

# WEITERE STUDIEN ÜBER DEN EINFLUSS DES pH AUF DIE OSMOTISCHEN PHÄNOMENE DER ZELLE<sup>1)</sup>

Von JOSE MARIA SUSAFETA, Vitoria (Spanien)

(Aus der Station Zoologique de Wimereux)

Mit 4 Textfiguren

Eingegangen am 1. Mai 1928

Ich sagte schon an früherer Stelle<sup>2)</sup>, daß wir heute besonders durch die Arbeiten von Procter, Wilson, Loeb und Pauli wissen, daß die Eiweißlösungen große Veränderungen ihres osmotischen Druckes, ihrer Viskosität, elektrischen Ladung, Quellung usw. ergeben, wenn wir den Wert des pH derselben variieren lassen. Hier interessiert uns vor allem die Variation des osmotischen Druckes der Eiweißlösungen je nach dem Wert ihrer Wassertoffionenkonzentration. Wir können an dieser Stelle die bisherigen Erklärungsversuche dieser Variation nicht alle wiedergeben. Wir wollen uns darauf beschränken, die Meinungen von Pauli und Loeb darüber ganz kurz zu besprechen. Pauli glaubt, daß bestimmte Werte vom pH die Ionisierung und Hydratisierung der Eiweißstoffe begünstigen und daß dieselben durch diese Wirkung einen stabilen hohen Dispersitätsgrad erreichen. Dadurch erklärt er die Vergrößerung, welche in dem osmotischen Druck der Eiweißlösungen hervorgerufen wird, wenn sie eine bestimmte Konzentration von Wasserstoffionen besitzen. Loeb glaubt dagegen, daß die Eiweißstoffe, welche sich in Lösung befinden, in Anwesenheit von Säuren und Alkalien, sich mit diesen nach den Gesetzen der klassischen Chemie verbinden. Er ist der Meinung, daß man kein Phänomen der Kolloidchemie, wie Vergrößerung in dem

---

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde in der „Station Zoologique de Wimereux“ Frankreich gemacht; für das große Entgegenkommen, das ich dort fand, möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Caullery meinen besten Dank aussprechen.

<sup>2)</sup> L'influence du pH sur les changements osmotiques cellulaires „Bulletin Biologique de la France et de la Belgique, T. L. XI, fase 2, pag. 143 à 162, 1927.

Dispersitätsgrad oder in der Hydratisierung der Teilchen usw., heranzuziehen braucht, sondern nur das Donnan'sche Phänomen in Betracht kommt, wenn man die Variationen der Eigenschaften der Eiweißlösungen, hervorgerufen durch Veränderung ihres pH-Wertes, erklären will.

Da das Protoplasma sehr reich an Eiweißstoffen ist, konnte man voraussetzen, daß sein innerer osmotischer Druck sich verändern müsse, wenn wir die Konzentration der Wasserstoffionen der äußeren Flüssigkeit und dadurch vielleicht auch seinen eigenen pH-Wert variieren lassen. Wir haben tatsächlich folgendes finden können: Die Spermatozoiden des *Carcinus moenas* haben normalerweise die Gestalt Fig. 1 a, wenn man sie im Seewasser im Profil betrachtet. Wenn wir sie aber in destilliertes Wasser oder in eine hypertonische Lösung bringen, fangen sie gleich an zu quellen und bekommen die Gestalt Fig. 1 b, c, d, e und

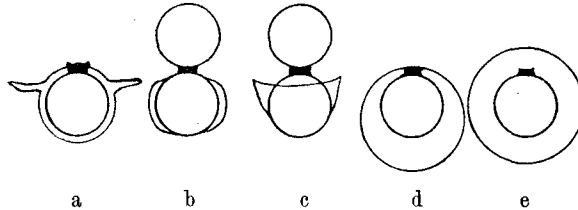


Fig. 1

- a: Normale Gestalt der Spermatozoiden des *Carcinus moenas* im Profil betrachtet.  
 b, c, d, e: Gestalten der aufgeblähten Spermatozoiden des *Carcinus moenas*.

platzen zum Schluß<sup>1)</sup>. Wenn wir uns nun verschiedene Lösungen von Glukose in destilliertem Wasser bereiten und die Spermatozoiden hineinbringen, werden wir beobachten können, daß, je größer die Konzentration der Glukose ist, desto geringer die Anzahl der aufgeblähten Spermatozoiden vom Aussehen der Fig. 1 b, c, d oder e ist. Wir können die Lösung aussuchen, in welcher 50% von normaler Gestalt und 50% geplatzt Spermatozoiden (besonders die Formen b oder c) vorhanden sind. Eine solche Lösung enthält ungefähr 2,73% Glukose. Wir können jetzt denselben Versuch machen mit einer  $\frac{n}{100}$  HCl-Lösung. In dieser Lösung platzen alle Spermatozoiden; wenn wir aber allmählich Glukose hinzufügen, wird die Anzahl der geplatzen Spermatozoiden verringert und wenn wir nun die Lösung suchen, in welcher 50% normaler und 50% geplatzt Spermatozoiden vorkommen, werden wir finden, daß eine

<sup>1)</sup> Den Einzelheiten dieses Phänomens haben wir uns in einer anderen Arbeit gewidmet.

solche Lösung mit  $\frac{n}{100}$  HCl, 4,52% Glukose enthält, d. h. um 1,79% konzentrierter ist, als die Lösung von Glukose, welche in destilliertem Wasser dasselbe osmotische Gleichgewicht aufweist. Man könnte für möglich halten, daß die HCl der sauren Lösung in die Spermatozoiden eindringt und ihren inneren osmotischen Druck vergrößert, gleich dem Wert, der 1,79% Glukose entspricht dem unserer  $\frac{n}{100}$  HCl. Diesen letzteren Betrag müssen wir auch für den osmotischen Wert der äußeren Flüssigkeit in Rechnung bringen.

Voriges Jahr hatten wir uns vorgenommen, das osmotische Gleichgewicht mit verschiedenen Mengen NaCl und verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffionen zu studieren. Wir stellten die Spermatozoiden des *Carcinus moenas* in  $\frac{n}{10}$ ,  $\frac{n}{10^2}$ ,  $\frac{n}{10^3}$ ,  $\frac{n}{10^4}$ ,  $\frac{n}{10^5}$ ,  $\frac{n}{10^6}$  HCl- und in  $\frac{n}{10^6}$ ,  $\frac{n}{10^5}$ ,  $\frac{n}{10^4}$ ,  $\frac{n}{10^3}$ ,  $\frac{n}{10^2}$ ,  $\frac{n}{10}$  NaOH-Lösungen, d. h. Lösungen, deren pH ungefähr 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ist. Diesen Lösungen haben wir verschiedene Mengen von NaCl hinzugefügt, bis sie 50% normale und 50% geplatze Spermatozoiden aufwiesen. Wir erzielten eine Kurve, die wir in einer früheren Arbeit dargestellt haben.

Es interessierte uns, dieses Jahr folgende Fragen zu lösen:

1. Ob unsere Kurve auch richtig ist, wenn man das NaCl durch einen nichtelektrolyten Stoff ersetzt.

2. Ob die Wertigkeit der Säuren bzw. der Alkalien, welche wir zur Erreichung der verschiedenen pH-Werte unserer Lösungen benutzen, einen Einfluß ausübt, da Loeb uns gezeigt hat, daß diese sehr wichtig ist für das Studium der Variationen des osmotischen Druckes der Eiweißlösungen.

3. Wollen wir diesmal den osmotischen Druck unserer Lösungen durch ihre Gefrierpunktserniedrigung, also durch den Wert  $\Delta$  ableiten, anstatt diesen Druck durch die Formel von Renner zu berechnen, wie wir es voriges Jahr gemacht haben<sup>1)</sup>. In dieser Arbeit haben wir NaCl durch Glukose ersetzt. Außerdem haben wir bei einer Reihe anderer Versuche die zweiwertige  $H_2SO_4$  anstatt HCl benutzt. Wir haben stets die Glukose, rein und wasserfrei, von Poulenc benutzt. Dieser Stoff hat gegenüber dem NaCl den Vorteil seines höheren Molekulargewichts. Dieser Umstand hat zur Folge, daß die Unterschiede in den Konzentrationen der Lösungen von verschiedenem pH, welche dieselben osmotischen Wirkungen ausüben, viel größer und dadurch viel leichter zu

<sup>1)</sup> Wir verdanken die Anregung der Freundlichkeit des Herrn Prof. Dalcq aus Brüssel.

beobachten sind. Bei Benutzung von NaCl haben wir Unterschiede dieser Werte um 0,75% gefunden. Bei Benutzung von Glukose findet man Abweichungen von 2,9%. Diese größere Empfindlichkeit hat uns erlaubt, unsere Kurven an drei Stellen zu verbessern, während wir sonst im Grunde unsere früheren Beobachtungen nur haben bestätigen können. In beiden Fällen sieht man die Kurven parallel laufen, was soviel bedeutet, daß die Variationen des inneren osmotischen Druckes der Spermatozoiden nur von dem Werte des pH und der Valenz der Säuren oder der Alkalien abhängig ist und nicht von dem Stoff, welchen wir als Maß desselben Druckes benutzen. Wir hätten vielleicht die Glukose ersetzen können durch einen anderen organischen Stoff von höherem Molekulargewicht, doch muß man darauf bedacht sein, daß dieser Stoff von der Säure oder dem Alkali, welche wir hinzufügen, nicht zerstört wird. Da wir aber sehr leicht die reine und anhydre Glukose von Poulenc erhalten konnten, haben wir nur sie für unsere Versuche benutzt.

Wie gesagt haben wir, um den Wert des osmotischen Druckes unserer Lösungen kennen zu lernen, ihre Gefrierpunktserniedrigung bestimmt und dann von dem Wert  $\Delta$  durch die bekannte einfache Formel

$$Pt = 12,05 \cdot \Delta \cdot \frac{273 + t}{273 - \Delta}; \quad (t = 18^{\circ}) \text{ den osmotischen Druck abgeleitet.}$$

Es ist die einfachste und genaueste indirekte Methode, welche uns zur Verfügung steht, um den osmotischen Druck einer Lösung, welche verschiedene Stoffe enthält, zu berechnen. In unseren Lösungen hatten wir außer Glukose eine bestimmte Menge HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder NaOH, welche bei den Konzentrationen  $\frac{n}{10}$  und  $\frac{n}{100}$  für den osmotischen Druck der Lösungen in Betracht gezogen werden muß. Dagegen kann man bei den Konzentrationen  $\frac{n}{1000}$  und  $\frac{n}{10000}$  usw. die Menge der Säuren und Alkalien vernachlässigen.

Durch diese kryoskopische Bestimmung haben wir folgende Versuche machen können: Wir suchten die Konzentration der Lösungen von NaCl, Glukose und Seewasser, welche die 50% der Spermatozoiden desselben Individuum von *Carcinus moenas* platzen lassen. Die gefundenen Konzentrationen waren: Für das Seewasser 1 ccm in 6,5 ccm destilliertem Wasser, dessen  $\Delta = 0,64$  ist. Für Glukose ungefähr 2,5 Gewichtsprozent in destilliertem Wasser, deren Wert  $\Delta = 0,64$  ist. Für NaCl wurde ungefähr 0,71%, deren  $\Delta = 0,62$  ist. Man sieht, daß die drei Lösungen, obwohl sie in ihrer Zusammensetzung ganz verschieden sind, fast dasselbe  $\Delta$  besitzen, also isotonisch sind. Wir meinen durch diese

Versuche die Ansichten der Forscher bestätigt zu finden, welche wie Koltzoff und Bindford an demselben Material auch zum Schluß gekommen sind, daß das Phänomen des Platzens der Spermatozoiden des *Carcinus moenas* in Lösungen von verschiedenen Konzentrationen nur abhängig ist von dem osmotischen Druck dieser Lösungen. Damit schließen sich diese Versuche den Untersuchungen anderer Forscher über Turgor und Plasmolyse an.

Der kleine Unterschied bei dem  $\Delta$ -Wert der Lösung von NaCl ist leicht zu erklären, wenn man bedenkt, daß wir der Einfachheit halber Präparate als die gleichen betrachten, in welchen wir 45,1 bis 54,9% normaler oder geplatzter Spermatozoiden vorfinden, und bezeichnen sie als Präparate mit 50% Inhalt.

Die Spermatozoiden des *Carcinus moenas* sind für diese Versuche ein ausgezeichnetes Material, da wir sie sehr leicht bekommen können und weil sie sehr klein sind (4  $\mu$ , 5  $\mu$ ) und wir in demselben Präparat mehrere Hundert beobachten können und deshalb eine große Sicherheit in der statistischen Berechnung erreichen. Es ist aber nötig, hier noch auf einen Punkt aufmerksam zu machen. Da die Crustaceen zu den Tieren gehören, welche einen veränderlichen osmotischen Druck in ihren Säften haben, müssen wir, wenn wir osmotische Studien über ihre Spermatozoiden machen wollen, die Wirkung der betreffenden Lösung mit einer Standard-Lösung von Glukose, NaCl usw. in destilliertem Wasser vergleichen. Die Konzentration von NaCl, in der 50% der Spermatozoide verschiedener vollkommen normaler Tiere platzen, kann zwischen 0,60 bis 0,70% variieren, die betr. Lösung von Glukose zwischen 2,5 bis 3%. Die Konzentration der Lösung, welche das Platzen der 50% der Spermatozoiden hervorbringt, bleibt aber für jedes Individuum unverändert, wenigstens am Tage des Versuches. Deshalb kann uns die Wirkung einer unbekanntem Lösung auf die Spermatozoiden nichts besagen, wenn wir sie nicht vergleichen mit der Wirkung einer Standard- oder einer bekannten Lösung.

Unsere Technik ist sehr einfach und schon in unserer früheren Arbeit sehr eingehend beschrieben worden. Man sucht einen großen männlichen *Carcinus moenas* aus. Diese großen Individuen besitzen auch große Mengen von freien Spermatozoiden, die sehr geeignet für unsere Versuche sind. Man schneidet ihn auf, hebt den oberen Teil der Schale ab und kann nun die ganzen Geschlechtsorgane sehen. Man schneidet einen kleinen Teil aus ihrer Mitte heraus, da, wo die Samenröhrchen

mehr eingerollt sind. Dort sind die Spermatozoiden noch frei und nicht in die Spermatophoren eingeschlossen, was zum guten Erfolg des Versuches notwendig ist. Dieses Stückchen legt man in Seewasser. Vorher hat man die Lösung vorbereitet, die man studieren will. Der Objektträger des Zeißschen Blutkörperzahlapparates muß ganz sauber und trocken sein. Wir benutzen diesen Objektträger, um die Zählung der normalen und geplatzen Spermatozoiden zu erleichtern. Von dem in Seewasser gelegten Stück schneiden wir ein kleines Teilchen ab und legen es auf Löschpapier, um es sehr rasch von dem Seewasser zu befreien. Ganz sauber zerreiben wir es auf dem Objektträger, um die Spermatozoiden frei zu machen und entfernen die groben Stücke, welche nicht auf demselben festgeklebt sind. Auf diesen Zellbrei tun wir schnell vier oder fünf Tropfen unserer Lösung und mischen mit einer ganz sauberen Nadel alles gut, dann fügen wir noch fünf weitere Tropfen hinzu und legen ein Deckglas darauf. Nach 5 Minuten können wir schon durch das Mikroskop das Präparat beobachten. Wir haben dazu das Objekt 9 und den Okular 6 oder 4 von Leitz benutzt. In jedem Quadrat des Objektträgers ( $\frac{1}{400}$  qmm) kann man die Anzahl der normalen und geplatzen Spermatozoiden zählen. Man zählt ungefähr 150 und berechnet den Prozentsatz von beiden Arten. Wir haben beobachtet, daß — hat man die richtige Lösung gefunden, also die Lösung, welche 50% von jeder Art enthält — dieses Verhältnis ein oder zwei Tage unverändert bleibt. Es handelt sich um ein stabiles osmotisches Gleichgewicht.

Da es notwendig ist, Lösungen von verschiedener Konzentration genauestens und rasch zu bereiten, machten wir folgendes: Wir bereiteten eine genaue 5prozentige Glukoselösung und nahmen davon eine kleine Menge in eine Bürette, während wir in einer anderen destilliertes Wasser hatten. Vorher hatten wir schon ausgerechnet, welche Menge wir zur Mischung von den beiden für eine bestimmte Konzentrierung nötig haben. Auf diese Weise erhalten wir am schnellsten und genauesten 5 ccm von jeder beliebigen Lösung. Zu gleicher Zeit haben wir in einer weiteren Bürette eine 5% Glukoselösung in destilliertem Wasser plus der Säure oder dem Alkali, welche nötig sind, um ein bestimmtes pH der Lösung zu erreichen, in einer zweiten destilliertes Wasser mit demselben pH. So können wir die Wirkung von zwei verschiedenen Lösungen auf Spermatozoiden desselben Individuums beobachten: Die eine ist eine Glukoselösung und die andere eine solche von

derselben Konzentration von Glukose mit verschiedener Wasserstoffionenkonzentration.

Bei allen Operationen ist die peinlichste Sauberkeit erforderlich, weil wir stets nur mit kleinen Mengen Flüssigkeit arbeiten, und ein einziges kleines Tröpfchen einer anderen Lösung oder von Seewasser das ganze Ergebnis vernichten kann. Besonders muß man die Spermatozoiden von Seewasser gründlich befreien, und den Objektträger jedesmal vollkommen trocken und sauber halten. Mit einem großen *Carcinus moenas* kann man nur 4—5 gute Präparate erzielen, da der Teil, welcher die freien Spermatozoiden enthält, sehr klein ist. Wenn diese in den Spermaphoren eingeschlossen sind, erleiden sie eine Veränderung, welche sie widerstandsfähiger gegen die osmotischen Variationen macht. Deshalb dürfen wir nicht solche Präparate annehmen, welche neben den freien Spermatozoiden auch Spermaphoren enthalten, da es sehr leicht möglich ist, daß in diesem Falle durch das Zerreiben der Spermaphoren die Spermatozoiden frei werden und so ein ganz anderes Verhalten aufweisen.

Um nun das Bild dieser Einzelheiten der Technik abzurunden, wollen wir den Gang der Operationen an einem beliebigen Tage schildern. So z. B. den Versuch, in welchem wir die Verdünnung des Seewassers, welche das Platzen von 50% der Spermatozoiden verursachte, suchten.

In den ausprobierten Verdünnungen ergab sich folgendes Resultat:

1. Seewasser 1 ccm + destilliertes Wasser 3 ccm — keine geplatzen Spermatozoide; für unsere Zwecke ist also die Lösung zu konzentriert.
2. Seewasser 1 ccm + 4 ccm destilliertes Wasser — alle Spermatozoiden bleiben stets normal; die Verdünnung zu konzentriert.
3. Seewasser 1 ccm + 8 ccm destilliertes Wasser — 67% platzen, die Lösung ist zu stark verdünnt.
4. Seewasser 1 ccm + 6 ccm destilliertes Wasser — 44% platzen, die Lösung ist noch ein wenig zu konzentriert.
5. Seewasser 1 ccm + 7 ccm destilliertes Wasser — 57% platzen.
6. Seewasser 1 ccm + 6,5 ccm destilliertes Wasser — 52% platzen.

Diese ist für unsere Zwecke die einzig richtige Verdünnung.

Genau so verfahren wir bei Mischungen unserer 5proz. Glukoselösung mit destilliertem Wasser und erprobten gleichzeitig und mit den gleichen Individuen auch Mischungen unserer 5proz. Glukoselösung mit variiertem pH und von destilliertem Wasser mit demselben pH.

### Ergebnisse

Wir wollen die Ergebnisse in einer Tabelle und in drei Kurven wiedergeben.

Übersichtstabelle

Konzentrationen der Säure oder der Base	HCl						H <sub>2</sub> O	NaOH					
	$\frac{n}{10}$	$\frac{n}{10}^2$	$\frac{n}{10}^3$	$\frac{n}{10}^4$	$\frac{n}{10}^5$	$\frac{n}{10}^6$		$\frac{n}{10}^6$	$\frac{n}{10}^5$	$\frac{n}{10}^4$	$\frac{n}{10}^3$	$\frac{n}{10}^2$	$\frac{n}{10}$
Entsprechende Werte des pH . . . .	1,07	2,02	3,01	4,01	5	6	7	8	9	10	11,13	12,12	13,07
Wert der Konzentrationen der Glukose in Prozenten . .	1,56	4,52	4,40	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	4,35	4,50	1,75
Werte $\Delta$ der Lösungen . . . .	0,50	0,62	0,55	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,53	0,60	0,48
Der osmotische Druck der Lösungen in Atmosphären . . .	6,38	7,91	7,02	5,62	5,62	5,62	5,62	5,62	5,62	5,62	6,76	7,66	6,13

In dieser Tabelle werden also die Eigenschaften der verschiedenen Lösungen, welche das Platzen der 50% (45,1—54,9%) Spermatozoiden verursacht, angegeben. Für die Lösung, welche  $\frac{n}{10}$  HCl enthält, sehen wir z. B., daß ihr pH = 1,07 ist; die Konzentration der Glukose bei diesem pH, welche die 50% der Spermatozoiden platzen läßt, ist 1,56; der Wert  $\Delta$  dieser Lösung ist 0,50 und der osmotische Druck nach diesem  $\Delta$ -Wert berechnet, ist 6,38 Atmosphären. Alle anderen Spalten haben die analoge Bedeutung.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind keine absoluten Werte, also nicht für alle Individuen gültig, da die Crustaceen w. e. zu den Tieren gehören, welche veränderlichen osmotischen Druck besitzen. Es sind nach wiederholten Messungen bei ihnen nur Mittelwerte erreicht worden.

Die Ergebnisse mit dem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sind:

Mit  $\frac{n}{10}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist die Konzentration der Glukose, welche das Platzen der 50% Spermatozoiden verursacht, 1,75%, ihr  $\Delta$  = 0,44 und ihr osmotischer Druck = 5,62 Atmosphären.

Mit  $\frac{n}{100}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist die Konzentration der Glukose, welche dieselbe Wirkung hat, 4,17%, ihr  $\Delta$  = 0,55 und ihr osmotischer Druck = 7,02 Atmosphären.

Mit  $\frac{n}{1000}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist die Konzentration der Glukose 4%, ihr  $\Delta$  = 0,50 und ihr osmotischer Druck 6,38 Atmosphären.



### Gemeinsame Erklärung für die drei Diagramme

Alle drei Diagramme sind der Ausdruck desselben Phänomens von drei verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet. Die verschiedenen Punkte dieser drei Diagramme stellen die Lösungen, welche dieselbe osmotische Wirkung ausüben (also das Aufblähen von 50 % der Spermatozoiden verursachen) dar, obwohl der osmotische Druck derselben ganz verschieden ist. Auf den Abszissen der drei Diagramme werden die pH-Werte bzw. die Konzentrationen der HCl und NaOH angegeben. Auf den Ordinaten werden die Konzentrationen (in Prozent) von Glukose (Diagr. 1), die  $\Delta$ -Werte (Diagr. 2) und die osmotischen Drucke (Diagr. 3) derselben Lösungen aufgetragen.

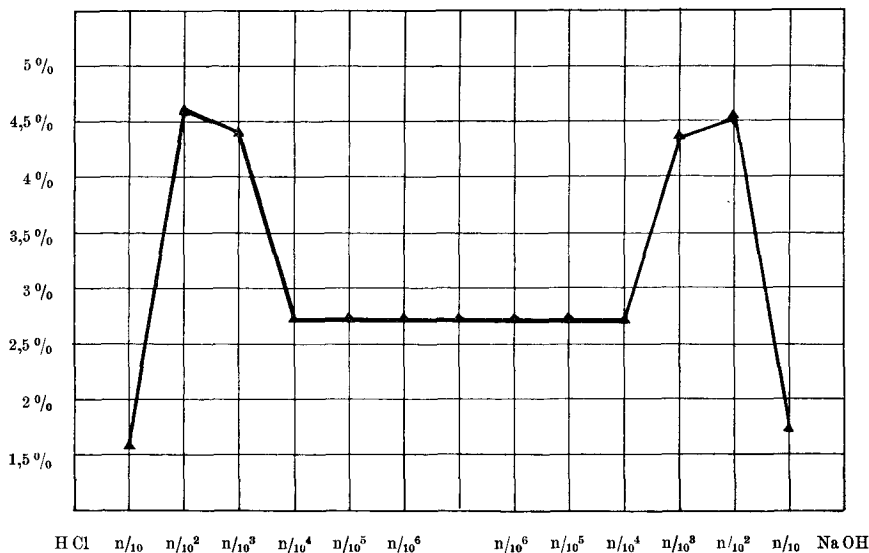


Fig. 2. Diagramm 1

Auf den Abszissen tragen wir die Konzentrationen der HCl bzw. NaOH der Lösungen auf, auf den Ordinaten die Werte der Konzentrationen von Traubenzucker, bezogen auf 100 Teile der eben genannten Lösungen

Bei Verdünnung von  $n/10^4$  und noch schwächerer Lösung läßt sich keine Wirkung bei diesem Phänomen beobachten im Vergleich zu den Wirkungen, welche reines destilliertes Wasser ausübt.

Alle drei Diagramme sind der Ausdruck desselben Phänomens von drei verschiedenen Gesichtspunkten aus betrachtet. Wenn wir einen Blick auf diese drei Diagramme werfen, werden wir merken, daß zuerst die Konzentration der Glukose, welche das osmotische Gleichgewicht, welches wir studieren, hervorruft, den niedrigsten Wert (1,56) bei den Lösungen  $n/10$  HCl einerseits und  $n/10$  NaOH andererseits hat, d. h. bei  $\text{pH} = 1,07$  und  $\text{pH} = 13,07$ . Dieser Wert ist kleiner als der Wert

der Konzentration der Glukose, welcher in destilliertem Wasser  $\text{pH} = 7$  dasselbe Gleichgewicht erzeugt. Dagegen sehen wir in den Diagrammen 2 und 3, daß die Werte  $\Delta$  bei den Lösungen von  $\text{pH} = 1,07$  und  $\text{pH}$

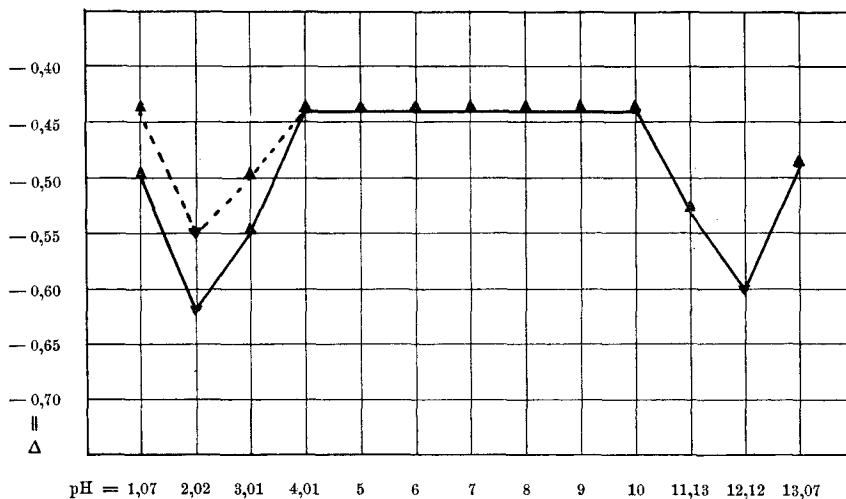


Fig. 3. Diagramm 2

Auf den Abszissen tragen wir die  $\text{pH}$ -Werte, auf den Ordinaten die  $\Delta$ -Werte der Lösungen auf. Die punktierte Linie bezieht sich auf Lösungen, in welchen  $\text{HCl}$  durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ersetzt wurde

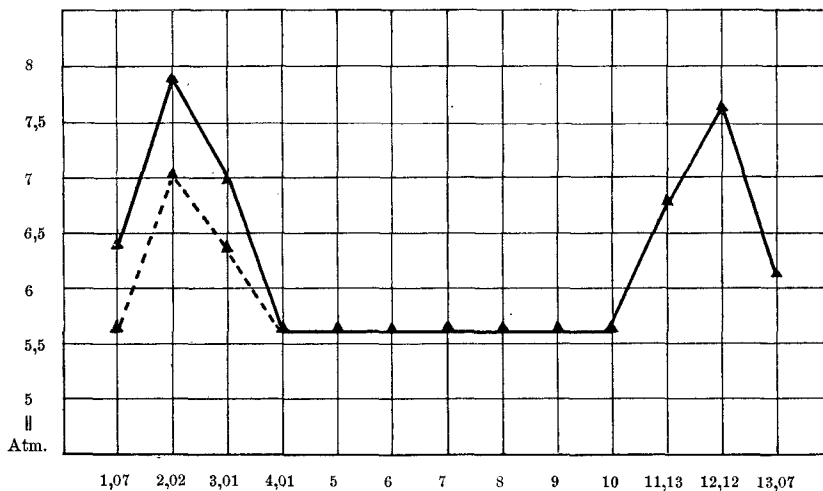


Fig. 4. Diagramm 3

Auf den Abszissen tragen wir die  $\text{pH}$ -Werte, auf den Ordinaten den osmotischen Druck der Lösungen, in Atmosphären ausgedrückt, auf. Die punktierte Linie hat Bezug auf Lösungen, in welchen  $\text{HCl}$  durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ersetzt wurde.

= 13,07 höhere sind als die entsprechenden in destilliertem Wasser und in den Lösungen mit  $\text{pH} = 4$  bis  $\text{pH} = 10$ , welche einen untereinander gleichen  $\Delta$ -Wert aufweisen.

Diese auf den ersten Blick widersinnig erscheinende Tatsache erklären wir uns dadurch, daß wir in einer  $\frac{n}{10}$  HCl-Lösung 3,6% HCl haben, also eine ziemlich starke Konzentration, welche zu einer schwächeren Menge Glukose addiert, einen niedrigen  $\Delta$ -Wert und deshalb einen höheren osmotischen Druck erzeugt.

Man kann auf dieselbe Weise den scheinbaren Gegensatz erklären, der entsteht, wenn man den kleinen Unterschied in der Konzentration der Glukose in dem Diagramm 1 beobachtet, die zwischen den Lösungen  $\frac{n}{100}$  HCl und  $\frac{n}{1000}$  HCl und auch den Lösungen  $\frac{n}{100}$  NaOH und  $\frac{n}{1000}$  NaOH besteht und den großen Unterschied, welcher besteht zwischen den Werten  $\Delta$  und dem osmotischen Druck von beiden Lösungen. Man muß immer bedenken, daß in den Lösungen  $\frac{n}{100}$  HCl und  $\frac{n}{100}$  NaOH, d. h.  $\text{pH} = 2,02$  und  $\text{pH} = 12,12$ , eine relativ große Menge von HCl bzw. NaOH enthalten ist. Diese Mengen verursachen eine ziemlich starke Steigerung der gesamten Konzentrationen beider Lösungen.

Die Wirkung des  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , durch die punktierten Linien angegeben, ist merklich schwächer als diejenige von HCl bei demselben Wert pH. Wir können mit Loeb diese, auch für die Eiweißlösungen gefundene, Tatsache dadurch erklären, daß sich das zweiwertige Anion  $\text{SO}_4''$  bei saurer Reaktion mit zwei Molekülen Eiweiß verbindet und die Anzahl der Teilchen des Protoplasmas und der osmotische Druck vermindert wird, die HCl dagegen, deren Anion  $\text{Cl}'$  einwertig ist, sich nur mit einem Eiweißmolekül kombiniert.

Wir sehen, daß unsere Kurven assymmetrisch sind in Beziehung auf eine Achse, welche durch den neutralen Punkt  $\text{pH} = 7$  geht, wahrscheinlich liegt das an einem Fehler bei den Versuchen, weil es fast sicher ist, daß die Wirkung des HCl identisch ist mit der des NaOH bei derselben Konzentration, bei dem Phänomen, welches wir studieren.

Wenn wir diese Ergebnisse vergleichen mit denjenigen, welche wir bei dem NaCl voriges Jahr gefunden haben, sehen wir eine vollständige Übereinstimmung in den wesentlichen Punkten. Die Gestalt der Kurven ist identisch. Wir sehen, daß die Kurve bei den Versuchen mit NaCl auch fast symmetrisch zu dem Neutralpunkt  $\text{pH} = 7$  ist, und daß die Maximalwirkung, wie bei der Glukose, bei den Werten  $\text{pH} = 2$  und  $\text{pH} = 12$  liegt. Wir deuteten darauf hin, daß wahrscheinlich  $\text{pH} = 3$  eine kleine Wirkung haben müßte. Da dieses Phänomen bei der Benutzung von Glukose viel empfindlicher ist, haben wir die Wirkung von

pH = 3 sehr deutlich sehen können, und auch, daß die Wirkung von pH = 11 mit der des pH = 3 symmetrisch ist, haben wir bestätigen können. Wir haben auch den Wert des osmotischen Druckes der Lösungen bei pH = 1 und pH = 13 durch das Studium der Gefrierpunktniedrigung genauer festgestellt. Die Wirkung des pH = 1 und pH = 13 war bei NaCl sehr schwer festzustellen, da diese ein zu kleines Molekulargewicht hat. Bei pH = 13 tritt im NaCl sehr rasch Cytolyse ein, und wir sagten in unserer früheren Arbeit „En faisant l'expérience avec la solution  $\frac{n}{10}$  NaOH on a l'impression que son action est semblable à celle de  $\frac{n}{10}$  HCl". Wenn man mit der Glukose rasch arbeitet, erzielt man in den ersten 5–10 Minuten Prozentualwerte, identisch mit denjenigen, welche man mit der  $\frac{n}{10}$  HCl erreicht hat, später tritt auch hier Cytolyse ein. Es scheint, daß in den ersten Minuten das Phänomen mit  $\frac{n}{10}$  NaOH rein osmotisch ist und ganz vergleichbar mit dem, was man bei niedrigeren Konzentrationen von Säuren oder Alkalien sieht. Später aber, wie gesagt, tritt Cytolyse ein und in einer halben oder ganzen Stunde lösen sich die Zellen vollkommen auf. Dieses ist der einzige Wert, bei dem man kein stabiles Gleichgewicht erreichen kann, aber was man in den ersten Augenblicken sieht, scheint uns zu berechtigen unsere Kurve auch bei pH = 13 zu vervollständigen. Diesen Wert konnten wir bei dem NaCl nicht feststellen. Es gibt auch einen Unterschied zwischen den absoluten Werten des osmotischen Druckes der Lösungen mit den NaCl und denen mit Glukose. Bei NaCl gaben wir als extreme Werte des osmotischen Druckes 10,4 und 7,8 Atmosphären an. Bei Glukose geben wir 7,91 und 5,67 Atmosphären an. Das liegt daran, daß diese Werte bei Glukose durch den Wert  $\Delta$  und bei NaCl durch die nicht so zuverlässige Formel von Renner berechnet wurden. Wir glauben, daß die Übereinstimmung von NaCl und von Glukose vollkommen ist. Die angezeigten kleinen Unterschiede sind wie gesagt erklärbar dadurch, daß bei Glukose die Methode empfindlicher ist und daß wir mit dem Wert  $\Delta$  den osmotischen Druck unserer Lösungen genauer berechnen können.

Zum Schluß wollen wir noch auf zwei Punkte aufmerksam machen: Merkwürdig ist die hemmende Wirkung der Glukose und des NaCl auf die Cytolyse, welche das NaOH hervorruft. Bestimmte Konzentrationen von Glukose können in Anwesenheit von NaOH die normale Gestalt der Spermatozoiden lange Zeit erhalten, obwohl dieselbe Menge von NaOH ohne Glukose in wenigen Sekunden die Cytolyse der Spermatozoiden verursacht. Dann ist noch hervorzuheben, daß der äußere Teil der Sper-

matozoiden, welche außerhalb der Kapsel liegt und welcher sich bezüglich der osmotischen Variationen, wie die anderen Teile der Zelle verhält, aus Nukleinsubstanzen besteht.

### Folgerungen

Was wir für das NaCl schon gefunden haben, können wir an dieser Stelle vervollständigen:

1. Es gibt einen sehr ausgeprägten Einfluß von bestimmten Werten vom pH auf den inneren osmotischen Druck der Spermatozoiden des *Carcinus moenas*.
2. Der höchste Wert dieses Einflusses wird erreicht bei den Werten  $\text{pH} = 2$  und  $\text{pH} = 12$ , der äußeren Flüssigkeit (den Wert des pH des Inneren der Zelle kennen wir nicht).
3. Es gibt auch eine Wirkung wie bei den Werten  $\text{pH} = 3$  und  $\text{pH} = 11$  der äußeren Flüssigkeit oder etwas geringer bei den Werten  $\text{pH} = 1$  und  $\text{pH} = 13$ .
4. Bei den Werten  $\text{pH} = 4, 5, 6, 7, 8, 9$  und  $10$  der äußeren Flüssigkeit kann man keinen Einfluß durch die Methode aufweisen.
5. Die  $\text{H}_2\text{SO}_4$  übt eine geringere Wirkung aus als HCl vom selben pH-Wert, doch der Wert scheint nicht die Hälfte von jenem zu sein.
6. Alle diese Ergebnisse und die Vergleichung unserer Diagramme mit den gefundenen Kurven anderer Forscher, welche die Wirkung des pH auf die Variationen des osmotischen Druckes der Eiweißlösungen studiert haben, zeigen eine große Ähnlichkeit dieser Phänomene bei der Substanz des Protoplasmas und des Kernes der Zellen einerseits und den Lösungen von Proteinen in vitro andererseits. Vielleicht können wir dadurch einen Einblick gewinnen in solche Eigenschaften des Protoplasmas, wie z. B. die Lage des isoelektrischen Punktes.

### Literatur

- Loeb, Jaques, Proteins and the Theory of Colloidal Behavior. New York 1922.
- Pauli, W., Kolloidchemie der Eiweißkörper. Dresden und Leipzig.
- Koltzoff, N. K., Studien über die Gestalt der Zelle. Untersuchungen über die Spermien der Dekapoden, als Einleitung in das Problem der Zellengestalt. Archiv f. mikr. Anat., Bd. 67, 1906.
- Raymond Bindford, The germ-cells and the Process of Fertilization in the crab *Menippe mercenaria*. Journal of Morphology, Philadelphia, Vol. 24, 1823.
- Susaeta, J. M., Sur l'éclatement des spermatozoides des Crustacés décapodes. Bull. Biol. France et Belgique, t. LX, 1926.
- L'influence du pH sur les changements osmotiques cellulaires. Bull. Biol. France et Belgique, t. LXI, 1927.