. Derselbe, Die Bedeutung der Kolloidnatur wässriger Farbstofflösungen für ihr Eindringen in lebende Zellen. Ber. d. deut. bot. Ges. Bd. 26. 1908. 73. Derselbe, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 51. 1912. 74. Derselbe, Zur Kenntnis der Rolle des elektrischen Ladungssinnes bei der Kolloidaufnahme durch die Plasmahaut. Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. 31. 1913. 75. Derselbe, Zur Kritik der Lipoid- und der Ultrafilter-Theorie der Plasmahaut nebst Beobachtungen über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloide für ihre Vitalaufnahme. Biochem. Zeitsch. Bd. 54. 1913. 76. Schlecht, H., Experimentelle Untersuchungen über die Resorption und die Ausscheidung des Lithionkarmins unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Beitr. z. path. An. u. allg. Path. Bd. 40. 1907. 77. Schulemann, W., Beiträge zur Vitalfärbung. Arch. mikr. An. Bd. 79. 1912. 78. Derselbe, Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie. Biochem. Zeitschr. Bd. 80. 1917. 79. Straub, W., Quantitative Untersuchung über das Eindringen von Alkaloiden in lebende Zellen. Arch. di fisiol. Bd. 1. 1904. 80. Teague, O., u. Buxton, B. H., Die Agglutination in physikalischer Hinsicht. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 60. 1907. 81. Traube, J., Theorie der Osmose und Narkose. Pflüger's Arch. Bd. 105. 1904. 82. Derselbe, Die osmotische Kraft. Pflüger's Arch. Bd. 123. 1908. 83. Derselbe, Über die Wirkung von Natriumcarbonat auf basische Farbstoffe und deren Giftigkeit. Biochem. Zeitschr. Bd. 42. 1912. 84. Verworn, M., Das Neuron in Anatomie und Physiologie. Vortr. geh. i. d. gem. Sitz. d. med. Hauptgr. d. 72. Vers. deut. Naturf. u. Ärzte. Aachen 1900. 85. Wal-lengren, H., Inanitionserscheinungen der Zelle. Zeitschr. f. allg. Phys. Bd. 1. 1902. 86. Wittich, v., Beiträge zur Physiologie der Nieren. Arch. mikr. An. Bd. 11. 1875. 87. Wolff, M., Über die Ehrlich'sche Methylenblaufärbung und über Lage und Bau einiger peripherer Nervenendigungen. Arch. f. An. u. Phys. An. Abt. 1902. 88. Zernecke, E., Untersuchungen über den feineren Bau der Cestoden. Zool. Jahrb. Bd. 9, Abt. f. An. 1896.

### Tafelerklärung.

Abb. 1. Vakuolisierte Paramäcien mit grossen gequollenen Granula:

A. ungefärbt,

B. nach Einwirkung stark verdünnter Neutralrotlösung.

Abb. 2. Vakuolisirtes Paramäcium, dessen Vakuolen vor der Farbstoffwirkung von geformten Bestandteilen völlig frei waren, zeigt kurze Zeit nach Beginn der Einwirkung einer stark verdünnten Neutralrotlösung, seine Vakuolen von gefärbten Granula dicht erfüllt.

Abb. 3. Wirkung von Neutralrot auf normale Paramäcien. Je nach der Konzentration der einwirkenden Lösung lassen sich drei Stufen der Farbstoffwirkung unterscheiden:

A. Erste Wirkungsstufe. Rings um die am Schlundende hängende Nahrungsvakuole erscheint ein schmaler roter Streifen als Ausdruck

einer Färbung des die Nahrungsvakuole begrenzenden Plasma-bezirkes. Gefärbte Granula fehlen. Zellkörper ungefärbt.

- B. Zweite Wirkungsstufe. Gefärbte Granula der Oberfläche der am Schlunde hängenden Nahrungsvakuole aufsitzend. Spärliche gefärbte Granula im Endoplasma hauptsächlich des hinteren Abschnittes des Tieres. Zellkörper ungefärbt.
- C. Dritte Wirkungsstufe. Diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers. Zahlreiche gefärbte Granula im Endoplasma und im Kortikalplasma. Dichte Anhäufung gefärbter Granula rings um die in Bildung begriffene Nahrungsvakuole. Reihenförmig angeordnete gefärbte Körnchen hauptsächlich an den beiden Enden des Tieres und in der Peristomgegend.

Abb. 4. Wirkung von Acridingelb:

- A. auf normale Paramäcien. Diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers ohne Hervortreten gefärbter Granula.
- B. auf vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula. Die grossen Granula gefärbt; der Zellkörper ungefärbt.

Abb. 5. Wirkung von Sudan III:

- A. auf normale Paramäcien. Diffuse Färbung des ganzen Zellkörpers ohne Hervortreten gefärbter Granula.
- B. auf vakuolisierte Paramäcien mit gequollenen Granula. Zellkörper und Granula gleichmässig gefärbt.

