

# ÜBER DIE BESTIMMUNG DES ISOELEKTRISCHEN PUNKTES BEI BLAUALGEN UND ANDEREN ALGEN NACH DER VITALFÄRBUNGSMETHODE

von

YÜ CHING-JANG und WANG YAO-SE

## INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung .....	11
	(a) Die physiologische Bedeutung des isoelektrischen Punktes von Protoplasma	
	(b) Die Bestimmung von $pH_i$ des Protoplasmas durch Vitalfärbung	
II	Material und Methode .....	12
	(a) Die untersuchten Algen	
	(b) Farbstoffe	
	(c) Herstellung der Pufferlösungen	
	(d) Die Elektrophorese-Apparatur	
III	Experimentelle Resultate .....	14
	(a) Vitalfärbungsmethode	
	(b) Elektrophorese	
IV	Zusammenfassung der Resultate .....	22
V	Bibliographie .....	22

## I. EINLEITUNG

### (a) Die physiologische Bedeutung des isoelektrischen Punktes von Protoplasma

Da der Hauptbestandteil des Protoplasmas Protein ist, wirkt es als ein Ampholyt, denn das ist eine Eigenschaft des Proteins. Es gibt daher einen isoelektrischen Punkt, in dem das  $pH$  des Ampholyten elektrisch neutral ist (gewöhnlich mit  $pH_i$  bezeichnet).

Aber das  $pH_i$  des Protoplasmas ist verschieden von dem des reinen Proteins, weil alle Protoplasmen verschiedene Arten von Protein enthalten. Darüber hinaus sind diese Proteine bei der Bildung des vollständigen Protoplasmas von vielen anderen Substanzen begleitet. Daswegen sollte das  $pH_i$  des Protoplasmas der isoelektrische Punkt des Ampholyt-Komplexes sein, der von den Proteinkomponenten gebildet wird. Man sollte also mehr als ein  $pH_i$  erwarten, wenn das Protoplasma mehrere Ampholyt-Komplexe enthält. Diese Erwartung wird erfüllt und ist von vielen Forschern bewiesen worden(1, 2).

Die Bestimmung des  $pH_i$  von Protoplasma ist deswegen von Wichtigkeit, weil an diesem Punkt alle physiologischen Funktionen stillstehen(3, 4): Absorptionsminimum, Viscositätsminimum, minimale Quellung, Dispersionsminimum, Permeabilitätsminimum, Minimum des osmotischen Druckes, in einen Wort, minimale vitale Aktivität des Protoplasmas, aber gleichzeitig Maximum der Oberflächenspannung.

### (b) Die Bestimmung von $pH_i$ des Protoplasmas durch Vitalfärbung

Wie wir schon sagten, ist das Protoplasma ein Ampholyt und beim  $pH_i$  ist die Anzahl der positiven Ladungen gleich der negativen. Wenn die Umgebung des Protoplasmas saurer wird als sein  $pH_i$  angibt, werden die überschüssigen Wasserstoffionen die saure Dissoziation des Ampholyts herabsetzen, und die basische Dissoziation wird die saure überwiegen so, dass das Ampholyt eine positive Ladung erhält. Wenn andererseits die Lösung basisch ist, lädt sich das Ampholyt negativ auf. Ein saures Färbemittel ist negativ geladen. Es hat also eine Affinität zu den positiv geladenen Teilchen und kann sie gut färben. Ebenso färbt ein basisches Färbemittel die negativ geladenen Teilchen. Wenn aber das Ampholyt elektrisch neutral ist, oder wenn Ampholyt und Färbemittel dieselben Ladungen tragen, wird das Färbemittel das Ampholyt nicht färben. Wir können also das  $pH_i$  der Ampholyt finden, für das weder saure noch basische Färbemittel färben, indem wir sie nach Eintanchen in Pufferlösungen von verschiedenem  $pH$  in das Färbemittel einführen.

## II. MATERIAL UND METHODE

### (a) Die untersuchten Algen

Die untersuchten Algen wurden von Reisfeldern, Gräben, Teichen und Baumwurzeln in der Nähe der Taiwan-Universität, Taipeh, Taiwan gesammelt.

Die Proben wurden im Winter 1951 und Frühling 1952 genommen.

Die Algen gehörten zu folgenden Spezies

1. Blaualgen: *Oscillatoria pringeps* Vaucher und *Nostoc commune* Vaucher
2. Grünalgen: *Hydrodictyon* sp.
3. Konjugaten: *Spirogyra* sp. und *Zygnema* sp.

Ummittelbar nach derahme der Proben, wurden sie in fließendem Leitungswasser einen Tag gewaschen und dann in neutralem Wasser für ein bis zwei Tage aufbewahrt.

Die Proben der *Nostoc* Spezies wurden 60 min. die der anderen Algen 20 min. in der Pufferlösung gelassen.

### (b) Farbstoffe

Für unsere Zwecke geeignete Farbstoffe mussten hohe Dispersibilität und Stabilität ihrer Ladungen in Lösungen von verschiedenem  $pH$  haben. Aber nur die folgenden Farbstoffe, die von verschiedenen Autoren benutzt wurden (4, 5, 6) waren für uns erreichbar.

Die Farbstoffe wurden zuerst in Wasser in den in Klammern beigefügten Konzentrationen aufgelöst.

Saure Farbstoffe:	Eosin	(0.01%)
	Erythrosin	(0.02%)
	Fuchsin S	(0.001%)
Basische Farbstoffe:	Methylenblau	(0.001%)
	Chrysoidin	(0.01%)
	Safranin	(0.001%)

Methylviolett	(0.001%)
Dahlia	(0.001%)
Bismarkbraun	(0.001%)

### (c) Herstellung der Pufferlösungen

Pufferlösungen mit pH-Werten zwischen 2 und 8 wurden nach Sørensen hergestellt(7). Borax-, Phosphat- und Zitrat Puffer wurden benutzt.

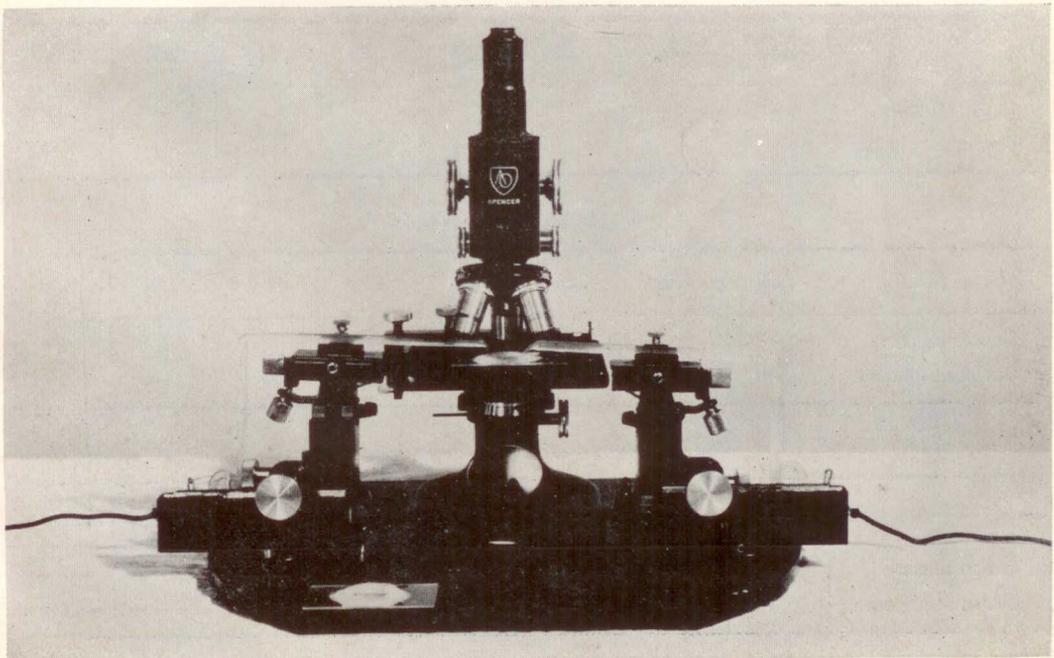
Die pH-Werte der 8 Pufferlösungen wurden nach der Wasserstoff-Elektroden-Methode bei 21°C nachgeprüft. Diese sind:

	pH Werte der Pufferlösungen		Pufferlösung
	theoretisch	gemessen	
1	1.93	1.93	Zitrat
2	2.97	3.09	
3	3.69	3.59	
4	4.83	4.85	
5	5.59	5.69	Phosphat
6	6.24	6.18	
7	7.38	7.67	
8	8.27	8.23	Borax

Jeder Vorratsflasche mit Pufferlösung wurde etwas Thymol zur Verhinderung von Schimmelbildung zugesetzt.

### (d) Die Elektrophorese-Apparatur

Der Elektrophorese-Apparat ist in dem folgenden Photo gezeigt (8):



Die Algenproben wurden gewaschen wie in a beschrieben und dann mit scharfen Glasnadeln klein geschnitten. Das Elektrophorese-Gefäß wurde mit Pufferlösung gefüllt und die gewaschenen Algen suspendiert. Dann wurden die KCl-Agar Elektroden an beiden Seiten des Gefäßes eingeführt und eine Spannung von 80 Volt angelegt. Der Strom betrug etwa 5 Milliampere. Mit einem Mikroskop wurde die Bewegung der Algen beobachtet und der pH Wert, bei dem die Algen keine Bewegung zeigen, gemessen. Diese Werte sollten die pHi der Algen sein.

### III. EXPERIMENTELLE RESULTATE

#### (a) Vitalfärbungsmethode

Nach der Behandlung wurde die Pufferlösung entfernt und die Farblösung zugesetzt. Nach der in Klammern angegebenen Zeit wurde die Färbung unter dem Mikroskop beobachtet.

Die Resultate sind unten tabuliert.

#### (a) *Oscillatoria princeps* Vaucher

##### 1. Eosin (40 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Centroplasma	+++	++	(+)	-	-	-	-	-
Chromatoplasma	++++	+++	+++	+	-	-	-	-

+ bedeutet Färbung, - keine Färbung, (+) schwache Färbung.

##### 2. Erythrosin (30 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Centroplasma	++	+	-	-	-	-	-	-
Chromatoplasma	+++	++	+	-	-	-	-	-

##### 3. Methylenblau (40 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Centroplasma	-	-	+	++	++	++	++	++
Chromatoplasma	-	-	-	+	++	++	++	++

##### 4. Methylviolett (35 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Centroplasma	(+)	+	+	++	+++	+++	+++	++++
Chromatoplasma	-	-	-	+	++	++	+++	++++

## 5. Safranin (5 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Centroplasma	(+)	+	+	++	+++	+++	++++	++++
Chromatoplasma	-	-	-	(+)	+++	+++	++++	++++

## 6. Chrysoidin (50 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Centroplasma	(+)	+	+	+	++	++	++	+++
Chromatoplasma	-	-	-	(+)	+	+	+	++

Das pHi bestimmt mit:

	Saurem Farbstoff	basischem Farbstoff
Centroplasma	3.1-3.6	1.9-3.1
Chromatoplasma	3.6-4.9	4.9-5.7

(b) *Nostoc commune* Vaucher

## 1. Eosin (60 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Heterocyst	+	(+)	-	-	-	-	-	-
Zentralkörper	++	++	++	(+)	-	-	-	-

## 2. Erythrosin (60 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.13	7.67	8.23
Heterocyst	+	(+)	-	-	-	-	-	-
Zentralkörper	++	+	+	(+)	-	-	-	-

## 3. Fuchsin S (60 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Heterocyst	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Zentralkörper	++	+	+	(+)	-	-	-	-

## 4. Methylenblau (80 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Heterocyst	-	-	-	-	(+)	+	+	++
Zentralkörper	-	-	-	(+)	(+)	+	+	++



## 2. Erythrosin (30 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Kernkörperchen	+++	+++	++	+	(+)	-	-	--
Kern	+++	+++	++	+	-	-	-	--
Chloroplast	+++	++	++	(+)	(+)	-	-	-
Cytoplasma	?	?	?	?	?	?	?	?

## 3. Methylenblau (40 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Kernkörperchen	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Kern	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Chloroplast	-	-	(+)	+	+	++	++	++
Cytoplasma	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++

## 4. Methylviolett (40 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Kernkörperchen	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Kern	(+)	(+)	+	+	++	+++	+++	+++
Chloroplast	-	-	(+)	(+)	+	++	++	++
Cytoplasma	(+)	+	+	+	++	+++	+++	+++

## 5. Safranin (5 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Kernkörperchen	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kern	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Chloroplast	(+)	(+)	++	++	++	++	+++	+++
Cytoplasma	+	+	++	++	++	+++	+++	+++

## 6. Chrysoidin (5 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Kernkörperchen	+	+	+	++	++	+++	+++	+++
Kern	(+)	(+)	+	++	++	+++	+++	+++
Chloroplast	-	-	(+)	(+)	+	++	++	++
Cytoplasma	-	-	(+)	+	+	++	++	+++

Das pHi bestimmt mit:

	Saurem Farbstoff	Basischem Farbstoff
Kernkörperchen	3.6-4.9	1.9-3.1
Kern	3.6-4.9	1.9-3.1
Chloroplast	3.6-4.9	3.6-4.9
Cytoplasma	?	3.1-3.6

(d) Spirogyra sp.

## 1. Eosin (20 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+++	+++	++	+	-	-	-	-
Kern	+++	+++	++	+	-	-	-	-
Chloroplast	+++	+++	++	(+)	-	-	-	-
Cytoplasma	?	?	?	?	?	?	?	?

## 2. Erythrosin (20 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+++	+++	++	+	(+)	-	-	-
Kern	+++	+++	++	++	(+)	-	-	-
Chloroplast	+++	+++	++	(+)	-	-	-	-
Cytoplasma	?	?	?	?	?	?	?	?

## 3. Fuchsin S (20 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+++	++	++	+	-	-	-	-
Kern	+++	++	++	+	-	-	-	-
Chloroplast	+++	++	++	(+)	-	-	-	-
Cytoplasma	+	+	+	(+)	-	-	-	-

## 4. Methylenblau (10 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	(+)	+	+	+	+	+	++	++
Kern	(+)	+	+	+	+	+	++	++
Chloroplast	-	-	(+)	+	+	+	+	+
Cytoplasma	+	+	++	++	++	++	++	+++

## 5. Methylviolett (20 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Kern	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
Chloroplast	-	-	-	(+)	+	+	+	+
Cytoplasma	-	-	(+)	+	+	+	+	+

## 6. Safranin (5 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	(+)	(+)	+	++	++	++	+++	+++
Kern	(+)	+	+	+	+	+	++	++
Chloroplast	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+
Cytoplasma	(+)	+	+	+	++	++	+++	+++

## 7. Chrysoidin (10 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Kern	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Chloroplast	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+
Cytoplasma	-	(+)	+	+	+	+	+	+

## 8. Bismarckbraun (10 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+	+	+	+	++	++	++	++
Kern	+	+	+	+	++	++	++	++
Chloroplast	-	-	-	(+)	+	+	++	++
Cytoplasma	+	+	+	+	++	++	++	++

## 9. Dahlia (10 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+	+	+	++	++	++	++	++
Kern	+	+	+	++	++	++	++	++
Chloroplast	-	-	-	+	++	++	++	++
Cytoplasma	-	(+)	+	+	++	++	++	++

Das pHi bestimmt mit:

	Saurem Farbstoff	basischem Farbstoff
Pyrenoide	3.6-5.7	3.1-3.6
Kern	3.6-5.7	3.1-3.6
Chloroplast	3.6-4.9	3.6-4.9
Cytoplasma	?	3.1-3.6

(e) Hydrodictyon sp.

1. Eosin (30 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Chloroplast	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Cytoplasma	++	+	+	-	-	-	-	-

2. Erythrosin (30 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Chloroplast	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Cytoplasma	++	+	+	-	-	-	-	-

3. Fuchsin S (20 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	++	+	(+)	-	-	-	-	-
Chloroplast	++	+	(+)	-	-	-	-	-
Cytoplasma	++	+	+	-	-	-	-	-

4. Methylenblau (50 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	-	-	-	(+)	+	+	++	++
Chloroplast	-	-	-	(+)	+	+	+	+
Cytoplasma	-	-	-	+	+	+	+	+

5. Methylviolett (50 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	-	-	-	(+)	+	+	+	+
Chloroplast	-	-	-	(+)	+	+	+	+
Cytoplasma	-	-	-	+	+	+	+	+

## 6. Safranin (40 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	—	—	—	(+)	+	++	+++	+++
Chloroplast	—	—	—	(+)	+	++	+++	+++
Cytoplasma	—	—	(+)	+	++	++	+++	+++

## 7. Chrysoidin (40 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	—	—	—	(+)	+	+	++	++
Chloroplast	—	—	—	(+)	+	+	++	++
Cytoplasma	—	—	—	+	++	++	+++	+++

## 8. Bismarckbraun (30 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	—	—	(+)	+	+	+	++	++
Chloroplast	—	—	(+)	+	+	+	++	++
Cytoplasma	—	—	(+)	+	++	++	++	++

## 9. Dahlia (15 min.)

pH	1.93	3.09	3.59	4.85	5.69	6.18	7.67	8.23
Pyrenoide	—	—	—	+	++	++	+++	+++
Chloroplast	—	—	—	+	++	++	+++	+++
Cytoplasma	—	—	(+)	+	++	++	+++	+++

Das pHi bestimmt mit:

	Saurem Farbstoff	Basischem Farbstoff
Pyrenoide	3.1-3.6	4.9-5.7
Chloroplast	3.1-3.6	4.9-5.7
Cytoplasma	3.1-3.6	3.6-4.9

## (b) Elektrophorese

(i) Oscillatoria:

pH Werte der Pufferlösung

Bewegungsrichtung

3.1

Kathode

3.6

Kathode

4.8

Anode

5.6

Anode

(ii) Zygnema:

pH Werte der Pufferlösung	Bewegungsrichtung
3.1	Kathode
3.6	Bewegungslos
4.8	Anode
5.6	Anode

#### IV. ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE

Die Bestimmung von pH<sub>i</sub> für jeden Teil des Pflanzenkörpers wurde studiert. Zwei Blaualgen, eine Grünalge und zwei Konjugaten wurden benutzt.

Aus den experimentellen Resultaten zieht der Autor die folgenden Schlüsse.

(a) Eosin wurde als der beste Farbstoff befunden. Fuchsin S, das von Kiyono(6) als giftig und nicht gut befunden wurde, gibt jedoch zufriedenstellende Resultate. Bismarkbraun und Dahlia sind auch geeignet ausgenommen beim Färben von Nostoc. Der Grund muss der geringen Dispersibilität in Nostoc zugeschrieben werden, denn die gelatinöse Membran von Nostoc verhindert das Eindringen des Farbstoffs.

(b) Bei Oscillatoria und Spirogyra stimmen die erhaltenen Resultate gut mit denen von Yamaha(5) überein. Sie zeigen, dass das pH<sub>i</sub> des Zentroplasmas von Oscillatoria (ca. 3.1) fast das gleiche ist wie das der Spirogyra-Kerne (3.1-3.6), und diese beiden sind saurer als die pH<sub>i</sub> des Chromatoplasmas von Oscillatoria (ca. 4.8) und des Chloroplasts von Spirogyra (3.6-4.8).

Yamaha erklärt das mit dem Vorhandensein von Tymonukleinsäure im Zentroplasma von Oscillatoria und den Kernen von Spirogyra.

Er gibt auch den Grund dafür, dass das pH<sub>i</sub> des Chromatoplasmas von Oscillatoria basischer ist als das des Chloroplasts von Spirogyra.

Er glaubt, dass man es auf das in dem Chromatoplasma der Blaualgen vorhandene basische Pigment, Phycocyan, zurückführen kann.

Dieselbe Erscheinung wird auch bei Zygnema beobachtet.

(c) Um die mit der Vitalfärbung erhaltenen Resultate nachzuprüfen, wurde auch das pH<sub>i</sub> von Zygnema und Oscillatoria nach der Elektrophorese-Methode bestimmt. Mit dieser Methode wurde das pH<sub>i</sub> von Zygnema und Oscillatoria zu 3.6 bzw. zwischen 3.6 und 4.8 gefunden. Diese Werte stimmen gut mit den nach der Vitalfärbung erhaltenen überein.

#### V. BIBLIOGRAPHIE

- (1) SAKAMURA, T. und LOO, T. L.: Bot. Mag. **39**, 61 (1925).
- (2) YAMAHA, G.: Ibid. **46**, 423 (1932).
- (3) YAMAHA, G.: Ippan Saibogaku (Allgemeine Zytologie), Erster Aufl. (1932) Tokyo, S. 291-308. (Japanisch).  
SAKAMURA, T.: Shokubutsuseirigaku (Pflanzenphysiologie), Zweite Aufl. Band 1, (1950) Tokyo, S. 51-57. (Japanisch).

- (4) MICHAELIS, L.: Wasserstoffionenkonzentration I. (1922) Berlin, S. 58-62.  
YAMAHA, G.: Saibogaku Zikkenho (Practicum der Zytologie), Erster Aufl. (1934), Tokyo, S. 74-75. (Japanisch).
- (5) YAMAHA, G. und Ueda, R.: Shokubutsu to Dobutsu (Botanik und Zoologie) **II** (7), 531, (1943). (Japanisch).
- (6) KIYONO, K., SUGIYAMA, S., und AMANO, S.: Die Lehre von der Vitalfärbung. I:13-17, 42-46, 173; II: 106. (1938) Kyoto.
- (7) YOSHIMURA, Y.: pH no Riron to Sokuteiho (Die Theorien und Bestimmungsmethode der Wasserstoffionenkonzentration), Zweite Aufl. (1942) Tokyo, S. 215-217. (Japanisch).
- (8) NAKANO, H.: Shokubutsu Seri- to Seitaiigaku no Jikkenho (Praktikum der Pflanzenphysiologie und Pflanzenökologie), Erster Aufl. (1933) Tokyo, S. 429. (Japanisch).