

NACHWEIS DER SCHWERMETALLE IN DEN PFLANZEN UND DIE METHODE DER CHROMOSPODOGRAMME.

Von

SILVESTR PRÁT.

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut, Universitas Carolina, Praha.

(Eingelangt am 31. August 1936.)

Mit der steigenden Bedeutung bestimmter Kationen für die Physiologie der Ernährung entwickelt sich auch das Bedürfnis einer genaueren Verfolgung ihrer Lokalisation in den Zellen, ihrer Transportwege und ähnlicher Fragen; die Lösung ist aber immer noch hauptsächlich wegen der ganz geringen Mengen einiger Elemente nicht genau durchführbar. Da nicht nur Anwesenheit, sondern auch verschiedene Formen der Lokalisation, das heißt

1. gewebslokalisiert,
2. zellokalisiert,
3. absolut lokalisiert

(J. KISSER, 183) und die Komplikationen der Reaktionen in heterogenen kolloiden Medien berücksichtigt werden müssen, sind die Aufgaben der Histochemie viel schwieriger als die der einfachen Mikrochemie, wie in vielen Arbeiten, namentlich in den Beiträgen von H. MOLISCH, G. KLEIN und den Programmabhandlungen von KISSER, BRUNSWIK und GICKLHORN betont wird (KLEIN, I. 305).

Der einzige Weg, der zur Lösung der Bestimmbarkeit kleinster Spuren im Gewebe führen kann, ist die genaue Ausarbeitung von Methoden und ihre Anwendung auf Materialien, in welchen der Gehalt an bestimmten Elementen künstlich erhöht wurde. Dazu kommt noch der zweite Umstand, der solche Untersuchungen notwendig macht:

Die Arbeiten über den Einfluß verschiedener Chemikalien auf die Zelle sind umso bedeutender, je mehr Faktoren gleichzeitig

beobachtet und gemessen werden können; es soll nicht nur ihre Giftigkeit auf die Pflanze durch quantitative Wachstumsmessungen und Wägungen ermittelt, sondern gleichzeitig sollen auch die Veränderungen in den Lösungen durch Analysen festgestellt werden; Analysen der Pflanzen sowie die cytologischen und histochemischen Befunde und die Speicherungsmöglichkeiten, gleichzeitig an demselben Material ermittelt, sollen dann die Reaktionsmöglichkeiten der Zellen angeben.

Den Sammelreferaten in der Zeitschrift *MIKROCHEMIE*, die ausgedehnte Bibliographien darstellen, kann man auch entnehmen, daß trotz mancher guter Methoden zur Bestimmung von Schwermetallen, der histochemischen Seite viel weniger Aufmerksamkeit gewidmet wurde, als der mikroanalytischen Bestimmung.

Daß die Aufgabe manchmal auch bei den chemisch sehr einfachen Reaktionen nicht leicht ist, wurde bei verschiedenen Reaktionen oft festgestellt. Die wegen ihrer charakteristischen Kristallform gut bewährte Reaktion auf Kalium, z. B. mit Kupferbleinitrit, kann wegen der nicht momentanen Entstehung des Reaktionsproduktes mit Lokalisationsänderungen verbunden werden.

Blei. Die Schwierigkeiten, welche durch die quellende Wirkung des Alkali bei der Einwirkung von Sulfid auf bleiimprägnierte Zellkerne entstehen, wurden von HAMMET geschildert (HAMMET, III. 139—141, V. 543) und konnten in eigenen Beobachtungen bestätigt werden. Die braune, wahrscheinlich kolloidale Fällung von Bleisulfid ist viel unbeständiger als die graue bis schwarze; dies ermöglicht auch die Beurteilung der Reagenzien. Deswegen kann frisch bereitetes Schwefelwasserstoffwasser als besseres Fällungsmittel bezeichnet werden als die Natriumsulfidlösung. Die Unbeständigkeit der Reagenslösung beschränkt aber die allgemeine Verwendbarkeit. Die alkalische Natriumsulfid-Lösung (1 Teil 30% Na_2S , 1 Teil 30% NaOH , 1 Teil Glyzerol) kann mit Vorteil verwendet werden (PRÁT, BABIČKA a POLÍVKOVÁ), jedoch führt auch hier der Überschuß von Alkali sehr leicht zum Anschwellen und Platzen der Zellkerne; das rasche Eindringungsvermögen ist aber wieder ein Vorteil. Die Resultate können durch vorhergehende Fixation mit verdünntem Jodjodkali (eventuell Joddämpfen) verbessert werden (vorsichtig, da PbJ_2 im Überschuß von KJ löslich!).

Da sich die Sulfid-Niederschläge in sehr feiner Verteilung be-

finden, sind sie der Oxydation sehr leicht zugänglich und müssen vor allen oxydierenden Substanzen ($H_2O_2!$) geschützt werden. Auch die Terpentinbehandlung bei der Paraffin-Einbettung oder -Lösung ist zu vermeiden. Die Aufhellung mit Chloralhydrat ist nicht möglich.

Die Präparate mit den Niederschlägen müssen in 24 bis 48 Stunden entwässert und eingebettet werden, da sonst in der alkalischen Sulfid-Lösung sowie in Glycerol allmähliche Dislokation und Umkristallisation einsetzt. Die Änderungen der Verteilung der Schwärzung kann man in manchen Fällen auch makroskopisch wahrnehmen.

Kupfer kann mit mehreren Reaktionen nachgewiesen werden, doch müssen manche sehr vorsichtig durchgeführt werden. Kaliumferrocyanid bewährt sich gut bei größeren Kupfermengen, für kleinere ist die Empfindlichkeit nicht befriedigend und da das Reagens nur schwer und langsam in die Zellen eindringt, ist eine Störung der Lokalisation sehr wohl möglich. Über die Fällung als Sulfid kann dasselbe gesagt werden, was bei der Bleireaktion angeführt wurde. Die Fällung mit Benzoinoxim liefert gute Resultate nur bei größerer Kupfermenge, da die Niederschläge der leichten Färbung wegen in den Zellen nicht genug klar hervortreten und leicht der Beobachtung entgehen können. Von allen geprüften Reagenzien hat sich die alkoholische Lösung von Rubeanwasserstoffsäure (0,5% in 96%igem Alkohol) am besten gezeigt. Dieses, bisher in der Mikrochemie gut bewährte Reagens (FEIGL, FEIGL u. KAPULITZAS, RAY, WÖBLING u. STEIGER) kann auch in der Histochemie sehr einfach verwendet werden. Es genügt, die zu prüfenden Gewebe oder Schnitte in die Reagenslösung schnell einzutauchen. Die Färbung und Fällung entsteht schnell und deswegen kann gute Lokalisation erzielt werden. Die Färbung ändert sich auch bei längerem Aufbewahren in der Reagenslösung oder in Alkohol oder in Glycerol nicht und die Objekte können sehr gut mit den üblichen Methoden der Mikrotechnik durch Xylol in Paraffin eingebettet und dann geschnitten werden. Daß aber auch bei diesem ziemlich schnell wirkenden Reagens die Diffusionsströme sehr wichtig sind, läßt sich sehr leicht zeigen, wenn ein Tropfen Reagens von der Seite des Deckgläschens eingesaugt zur Wirkung kommt; dabei lassen sich dann sowohl

makroskopisch als — an einzelnen Zellen — mikroskopisch verschieden gefärbte Zonen, den Diffusionsströmen entsprechend, beobachten; diese Bildungen verdienen aber für sich selbst nähere Aufmerksamkeit wegen ihrer Beziehungen zu den Strukturen der Zelle.

Von den Nickelreaktionen ist die Fällung mit Dimethylglyoxim sicher die am häufigsten angewendete und hat sich in vielen Fällen sehr gut bewährt. Für die Histochemie muß aber die ziemlich langsame Kristallisation als Nachteil betrachtet werden, da dabei oft die Lokalisation — und zwar nicht nur die absolute, sondern auch die Zellokalisation und eventuell auch die

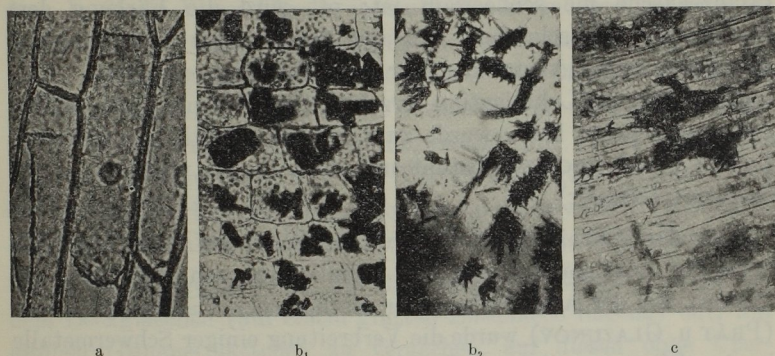


Abb. 1. Verschiedene Formen der Kristalle von Nickel-Dimethylglyoxim in und an den Zellen nach der Elektroinjektion. a) Epidermis von *Allium cepa* (nach der Plasmolyse mit 1 mol Saccharose). b) In den Zellen von *Vallisneria*. c) An den Zellen der Blattspitze von *Zea* Mais, an den Spaltöffnungen angehäuft.

Gewebslokalisierung — verändert wird. Dies wird noch verstärkt durch starke Diffusionsströme, die beim Zusammentreffen des alkoholischen Reagens mit dem wasserhaltigen Gewebe entstehen.

An Bohnenstengeln und Blättern sowie an Maisblättern wurde oft beobachtet, daß stärkste Fällungen von Nickel-Dimethylglyoxim an und um die Spaltöffnungen auftraten. Es handelte sich aber nicht um selektive Lokalisation, sondern die Öffnungen der Stomata ermöglichen ein viel schnelleres Zusammenkommen des Nickels mit dem Reagens, als durch die Kutikularschichten hindurch möglich ist.

Da in den komplizierten Systemen der Zellkolloide durch die Anwesenheit der verschiedensten Verbindungen die chemischen Reaktionen und Mikroreaktionen verschiedenartig beeinflußt werden können, wurde oft auf die Notwendigkeit der Kontrolle durch die Aschenanalysen hingewiesen. Die Einführung und Ausarbeitung der Methode der Mikroizineration hat den Bereich der Möglichkeiten besonders erweitert (MOLISCH, POLICARD, OHARA, WERNER, SCHULTZ-BRAUNS).

Oft kann man schon an gewöhnlicher Asche makroskopisch wichtige Aufschlüsse über Gewebelokalisation bekommen. Es kann wohl als allgemein bekannte Tatsache angenommen werden, daß Pflanzenasche nie schneeweiß ist; oft wird die Färbung dem Eisengehalte zugeschrieben; daß aber die genauere Verfolgung der makroskopischen Verteilung der Aschenfärbung wichtige Aufschlüsse über die Lokalisation verschiedener Elemente in den Pflanzenorganen geben kann, wurde zum erstenmal deutlich von NĚMEC, BABIČKA und OBORSKÝ betont und auch in der weiteren Arbeit bestätigt (NĚMEC).

Nach der Mikroizineration wurde die Farbe der Asche als Indikator der Zusammensetzung und Lokalisation von POLICARD angegeben. Bei der Ausarbeitung der Methode der Elektroinjektionen (PRÁT u. GLAZUNOV) wurde die Verbreitung einiger Schwermetalle in der Pflanze verfolgt und dabei erwies sich die Methode der Spodogramme, und zwar der Makro- sowie Mikrospodogramme als vorteilhaft. Für Makrospodogramme sind sehr gut die weiß emaillierten Schamottenplatten (Rako oder Westböhmisches Kaolinwerke) geeignet. Die getrocknete Pflanze wird auf die Platte gelegt und die Enden der Stengel und Spitzen längerer Blätter werden mit einem Tropfen von dünnem Gipsbrei befestigt, wodurch sie genügend festgehalten werden; nach der Verbrennung läßt sich dann der Gipstropfen leicht wieder entfernen. Bei vorsichtiger, langsamer Verbrennung behalten die Pflanzenteile gut ihre Formen bei und die Asche kann an der weißen Unterlage der Farbe nach sehr gut geschätzt werden. Man kann dann sehr leicht ohne Lokalisationsstörung einige Reaktionen durchführen. Sehr gut bewähren sich alkoholische Reagenzlösungen (96%iger oder auch 50%iger Alkohol). Wenn dagegen wässrige oder gar saure Lö-

sungen verwendet werden, tritt sehr leicht Lokalisationsänderung und auch Zerfließen der ganzen Aschenskelette auf.

Die Reaktionen werden in der Art der Tüpfelreaktionen so durchgeführt, daß das Aschenskelett mit einer feinen Pipette mit der Reagenslösung befeuchtet wird; bei langsamem Betupfen wird die Reagenslösung durch die Asche eingesaugt und fließt nicht über die Platte. Wenn notwendig, wird das Betupfen wiederholt. Einige Reaktionen erscheinen sofort oder in einigen Sekunden (mit Rubeanwasserstoffsäure), andere langsamer, nach Verdunstung des Alkohols (Dimethylglyoxim). Wenn notwendig, kann das überschüssige Reagens vorsichtig mit Alkohol abgespült werden. In dieser Weise können instruktive Chromospodogramme erhalten werden, welche noch durch mikroskopische Kontrolle ergänzt werden können. Die von POLICARD und OKKELS empfohlene Imprägnation mit Kolodium, die eventuell störend wirken könnte, ist bei dieser Ausführung nicht notwendig. Für die Mikroinzineration ist es notwendig, alle die Vorschriften genau einzuhalten, welche bei Ausarbeitung der Methodik angegeben wurden (MOLISCH, OHARA, POLICARD, WERNER, SCHULTZ-BRAUNS, MACLENNAN).

Am besten bewährt sich, die Blättchen oder Schnitte direkt auf dem Deckgläschen (auf einem glatten Eisenblech liegend) oder auf dünnen Glimmerplättchen zu veraschen, auf diesen ohne Übertragen direkt zu beobachten, die Reaktionen vorzunehmen und diese dann direkt als Deckgläschen anzuwenden. Der Vorgang ist derselbe wie bei Vorbereitung der Makrospodogramme. Nach Durchführen der Reaktion und Trocknen werden die Präparate mit Chloroform oder Xylol betupft und in Kanadabalsam aufbewahrt. Mit dieser Methode kann sehr leicht festgestellt werden, daß in die Pflanze injiziertes Kupfer oder Nickel durch die Gefäßbündel bis in die Blattspitzen transportiert wird. Da namentlich in den Gefäßbündeln sehr leicht schwarze Kohle verbleibt und die Kupfer-Rubeanwasserstoffsäure-Verbindung auch dunkle Niederschläge bildet, empfiehlt es sich, eine mikroskopische Kontrolle der Asche vor der Reaktion vorzunehmen. Die Nickeldimethylglyoximkristalle oder der violette Niederschlag von Nickel mit Rubeanwasserstoffsäure tritt dagegen sehr deutlich hervor.

Zusammenfassung.

Es werden Reaktionen auf Blei, Kupfer und Nickel in den pflanzlichen Zellen beschrieben und die Rubeanwasserstoffsäure (Dithiooxamid) wird als histochemisches Reagens empfohlen.

Ferner wird die Methode der Chromospodogramme näher ausgeführt.

Literatur.

- BABIČKA, J.: Kolorimetrische Bestimmung von Kobalt in einer Nährlösung und in der Asche von Pflanzenorganen. Věst. Král. Čes. Spol. Nauk. Tr. II. roč. 1934.
- BRUNSWIK, H.: Die Grenzen der mikrochemischen Methodik in der Biologie. Naturwissensch. **11**, 881 (1923); Ref. Mikrochemie **2**, 23 (1924).
- FEIGL, F.: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen. 2. Aufl. Leipzig 1935.
- FEIGL, F. u. KAPULITZAS, H. J.: Beiträge zur qualitativen Mikroanalyse. Mikrochemie **8**, 239 (1930), Taf. XII.
- GICKLHORN, J.: Mikrophysik und Mikrochemie in der Biologie und Medizin. Mikrochemie **11**, 369 (1932).
- H. and W. Organic Reagents for Metals. Rubeanic acid (Dithiooxamid). 80—81, 1934. Hopkins and Williams Ltd. 16 and 17 Cross Street, Hatton Garden London E. C. 1.
- HAMMET, F. S.: Studies in the biology of metals III. The localization of lead within the cell of the growing root. Protoplasma **5**, 135 (1929), V. The selective fixation of lead by root nuclei in mitosis. Protoplasma **5**, 543 (1929).
- HENCKEL, K. O.: Die Mikroveraschung. Abderhaldens Hand. d. biolog. Arbeitsmeth. Abt. V, Teil 2, 1471—1477, 1929.
- KISSER, J.: Die Bedeutung der Methoden der botanischen Mikrotechnik für die pflanzliche Mikrochemie und Histochemie. Mikrochemie, PREGL-Festschrift, 178 (1929).
- KISSER, J. u. K. LETTMAYER: Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Tüpfelreaktionen für quantitative Zwecke. Mikrochemie **12**, 235 (1932).
- KISSER, J. u. K. LETTMAYER: Untersuchungen über die Auswaschbarkeit der von Samen absorbierten Salze und ihre Bedeutung für die Samenstimulation. Ztschr. f. Pflanzenernähr., Düngung u. Bodenk. A **34**, 172 (1934).
- KLEIN, G.: Handbuch d. Pflanzenanalyse. J. Springer, Wien 1931—1933.
- KLEIN, G.: Praktikum der Histochemie. Berlin-Wien, Springer 1929.
- MACLENNAN, R. F.: Simplified methods for micro-incineration of tissues. Science **78**, 367 (1933).
- MARTINI, A.: Die Mikrokristalloskopie in den Gelen. Mikrochemie **7**, 236 (1929).
- NIETHAMMER, AN.: Über die Bedeutung u. Verwendbarkeit mikrochemischer Reaktionen für Permeabilitätsstudien an Pflanzen. Mikrochemie **7**, 314 (1929).

- NIETHAMMER, A.: Studien über Beeinflussung der Pflanzenzelle durch Schwermetallverbindungen. *Protoplasma* 8, 50 (1929); 12, 554 (1931).
- Verzeichnis der von Prof. Dr. HANS MOLISCH verfaßten wissenschaftlichen Arbeiten. *Planta* 2, 678 (1926).
- NĚMEC, B. a BABIČKA, J.: Chlorosa rostlin způsobená kobaltem. Chlorosis of plants produced by cobalt. *Věst. Král. Čes. Spol. Nauk, Tř. II. roč.* 1934.
- NĚMEC, B., J. BABIČKA a A. OBORSKÝ: Výskyt zlata v přesličkách: (*Equisetum palustre* a *arvense*.) *Rozpravy II. Třídy České Akademie. Roč. 46. č. 1.* str. 1—8.
- NĚMEC, B., J. BABIČKA und A. OBORSKÝ: Über das Vorkommen von Gold in den Schachtelhalmen. (*Equisetum palustre* und *arvense*.) *Bull. internat. de l'Acad. d. Sciences de Bohême* 1936. 1—7.
- NĚMEC, B.: Über einige seltenere Elemente in der Asche von *Polyporus fomentarius* und seiner Wirtshölzer. *Ber. d. Deutschen Bot. Gesellschaft* 54, 276 (1936).
- POLICARD, A.: La Microicineration et son intérêt dans les recherches histo-chimiques, I. Technique. *Bull. d'Histologie* 1, 26 (1924); *Mikrochemie* 2, 197 (1924).
- POLICARD, A.: La microicineration des cellules et des tissus. *Protoplasma* 7, 464 (1929).
- POLICARD, A. und H. OKKELS: Die Mikroveraschung (Mikrospodographie) als histochemische Hilfsmethode. *Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmeth.* Abt. V, Teil 2, 1815—1828, 1931.
- PRÁT, S., J. BABIČKA a J. POLÍVKOVÁ: Resorpce minerálních solí kořeny IV. The resorption of mineral salts by roots. *Spisy vyd. Přírodověd. fakultou Karlovy univ. č. 121, str. 1—24, 1932.* (Publications de la Fac. d. sci. de 'univ. Charles, n. 121, p. 1—24, 1932.)
- PRÁT, S. u. A. GLAZUNOV: Elektroinjektion als Methode der Pflanzenphysiologie. *Protoplasma im Druck.*
- RAY, P.: Mikrochemische Reaktionen von Kupfer, Nickel und Kobalt mit Rubeanwasserstoffsäure. *Ztschr. analyt. Chem.* 79, 94 (1929); *Mikrochemie* 8, 207 (1930).
- SCHULTZ-BRAUNS, O.: Über den Ausbau der Technik der Schnittveraschung und über neue histo-topochemische Aschenbefunde. *Zbl. Path.* 52, Erg.-H., 153 u. 171 (1931); *Ber. ges. Physiol.* 65, 537 (1932).
- WERNER, O.: Ein neuer Apparat zur Gewinnung von Pflanzen für Aschenbildbestimmungen. *Mikrochemie* 7, 110 (1929).
- WÖBLING, H. u. STEIGER, B.: Über Rubeanwasserstoff als Mikroreagens auf die Elemente der Platin-Gruppe. *Mikrochemie* 15, 295 (1934).