Die Vitalfärbung von *Opalina ranarum* mit Säurefarbstoffen und ihre Beeinflussung durch Narkoticum.

Von
Wilhelm Hertz.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 20. Mai 1922).

Einleitung. Bei den Untersuchungen über die Färbbarkeit lebender Zellen haben besonders die Ergebnisse mit Säurefarbstoffen Schwierigkeiten für die Deutung bereitet. Während sich fast alle tierischen und pflanzlichen Zellen mit basischen Farbstoffen ohne weiteres in kurzer Zeit anfärben, gibt es nur eine beschränkte Zahl von Zellarten, welche die meisten Säurefarbstoffe in sichtbarer Menge aufnehmen. Es ist nun sowohl für die Theorie der Vitalfärbung, als auch insbesondere für die Theorie der Zellpermeabilität von höchstem Interesse, dafür eine Erklärung zu geben. Nach der Auffassung von *Overton* und *Höber* ist die beschränkte Anfärbbarkeit mit der Mehrzahl der Säurefarbstoffe Ausdruck einer „physiologischen Permeabilität“, d. h. einer Anpassung an besondere Aufnahmebedürfnisse, die sich unter den tierischen Zellen bei gewissen Epithelien der Nieren, bei phagocytierenden Zellen, wie den *Goldmannschen* „Pyrrolzellen“ des Bindegewebes, den *Kupfferschen* Sternzellen der Leber sowie anderen Retikuloendothelialzellen in der Milz, dem Knochenmark und anderen Organen eben in der Aufnahme der Säurefarbstoffe, und zwar in einer *aktiven* Aufnahme äußert; nach den neuesten sorgfältigen Untersuchungen von *Collander*¹⁾ an Pflanzenzellen ist auch da offenbar die Fähigkeit zu dieser Art Vitalfärbung bei gewissen Zellen, wie Blumenblattzellen, jugendlichen halb embryonalen Zellen und Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft der Leitbündel liegen, vorhanden, während andere Zellen, wofern sie nur unverseht sind, ungefärbt bleiben. — Einen abweichenden Standpunkt nehmen *Ruhland*, *Bethe* und *von Möllendorff* ein; sie sind der Ansicht, daß die tierischen und pflanzlichen Zellen generell auch für die Säurefarbstoffe *passiv* durchlässig sind, daß also die Anfärbung in jedem Fall die Folge nicht einer physiologischen, sondern einer „physikalischen

¹⁾ *Collander*, Jahrb. f. wiss. Bot. **60**, 354. 1921.

Permeabilität“ im Sinne *Höbers* sei, daß aber das Eindringen der Farbe immer nur dann sichtbar werde, wenn irgendwie eine Farbspeicherung stattfindet. Das Speicherungsvermögen der Zellen ist aber verschieden und hängt nach *Bethe* von ihrer Innenreaktion ab; wie Gelatinegallerte und Eiweißsole sich nur dann stark mit Säurefarbstoffen anfärben, wenn sie selber angesäuert werden, während Alkalisierung die Säurefarbstoffe fernhält, so soll auch nur ein saurer Zellinhalt zu reichlicher Aufnahme von Säurefarbstoff prädisponieren, während neutrale oder gar alkalische Reaktion das Gegenteil bewirkt. *Bethe*¹⁾ hat für seine Theorie zahlreiche eigene Beobachtungen und solche von Schülern ins Feld geführt; *Nirenstein*²⁾ und *Collander* haben Versuche mitgeteilt, die teils eine andere Deutung für den Einfluß der Reaktion auf die Anfärbung, als *Bethe* sie gibt, zulassen, und die teils den Anschauungen von *Bethe* widersprechen. Doch kann auf das Für und Wider hier nicht eingegangen werden. Wohl aber soll zu der Frage der Vitalfärbung mit Säurefarbstoffen von neuem durch Versuche Stellung genommen werden, die an *Opalina ranarum*, dem im Froschendarm parasitierenden Infusor, angestellt wurden. *Kozawa*³⁾ und *Rohde*⁴⁾ haben nämlich mitgeteilt, daß die lebenden Opalinen sich mit zahlreichen Säurefarbstoffen wundervoll durchfärben, wenn man die Farbstoffe an die Frösche verfüttert. Dies ist nach dem, was vorher über das beschränkte Vorkommen einer Durchfärbung mit Säurefarbstoffen gesagt wurde, an sich sehr interessant, zumal da diese Infusorien kein Cytostoma besitzen, so daß die Tatsache ihrer Anfärbung das Permeabilitätsproblem von neuem aufrollt. Dazu kommt, daß die Opalinen zwar außerhalb des Darmes noch mit Sicherheit im Darminhalt angefärbt werden können, aber in Ringerlösung die Farbe nicht oder höchstens nach längerer Zeit aufnehmen. Da die Bedingungen für diese Unterschiede bisher nicht genauer durchforscht sind, so habe ich dies auf Veranlassung von Prof. *Höber* genauer zu präzisieren versucht; zugleich erhielt ich die Aufgabe, durch Untersuchung des Einflusses der Narkose auf die Färbung mit basischen und mit Säurefarbstoffen eine deutliche Unterscheidung von physikalischer und physiologischer Permeabilität anzustreben.

Zur Methodik. Bei den folgenden Versuchen wurde vor allem darauf geachtet, daß die Eigenbewegung der Opalinen nicht wesentlich beeinträchtigt wurde und die Tiere ein normales Aussehen behielten. Vor Versuchen mit Farblösungen

¹⁾ *Bethe*, Wien. med. Wochenschr. 1916, Nr. 14; Kolloidzeitschr. **27**, 16. 1920; Biochem. Zeitschr. **127**, 18. 1922; *Rohde*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **182**, 114. 1920 u. **168**, 411. 1917; *Pohle*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 48.

²⁾ *Nirenstein*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **179**, 233. 1920.

³⁾ *Höber*, Biochem. Zeitschr. **67**, 420. 1914 nach Versuchen von *Kozawa*.

⁴⁾ *Rohde*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **168**, 411. 1917.

wurde stets untersucht, inwieweit die beabsichtigten Beimengungen zu den Lösungen auf die Infusorien schädigend einwirkten oder nicht. Um einwandfreie Resultate zu erhalten, übertrug ich die Opalinen nicht direkt mit der Platinöse aus dem Darm in die Farblösung, sondern erst in ein Schälchen mit reiner Ringerlösung, woraus ich sie dann mit einer feinen Capillare in die endgültige Lösung brachte. So wurden unbeabsichtigte Verunreinigungen aus dem Darm möglichst ausgeschaltet. Ferner stellte ich die Farbschälchen im dunklen, kühlen Zimmer auf, um möglichst dieselben äußeren Bedingungen zu schaffen, wie sie die Infusorien im Frostdarm gewohnt sind.

Der Einfluß saurer Lösungen auf die Vitalfärbung der Opalinen mit Sulfosäurefarbstoffen.

Schon *Bethes* Schüler *Rohde* hat den Versuch gemacht, im Sinne von *Bethes* Speicherungstheorie die Opalinen zur stärkeren Aufnahme von Säurefarbstoffen durch Ansäuern ihres Mediums zu veranlassen. Er gibt darüber an, daß die Opalinen sich in einem Acetatgemisch von $c_H = 10^{-4,74}$, soweit sie am Leben bleiben, nach längerer Zeit, aber nicht regelmäßig anfärben, während sie in Leitungswasser oder Ringerlösung ungefärbt bleiben. Ich stellte entsprechende Versuche mit sauren Acetat- und Phosphatgemischen¹⁾ an. Aber schon die Vorversuche ohne Farbstoff ergaben eine recht ungünstige Wirkung der 1/10 Mol. Acetatgemische. Bei $c_H = 0,11 \times 10^{-5}$ wird die normale Beweglichkeit sehr schnell gehemmt, nach 5 Min. bleibt nur ein schwaches Flimmern, das nach 20 Min. aufhört. Die Tiere zeigen dann ein dunkles Plasma. Bei $c_H = 0,28 \times 10^{-6}$ halten sich die Infusorien bis 7 Std. ganz gut. Auch mit Ringerlösung auf 1/100 mol. verdünnte Acetatgemische wirken schnell schädigend. Phosphatgemische sind weniger ungünstig für die Tiere. Bei $c_H = 10^{-4,588}$ bleiben einige noch 10–15 Min. ziemlich normal bewegt. Nach einer Stunde sind sie zum Teil schon vollkommen zerstört, nach zwei Stunden alle. Färbungen an einigermaßen normalen Tieren in nicht zu stark schädigenden Acetat- oder Phosphatgemischen²⁾ wurden nicht beobachtet trotz Verwendung von Farbstoffkonzentrationen von 0,1–0,5% (Cyanol, Lichtgrün F. S. und Benzoblau) und einer Versuchsdauer bis zu 24 Stunden.

Der Einfluß bestimmter organischer Substanzen auf die Vitalfärbung der Opalinen mit Sulfosäurefarbstoffen.

Bei Wiederholung der *Kozawaschen* Versuche zeigte sich, daß sich Opalinen sowohl in einem mit 1 proz. Farblösung abgebundenen isolierten Frostdarm als auch bei Zusatz von Darminhalt zu 1 proz. Farblösungen in 8–24 Stunden sehr gut färben. Für erstere Versuche

¹⁾ *Kozawa*, Biochem. Zeitschr. **60**, 146. 1914.

²⁾ $c_H = 10^{-4,949}$

wurde dies mit Cyanol, Lichtgrün F. S., Benzoreinblau, Benzoblau und Trypanblau erwiesen, für letztere mit Lichtgrün, Cyanol und Benzoblau. All diese Farbstoffe sind solche, die in keinerlei Weise „lipoidlöslich“ sind, d. h. sich aus wässriger Lösung weder auf Cholesterin- oder Lecithinlösungen in organischen Lösungsmitteln noch auf das *Nirensteinsche* Gemisch von Diamylamin, Ölsäure und Öl verteilen, und die ferner nicht generell, sondern nur speziell die in der Einleitung genannten Zellsorten färben. — Die Kontrolltiere in einfacher Ringerlösung waren ungefärbt, aber sie hatten meist ihre Eigenbewegung eingebüßt. Nur das Flimmern der Cilien war geblieben, öfter waren sie auch ganz zerstört und stark gefärbt. Auf diese Wirkung der *reinen* Ringerlösung komme ich weiter unten noch ausführlich zu sprechen.

Bei weiteren Versuchen zeigte sich nun, daß auch durch Einlegen von Stückchen gereinigten Dickdarms, von Dünndarm, Leber und Niere (vom Frosch) in die Farblösungen sehr gute Färbungen eintraten bei vollkommen normalem Verhalten der Tiere. Auch in einem filtrierten Auszug der Froschleber wurden die gleichen guten Resultate erzielt. Ich ging dann zu künstlich gereinigten organischen Substanzen über, zu Pepton (Präparat *Witte*), Pepsin (*Witte*), Trypsin und Albumin¹⁾. Diese Substanzen wurden in Konzentrationen von $\frac{1}{2}$ –1% in der endgültigen Farblösung verwendet und die Farbstoffe Cyanol und Benzoblau ($\frac{1}{2}$ %) benutzt. Ferner blieb die Salzkonzentration bei den Versuchen stets die gleiche. Nach der angegebenen Zeit in farblose Ringerlösung übertragen, schwammen die Tierchen wieder wunderbar schön gefärbt und lebhaft herum. Auch die Vorversuche in farblosen Lösungen ergaben eine gute Haltbarkeit der Opalinen bei Anwesenheit dieser organischen Zusätze. In einer 1proz. Peptonlösung hielten sich die Infusorien fast 10 Tage recht gut, in einer $\frac{1}{2}$ proz. Trypsinlösung 4 Tage sehr gut. Prüfung der organischen Lösungen mit Methylrot und Neutralrot ergab ziemlich neutrale Reaktion. Methylrot blieb immer gelb; keinesfalls überstieg also die H-Ionenkonzentration 10^{-6} .

Bei der Verwendung von Pepsin- und Trypsinpräparaten konnte der Gedanke naheliegen, daß es sich hier vielleicht um eine „Anverdauung“ der Tiere handeln könnte, und daß diese vielleicht auch im Froschdarm stattfindet. Dieses ist aber nicht der Fall. Sowohl aufgekochter Darminhalt, als 5 Min. stark gekochte Pepsin- und Trypsinlösung, wie auch Pepton und filtrierter Leberauszug ändern nichts an den Färbeergebnissen. Unter den Körpern, bei deren Anwesenheit

¹⁾ Das durch Ammonsulfat-Fällung aus Serum gewonnene Albumin muß durch Dialyse völlig von dem Salz befreit werden, da schon kleine Mengen davon auf Opalinen schädlich wirken und die Färbung verhindern.

Vitalfärbung der Opalinen mit Cyanol usw. eintritt, befinden sich also auch kochbeständige¹⁾.

Bei den Kontrolltieren in reiner Ringerlösung machte sich wieder z. T. eine schlechte Haltbarkeit in den 24 Std. der Versuchsdauer geltend, wie oben schon erwähnt wurde. Sehr oft war die Eigenbewegung stark herabgesetzt, z. T. nur starker Flimmerschlag vorhanden. Auch in farbloser Lösung und bei Verwendung von doppelt destilliertem Wasser kamen diese Fälle vor. Dabei waren die Tiere in den farbigen Kontrollösungen stets ganz hell und ungefärbt.

Diese Tatsachen führten zu einer näheren Untersuchung über die Wirkung der Ringerlösung auf die Opalinen. Die Zusammensetzung meiner Ringerlösung war 0,65% NaCl, 0,014% KCl, 0,012% CaCl₂ und 0,01% NaHCO₃. Das Bicarbonat kann ohne Veränderung der Versuchsergebnisse fortgelassen werden. „Wäscht“ man nun Opalinen in Ringerlösung, indem man sie aus dem ersten Schälchen in ein weiteres gleiches überträgt, so daß Verunreinigungen immer mehr ausgeschlossen werden, so zeigt sich meist schon bei der zweiten und dritten Übertragung, daß einige Tiere die Bewegung einstellen und stark flimmernd am Boden des Schälchens „kleben“, so daß man sie kaum mit der Capillare fortnehmen kann. Läßt man eine solche 4. Übertragung in reine Ringerlösung 12 Std. stehen, so sind nach dieser Zeit die Opalinen z. T. tot und cytolysiert, z. T. ohne jeden Flimmerschlag, dabei hell und feinblasig im Innern, z. T. zeigen sie langsame Eigenbewegung, sind aber sehr dunkel und groß-granuliert. Bringt man solche Tiere in Neutralrotlösung (0,001%), so färben sich besonders diese bräunlichen „Granula“, während die schmalen Zwischenräume nur schwach gefärbt erscheinen. Kontrolltiere in einer Lösung mit Organauszug, die auch zu gleicher Zeit in Neutralrotlösung gebracht werden, zeigen stärkere Diffusfärbung mit nicht so vielen und so stark hervortretenden Granulis. Die diffuse Plasmafärbung zeigt etwas schwächer roten Farbton als die Granula. In anderen Fällen vertragen die Opalinen das „Waschen“ sehr viel besser, sind nach 12 Std. noch hell und normal beweglich, zeigen aber nach längerem Verweilen in Neutralrot auch jene merkwürdige stärkere Granulafärbung²⁾.

Setzt man aber einer Ringerlösung eine Spur Verunreinigung aus dem Darminhalt zu, so steigt die Haltbarkeit der Opalinen sehr stark, ohne daß in einer solchen Lösung mit $\frac{1}{2}\%$ Cyanol oder Benzoblau schon Färbung auftritt. Daher wurden fernerhin die Kontrollösungen in dieser Weise angesetzt und erheblich bessere Resultate erzielt. Sobald man aber stärkere Verunreinigungen aus dem Darmzusatz, so treten schwache Färbungen mit den Säurefarbstoffen auf.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß entsprechende Färbungsversuche negativ verliefen bei Zusatz von Traubenzucker, Gly-

¹⁾ Die Trypsinwirkung ist vielleicht nur auf das Eiweiß zu beziehen, das dem benutzten Präparat anhaftete.

²⁾ Jedenfalls ist die Resistenz der verschiedenen Opalinengenerationen aus den verschiedenen Froschdärmen nicht gleich, wie auch Form und Größe der Tiere stark wechselt.

kogen, Lecithin (*Merck*, puriss.) und auch Pferde- und Rinderserum, für die *Kozawa*¹⁾ positive Resultate angibt.

In reiner isotoner Traubenzuckerlösung hört die Eigenbewegung der Opalinen schon nach einer $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Std. auf; ihre Form bleibt normal. Nach dieser Zeit in Ringerlösung zurückgebrachte Tiere leben wieder einigermaßen auf, nicht mehr nach $1\frac{1}{2}$ Std. Nach 4 Std. ist völliger Verfall der Infusorien eingetreten. Zusatz von 0,1 cem Ringer zu 0,9 cem isotoner Traubenzuckerlösung steigert die Haltbarkeit stark. Farbversuche in solchen u. a. Lösungen verliefen negativ, ebenso in 0,75 proz. Glykogen- und Stärkelösung oder 0,0008 proz. Lecithin-Emulsion, trotzdem die Tierchen noch unbeeinträchtigt und hell herumschwimmen. Aktives Rinder- oder Pferdeserum auf die richtige Salzkonzentration mit Wasser verdünnt wirkt schnell tödlich. Nach 5 Min. hört die Eigenbewegung auf. Man sieht, wie sich kleine Gerinnsel auf den Cilien niederschlagen und sie einbetten. Nach 1 Std. sind alle Opalinen zerstört. Inaktiviert man aber das Serum durch halbstündiges Erwärmen auf 56°, so fällt diese starke Schädigung fort. Trotzdem bekam ich nur einmal eine unregelmäßige Färbung.

Zur Erklärung der Erscheinungen blieb noch zu untersuchen, ob sich die Zellinnenreaktion unabhängig von der äußeren bei Nahrungsaufnahme nach der saueren Seite hin verändert, so wie *E. Nirenstein*²⁾ dies an den Nahrungsvakuolen von *Paramecium caudatum* beobachtet hat. Um einen etwa vorhandenen Zusammenhang hiermit und der Färbung mit den fraglichen Säurefarbstoffen festzustellen, wurden Opalinen aus demselben Froschdarm einerseits in 0,5 proz. Cyanollösungen mit und ohne Leberauszug, andererseits in ebensolche farblose Lösungen gebracht. Nach 12–14 Std. waren die Infusorien in der Cyanol-Organextraktlösung wieder tadellos gefärbt, dagegen in der Kontrollösung absolut ungefärbt. Die Opalinen in den farblosen Lösungen wurden nun auf ihre Innenreaktion mit Neutralrot geprüft³⁾. Es konnte absolut kein Unterschied in der Farbtönung festgestellt werden. Also wird auch keine stärkere H-Ionenkonzentration im Zellinneren an ihrer Färbbarkeit schuld sein.

Betrachten wir die bisher angeführten Versuche, so müssen wir sagen, daß sichere positive Schlüsse daraus noch nicht gezogen werden können. Ziemlich gesichert scheint die negative Feststellung, daß eine stärkere H-Ionenkonzentration für die gute Opalinenfärbung mit jenen Säurefarbstoffen nicht verantwortlich gemacht werden kann. Auch wenn man annehmen wollte, daß beim Verweilen in Lösungen mit Organzusatz nur zeitweise die Zellinnenreaktion sauer sei, so wie in der Nahrungsvakuole von *Paramecium*⁴⁾, so müßte doch der gespeicherte Farbstoff beim Umschlagen der Reaktion in neutral bis

¹⁾ *Höber*, *Biochem. Zeitschr.* **60**, 146. 1914.

²⁾ *Nirenstein*, *E.*, *Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol.* **179**, 298. 1920.

³⁾ Vgl. auch die *Rohdeschen* Angaben über die Zell-Innenreaktion der Opalinen.

⁴⁾ *Nirenstein*, *E.*, 1920.

schwach alkalisch nach der *Betheschen* Ansicht wieder abgegeben werden, wenn die Zellpermeabilität keine Rolle spielte. Im Gegenteil wird aber der Farbstoff (z. B. Benzoblau) ziemlich lange von Opalinen festgehalten, die nach Übertragung in farblose Ringerlösung noch weitere 24 Std. beobachtet wurden.

Weiterhin kann nur die starke Vermutung geäußert werden, daß es sich bei der Anfärbung mit den genannten Säurefarbstoffen um einen aktiven Vorgang von Seiten der Opalinen handelt, der mit der Nahrungsaufnahme der Tiere zusammenhängt. Es sei nochmals daran erinnert, daß die Opalinen kein Stoma besitzen und die Nahrungsstoffe also wohl durch die ganze Oberfläche aufnehmen müssen. Aufnahme sichtbarer Partikel beobachtete ich nicht¹⁾. Als Nahrungsstoffe kommen sehr wahrscheinlich Eiweiß oder eiweißähnliche Stoffe in Betracht. Jedenfalls können auch Eiweißbruchstücke in Frage kommen, die nicht durch Hitze koagulierbar sind. Intensive Nahrungsaufnahme tritt wahrscheinlich nur bei stärkerem Angebot an Nahrungsstoffen ein, so wie es die Infusorien im Froschdarm gewohnt sein mögen. In sehr schwach mit Darminhalt verunreinigter farbiger Ringerlösung findet auch wahrscheinlich keine stärkere Nahrungsaufnahme statt, so daß auch keine Färbungen auftreten. Absolut reine Ringerlösung scheint kein günstiges Medium für diese parasitierenden Infusorien zu sein.

Es ist denkbar, daß eine Änderung der einzelnen Salzkonzentrationen eine Besserung in der Haltbarkeit der Opalinen hervorruft. Die teilweise granuläre Bräunung nach 12 Std. wäre vielleicht als eine teilweise Kolloidfällung durch die Salze der Lösung anzusehen²⁾. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß durch die reine Salzlösung und gar durch das „Waschen“ in dieser Bestandteile der Plasmahaut fortgespült³⁾ werden, wodurch die Zellpermeabilität verändert würde und die Salze, wenn auch langsam, ins Zellinnere dringen könnten, um dort jene Fällungen hervorzurufen. Jedoch sind dieses nur Vermutungen, ohne daß diese Erscheinung noch weiter verfolgt ist.

Einfluß der Narkose auf die Vitalfärbung mit den Säurefarbstoffen.

Der Einfluß von Narkoticum auf die Vitalfärbung mit Säurefarbstoffen ist bisher nur von *Collander* (s. o.) an den Kelchblättern von *Hyacinthus* beiläufig untersucht worden. Für tierische Zellen sind bisher

¹⁾ Merkwürdig ist, daß bei sehr guten Vitalfärbungen mit Cyanol usw. sehr oft das Vorderende der Tiere fast ungefärbt bleibt, besonders bei den langen Opalinen aus *R. esculenta*. Bei schwachen Anfärbungen ist zuerst meist das Hinterende gefärbt. Vielleicht besteht ein Zusammenhang hiermit und der Beobachtung, daß am Hinterende der Tiere meist eine cilienfreie Stelle sichtbar ist, mit der sich die Opalinen oft aneinander oder an Partikeln festsetzen. Bei basischen Farbstoffen wurde solche verschieden starke Färbung an ein und demselben Tiere nicht beobachtet.

²⁾ Vgl. *Spek*, Acta Zoologica 1921, S. 191.

³⁾ Vgl. die Beobachtungen über Hypodynamie beim Herzen; ferner *Brinkman* und *van Dam*, Biochem. Zeitschr. 108, 35. 1920.

keine diesbezüglichen Angaben bekannt. Auf Veranlassung von Prof. Höber versuchte ich nun, die Färbung der Opalinen im isolierten, mit Farblösung gefüllten Froschdarm durch Narkoticum zu beeinflussen.

Als Narkoticum benutzte ich Propyl- und Isobutylurethan. Die brauchbare Konzentration für Isobutylurethan ergab sich zu 0,05 bis 0,03 Mol., für Propylurethan 0,14—0,08 Mol. Die Versuche zur Auffindung dieser Konzentrationen wurden aus praktischen Gründen nicht in reiner Ringerlösung, sondern unter Zusatz von filtriertem Leberauszug angesetzt. Insofern haben die Angaben also keinen absoluten, sondern nur praktischen Wert.

Unter diesen Umständen stellen die Infusorien z. B. bei 0,14 Mol. Propylurethan innerhalb 4—6 Std. ihre Eigenbewegung ein. Es geschieht dieses langsam; die Bewegung wird immer schwächer, bis nur noch ein lebhaftes, bei längerer Narkose allmählich ermüdendes Flimmern der Tierchen übrig bleibt. Ihr Aussehen ist trotzdem ganz normal. In diesem Zustand des Flimmerns bleiben die Infusorien 8 bis 11 Std. ungeschädigt. Nach Verweilen von 12—15 Std. in einer Narkoticumlösung kehrt also die Eigenbewegung der Opalinen bei Übertragung in einfache Ringerlösung mit etwas Leberauszug bald zurück. Oft sind sie schon innerhalb 5—10 Min. wieder normal bewegt, in anderen Fällen dauert es $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Std. Narkotisiert man auch noch das Flimmern fort, so ist die Narkose nach längerer Zeit nicht mehr reversibel.

Für den Hauptversuch wurde nur die Hälfte eines Froschdarmes mit 1 proz. Benzoblaulösung gefüllt und gut abgebunden in einen verschlossenen Kolben mit 40 cem Narkoticum-Ringerlösung eingehängt. Benzoblau hatte sich als praktisch erwiesen, da es nicht so diffusibel ist, daß es die Darmwand passieren könnte, andererseits aber sehr schöne Färbungen der Infusorien abgibt¹⁾. Die andere Hälfte des Darmes wurde mit Opalinen aus demselben Frosch in ein Schälchen mit etwas 1 proz. Benzoblau-Ringerlösung gelegt. Nach 9—10 Std. waren diese Infusorien wie immer sehr schön gefärbt und lebendig, die narkotisierten Opalinen dagegen *vollkommen ungefärbt*. Sie wurden aus dem Darm erst in farblose Narkoticumlösung derselben Konzentration übertragen, um den Grad der Narkose festzustellen. Es zeigte sich stets ein sehr schönes Bild: der ganze Haufen gut normal aussehender Tierchen trotz kräftigen Flimmerschlages ganz unbewegt. Die Eigenbewegung kehrte dann nach wenigen Minuten normal zurück, wenn die Infusorien, wie beschrieben, in narkoticumfreie Lösung gebracht wurden. Öftere Wiederholungen des Versuches ergaben dasselbe Resultat.

¹⁾ Bei sehr vorsichtiger Behandlung und frischem Material bleibt der Darm auch in Narkoticumlösung 12 Std. vollkommen dicht für den Farbstoff.

Natürlich ging mein Bestreben nun dahin, diese Versuche auch außerhalb des Darmes auszuführen, da dann auch Versuche mit diffusiblen Farbstoffen, wie Cyanol, ausführbar waren. Die Versuchsanordnung ergibt sich aus dem vorigen: es wurden $\frac{1}{2}$ proz. Cyanol- oder Benzoblaulösungen unter Zusatz von filtriertem Leberauszug und Propylurethan (0,14—0,08 Mol.) angesetzt. Salzkonzentration und Menge des zugesetzten Organauszuges war stets gleich gehalten mit der narkoticumfreien Kontrollösung. Nach 13—15 Std. zeigten sich dieselben verblüffend guten Ergebnisse auch mit dem diffusiblen Cyanol, wie sie eben für die Versuche im isolierten Froschdarm mitgeteilt wurden. Bei den niedrigen Propylurethankonzentrationen (0,1 bis 0,08 Mol.) war die Eigenbewegung oft noch schwach erhalten, eine Anfärbung aber meist absolut nicht vorhanden oder nur minimal, während in 0,14—0,12 Mol. Narkoticumlösungen niemals eine Färbung zu sehen war. Erwähnt sei, daß öfters vereinzelte fleckenweise oder stark angefärbte Tiere vorkommen, die sich aber stets als geschädigt herausstellen, z. T. vakuolisiert sind und niemals Reversibilität der Narkose zeigen.

Daß endlich Färbung oder Nichtfärbung wirklich von dem Narkosegrad der Opalinen und nicht von irgendwelchen anderen Umständen abhängen, zeigten mir deutlich zwei Fälle. Nicht alle Opalinen sind, besonders bei den niederen Narkoticumkonzentrationen, gleich schnell und gleich stark beeinflusst. So zeigte sich einmal bei einer Narkose im Darm (0,1 Mol. Propylurethan) und einmal außerhalb desselben (0,08 Mol.) eine Opaline, die nach 9 Std. noch recht lebhaft und sehr gut gefärbt in der farblosen Narkoticumlösung, in die ich sie übertragen hatte, herumschwamm, während alle übrigen Tierchen nur sehr langsam oder gar nicht bewegt und ganz *ungefärbt* waren.

Sehr verlockend war es nun im Hinblick auf die Ergebnisse *E. Nirensteins* an Paramaecien, die *Färbbarkeit der Opalinen mit diamylaminlöslichen Säurefarbstoffen* und ihre Beeinflussung durch Narkotica zu untersuchen. Es gibt nämlich eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Säurefarbstoffen, die in ähnlicher Weise „lipoidlöslich“ sind, wie die basischen Farbstoffe, und diese selben Säurefarbstoffe sind im Gegensatz zu den übrigen anscheinend gerade so zur generellen Färbung tierischer Zellen geeignet, wie die basischen Farbstoffe, wie wohl aus *Nirensteins* Gegenüberstellung der relativen Löslichkeit in seinem oben schon einmal erwähnten Gemisch aus Öl, Ölsäure und Diamylamin und ihrer Fähigkeit zur Vitalfärbung hervorgeht. Die Färbung mit diesen Säurefarbstoffen wäre natürlich als ein rein passiver Vorgang aufzufassen. Ich verwendete Tuchscharlach G, Tuchrot 3 G A und Tropaeolin 000/2 (*Merck*).

Farbstoff	Konzentration in %	Färbung nach Stunden	Grad der Färbung
Tuchscharlach G	0,005	$\frac{3}{4}$ —1	gut
Tuchrot 3 G A	0,015	1— $2\frac{1}{2}$	deutlich, aber schwach
Tropaeolin 000/2 (Merck)	0,04	1— $2\frac{1}{2}$	deutlich, aber schwach

Die beiden ersten Farbstoffe, besonders Tuchrot, sind schwer löslich in Wasser und fallen bei Salzzusätzen leicht aus. Die wässerigen Lösungen wurden daher stark erwärmt und vor jedem Versuch frisch hergestellt. Sie wurden dann zu gleichen Teilen mit Ringerlösung vermischt¹⁾. Die Ringerlösung wurde möglichst spät zu der Farblösung hinzugegeben. Die Opalinen zeigen keinerlei verändertes Aussehen in solchen Lösungen²⁾. Die obige Tabelle gibt die Färbeergebnisse an normalen frischen Opalinen in reiner „ $\frac{1}{2}$ -Ringerlösung“ an. Ein Zusatz von Leberauszug hat keinen Einfluß auf die Färbungsgeschwindigkeit oder Stärke auch bei langer Versuchsdauer.

Um den Einfluß von Narkoticum auf diese Vitalfärbung festzustellen, wurden Opalinen in farbloser Ringerlösung mit Organzusatz in üblicher Weise narkotisiert. Nach 5—12 Std. übertrug ich sie dann in die reinen Farblösungen mit der gleichen Narkoticumkonzentration und „ $\frac{1}{2}$ -Ringerlösung“, die Kontrolltiere (aus dem gleichen Darm) in die entsprechende Lösung ohne Narkoticum. Nach 1—3 Std. in farblose Lösung zurückgebracht und unter zwei nebeneinanderstehenden Mikroskopen verglichen, zeigten narkotisierte und Kontrolltiere absolut gleiche Färbungsstärken. Die Narkose war stets reversibel. Die Versuche zeigten eindeutig 1., daß die erprobten diamylaminlöslichen Säurefarbstoffe im Gegensatz zu den unlöslichen auch in gewöhnlicher physiologischer Salzlösung ohne organische Zusätze in nicht langer Zeit Opalinen deutlich färben; 2., daß diese Färbung durch Narkoticum nicht geschwächt oder verzögert wird.

In derselben Weise wie bei den diamylaminlöslichen Säurefarbstoffen wurde nun schließlich die *Beeinflussung der Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen* geprüft. Schon narkotisierte Opalinen wurden zu gleicher Zeit mit den Kontrolltieren in die reinen Farb-Ringerlösungen mit und ohne Narkoticum gebracht und die schnell eintretenden Anfärbungen wie oben verglichen. Zur Verwendung kamen:

Neutralrot 0,0005—0,001 $\frac{0}{0}$;

Methylgrün 0,0005—0,01 $\frac{0}{0}$, lipidunlöslich nach *Ruhland* und *Höber*;
ölsäure-diamylaminlöslich nach *Nirenstein*³⁾;

¹⁾ Solche Lösungen sind fernerhin als „ $\frac{1}{2}$ -Ringerlösung“ bezeichnet.

²⁾ Dagegen quellen Opalinen in destilliertem oder Leitungswasser in $\frac{1}{2}$ Std. auf und zeigen nach einer Stunde kaum noch Eigenbewegung.

³⁾ *Nirenstein*, l. c. S. 315. Tab. V.

Rhodamin B 0,02%, sehr diffusibel;

Nachtblau 0,001%, hochkolloidal.

Es ergab sich wieder, daß im wesentlichen das Narkoticum keinen Einfluß auf Anfärbungsgeschwindigkeit und Farbspeicherung hat. Mit Methylgrün zeigten sich fast nie Unterschiede. Nur einige Male war die Farbintensität bei den Opalinen in beiden Lösungen zwar gleich, aber die Kontrolltiere erschienen etwas bläulicher als die mehr grünen narkotisierten Opalinen. Indicatoreigenschaften hat Methylgrün nicht; auch bei Reduktion mit Traubenzucker wird es nur entfärbt. Der Grund der Farbänderung konnte also nicht festgestellt werden. Mit Rhodamin gab es niemals irgendwelche Unterschiede in Zeit oder Intensität der Anfärbung. Da eine 0,02proz. Farblösung sehr stark gefärbt erscheint, mußte nach einigen Minuten die Lösung im Schälchen bis auf einen kleinen Tropfen abgesogen werden, um den Anfärbungsgrad der Opalinen zu vergleichen. Auf diese Weise erscheinen die Tiere schön gefärbt gegen die in dieser Schichtdicke farblos aussehende Lösung. Gibt man dann unter dem Mikroskop farblose Ringerlösung in das Schälchen, so sieht man sehr schön, wie die Infusorien erst noch einige Augenblicke gefärbt bleiben, dann aber sehr schnell ganz abblassen bis auf eine minimale Granulafärbung. Auf diese Weise erklärt es sich, daß ich bei Übertragung von Opalinen aus Rhodamin in farblose Lösungen zuerst niemals gute Färbungen erhielt. Das rasche Verschwinden des Rhodamins aus dem Opalinenplasma wird wohl eher auf seiner Diffusibilität als auf seiner Zerstörung beruhen, da es durch Traubenzucker nicht reduziert wird. Nach Angaben von *Overton*¹⁾ und *Ruhland*²⁾ soll es allerdings langsamer als andere basische Farbstoffe eindringen. — Wegen der geringen Wasserlöslichkeit und der großen Elektrolytempfindlichkeit wurde Nachtblau in Äthylalkohol gelöst (0,002 g in 3 ccm), in 100 ccm Wasser eingetropft und die Lösung wieder zu gleichen Teilen mit Ringerlösung gemischt³⁾. Die Giftigkeit des Farbstoffes schrieb kurze Versuchsdauer vor (10 Min.). In dieser Zeit färben sich die Opalinen aber sehr gut ohne Schädigung und ohne Beeinflussung durch Narkose. — Am unklarsten und verschiedensten fielen die Versuche mit Neutralrot aus. Hier spielt die Indicatoreigenschaft des Farbstoffes eine Rolle und macht den Vergleich oft unmöglich. Aber die Reaktionsverhältnisse lassen keine Regelmäßigkeit erkennen. Schon die Kontrolltiere sind unter sich ganz ungleich gefärbt. Viele bleiben während 45 Min. und länger nur orange bei gleich guter Beweglichkeit, wie die stärker rot gefärbten. Ebenso zeigen die narkotisierten Opalinen einmal etwas rötlicheren,

¹⁾ *Overton*, Jahrb. f. wiss. Bot. **34**, 669. 1900.

²⁾ *Ruhland*, Jahrb. f. wiss. Bot. **46**, 1. 1908.

³⁾ Die geringen Mengen Alkohol haben keinen Einfluß auf die Opalinen.

einmal etwas gelblicheren Farbton. Ein Zusammenhang mit dieser Erscheinung und der Narkosezeit konnte nicht erbracht werden. Meist waren also die Kontrolltiere gleich orange gefärbt wie die narkotisierten; bei den ersteren kamen jedoch häufiger Opalinen vor, die stärkere Rotfärbung aufwiesen, besonders infolge stärkerer Farbspeicherung in den Granulis. Ein eindeutiges Resultat ließ sich mit Neutralrot nicht erzielen. — Trotzdem darf im ganzen gesagt werden, daß Narkoticum auch auf die Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen keinen Einfluß hat.

Die Theorien der Vitalfärbung.

Wie verhalten sich diese Ergebnisse zu den Theorien der Vitalfärbung? Es sei zunächst auf die schon angeführte Theorie *Bethes* eingegangen, nach der alle Zellen auch für Säurefarbstoffe gut permeabel sind, und nach der über eine sichtbare Speicherung innerhalb der Zellen die Reaktion im Zellinneren entscheidet. Die vorliegenden Versuche zeigen demgegenüber keinen engeren Zusammenhang der Vitalfärbung mit der H-Ionenkonzentration im Zellinneren der Opalinen. Weder ein Zusatz von Organen oder organischen Präparaten zu den Farblösungen, noch die Narkose scheinen die Zellinnenreaktion wesentlich und eindeutig zu beeinflussen, obwohl sie die Anfärbung aufs stärkste verändern. Am ersten könnten noch die schwankenden Ergebnisse an narkotisierten Opalinen mit Neutralrot zugunsten der *Bethes* Theorie sprechen. Es ist aber gegenüber den verschiedenen Resultaten mit Neutralrot die absolute Einheitlichkeit der Ergebnisse mit diamylaminlöslichen und -unlöslichen Säurefarbstoffen, sowie den drei anderen basischen Farbstoffen hervorzuheben. Auch erklärt die Theorie den großen Unterschied zwischen diamylaminlöslichen und -unlöslichen Säurefarbstoffen in Färbung und im Verhalten gegenüber narkotisierten Opalinen keineswegs. Daher dürfte wohl ein so entscheidender Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die sichtbare Farbstoffaufnahme, wie die Theorie ihn fordert, wenigstens für die vorliegenden Versuche nicht in Frage kommen.

Auch die Haftdrucktheorie *Traubes* kann nicht zur Erklärung der Vitalfärbung an Opalinen herangezogen werden, wenigstens soweit es sich um einen Vergleich mit den Messungen der Oberflächenaktivität für die Grenzfläche Wasser—Luft handelt. Vergleicht man die stalagmometrischen Messungen *Collanders* in Tabelle I seiner angeführten Arbeit, so findet man z. B. für Cyanol und Tuchscharlach dieselbe Tropfenzahl, obwohl diese Farbstoffe gegenüber Opalinen ein ganz verschiedenes Verhalten zeigen.

Die schon zur Genüge von anderer Seite¹⁾ widerlegte Ultrafiltertheorie *Ruhlands* kann auch hier keine Stütze finden. Man beachte etwa die guten Färberesultate mit dem kolloiden Nachtblau und Tuchscharlach und die in reiner Ringerlösung negativen Resultate mit dem diffusiblen Cyanol.

Dagegen stützen die vorliegenden Versuche gut die Ansicht *Höbers*, daß es sich bei den wenigen Zellen, die sich mit diamylaminunlöslichen Farbstoffen färben, um einen aktiven Vorgang handelt. Bei Opalinen wird dieser wahrscheinlich nur durch bestimmte organische Zusätze zu den physiologischen Salzlösungen hervorgerufen und ist narkotisierbar. Demgegenüber ist dann die Vitalfärbung mit diamylaminlöslichen sauren und mit basischen Farbstoffen als ein rein physikalischer (oder chemisch-physikalischer, falls Salzbildung in Frage kommt) Vorgang anzusehen, der nicht vom Funktionszustand der Zelle abhängt und demgemäß auch nicht narkotisierbar ist. Mit den Resultaten stimmt auch die *modifizierte Lipoidtheorie Nirensteins* sehr gut überein. Danach geht ja die Vitalfärbung von *Paramaecium* der Ausschüttelbarkeit des Farbstoffes durch das Ölsäure-Diamylamin-Gemisch aus der wässrigen Lösung ausnahmslos parallel. Soweit die von mir benutzten Farbstoffe in Betracht kommen, bestätigen meine Versuche vollkommen die Ansichten *Nirensteins*, wobei wohl auch auf die große Verwandtschaft der untersuchten Objekte hingewiesen werden muß. Die Färbungen mit diamylaminunlöslichen Farbstoffen fallen dann also ganz aus dem Rahmen dieser Theorie heraus durch die besonderen Bedingungen, die ihre Aufnahme in die Infusorienzellen vorschreiben, und sind einstweilen erklärt mit der erwähnten *Höberschen* Hypothese.

Zusammenfassung.

Opalinen färben sich mit diamylaminunlöslichen Säurefarbstoffen außerhalb des Froschdarmes in Ringerlösung nur bei Zusätzen von bestimmten organischen Substanzen. Hierfür kommen wahrscheinlich Eiweiß oder eiweißähnliche Körper in Betracht. *Die erwähnte Färbung ist durch Narkoticum vollständig zu hemmen.* Dagegen färben sich die Infusorien auch in reiner Ringerlösung in nicht langer Zeit mit diamylaminlöslichen sauren und basischen Farbstoffen. Diese Färbung ist durch Narkoticum nicht zu hemmen oder anderweitig zu beeinflussen. Nur bei Neutralrot konnte wegen der Indicatoreigenschaft des Farbstoffes kein sicheres Resultat erzielt werden. Auch die Reaktionsverhältnisse im Zellinnern ergaben kein einheitliches Bild. Es kann somit der H-Ionenkonzentration im Zellinnern für die vorliegenden Versuche

¹⁾ *R. Höber*, Physikal. Chemie der Zelle u. der Gewebe, 5. Aufl., S. 522; *Nirenstein*, l. c. S. 327; *Collander*, l. c. S. 397.

nicht der Einfluß auf die Vitalfärbung eingeräumt werden, wie ihn die *Bethesche* Theorie fordert. Dagegen berechtigen die erprobten Bedingungen, unter denen Opalinen diamylaminunlösliche Säurefarbstoffe aufnehmen und die Hemmung dieser Färbung durch Narkoticum sehr wohl zu der *Höberschen* Annahme, daß es sich hier um einen aktiven Zellvorgang handelt, der noch nicht näher geklärt ist. Mit dieser Vorstellung und den übrigen Ergebnissen mit diamylaminlöslichen sauren und mit basischen Farbstoffen steht auch die modifizierte Lipoidtheorie *Nirensteins* im besten Einklang.

Zum Schluß möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. *R. Höber* auch an dieser Stelle noch einmal recht herzlich danken für die überaus freundliche Anleitung und das lebhafte Interesse, das er der vorliegenden Arbeit stets entgegenbrachte.