

Die Wirkung des Chloroforms auf die Chlorophyllassimilation.

Von

K. v. Körösy.

Mit einer Abbildung im Text.

(Mitteilung aus der biologischen Abteilung des Rockefeller Institute for Medical Research.)
(Der Redaktion zugegangen am 17. Juli 1914.)

Cl. Bernard¹⁾ wies darauf hin, daß die Anästhetica (Narcotica) die verschiedensten Lebenserscheinungen zu hemmen befähigt sind; unter diesen beeinflussbaren Lebenserscheinungen führt er auch die Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen auf. Die Untersuchung dieser Wirkung der Narcotica bietet das besondere Interesse dar, daß es sich dabei um Beeinflussung eines Reduktionsprozesses par excellence handelt. Bei den Narkosewirkungen verlaufen häufig Funktionshemmung und Herabsetzung des Sauerstoffverbrauches zusammen. Daß dies aber keineswegs immer der Fall ist, zeigten Warburg²⁾ und Loeb und Wasteneys³⁾ für die Wirkung der Narcotica auf die Zellteilung des befruchteten Seeigeleies, und Loeb und Wasteneys⁴⁾ für die Narkose der Fischembryonen und Medusen. Diese Autoren konnten völlige Aufhebung der Funktion, d. h. völlige Narkose durch Chloroform und andere Narcotica herbeiführen, ohne daß die Geschwindigkeit der Oxydation verringert war. In dieser Arbeit, die auf Veranlassung von J. Loeb unternommen wurde, soll nun untersucht werden, ob das Chloroform seine assimilationshemmende Wirkung bei ähnlicher Konzentration ausübt, wie seine übrigen narkotischen Wirkungen.

Das vorhandene Tatsachenmaterial über diese Frage ist,

¹⁾ Bernard, Cl., *Leçons sur les phénom. de la vie*. Paris, Baillière 1885, Bd. 2, S. 278.

²⁾ Warburg, O., *Diese Zeitschrift*, Bd. 66, S. 305 (1910).

³⁾ Loeb, J., und Wasteneys, H., *Journ. Biol. Chem.*, Bd. 14, S. 517 (1913).

⁴⁾ Dieselben, *Bioch. Zeitschr.*, Bd. 56, S. 295 (1913).

wie aus der vollständigen Zusammenstellung der Literatur durch Czapek ersichtlich, sehr spärlich. Cl. Bernard selbst teilte seine Versuche nicht mit, nur das Resultat derselben. In den schönen Untersuchungen von Bonnier und Mangin¹⁾ kommt das Chloroform nur als eines der Mittel in Betracht, um zu zeigen, daß Assimilation und Respiration zwei unabhängige Prozesse sind. Kny²⁾ bediente sich der quantitativ nicht verwertbaren Bakterienmethode von Engelmann.

Treboux³⁾ untersuchte mit Hilfe der Blasen-zählmethode den Einfluß der verschiedensten Stoffe auf die Chlorophyll-assimilation. Vers. XV dieses Autors bezieht sich auf Chloroformwirkung; es wurde nacheinander die Wirkung verschiedener Konzentrationen auf dieselbe Pflanze untersucht: 0,005% hatte eine unbedeutende hemmende Wirkung, 0,01 und 0,05% eine etwas stärkere, während in 0,1% die Blasen-ausscheidung aufhörte. Treboux's fernere Angaben sind nur qualitativer Art. Die mit großer Sorgfalt durchgeführten Versuche von Irving,⁴⁾ in denen die CO₂-Produktion im Lichte und im Dunkeln, in reiner und chloroformhaltiger Luft untersucht wurde, beziehen sich eigentlich auf die Respiration; sie beweisen, daß Kegels⁵⁾ Beobachtungen auf einem Irrtum beruhen. Vers. XV von Irving zeigt, daß die Assimilation von Kirschchlorbeerblättern bei 0,0014 ccm Chloroform pro 1 Liter Luft herabgesetzt, und diese Herabsetzung nachher nur teilweise reversibel ist; bei 0,02 ccm Chloroform hörte die Assimilation, nach Vers. XVI, vollständig auf.

Zur systematischen Untersuchung dieser Frage wurde in meinen Versuchen die Blasen-zählmethode⁶⁾ gewählt. Dieselbe hat den großen Vorzug, daß mit ihr die Veränderung der Assimilationsintensität in kurzen Zeiträumen zu verfolgen ist. Black-

¹⁾ Bonnier, G., und Mangin, L., *Annal. d. scienc. natur.*, 7. série, *Botan.*, Bd. 3, S. 5 (1886).

²⁾ Kny, L., *Ber. bot. Ges.*, Bd. 15, S. 388 (1897).

³⁾ Treboux, O., *Flora*, Bd. 92, S. 49 (1903)

⁴⁾ Irving, A. E., *Annals of botany*, Bd. 25, II, S. 1077 (1911).

⁵⁾ Kegel, W., *Inauguraldissert.*, Göttingen 1905.

⁶⁾ Detmer, D. *kleine pflanzenphysiol. Prakt.*, II. Aufl., G. Fischer.

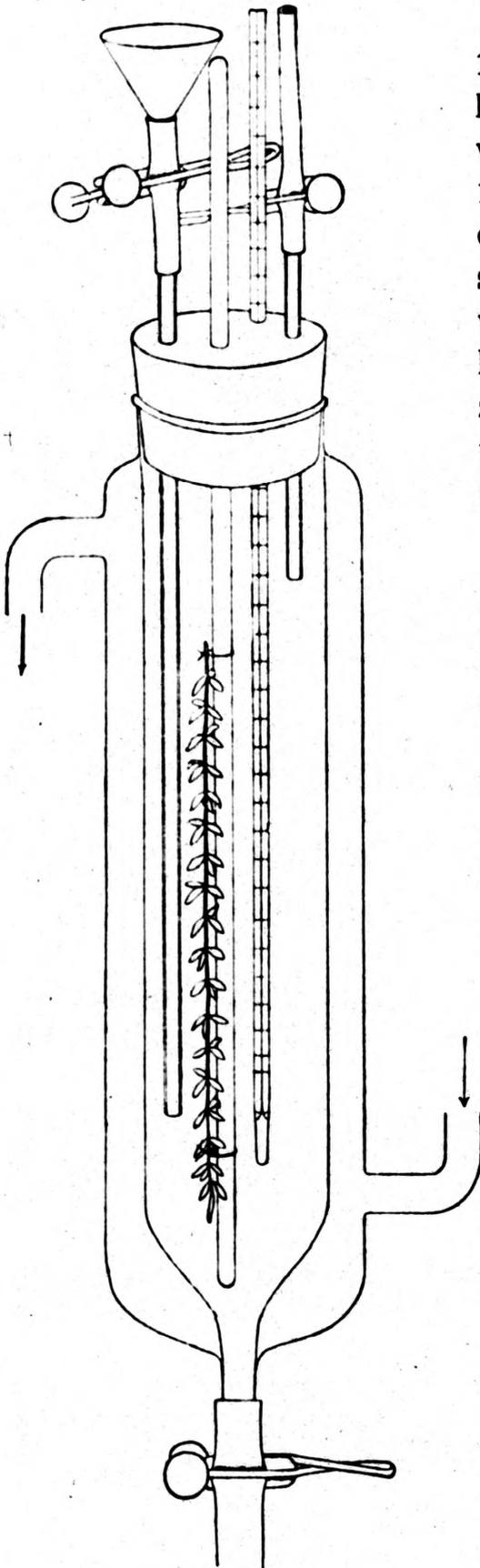
man und Smith¹⁾ teilten neuerlich eine sehr genaue Methode für Assimilationsuntersuchungen an Wasserpflanzen mit, bemerken aber selbst, daß dieselbe der Blasenzühlmethode nur bei extremen Graden der Beleuchtung, der Temperatur und des Kohlensäuregehaltes vorzuziehen ist. Als Versuchspflanzen dienten in meinen Versuchen ca. 10 cm lange Sprosse von *Elodea canadensis*; Blackman und Smith²⁾ machen darauf aufmerksam, daß die im Gewächshaus gehaltenen Pflanzen von *Elodea* an Assimilationsenergie einbüßen, aber daß gelegentlich auch ganz frische Pflanzen schwächer assimilieren, was für die von Blackman untersuchte absolute Assimilationsgröße von Bedeutung war. Da es für meine Versuche nur auf relative Werte ankam, war es erlaubt, meine Pflanzen im Gewächshaus zu kultivieren.

Es erfordert viele Umsicht und sehr genaues Arbeiten, um mit der Blasenzühlmethode verläßliche Werte zu erhalten. Von den vorhandenen Beschreibungen³⁾ der Arbeitsweise fand ich die Angaben Treboux's am genauesten. Besonders störend sind die Temperaturschwankungen, auch wenn sie verhältnismäßig gering sind. Um dieselben zu verhindern, war der Versuchszylinder doppelwändig (s. Fig. 1); durch den Mantel floß aus großen Behältern ständig Wasser von Zimmertemperatur. Trotzdem alle Lösungen im selben Zimmer standen, war es manchmal notwendig, die einzugießende Flüssigkeit etwas zu erwärmen oder abzukühlen. Der Versuchszylinder hatte unten einen Abfluß und war oben mit einem Gummistopfen verschlossen, um Verlusten an Kohlensäure vorzubeugen; durch vier Bohrungen desselben kamen ein Glasstab, an den der Sproß mit zwei Fäden lose befestigt war, eine Glasröhre zum Einlassen der Flüssigkeit, eine andere zum Entweichen der Luft und ein in Zehntel-Grade geteiltes Thermometer. Der Flüssigkeitswechsel konnte so mit der größten Schnelligkeit vor sich gehen, ohne die Lage des Sprosses zu ändern.

¹⁾ Blackman, F. F., und Smith, A. M., Proc. Roy. Soc. B., Bd. 83, S. 374 (1911).

²⁾ Dieselben, ebenda, Bd. 83, S. 389 (1911).

³⁾ Jacobi, B., Flora, Bd. 86, S. 289 (1899); Treboux, a. a. O.; Pantanelli, E., Jahrb. f. wissensch. Bot., Bd. 39, S. 167 (1903).



Als Lichtquelle diente eine 150kerzige Metallfadenlampe. Die Pflanzen standen in einem wechselnden Abstände von 10—40 cm von derselben, um eine möglichst günstige Geschwindigkeit der Blasenentwicklung zu erhalten. Um mit konstanter Kohlensäurekonzentration arbeiten zu können, wurde durch eine große Quantität von doppelt (über Glas) destilliertem Wasser eine Stunde lang ein starker Kohlensäurestrom aus einer Bombe geleitet. Dann wurde die Flasche mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen und die für den Versuch notwendigen Mengen kohlensäurehaltigen Wassers durch Einblasen eines schwachen Kohlensäurestromes gewonnen. Diese nicht vollständig gesättigte Kohlensäurelösung¹⁾ zeigte mit Phenolphthalein titriert einen nahezu konstanten Kohlensäuregehalt von durchschnittlich 0,11% (g CO₂ in 100 ccm Lösung). Diese Kohlensäurelösung wurde immer auf das fünffache verdünnt, so daß die Versuche

¹⁾ Blackman, F. F., und Smith, A. M., Proc. Roy. Soc., B. Bd. 83, S. 377 (1911).

mit einem Kohlensäuregehalte von 0,022% (= 11 Vol. %) ausgeführt wurden.

Die Sprosse wurden mit einer nicht zu scharfen Schere abgeschnitten und dem Vorschlage von Treboux folgend am folgenden, manchmal am zweitfolgenden Tage verwendet. Nicht alle Sprosse geben eine genügend gleichmäßige Blasen-ausscheidung; manchmal bilden sich am Schnittende Riesenblasen, denen für längere oder kürzere Zeit ein regelmäßiger Blasenstrom folgt, der aber dann schließlich doch immer unregelmäßig wird. Es müssen manchmal 3—4 Sprosse versucht werden, bis einer eine genügend gleichmäßige Blasenausscheidung gibt.

Es wurde mit einer Stoppuhr die Zeitdauer einer gewissen Blasenanzahl beobachtet; 11 Blasen bedeuten 10 Blasenintervalle. Zuerst wurde in reiner Kohlensäurelösung beobachtet, dieselbe zweimal gewechselt, um sicher zu sein, daß die Blasenanzahl genügend konstant blieb. Dann wurde die Versuchslösung eingefüllt, die ebensoviel Kohlensäure und wechselnde Mengen Chloroform enthielt. Um zu sehen, wie weit die durch die Chloroformlösung verursachte Veränderung reversibel ist, wurde schließlich wieder in reiner Kohlensäurelösung weiter beobachtet, und dieselbe nochmals gewechselt.¹⁾

Nach jedem Flüssigkeitswechsel muß man einige Zeit warten, bis die Blasenanzahl regelmäßig wird. Die hemmende Wirkung des Chloroforms setzt nicht auf einmal in ihrer vollen Größe ein, sondern verstärkt sich mit der Zeit. Die ursprüngliche Blasenanzahl kehrt in der Nachperiode desto später zurück, je stärker die Hemmung war. Manchmal scheint die Chloroformwirkung den Höhepunkt ihrer hemmenden Wirkung erst zu

¹⁾ Es wurde auch versucht, die Wirkung von Alkoholen auf die Assimilation von *Elodea* mit dieser Methode zu beobachten; geringe Konzentrationen waren ohne Wirkung, dann trat Zunahme der Blasenanzahl ein. In diesen Konzentrationen war aber die Oberflächenspannung merklich verändert; ließ ich Kohlensäure durch eine kleine Öffnung in Bläschen austreten, so traten in diesen Konzentrationen der Alkohollösungen mehr Blasen aus, als in Wasser, während in den gebrauchten Chloroformlösungen die Blasenanzahl unverändert blieb. Die Wirkung der Alkohole läßt sich also mit der Blasenanzahlmethode nicht bestimmen.

Beginn der Nachperiode zu erreichen. Da man die Nachperiode nicht unendlich ausdehnen kann, weil dann die Gefahr einer vom Versuche unabhängigen Änderung der Blasenanzahl immer größer wird, muß man die Chloroformperiode zu geeigneter Zeit unterbrechen. In Anbetracht dieser Umstände hat es keine Berechtigung, die erhaltenen Hemmungen in perzentuellen Werten auszudrücken. Versuch 17 möge als Beispiel dienen, wie konstant die Blasenabsonderung stundenlang bleibt.

Aus den mitgeteilten Versuchsprotokollen ist zu entnehmen, daß «Narkose» nur in einer engen Konzentrationsbreite vorkommt: eine 0,002-n-(Gr.-Molek. pro Liter Lösung) Chloroformlösung hat noch keine merkliche Wirkung, während sie von 0,01-n an vollständige Sistierung der Blasenabsonderung verursacht. Eine Ausnahme ist nur Versuch 16 (0,012-n), bei welchem die Blasenabsonderung während der ganzen Zeit unverändert fortläuft. Zwischen diesen 2 Konzentrationen, von 0,04—0,09-n, erhält man eine größere oder kleinere Hemmung. Dieselbe ist im allgemeinen reversibel, d. h. es liegt Narkose vor; in der Nachperiode zeigt sich nämlich die Wirkung in 6 Fällen von 9 reversibel, in einem siebenten Falle, bei Versuch 7, wurde der Rückgang nicht vollständig abgewartet. In Versuch 10, wo die Hemmung so stark war, daß sie als Nachwirkung zu einer vollständigen Sistierung führte, stellt sich trotzdem nach längerer Zeit ein Beginn der Blasenabsonderung ein. Nur in Versuch 4 zeigt sich gar keine Reversibilität. In den 0,010 und 0,011-n-Lösungen sistiert die Blasenabsonderung, und zwar in drei Fällen — für den beobachteten Zeitraum — auf eine irreversible Weise; in Versuch 12 stellte sich nach längerer Zeit eine schwache Blasenabsonderung ein.

Als Resultat ergibt sich also aus diesen Versuchen, daß Chloroformlösungen von 0,004—0,009-n, im Mittel 0,0062-n (0,074%) die Chlorophyllassimilation reversibel herabsetzen. Es ist dies dieselbe Konzentration, in der nach Loeb und Wasteneys Chloroform auf die Zellteilung¹⁾ (0,07%) und auf Fischembryonen²⁾ (0,07%) narkotisierend wirkt.

¹⁾ Loeb, J., und Wasteneys, H., Journ. Biol. Chem., Bd. 14, S. 521 (1913).

²⁾ Dieselben, Biochem. Zeitschr., Bd. 56, S. 302 (1913).

Versuchsprotokolle.

Normaldruck bedeutet reine Kohlensäurelösung, Fettdruck mit Chloroform versetzte Kohlensäurelösung. Die horizontalen Scheidelinien bedeuten Flüssigkeitswechsel. ∞ bedeutet keine einzige Blase in einer Minute. Die Zeiten oberhalb 60 Sek. sind von Beobachtungen einer geringeren Anzahl von Blasen auf die betreffende Blasenanzahl umgerechnet.

1.			2.			3.			4.			5.			6.		
0,002-n-Chloroform			0,002-n-Chloroform			0,004-n-Chloroform			0,004-n-Chloroform			0,005-n-Chloroform			0,006-n-Chloroform		
Zeit-	Blasen.	Temp.															
punkt	Sek.	o C.															
2 10	13	24,4	2 12	11	21,1	2 29	10	20,3	2 11	20	20,8	4 17	11	21,3	1 51	14	20,2
2 18	12	24,5	2 23	10	21,1	2 40	10	20,4	2 22	20	20,8	4 27	14	21,2	2 02	14	20,2
2 29	14	24,4	2 37	10	21,1	2 48	10	20,6	2 36	21	20,8	4 36	14	21,3	2 17	14	20,4
2 39	14	24,4							2 46	20	20,8	4 55	12	21,3	2 28	14	20,2
—	14	24,4	2 47	11	21,1	3 01	10	20,3	3 06	21	20,8	5 00	13	21,4	2 39	14	20,3
—	16	24,4	3 07	13	21,2	3 09	10	20,3	3 20	22	20,9	5 07	12	21,3	3 00	13	20,2
3 03	13	24,5	3 21	12	21,2	3 23	11	20,3	3 31	22	20,9	5 16	12	21,2	3 08	14	20,2
3 20	13	24,5	3 32	11	21,2	3 40	10	20,2	3 49	23	21,0	5 23	15	21,2	3 22	17	20,2
3 27	13	24,5	3 50	11	21,3	3 49	20	20,0	4 05	27	21,0	5 28	36	21,1	3 39	19	20,2
3 36	15	24,6	4 06	11	21,3	3 58	21	20,1	4 21	32	21,0	5 33	16	21,0	3 48	25	19,9
3 48	16	24,6	4 22	11	21,3	4 08	11	20,0	4 27	33	21,0	5 40	18	21,0	3 59	33	20,0
3 58	16	24,6	4 28	11	21,3	4 18	11	20,0	4 41	28	21,0	5 51	16	21,0	4 07	29	19,9
4 06	12	24,6	4 42	12	21,3	4 29	12	20,0	5 01	29	21,1	6 08	17	21,1	4 19	25	19,8
4 25	14	24,6	5 02	11	21,3	4 41	12	20,0	5 18	30	21,0	6 08	17	21,1	4 30	22	19,8
4 31	14	24,7	5 19	13	21,3	5 02	15	20,0	5 31	30	21,0	6 19	15	21,0	4 42	21	19,8
4 38	14	24,6	5 32	11	21,3	5 15	14	20,0	5 46	31	20,9	6 38	13	21,1	5 03	20	19,8
5 32	11	24,7							6 10	30	21,0	6 45	13	21,1	5 14	14	20,0
									6 19	30	20,8	6 56	10	21,0	5 25	14	19,9
									6 34	30	20,8				5 35	13	19,9
									6 41	31	20,8				5 47	12	19,9
															5 48	13	19,8

7.			8.			9.			10.			11.			12.		
0,006 n-Chloroform			0,006 n-Chloroform			0,008 n-Chloroform			0,008 n-Chloroform			0,009 n-Chloroform			0,010 n-Chloroform		
Zeitpunkt	11 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	21 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	21 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	3 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	11 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	6 Blasen. Sek.	Temp. ° C.
4 08	28	21,7	2 10	18	20,8	11 28	11	20,5	4 28	20	22,1	10 37	12	20,8	9 47	17	20,4
4 18	31	21,6	2 21	17	20,8	11 39	12	20,6	4 38	19	22,1	10 44	13	20,8	10 06	15	20,4
4 28	29	21,6	2 34	17	20,8	11 56	12	20,7	4 52	18	22,2	11 09	11	20,9	10 16	15	20,5
4 37	29	21,7	2 46	17	20,9	12 10	8	20,8	4 58	19	22,2	11 29	11	20,9	10 25	15	20,6
4 49	37	21,6	3 05	18	20,9	12 23	8	20,9	5 10	17	22,1	11 40	10	21,0	10 34	15	20,6
4 58	40	21,7	3 19	15	20,9	—	10	21,0	5 10	17	22,1	11 57	11	21,1	10 38	18	20,6
5 01	47	21,6	3 30	17	20,9	—	11	21,0	—	17	22,3	11 57	11	21,1	10 45	17	20,6
5 08	41	21,6	3 48	20	21,0	12 52	11	21,0	5 30	28	22,1	12 10	10	21,2	11 10	17	21,7
5 15	40	21,6	4 04	22	21,0	1 00	13	21,0	5 42	51	22,2	12 24	15	21,4	11 30	18	21,8
5 22	41	21,5	4 26	25	21,0	1 10	16	21,0	5 56	53	22,2	—	44	21,5	11 41	17	21,8
5 29	38	21,4	4 40	22	21,0	1 22	18	21,0	6 13	∞	22,1	12 53	26	21,4	11 58	∞	—
5 41	41	21,4	5 00	22	21,1	1 34	12	21,2	6 27	∞	22,2	1 01	22	21,5	12 10	∞	—
5 56	37	21,4	5 17	22	—	1 58	17	21,1	6 42	*)	22,2	1 11	19	21,5	12 25	∞	—
6 09	36	21,3	5 30	19	21,1	2 12	13	21,1	6 56	119	22,2	1 23	14	21,5	12 54	107	21,3
			6 09	20	20,9	2 19	12	21,2				1 35	13	21,6	1 02	112	21,3
			6 18	20	20,9	2 26	12	21,1				1 59	13	21,6	1 12	93	21,3
			6 33	19	20,9										1 24	86	21,4
			6 40	19	20,8												

*) 1 Blase in 60 Sek.

13. 0,010-n-Chloroform			14. 0,010-n-Chloroform			15. 0,011-n-Chloroform			16. 0,012-n-Chloroform			17. Ohne Chloroform		
Zeitpunkt	11 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	11 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	21 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	4 Blasen. Sek.	Temp. ° C.	Zeitpunkt	11 Blasen. Sek.	Temp. ° C.
4 17	9	21,8	3 07	11	20,1	3 07	14	21,4	5 11	33	22,0	2 13	14	21,0
4 27	10	21,8	3 21	12	—	3 18	15	21,3	—	29	22,1	2 24	14	21,0
4 37	11	21,8	3 38	10	20,0	3 27	15	21,4	—	29	22,1	2 38	14	21,0
4 51	7	21,8	3 47	12	19,9	—	17	21,4	5 31	29	22,1	2 48	14	21,0
4 57	10	21,8	4 01	13	19,9	—	17	21,3	—	—	—	3 08	15	21,1
5 09	8	21,8	4 06	11	19,9	—	—	—	5 43	32	22,0	3 22	14	21,2
5 29	9	21,8	4 20	12	19,8	3 54	16	21,3	—	—	—	3 38	14	21,2
5 41	26	21,7	4 31	20	19,8	4 09	∞	21,4	5 57	32	22,0	3 51	13	21,2
5 51	∞	21,8	4 37	35	19,8	4 19	∞	21,4	—	—	—	4 07	14	21,3
5 58	∞	21,8	4 43	∞	19,8	4 29	∞	21,3	6 14	34	22,0	4 23	14	21,3
6 12	∞	21,8	4 50	∞	19,8	4 38	∞	21,4	—	—	—	4 29	13	21,3
6 26	∞	21,8	5 04	∞	19,8	4 50	∞	21,3	6 29	29	22,1	4 43	12	21,3
6 40	∞	21,8	5 18	∞	19,8	5 09	∞	21,3	6 37	27	22,0	5 03	14	21,3
7 08	∞	21,7	5 24	∞	19,8	5 30	∞	21,1	—	—	—	5 20	15	21,3
			5 46	∞	19,8	—	—	—	6 51	27	22,0	5 33	12	21,3