

Botany. — *Über die Beeinflussung der Hefeatmung durch Neutralrot.* Von
MAX GEIGER-HUBER. (Communicated by Prof. F. A. F. C. WENT.)

(Communicated at the meeting of November 29, 1930).

Seit die Bedeutung der Vitalfärbung für die Erforschung der lebenden Zelle erkannt wurde, ist man nicht nur eifrig bestrebt den Färbungsvorgang selbst aufzuklären, sondern da jede Färbung auch einen mehr oder minder starken Eingriff in die physiologischen Vorgänge der Zelle bedeutet, wird ebenfalls untersucht, welche Veränderungen die Leistungen der Zelle durch die Färbung erfahren. Mitbestimmend für die Ausführung solcher Versuche mag auch der Wunsch sein, die aus der Praxis der Vitalfärbung stammenden Angaben über grössere oder geringere „Giftigkeit“ der einzelnen Farbstoffe, durch exakte Aussagen über deren Wirkung auf die einzelnen Teilprozesse in der Zelle zu ersetzen. So sind auch die Versuche, über die im folgenden berichtet wird, in der Absicht unternommen worden, festzustellen, inwieweit die Atmung der Hefe durch Anfärbung der Zellen mit dem allgemein als unschädlich geltenden Neutralrot geändert würde.

Arbeiten, die über die Beeinflussung der Atmung botanischer Objekte durch Farbstoffe handeln, liegen mehrere vor, von denen hier nur die neueren von GENEVOIS (1928) und von ALBACH (1929b) erwähnt sein mögen. GENEVOIS findet bei Algen, dass durch die Anfärbung der Vakuolen eine je nach dem Farbstoff verschieden starke Steigerung der Atmung eintritt; die Grösse der Steigerung soll dabei mit der Höhe des Oxydations-Reduktionspotentials in Zusammenhang stehen, da Farbstoffe mit hohem Redoxpotential, wie Methylenblau, stärker wirken, als solche mit niederem (z.B.: Neutralrot). ALBACH bestätigt im Wesentlichen an *Elodea* die Feststellungen GENEVOIS' über die Beeinflussung der Atmung, zeigt aber weiter, dass sich die Änderung der Atmung durch Auswaschen des Farbstoffes wieder beseitigen lässt; auf weitere Ergebnisse seiner Arbeit soll später noch eingegangen werden.

Während nun die genannten Autoren verschiedene Farbstoffe benützten, auch etwa deren Konzentration änderten, wurde in meinen Versuchen nur Neutralrot 1 : 10000 verwendet, dagegen die H^+ -Konzentration als ein anderer die Färbung beeinflussender Faktor variiert. Ausserdem fand auch noch das Alter der Hefe Berücksichtigung, weil Vorversuche einen Einfluss auf die Atmungsgeschwindigkeit wahrscheinlich gemacht hatten.

Die Atmungsmessung geschah manometrisch mit einer Apparatur, deren allgemeine Beschreibung zu finden ist z.B. bei WARBURG (1926) und KREBS (1928). Es genügen daher einige spezielle Angaben: Die Versuche wurden

bei $20 \pm 0.05^\circ \text{C}$. ausgeführt. Verwendung fanden einfache Manometer, deren Atmungsgefäße einschliesslich der Kapillare bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit, ein Volumen hatten von 17.0—19.6 cc (ausgewogen mit Quecksilber). Die Atmungströge wurden für die Versuche mit 3.2 cc m/15 Phosphatlösung gefüllt, dann wurde 0.4 cc einer 10 % Glukoselösung zugesetzt und schliesslich 0.2 cc einer der Konzentration nach genau bekannten (meistens 8—10 %) Hefesuspension; das Volumen der Hefezellen war durch Zentrifugieren im Hämatokriten bestimmt worden. In den Einsatz des Atmungstrogos wurde 0.3 cc 5 % Kalilauge gegeben zur Absorption der Kohlensäure. Der Anhang des Atmungstrogos enthielt 0.2 cc 0.1 % Neutralrot (zur Injektion vitaler Gewebe n. EHRLICH, von GRÜBLER, Leipzig), das im geeigneten Zeitpunkt in den die Hefezellen enthaltenden Hauptraum hinübergespült werden konnte. Der Gasraum der Gefäße war mit Luft gefüllt. Die Gefässkonstante für die einzelnen Manometer betrug 1.20 bis 1.46, d.h. jeder mm abgelesener Druckunterschied entsprach einem Verbrauch von 1.20 bis 1.46 cmm Sauerstoff (0°C und 760 mm Hg). Ausser den fünf Versuchsmanometern wurde stets ein mit den gleichen Flüssigkeiten aber ohne Hefe versehenes Kontrollmanometer mitbenützt, dessen Ausschläge, allein durch Schwankungen der Temperatur und des Barometerdruckes verursacht, als Korrektur bei den Ausschlägen der Versuchsmanometer berücksichtigt wurden. Vor Beginn der Versuche wurden die Manometer zum Ausgleich der Temperatur und der Gase 30—50 Minuten im Thermostaten geschüttelt mit gleicher Schüttelgeschwindigkeit wie beim Versuch (110—120 Schwingungen pro Min.). Die Manometerausschläge wurden je nach der Grösse der Atmung alle 15, 20 oder 30 Minuten abgelesen. Differenzen der Atmungswerte bis zu etwa 5 % liegen für diese Versuchsanstellung innerhalb der Fehlergrenze. Die Hefezellen wurden nur von sehr schwachem, indirektem Lampenlicht getroffen.

Als Lösungen von bestimmter Wasserstoffionenkonzentration wurden solche von prim. Kaliumphosphat (m/15) und sec. Natriumphosphat (m/15), sowie Mischungen von beiden verwendet. Da die Pufferkapazität der betreffenden Lösungen verschieden ist, wurde untersucht, wie weit deren p_H durch den Versuch verschoben wird. Die kolorimetrische Bestimmung (im Bjerrumkeil) ergab: 5.1 (ca. 4.9), 5.8 (ca. 5.6), 6.2 (ca. 6.0), 6.9 (ca. 6.8) und 8.3 (ca. 7.9); die eingeklammerten Werte beziehen sich auf Messungen des p_H in der Suspensionsflüssigkeit nach vierstündigem Versuch (Hefezellen abzentrifugiert, Messung in überstehender, klarer Lösung). Die im folgenden genannten p_H -Werte sind die Mittel aus diesen Bestimmungen.

Alle Versuche wurden mit käuflicher Bäckerhefe ausgeführt, die gewaschen, in Leitungswasser suspendiert (ca. 10 % Suspension) und im Eisschrank bei 3—4° C aufbewahrt wurde; das Wasser wurde jeden Tag erneuert. Eine Bakterienentwicklung wurde nicht beobachtet; selbst nach mehrstündigen Versuchen bei 20° C ergab die mikroskopische Kontrolle höchstens im alkalischen Milieu das Vorhandensein von wenigen Bakterien,

die aber gegenüber der Menge der Hefezellen kaum in Betracht kamen für eine Änderung der Atmungsgrösse.

An Hand der folgenden Tabelle sollen vorerst die Ergebnisse der Atmungsmessungen an *ungefärbten* Hefezellen besprochen werden. Unter-

Tag \ p_H	5.0	5.7	6.1	6.9	8.1	cmm. verwendete Hefe	Vorperiode ca. min.
2.	7.1 100 100	7.4 100 104	7.0 100 98	7.0 100 98	6.2 100 87	7.0	60
6.	7.0 98 100	6.6 90 96	7.2 102 99	6.4 92 103	6.9 112 92	15.5	80
7.	6.8 95 100	6.8 91 100	6.8 97 100	6.9 99 102	6.5 105 96	6.5	60
10.	5.6 79 100	5.5 73 97	6.5 93 115	6.0 86 106	5.4 87 96	5.9	80
12.	5.8 81 100	5.8 78 100	6.1 87 104	6.1 87 104	5.7 92 97	10.3	70
13.	5.6 79 100	5.8 78 102	5.7 81 101	5.6 80 100	5.0 82 89	7.8	90
20.	4.5 63 100	4.4 59 97	4.8 69 107	4.2 60 94	4.5 73 100	7.8	75
Mittel	100	99.4	104.1	99.8	94.8		

sucht wurde die Abhängigkeit der Atmung von der Wasserstoffionenkonzentration zwischen p_H 5 und p_H 8.1 und ausserdem der Einfluss der Aufbewahrungsdauer auf die Atmung. Die Atmung wurde 60 bis 90 Minuten (s. Werte der letzten Kolonne) nach dem Einbringen der Hefe in die glukosehaltige Phosphatlösung bestimmt und zwar erst nachdem die Atmungsgeschwindigkeit konstant geworden war; die Messungen wurden dann über eine Stunde fortgesetzt. Die fettgedruckten Zahlen in der Tabelle sind die Atmungswerte pro Stunde und 1 cmm lebende Hefe.

Um die verschiedenen Versuche mit einander vergleichen zu können,

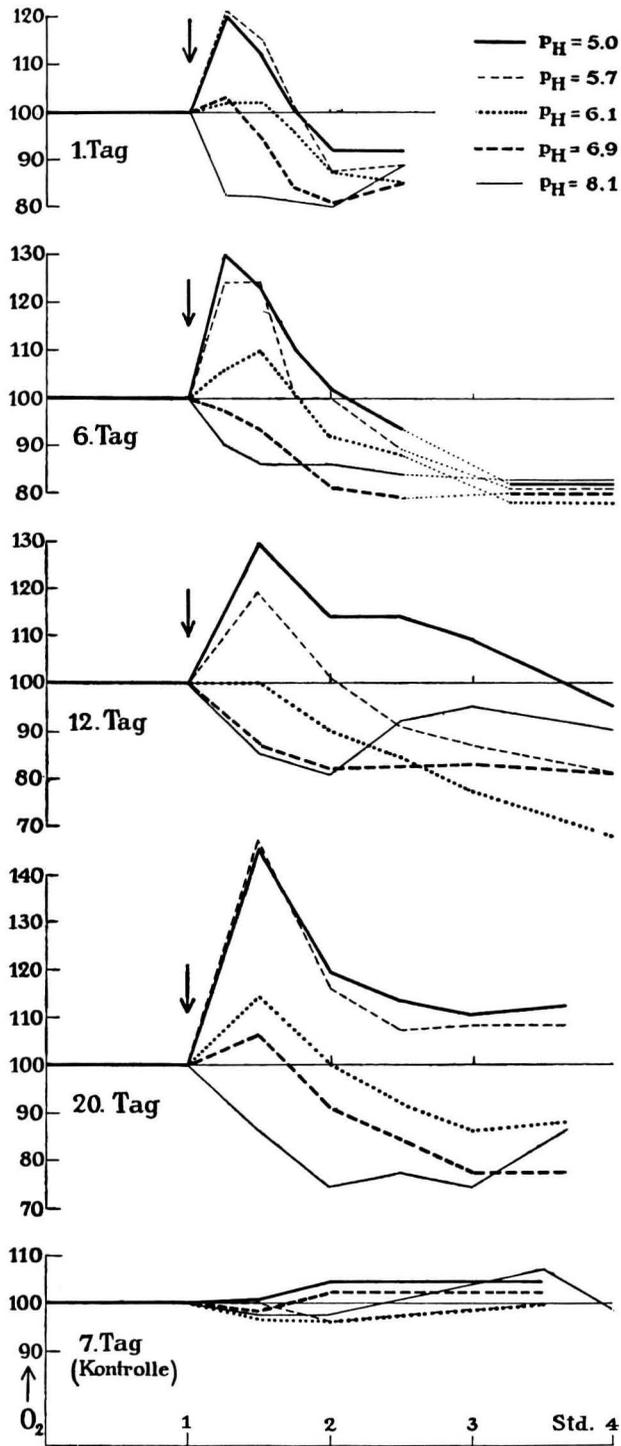
wurde der Atmungswert bei p_H 5 willkürlich gleich 100 gesetzt und die übrigen Werte des gleichen Versuches in Prozenten dieses Bezugswertes ausgedrückt. Wie man sieht, ändern sich die Atmungswerte kaum bei einer Verringerung der H^+ -Konzentration auf den tausendsten Teil (p_H 5 bis p_H 8), allenfalls kann aus den Zahlen eine Tendenz zum Abfallen der Atmung bei alkalischer Reaktion herausgelesen werden. Um nun festzustellen, ob sich dieses Verhalten der Hefeatmung mit der Dauer der Aufbewahrung ändert, wurden Versuche mit bis zu 20 Tagen bei 3—4° C aufbewahrter Hefe ausgeführt. Es ist ja denkbar, dass die Hefe durch das „Aushungern“ und die Aufbewahrung in elektrolytarmer Flüssigkeit¹⁾ die Pufferungsfähigkeit teilweise einbüsst und daher für die Atmung in Abhängigkeit von der H^+ -Konzentration schon zwischen p_H 5 und p_H 8 eine „Optimumkurve“ resultieren würde. Die zuletzt aufgeführten Versuche geben jedoch für eine solche Änderung der Abhängigkeit innerhalb 20 Tagen keine deutlichen Anhaltspunkte. Vergleichen wir noch die Mittel aus allen aufgeführten Messungen, so bestätigt sich das oben Gesagte über die Unabhängigkeit der Atmungsgeschwindigkeit von der H^+ -Konzentration zwischen p_H 5 und p_H 8.

Dagegen wirkt die *Aufbewahrungsdauer* deutlich erniedrigend auf die Atmung der Hefe ein. Nach 20 Tagen ist der Atmungswert auf rund 60—70 % des Anfangswertes gesunken (Werte rechts neben der fettgedruckten Zahl!), obwohl die in der Aussenlösung vorhandene Glukosekonzentration hoch genug ist, um die normale Atmungsgeschwindigkeit während der ganzen Dauer des Versuches zu gestatten.

Betrachten wir nun die Versuche mit *Neutralrotzusatz* (siehe Figur). Die Hefezellen befanden sich in glukosehaltiger Phosphatlösung von verschiedenem p_H . Nachdem die Vorperiode abgelaufen und die Manometerausschläge konstant geworden waren, wurde die Atmung während einer Stunde gemessen (2—4 Werte), dann die Neutralrotlösung aus dem Anhang des Atmungsgefäßes in den die Zellen enthaltenden Hauptraum hinübergespült (Konzentration des Neutralrots jetzt 1 : 10000) und die Druckänderungen in kurzen Intervallen über zwei bis drei Stunden verfolgt. Die Resultate einiger Versuche sind in der Figur in Kurven dargestellt: dabei wurde der mittlere Atmungswert [O_2 -verbrauch] der ersten Stunde vor Farbstoffzusatz für jedes p_H gleich 100 gesetzt und die spätern Werte in Prozenten dieser Bezugszahl ausgedrückt.

Der Versuch vom 1. Tag zeigt deutlich, dass sich die Atmung unmittelbar nach dem Farbstoffzusatz je nach dem Säuregrad der Lösung ganz verschieden verhält. Bei p_H 5.0 und 5.7 finden wir ein rasches Ansteigen um 20 %, dann fällt aber der Wert gegen Ende der ersten Stunde auf ca 90 %,

¹⁾ Nach freundlicher Mitteilung von Hrn. Prof. SCHOORL zeigt das Utrechter Leitungswasser folgende Mittelwerte: $x_{20} = 157.10^{-6}$, Fixa 112, Glühverlust 7.4, $KMnO_4$ -Verbrauch 1.4, Cl' 14, SO_4'' 4, HCO_3' 99, freies CO_2 8, SiO_2 10, CaO 38, MgO 5.4, O_2 8.5; alle Werte mit Ausnahme des ersten: mg per Liter.



Sauerstoffverbrauch von Bäckerhefe in Lösungen von verschiedenem Aciditätsgrade nach Zusatz von Neutralrot (↓).

um diese Höhe beizubehalten. Bei p_H 8.1 sinkt die Atmung sofort auf ungefähr 82 %, steigt dann aber gegen Ende des Versuches noch um etwa 7 % an. Die Atmung bei p_H 6.1 und 6.9 hält etwa die Mitte zwischen den genannten Extremen, erreicht aber zum Schluss des Versuches auch den Wert von 85 %. Es fällt bei Betrachtung dieses Versuches also auf: 1. dass kurz nach dem Farbstoffzusatz ein deutlicher *Gegensatz* herrscht zwischen der Atmung im sauren und alkalischen Milieu, 2. dass im Verlauf von etwa Kurz nach dem Farbstoffzusatz ein deutlicher *Gegensatz* herrscht zwischen der Atmung im sauren und alkalischen Milieu, 2. dass im Verlauf von etwa bei *allen* p_H -Stufen ungefähr die *gleiche* Grösse haben und 4. dass der gemeinsame Wert rund 10—15 % *niedriger* ist, als vor dem Farbstoffzusatz.

Noch deutlicher als im ersten Versuch tritt dies beim Versuch vom 6. Tag in Erscheinung, der — mit Unterbruch — auf vier Stunden ausgedehnt worden war. Man erhält hier stark den Eindruck, als ob die Farbstoffzugabe eine Störung der Sauerstoffaufnahme bewirkt habe, verschieden je nach dem Aciditätsgrade der Lösung, und dass sich die Störung allmählich wieder ausgleiche, indem die Atmung bei allen p_H -Stufen einen konstanten Wert annimmt, der etwa 20 % unter dem Anfangswert liegt.

Auch die Versuche vom 12. und vom 20. Tag zeigen prinzipiell das Gleiche, nur ist hier die „Störung“ grösser und wird nicht so schnell ausgeglichen; der gemeinschaftliche Wert wird wohl erst viel später, vielleicht im Versuch vom 20. Tag gar nicht mehr erreicht¹⁾.

Um zu erfahren, ob die beschriebenen Erscheinungen überhaupt mit der Zelltätigkeit in Zusammenhang stehen, wurden Versuche ausgeführt mit gleicher Zusammensetzung der Lösungen wie vorher, aber unter Weglassen der Hefezellen. Sofern die beschriebenen Veränderungen in der O_2 -Aufnahme etwa nur durch die Änderung der Löslichkeit des Sauerstoffes nach Zusatz des Neutralrots bedingt gewesen wären, hätten nun bei diesen „blinden“ Versuchen nach der Farbstoffzugabe Druckänderungen auftreten müssen; dies war jedoch *nicht* der Fall.

Es galt nun noch nachzuweisen, ob das allmähliche Absinken der Atmungswerte mit der Zeit nicht auf andere Ursachen als die Farbstoffzugabe zurückgeführt werden müsse, auf das Absterben von Hefezellen während des Versuches, auf die Erschöpfung des Atmungsmaterials oder auf eine Beeinflussung der Atmung durch die H^+ -Konzentration mit der Zeit (Zeitfaktorwirkung).

Zum ersten Einwand: Die Auszählung der nach der Methylenblau-methode (KOCH 1922) festgestellten toten Hefezellen ergab vor und nach den Versuchen die gleichen Werte (ca. 1—2 %).

Zum zweiten Einwand: Versuche bewiesen, dass wenn selbst 80 % der Glukose verbraucht würden, die noch vorhandene Zuckerkonzentration genügt, um die Atmung mehrere Stunden auf der maximalen Höhe zu

¹⁾ Die Versuche konnten aus methodischen Gründen nicht über längere Zeit ausgedehnt werden.

halten (Siehe auch Ergebnisse der Versuche zum folgenden Einwand).

Zum dritten Einwand: Versuche ergaben, dass die Atmungswerte während eines vier Stunden dauernden Versuches (ohne Neutralrot) innerhalb der Fehlergrenze konstant bleiben oder doch nur so wenig schwanken, dass die Ergebnisse bei Farbstoffzusatz damit nicht erklärt werden können; die Atmungswerte bei p_H 8.1 waren am ungleichmässigsten. Ein solcher Versuch ist in der Figur dargestellt (7. Tag), für einen weitem vom 19. Tag seien die Atmungswerte nach $3\frac{1}{2}$ Stunden Versuchsdauer für die fünf p_H -Stufen angegeben: 107, 109, 93, 97 und 104.

Nachdem die oben gemachten Einwände durch die eben mitgeteilten Kontrollversuche hinfällig geworden sind, darf man wohl annehmen, dass das *Neutralrot selbst den primären Anstoss zum Auftreten der betreffenden Erscheinungen gibt*. Da hauptsächlich eine Darstellung der experimentellen Befunde beabsichtigt ist, soll auf die Ursachen, welche für die verschiedene Beeinflussung der Atmung durch das Neutralrot kurz nach dessen Zugabe in Betracht kommen könnten, nicht eingegangen werden. Es mag nur an die bekannten Anschauungen (z.B. bei KOLTHOFF 1926) erinnert werden, wonach bei Farbstoffen von Indikator Natur, wie eben Neutralrot, das Verhältnis von ionogener zu normaler Form und damit auch die Konstitution und Farbe je nach dem Säuregrad ändert und daher eine *verschiedene* Einwirkung des Farbstoffes auf die Atmung bei wechselnder H^+ -Konzentration wohl verständlich erschiene.

Auch ALBACH (1929 b) beschreibt Versuche, bei denen er kurz nach der Einwirkung von Methylenblau eine starke Steigerung der Atmung wahrnahm. Bei Versuchen mit Neutralrot 1 : 10000 erhält er ebenfalls eine Atmungssteigerung, die sich aber über einige Stunden hinzieht, worauf dann die Atmung wieder zu fallen beginnt und nach 8 Stunden etwa den Normalwert erreicht. Eine „zweiphasische“ Wirkung (zuerst fördernd, dann hemmend), wie sie bei den zwei ersten vorliegenden Versuchen (p_H 5.0 und 5.7) deutlich zu sehen ist, scheint er dagegen nicht wahrgenommen zu haben¹⁾. Betrachten wir die Atmungswerte nach der ersten Stunde von der Farbstoffzugabe an (also nach dem Zustandekommen stationärer Verhältnisse), so besteht zwischen den Resultaten von GENEVOIS (1928) an *Algen* und von ALBACH (1929 b) an *Elodea* und den vorliegenden an *Saccharomyces* (Bäckerhefe) insofern eine Verschiedenheit, als die beiden genannten Autoren eine *Erhöhung* der Atmung finden nach Anfärbung mit Neutralrot; es scheinen sich demnach verschiedene Pflanzen gegenüber dem Farbstoffzusatz verschieden zu verhalten.

Es soll nun noch auf die mikroskopischen Beobachtungen eingegangen werden, die parallel mit den Atmungsmessungen gemacht wurden²⁾; das

¹⁾ ALBACH hat allerdings nach der Anfärbung die Farbstofflösung durch dest. Wasser ersetzt.

²⁾ In den Thermostaten versenkte Kolben mit Hefesuspension von gleicher Phosphat-, Glukose- und dann auch Neutralrotkonzentration wie in den Atmungsversuchen, erlaubten die fortlaufende mikroskopische Untersuchung.

Ergebnis war in allen Fällen prinzipiell gleich. Bei p_H 8.1, 6.9 und 6.1 tritt innerhalb kurzer Zeit nach der Farbstoffzugabe (oft nach einigen Minuten) eine deutliche Rosafärbung der Vakuolen auf, die rasch an Intensität zunimmt, sodass schliesslich die Vakuole tief orangerot gefärbt ist und einzelne Flecken von kräftig dunkelrotbrauner Farbe zeigt. Besonders rasch färben sich kleine, hellglänzende, dem Rande der Vakuole anliegende Körperchen oder Bläschen an (GUILLIERMOND 1930). Einige Male wurden bei p_H 8.1 auch gelbe Nadeln in der heller gewordenen Farbstofflösung beobachtet; anscheinend handelt es sich um auskristallisierten Farbstoff (ALBACH 1929 a).

Bei p_H 5.0 und 5.7 dagegen wurde *nie eine Anfärbung* der Vakuolen festgestellt, selbst nicht nachdem die Zellen einige Tage in der Lösung verblieben waren. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass allerdings bei allen p_H -Stufen Zellen gefunden wurden, deren *Protoplasma* angefärbt war. Ihre Anfärbung erfolgte jedoch sehr rasch und ausserdem stimmte ihre Zahl mit der durch die Methylenblauprobe gefundenen Zahl der vor dem Versuch toten Zellen überein.

Die über die Färbung gemachten Beobachtungen bestätigen also die schon verschiedentlich gemachte Erfahrung (Lit. bei ALBACH 1929 a), dass basische Farbstoffe in saurem Milieu schlecht oder gar nicht anfärben. Diese Ergebnisse gewinnen aber im Zusammenhang mit den Resultaten der Atmungsversuche besonderes Interesse. Wie wir gesehen haben, zeigt die Atmung in saurem Milieu nach der Farbstoffzugabe deutlich eine *Veränderung, obwohl ja ein Eindringen von Farbstoff in die Zellen nicht festgestellt werden konnte*¹⁾. Da nach dem oben Vorgebrachten eigentlich nur der Farbstoff als erste Ursache der Veränderung in Betracht kommen kann, in der Zelle aber kein Farbstoff zu sehen ist, so müssen wir doch in die Zelle eingedrungene, unsichtbare Spuren für die Wirkung verantwortlich machen, oder aber, wir verlegen den Ort der Beeinflussung an diejenige Stelle der Zelle, *wo sie auch im ungefärbten Zustand vom Farbstoff berührt wird: an die Grenzfläche Protoplasmamembran-Farbstofflösung*. Bei der Bedeutung, die dieser Zellort für die Atmung und andere Funktionen der Zelle hat, scheint eine Beeinflussung der Atmung von hier aus wohl möglich, umsomehr als an einen analogen Fall erinnert werden kann. WARBURG (1910) fand nämlich bei Seeigeleiern, dass deren Atmung durch Zusatz von OH-ionen zur Suspensionsflüssigkeit gesteigert wurde, obwohl er nachweisen konnte, dass die OH-ionen nicht in die Zelle eindringen. Man wird daher für diese Steigerung wohl nur eine Veränderung des physikalisch-chemischen Zustandes der Plasmahaut durch die OH-ionen als Ursache annehmen können.

Nun berichtet allerdings auch ALBACH (1929 b), dass er mit Eosin keine Anfärbung des Protoplasmas habe erhalten können, aber trotzdem eine

¹⁾ Neutralrot ist als zweifarbiger Indikator sowohl im alkalischen (gelborange), als im sauren Milieu (rot) gefärbt und besitzt das Umschlagsgebiet zwischen p_H 6.8 und 8.0.

Veränderung der Atmung gefunden habe und daher wohl doch geringe Mengen Farbstoff in die Zellen eingedrungen seien. Die oben dargestellten Versuche mit Neutralrot gehen nun insofern weiter, als mit dem *gleichen* Farbstoff, je nach dem Aciditätsgrad, eine Anfärbung oder auch keine Färbung erzielt werden konnte und dass zum Schluss, *unabhängig vom Färbeerfolg, eine quantitativ gleiche Atmungsbeeinflussung resultierte.*

Halten wir nun an der Anschauung fest, dass der Farbstoff nicht in die Zelle eindringt, sondern die Beeinflussung an der Grenzfläche stattfindet, so geht aus der *quantitativen* Übereinstimmung der Atmungshemmung bei gefärbten und ungefärbten Zellen hervor, dass ein Eindringen von Farbstoff in die Zelle, und vor allem die Anfärbung für eine Beeinflussung der Atmung *nicht nötig* ist. Bleiben wir dagegen bei der Ansicht, dass doch eingedrungene, wenn auch unsichtbare Farbstoffspuren verantwortlich sind, so geht wiederum aus der quantitativen Übereinstimmung der Atmungshemmung bei allen p_H -Stufen hervor, dass die für die Wirkung nötige Farbstoffkonzentration in der Zelle *nur sehr niedrig zu sein braucht* und *weiteres Eindringen und Speichern des Farbstoffes für die Wirkung unwesentlich ist*, da ja dadurch keine Verstärkung derselben mehr hervorgerufen wird.

Zusammenfassung: Atmungsversuche (manometrische O_2 -Messung) an Bäckerhefe bei $20^\circ C$ ergeben :

1. dass die Atmung zwischen p_H 5.0 und 8.1 unabhängig ist von der H^+ -Konzentration, dass dagegen die Atmung mit zunehmendem Alter der Hefezellen kleiner wird.
2. dass nach Zusatz von Neutralrot (1 : 10000) die Atmung im sauern Milieu rasch um 20—30 % ansteigt, im alkalischen Milieu um 10—20 % absinkt; etwa eine Stunde nach dem Farbstoffzusatz ist die Atmung bei allen p_H -Stufen gleich gross und beträgt nur ca. 80 % der Atmung ungefärbter Zellen.
3. dass mit zunehmendem Alter der Zellen die Veränderung der Atmung durch Farbstoffzusatz stärker wird und die Werte erst nach längerer Zeit zur Übereinstimmung kommen.
4. dass im sauern Milieu nach der Farbstoffzugabe eine Änderung der Atmung auftritt, obwohl eine Anfärbung der Zellen nicht zu erkennen ist. Es wird hierfür auf eine weitere Möglichkeit der Erklärung hingewiesen, nämlich auf eine Beeinflussung der Protoplasmagrenzschicht durch den Farbstoff.
5. dass für die Erreichung der Atmungshemmung eine Anfärbung der Zelle nicht notwendig ist; dies geht speziell aus der quantitativen Übereinstimmung der Atmungshemmung bei allen p_H -Stufen hervor.

Herrn Prof. Dr. F. A. F. C. WENT danke ich herzlich für die Erlaubnis in seinem Institut arbeiten zu dürfen, für die Beschaffung der Apparatur

und besonders auch für das Interesse, welches er der Arbeit stets entgegenbrachte.

L I T E R A T U R.

- 1929a. ALBACH, W.: Zellphysiolog. Unters. über vitale Protoplasmafärbung. — *Protoplasma* 5, 412—443.
- 1929b. ALBACH, W.: Mikrorespirometr. Unters. über d. Einfluss d. Vitalfärbung und d. Plasmolyse auf d. Atmung von Pflanzenzellen. *Protoplasma* 7, 395—422.
1928. GENEVOIS, L.: Coloration vitale et respiration. *Protoplasma* 4, 67—87.
1929. FÜRTH, R.: Die elektr. Charakteristik d. Lösungen, Farbstoffe und Biokolloide. *Kolloidchem. Beihefte* 28, 285—292.
1929. GICKLHORN, J.: Beobachtungen über d. vitale Farbstoffspeicherung. *Ebenda* 28, 367—382.
1929. GUILLIERMOND, A.: Nouvelles observ. sur la coloration vitale par le rouge neutre dans les cellules végétales. *C. R. Acad. Paris* 188, 813—815.
1930. GUILLIERMOND, A.: Recherches ultramicroscopiques sur les cellules végétales. *Rev. gén. bot.* 42, 196.
1924. HÖBER, R.: *Physikal. Chemie der Zellen und Gewebe*. 5. Aufl. Berlin.
1928. KELLER u. GICKLHORN: Methoden d. Bioelektrostatik. *Abderhaldens Handb. biol. Arbeitsmeth.* Abt. V, Teil 2, 1189—1280.
1922. KOCH, ALFR.: *Mikrobiolog. Praktikum*, Berlin.
1926. KOLTHOFF, I. M.: *Der Gebrauch von Farbindikatoren*, Berlin.
1928. KREBS, H. A.: Methoden der manometr. Messung van Atmung und Gärung, in: *Openheimer—Pincussen: Methodik der Fermentforschung*, Leipzig.
1926. MICHAELIS, L.: *Praktikum d. physikal. Chemie*, 3. Aufl. Berlin.
1927. MICHAELIS, L.: *Die Wasserstoffionenkonzentration*, 2. Aufl., Berlin.
1910. WARBURG, O.: Ueber Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen am Seeigellei. *Hoppe—Seyler Z. physiol. Chemie* 66, 305.
1926. WARBURG, O.: *Ueber den Stoffwechsel der Tumoren*. Springer, Berlin.

Utrecht, November 1930.

Botanisch Laboratorium.

On page 1064, lines 8 and 9 from the top paste the following lines:

einer Stunde die gesteigerte Atmung im stärkst sauern Milieu einer erniedrigten Platz macht, 3. dass nach etwa einer Stunde die Atmungswerte