

QUANTITATIEVE PERMEABILITEITSBEPALINGEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE LANDBOUWKUNDE AAN DE LANDBOUW-
HOOGESCHOOL TE WAGENINGEN, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS Ir. J. W. DIEPERINK,
HOOGLEERAAR IN HET LANDMETEN, HET WATER-
PASSEN EN DE GEODESIE, VOOR EENE, — OVER-
EENKOMSTIG ART. 46, LID 3 VAN DE WET VAN
15 DECEMBER 1917 TOT REGELING VAN HET
HOGER LANDBOUWONDERWIJS (STAATSBLAD
No. 700), ZOOALS DIE LAATSTELIJK IS GEWIJZIGD
BIJ DE WET VAN 29 JUNI 1925 (STAATSBLAD No. 283),
— DAARTOE BENOEMDE COMMISSIE UIT DEN
SENAAT, TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 20 APRIL
1928, DES NAMIDDAGS TE DRIE UUR, DOOR

KLAAS TAMMO WIERINGA

GEBOREN TE NOORDHORN



STELLINGEN.

I

Het determinatie-systeem der bacteriën volgens LEHMANN en NEUMANN, hoewel zeer onvolledig, is te verkiezen boven dat van het Committee of the Society of American Bacteriologists (Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology).

II

De methode der bepaling van het „werkelijk eiwit” volgens STUTZER, zooals deze is voorgeschreven door de Rijkslandbouwproefstations, dient te worden vervangen door die van BARNSTEIN.

III

Zware kleigronden zijn op te vatten als gronden met een hoog gehalte aan hydrophyle colloïden.

IV

Bij het colloïdchemisch bodemonderzoek dient naast de bepaling van het gehalte aan afslibbare bestanddeelen het zwelingsvermogen der bodemcolloïden te worden gemeten.

V

Negatieve osmose is een bijzonder geval van electro-endosmose en kan verklaard worden door het optreden van diffusiepotentialen.

VI

De ionen der electrolyten vormen in waterige oplossing hydraten.

VII

Standpasteurisatie bij 63° gedurende 30 minuten is uit een oogpunt van hygiëne te verkiezen boven de thans gebruikelijke kortdurende pasteurisatie bij hogere temperaturen.

VIII

Bij biologische onderzoekingen dient, voor zoover dat mogelijk is, de fout van de methode te worden bepaald; door CLARENBURG is bij zijn onderzoek naar de waarde van de „kleine-plaatculturen” volgens FROST voor de bepaling van het aantal levende bacteriën in melk, hieraan niet voldoende aandacht geschonken.

(A. CLARENBURG, Diss. Utrecht 1925).

IX

Verdere intensivering in het landbouwbedrijf in Nederland is thans in de eerste plaats rendabel in den weidebouw.

X

De cellen van den wortel der suikerbiet zijn in staat suiker te binden.

XI

In de proefnemingen van de Rijkslandbouwconsulenten dient door onderlinge samenwerking en samenwerking met landbouwkundige instellingen meer eenheid te worden gebracht.

XII

De specialisatie in den Landbouwvoorlichtingsdienst dient verder te worden doorgevoerd dan thans het geval is.

Bij het voltooien van dit proefschrift, grijp ik met dankbaarheid de gelegenheid aan allen te herdenken, die mij bij mijn studie aan de Rijks Hoogere Land-, Tuin-, en Boschbouwschool den weg in de wetenschap hebben helpen vinden.

In de eerste plaats hooggeleerde ABERSON wil ik U mijn dank brengen voor de wijze, waarop Gij ons van Uw rijkdom aan kennis en ervaring hebt meegedeeld. Ook zal ik nimmer vergeten, dat ik door Uw toedoen in staat ben gesteld in wetenschappelijke richting te blijven doorwerken.

Hooggeleerde SÖHNGEN, hooggeachte promotor, ofschoon ik pas na de voltooiing van mijn studie aan de R. H. L. T. en B. School met U heb mogen kennis maken, zijt Gij wel degene geweest, die tot mijn wetenschappelijke vorming het meest hebt bijgedragen. Toen ik U voor de eerste maal ontmoette, kon ik niet vermoeden, van welk een groote beteekenis dat oogenblik voor mijn verdere leven zou zijn. De tijd, die ik in Groningen onder Uw leiding mocht werken aan het Rijkslandbouwproefstation, heeft mijn verdere levensrichting bepaald. Ik stel het op hoogen prijs, dat ik ook daarna met U mocht blijven samenwerken. Wat de omgang met U ook buiten het laboratorium voor mij beteekent, kan ik slechts in stilte gedenken.

Groote waardeering, hooggeleerde PITSCH, heb ik voor Uwe colleges, die van een ruime opvatting getuigen.

Met waardeering denk ik ook terug aan den tijd, hooggeleerde QUANJER, dat ik in Uw laboratorium voor het eerst kennis maakte met den mij toen nog geheel vreemden microcosmos.

U, Hooggeleerde VAN UVEN, ben ik zeer erkentelijk voor de aanwijzingen, die ik van U ontving bij de bewerking van het wiskundige gedeelte van mijn proefschrift.

Tenslotte breng ik aan allen mijn dank, die aan de totstandkoming van dit proefschrift hun medewerking hebben verleend. De vriendschappelijke omgang met U, Dr. COOLHAAS, waardoor

gedachtenwisseling over de onderzoeken steeds mogelijk was, stel ik op hoogen prijs. De amanuenses van het microbiologisch laboratorium dank ik voor de hulpvaardigheid, waarmee zij aan de proefnemingen hebben meegewerkt.

Voor de bereidwilligheid mij aan de bibliotheek der Landbouwhoogeschool steeds betoond bij het verschaffen van litteraturen ben ik ten zeerste erkentelijk.

INLEIDING.

Bij de cultuur van de landbouwgewassen, de voeding van mensch en dier, kortom de verzorging van de stoffelijke belangen van alles wat leeft, nemen we stilzwijgend aan, dat de stoffen, die we als bemesting of voedsel aan de te verzorgen individuen toedienen, tenslotte door de levende cel direct of nadat een reeks van omzettingen heeft plaats gehad, worden opgenomen en in het inwendige van die cel tot opbouw of tot het verrichten van levensfuncties dienen. De celwand en ook het protoplasma moeten dus volgens onze begrippen permeabel zijn voor deze voedingsstoffen.

Tevens weten we, dat een groot aantal stoffen schadelijk is. Ook van deze wordt in het algemeen aangenomen, dat ze in het levende protoplasma naar binnen kunnen dringen. Deze permeabiliteit kan echter ook het gevolg zijn van beschadiging van het protoplasma, zoodat de eigenschappen hiervan geheel zijn veranderd door de werking van de schadelijke stof.

Aan den anderen kant weten we, dat waardelooze, soms zelfs schadelijke afvalproducten, welke bij de dissimilatie van eiwitten en koolhydraten ontstaan, uit de cel diffundeeren, terwijl andere oplosbare stoffen daarentegen in groote hoeveelheden in de cel worden opgehoopt, zonder dat zij naar buiten treden, zoolang de cel intact blijft. Zoo worden suikers, in bladcellen der suikerbiet gevormd, naar den wortel getransporteerd, waar zij de cellen binnen dringen en nu vastgehouden worden. Pas wanneer de cel door verwarming of op andere wijze beschadigd wordt, kan de suiker naar buiten diffundeeren. In andere plantenorganen worden zuren of kleurstoffen in betrekkelijk hooge concentraties aangetroffen. Zeer bekend is ook het verschijnsel, dat organische, zoowel als anorganische stoffen zich zeer verschillend en schijnbaar op de meest grillige wijze verdeelen over cellen en de hen omringende vloeistof. Uit de chemische analyse

van de aschbestanddeelen van bloedlichaampjes en bloedserum vond ABDERHALDEN, dat het serum van de onderzochte diersoorten meer Na⁺ bevat, dan de bloedlichaampjes; in die van paard, varken en konijn ontbreekt het Na⁺ zelfs geheel. Daarentegen is het kaliumgehalte der bloedlichaampjes steeds grooter dan dat van het serum. Het chloor bevindt zich hoofdzakelijk in het serum, terwijl de bloedlichaampjes belangrijk meer anorganisch phosphorzuur bevatten (HÖBER, 43, blz. 454). WODEHOUSE (149) vond in het celsap van *Valonia* een veel hooger kali-gehalte dan in het omringende zeewater; magnesium kwam in het celsap slechts in zeer geringe hoeveelheden voor, terwijl sulfaat geheel ontbrak, niettegenstaande het zeewater van deze beide ionen tamelijk veel bevat. Daarentegen werd op nitraat, dat in het zeewater niet kon worden aangetoond, in het celsap een duidelijk positieve reactie verkregen. Uit deze en vele andere voorbeelden blijkt duidelijk, dat bij de opname van stoffen door levende organismen niet uitsluitend diffusieverschijnselen, doch ook nog andere factoren van belang zijn.

Ofschoon de permeabiliteit van het protoplasma voor vele stoffen reeds lang als vaststaand werd aangenomen, is het nog slechts een veertigtal jaren geleden, dat bij de plasmolyse van plantencellen verschijnselen werden waargenomen, die ongeveer gelijktijdig de botanici HUGO DE VRIES (145, 146), JANSE (51, 52) en KLEBS (59) op het spoor brachten van een methode van onderzoek naar de opneembaarheid van stoffen door de plantencel. In het jaar 1876 schreef PFEFFER (100) nog: „Abgesehen von Farbstoffen und den Körpern, welche ihren Eintritt durch Reaction im gefärbten Zellsaft kenntlich machen, ist über die diosmotischen Eigenschaften der Plasmamembran sehr wenig bekannt und um den Uebertritt kleiner Mengen anderer Stoffe direkt feststellen zu können reichen auch bisher angewandte Methoden nicht aus.”

Reeds in 1871 verrichtte DE VRIES (142) proeven over de contractie van het protoplasma van cellen van de roode biet, door deze in zoutoplossingen te brengen. Deze protoplasmacontractie, in zoutoplossingen met hogere osmotische concentratie dan het celsap, verklaarde NÄGELI (75) door de diosmotische eigenschappen van het protoplasma, dat vergeleken werd met TRAUBE's (133) semipermeabele neerslagmembranen. DE VRIES

(143, 144), voortbouwende op dit principe, bepaalde nu, welke concentratie van verschillende stoffen noodig is, een contractie van het protoplasma te veroorzaken, die juist aanleiding geeft tot loslaten van het protoplasma van den celwand. Deze bepaling der plasmolytische grensconcentratie berust op het beginsel, dat de cel te vergelijken is met een osmometer met volkomen semipermeabele membraan. Slechts wanneer dit het geval is, kunnen deze coëfficiënten dezelfde waarde hebben als VAN 'T HOFF's factor „i”.

Reeds spoedig werden nu aan KLEBS, JANSE en DE VRIES stoffen bekend, die bij abnormaal hoge concentraties plasmolyseeren. Ook was van deze stoffen de plasmolytische grensconcentratie niet constant. Met ureum en glycerine kon weliswaar plasmolyse worden verkregen, na eenigen tijd echter trad deplasmolyse in, zoodat de concentratie moest worden verhoogd, om weer plasmolyse te kunnen verkrijgen. De plasmolytische grensconcentratie was verschoven en met deze hoogere concentratie was nu het celsap isotonisch. Het verschijnsel vertoont groote overeenkomst met het terugloopen van den osmotischen druk in den osmometer, als de opgeloste stof langzaam door de membraan diffundeert. Genoemde schrijvers meenden dan ook, de opname van deze stoffen door de cel bewezen te hebben.

Spoedig volgden nu vele van dergelijke waarnemingen. Het was vooral OVERTON (87, 88, 89), die op deze wijze de meerdere of mindere opneembaarheid van vele stoffen bepaald heeft. Het zeer omvangrijke permeabiliteitsonderzoek van OVERTON (90, 91, 92) met deze en andere methoden leidde hem tenslotte tot het opstellen van de volgende algemeen geldende permeabiliteitsregels, waarvan de juistheid in groote trekken ook thans nog kan worden aanvaard.

Zeer snel worden geabsorbeerd de eenwaardige alcoholen, aldehyden en ketonen, aldoximen en ketoximen, mono-, di- en trihalogeen koolwaterstoffen, nitrilen en nitroalkylen en de neutrale esters van organische en anorganische zuren. Zij veroorzaken geen plasmolyse en dringen dus even snel of sneller door het protoplasma dan water. Minder snel diffundeeren 2-waardige alcoholen en amiden van éénwaardige zuren, glycerine, ureum en thioüream, stoffen dus met meerdere hydroxyl- of amidogroepen. Uiterst langzaam worden de aminozuren opgenomen,

terwijl bij de 6-waardige alcoholen en suikers geen permeabiliteit kon worden waargenomen. Met toenemend aantal hydroxyl- of amidogroepen neemt blijkbaar de opneembaarheid af. Basische anilinekleurstoffen dringen naar binnen, terwijl sulfozure kleurstoffen niet in staat zijn de levende cel te kleuren. Zouten van alkaliën en aardalkaliën gaan niet naar binnen. Zij veroorzaken blijvende plasmolyse. OVERTON's proefnemingen leidden tot de theorie, dat de grenslaag van het protoplasma zou bestaan uit een mengsel van lipoiden. Alle stoffen, die in lipoiden oplosbaar zijn, worden door de cel opgenomen, en de snelheid waarmee dit gebeurt, is afhankelijk van de deelingsquotiënten tusschen water en olie (89, 90, 91, 92, 93).

De lipoid-theorie, die op fysisch-chemisch gebied zijn analogon vindt in de theorie der „*auswählenden Löslichkeit*” voor de permeabiliteit van halfdoorlatende wanden, opgesteld door NERNST (77, 78) en TAMMANN (127), in beginsel reeds door L'HERMITE (40) aangegeven, werd in wezen reeds in 1888 door QUINCKE (105) uitgesproken, die tot de conclusie kwam, dat de celinhoud omgeven is door een zeer dunne vloeibare laag, die niet in alle verhoudingen met water mengbaar is en misschien uit een vette olie of vloeibaar vet bestaat.

Hoe aantrekkelijk de theorie van OVERTON ook is, en hoe vele feiten er ook door worden verklaard, toch zijn er te veel tegenstrijdigheden tusschen theorie en werkelijkheid, om haar voetstoots te aanvaarden. Een groote massa organische stoffen, waaronder de meeste organische vergiften en geneesmiddelen, worden door de cel opgenomen, terwijl voedingsstoffen als aminozuren en suikers en ook anorganische zouten niet of niet merkbaar naar binnen zouden dringen. „Die Aufklärung dieses scheinbaren Widerspruchs scheint mir als eine der wichtigsten Aufgaben der Zukunft. . . .” zegt OVERTON (92). Naast de zuiver osmotische permeabiliteit, welke berust op „*auswählende Löslichkeit*”, vermoedt OVERTON, dat een opneembaarheid voor eiwitachtige lichamen en suikers bestaat, waaraan de cellen actief deelnemen (89).

Zooals voor neerslagmembranen de theorie van NERNST zijn tegenhanger vindt in de poriëntheorie van M. TRAUBE, zoo kan voor de permeabiliteit van het protoplasma OVERTON's lipoid-theorie geplaatst worden tegenover de ultrafiltertheorie van

RUHLAND (111), volgens welke uitsluitend het moleculair volume en de poriëngrootte beslissen over al of niet opneembaarheid van de stoffen.

Met behulp van een zeer verfijnde techniek voor de bepaling van plasmolytische grensconcentraties, of liever wat daarmee geheel overeenkomt bij proeven met *Beggiatoa mirabilis*, gelukte het RUHLAND en HOFFMANN (112) het verband vast te leggen tusschen moleculair volume en opneembaarheid voor zeer uiteenlopende organische stoffen, waaronder kleurstoffen, alcaloïden, glucosiden, suikers, meerwaardige alcoholen e.a. Uitzonderingen vormen de zuuramiden en aminozuren, die te langzaam diffundeeren, terwijl voor de anorganische zouten geldt, dat hun doorlaatbaarheid additief bepaald wordt door de eigenschappen van de samenstellende ionen. Deze beïnvloeden den zwellingsstoestand van het protoplasma meer of minder, overeenkomstig hun plaats in HOFMEISTER'S (49) lyotrope reeksen. De ultrafiltertheorie blijft hierbij van kracht. De snelheid der diffusie hangt echter bovendien af van den zwellingsstoestand der protoplasma-colloïden, geheel in overeenstemming met de meening van KAHHO (56, 57, 58).

Het blijkt dus door verfijnde techniek mogelijk ook de permeabiliteit van anorganische zouten, aminozuren en suikers aan te toonen. Voor KNO_3 was 'dit reeds vroeger gedaan door JANSE (51, 52) en VAN RIJSSELBERGHE (113), e.a., terwijl vooral FITTING (21) met een zeer nauwkeurige plasmolytische methode van vele zouten de opneembaarheid aantoonde. Nu zijn deze plasmolytische methoden gebaseerd op de beschouwing van de cel vanuit een eenvoudig osmotisch oogpunt, waarbij de cel te vergelijken is met een osmometer. Het herstel van het osmotische evenwicht, dat ontstaat, wanneer de cel in anisotonische oplossingen wordt gebracht, is naar deze zienswijze het gevolg òf van waterverplaatsing, òf van diffusie van de opgeloste stof.

Complicaties doen zich reeds voor, wanneer naast *endosmose* der in de buitenvloeistof opgeloste stof ook *exosmose* uit het celsap optreedt. Op een andere mogelijkheid voor het vormen van een nieuwen evenwichtstoestand wees reeds VAN RIJSSELBERGHE. Wanneer een cel in een hypotonische oplossing gebracht wordt, neemt zij zoolang water op, tot de elasticiteit van den celwand een verdere zwellung belet. De kracht, waarmee het

water wordt opgenomen („Saugkraft” volgens URSPRUNG en BLUM (140), „suction pressure” volgens STILES (119)) kan zoo groot zijn, dat de celwand daaraan niet voldoende weerstand kan bieden en barst. In hypertonische oplossingen verliezen de cellen daarentegen hun turgor. Door stofwisselingsregulatie kan nu de cel den turgor binnen zekere grenzen regelen. Door VAN RIJSSELBERGHE werd waargenomen, dat in sterk hypotonische oplossingen kristallen van Ca-oxalaat in de cellen werden gevormd, wat een verlaging van den osmotischen druk van het celvocht tengevolge heeft. Deze „katatonose” is het tegengestelde van de eveneens door VAN RIJSSELBERGHE beschreven „anatonose”, welke optreedt in hypertonische oplossingen bv. door vorming van oxaalzuur uit reservestoffen als zetmeel. Zóó bewaart de cel door diffusie van water en opgeloste stoffen en door stofwisselingsregulatie een zekeren osmotischen overdruk t.o.v. de omringende vloeistof, welke het grootst is bij 0,2—0,4 % KNO_3 en nul wordt in nitraat oplossingen van 2,2—2,4 %. Wanneer deze verschijnselen zich voordoen, is de verschuiving van de plasmolytische grensconcentratie geen bewijs meer voor de stofopname.

Er bestaan echter nog andere bezwaren tegen de osmotische opvatting van DE VRIES. Isotonie kan nl. niet zonder meer gelijk gesteld worden met osmotischen druk van het celsap. De druk in de cel op den wand uitgeoefend, is op te vatten als de algebraïsche som van osmotischen druk van het celsap, centraal-druk van het protoplasma, zwellingsdruk van de protoplasma-colloïden en osmotischen druk van de buitenvloeistof. In cellen zonder vacuole kan volgens PFEFFER (102) de zwellingsdruk van het protoplasma een belangrijk deel van de plasmolytische grensconcentratie compenseeren. Wanneer nu zouten of ionen den zwellingsstoestand van de celcolloïden beïnvloeden, wordt daardoor ook de isotonische concentratie verschoven. Dit heeft niet alleen te gelden voor de protoplasma-colloïden, maar ook voor in de vacuole voorkomende colloïdaal opgeloste stoffen is de mogelijkheid van verschillenden hydratatiegraad onder verschillende omstandigheden niet uitgesloten.

OSTWALD (86), die de molecuulzeef-theorie van M. TRAUBE overdroeg op ionen, heeft aangetoond, dat electrolyten slechts door membranen kunnen diffundeeren, als hun ionen doorgelaten

worden. Is een der ionen impermeabel, dan treedt geen diffusie op. In dit geval kan het doorlaatbare ion slechts diffundeeren, wanneer tegengesteld geladen ionen in dezelfde richting gaan, of wanneer uitwisseling plaats heeft met gelijk geladen ionen, welke zich in tegengestelde richting bewegen. Wanneer we dit op de cel overdragen, is het duidelijk, dat blijvende plasmolyse optreedt bij electrolyten, terwijl toch een der ionen door de cel wordt geabsorbeerd.

STILES wees nog op een andere fout, die bij plasmolytische methoden kan worden gemaakt. Wanneer een stof in de cel dringt en daar aanleiding geeft tot de vorming van een onoplosbare verbinding, of wanneer zij zoodanig wordt gebonden, dat de osmotische druk van het celsap er niet door verandert, kan deze stof toch blijvend plasmolyseeren, zoolang de concentratie buiten de cel hoog genoeg blijft. Zoo vonden STILES en JØRGENSEN (122), dat coupes van aardappelknollen en koolrapen in keukenzoutoplossingen constant geplasmolyseerd bleven, terwijl STILES en KIDD (124) constateerden, dat NaCl, zij het dan ook langzaam, door deze weefsels werd opgenomen. Ook is door het werk van PFEFFER (101) e.a. met bepaalde, meestal basische kleurstoffen bekend, dat deze in de cellen tot veel hogere concentratie worden opgenomen, dan waarin ze buiten de cel aanwezig zijn. Dit schijnt slechts mogelijk, wanneer zij in de cel adsorbief of chemisch gebonden worden of wanneer ze in bepaalde celbestanddeelen sterker oplossen dan in andere.

Van vele stoffen is bekend, dat zij in de cel neerslagen veroorzaken. Zoo toonde C. DARWIN (13) aan, dat ammoniumcarbonaat een troebeling veroorzaakt in wortelcellen van *Euphorbia peplus*; PFEFFER vond, dat oplosbare carbonaten en oxalaten in het celsap hun Ca-zouten precipiteeren, terwijl OSTERHOUT (83) omgekeerd met oplosbare Ca-zouten oxaalzuur in de cel kon neerslaan. Zoo is de opneembaarheid van deze zouten of hun ionen bewezen. Bij plasmolytische methoden moet echter rekening gehouden worden met de vorming van dergelijke verbindingen, die den teruggang der plasmolyse tegenhouden.

Willen we de juiste permeabiliteitsverhoudingen kennen, dan moeten we de hoeveelheid stof bepalen, die gedurende de tijds-eenheid door de eenheid van oppervlak diffundeert bij de eenheid van concentratieverval. Verschillende onderzoekers, die

zich met het meten der permeabiliteit hebben bezig gehouden, hebben zich dit doel meer of minder duidelijk voor oogen gesteld en daarnaar hun onderzoekingsmethode ingericht. Deze methoden nu zijn legio. In het 1e hoofdstuk zullen de belangrijkste ervan worden besproken en zal worden nagegaan, in hoeverre zij aan het gestelde doel beantwoorden.

HOOFDSTUK I.

HISTORISCH OVERZICHT VAN DE METHODEN DER PERMEABILITEITSBEPALING.

Bij de beoordeeling van de methoden der permeabiliteitsbepaling en der daarmee verkregen resultaten moet er op gelet worden, dat de snelheid, waarmee een stof door een cel wordt opgenomen, niet alleen afhangt van de permeabiliteit van de membraan, maar tevens van het concentratieverval. Het concentratieverval nu hangt af van de hoeveelheid stof, die reeds naar binnen gediffundeerd is, van het volume, waarin deze stof is opgelost en tevens van de omzettingen binnen de cel. Het is daarom in zekeren zin onjuist, snelheid van stofopname te identificeren met diffusie-snelheid.

Afgezien van eenige groepen van stoffen, waarvan de opneembaarheid door directe waarneming kan worden bepaald, zooals o.a. het geval is bij kleurstoffen, stoffen, die in de cel een neerslag veroorzaken met looizuur of andere verbindingen of hun ionen, en zuren of basen, die in bepaalde gekleurde cellen een kleuromslag teweeg brengen, kunnen de uit de litteratuur bekende methoden der permeabiliteitsbepaling worden ingedeeld in 3 groepen, te weten:

A. *Osmotische methoden.*

B. *Chemische methoden en*

C. *Physische methoden*, waaraan we dan als 4e groep kunnen toevoegen:

D. Permeabiliteitsbepaling door *directe waarneming van zichtbare veranderingen in de cel.*

Naar gelang van het proefobject moet de keuze der te gebruiken methode worden bepaald.

A. In de groep der *Osmotische methoden* ontmoeten we een groote verscheidenheid van werkwijzen, alle berustende op

meting of waarneming van verplaatsing van water in of uit de cel of van veranderingen, daardoor teweeg gebracht.

1. De oudste dezer methoden is wel die der *plasmolytische grensconcentraties* of *isotonische coëfficiënten*, waarvan het principe reeds in de inleiding werd besproken.

Plantencellen, die zich goed leenen voor het waarnemen van plasmolyse worden in oplossingen met stijgende concentratie gebracht.

Microscopisch wordt dan bepaald, bij welke concentratie de plasmolyse juist begint. De verhouding van deze plasmolytische grensconcentraties tot die van een stof, welke niet door de cel wordt opgenomen, is volgens LEPESCHKIN (65) en TRÖNDLE (134, 135) een maat voor de permeabiliteit. De grensconcentratie van saccharose of van raffinose (RUHLAND en HOFFMANN (112)) wordt hierbij meestal als eenheid aangenomen. Van deze suikers is dan verondersteld, dat zij niet door de cel worden opgenomen. Dit schijnt toelaatbaar; er zijn althans geen stoffen bekend, die bij lagere concentratie plasmolyse veroorzaken. Bij electrolyten moet de dissociatiegraad in aanmerking worden genomen, terwijl in sommige gevallen met de vorming van complexe ionen, misschien ook van hydraten, rekening dient te worden gehouden.

De nauwkeurigheid van de methode hangt vooral af van het concentratieverschil tusschen twee opeenvolgende oplossingen, dat nog juist plasmolyse waarneembaar maakt. Het is daarom noodig, gemakkelijk plasmolyseerbare en zoo mogelijk osmotisch gelijkwaardige cellen voor dit onderzoek te gebruiken.

Als maatstaf voor de permeabiliteit berekende LEPESCHKIN (66) de permeabiliteitsfactor $\mu = \frac{C_1 - C}{C_1}$, waarin C voorstelt de plasmolytische grensconcentratie der niet diffundeerende stof (saccharose) en C_1 die der gevraagde. Geheel overeenkomstig hiermee bepaalde TRÖNDLE (134, 135) de permeabiliteits coëfficiënt $\mu = 1 - \frac{i'}{i}$, waarin i de dissociatiefactor is en i' , die uit de grensconcentratie berekend.

Nu werd door FITTING (22, 23) en door STILES (119) gewezen op bezwaren, die bestaan tegen het gebruik van isotonische coëfficiënten voor de permeabiliteitsbepaling. Behalve de reeds in de inleiding vermelde verschijnselen, die aantoonen, welk een

ingewikkeld en moeilijk te begrijpen meetinstrument de cel is, komen FITTING's bedenkingen in hoofdzaak op het volgende neer:

Er wordt aangenomen, dat de celmembranen saccharose niet doorlaten; hiervoor zijn niet voldoende bewijzen geleverd. Het is niet bekend, in hoeverre de permeabiliteit van het protoplasma door de stoffen beïnvloed wordt. Cellen, die een langen tijd in water gelegen hebben, zijn dikwijls veel moeilijker te plasmolyseeren dan cellen, die deze voorbehandeling niet hebben ondergaan; de grensconcentratie is tengevolge van het spoelen dus verhoogd en de cel schijnbaar doorlatender geworden. De deplasmolyse van deze cellen geschiedt echter veel langzamer dan normaal, zoodat de permeabiliteit geringer geworden is.

Verder wordt de maximale plasmolyse voor suikers en verschillende zouten op verschillende tijden bereikt. Ook uit zuiver physisch oogpunt heeft FITTING bezwaar tegen het vergelijken van deze isotonische coëfficiënten met de physisch-chemisch bepaalde „i” waarden. De wet van VAN 'T HOFF geldt slechts voor zeer verdunde oplossingen.

Ook STILES wijst op de verwaarloozing van den tijdfactor bij de bepaling der permeabiliteitscoëfficiënten.

Een aantal van de bovengenoemde bezwaren werden nu door FITTING ondervangen door gebruik te maken van:

2. De methode der deplasmolyse.

Deze methode, die voor het eerst door OVERTON (87) op groote schaal werd toegepast, bezit eenige belangrijke voordeelen boven de voorgaande. In de eerste plaats wordt niet de impermeabiliteit voor een of andere verbinding aangenomen, ten tweede wordt de tijd in rekening gebracht, waardoor het mogelijk is de snelheid van het proces te vervolgen en ten derde wordt geen gebruik gemaakt van den dissociatie-factor.

Volgens deze methode is de tijd, die noodig is voor volledige deplasmolyse, een maat voor de snelheid der endosmose. Ook voor giftige en weinig oplosbare stoffen, waarvan slechts geringe concentraties kunnen worden aangewend, bepaalde OVERTON zoo de opneembaarheid. Zij werden in kleine hoeveelheden toegevoegd aan nog juist hypotonische of isotonische concentraties van stoffen, waarvoor de wand impermeabel is, zoodat geplasmolyseerd werd met den geringen *partieelen druk* van de giftige of weinig oplosbare stof.

Door FITTING (21, 22, 23) werd de methode zoodanig uitgevoerd, dat hij den tijd kon meten, die noodig was om de plasmolytische grensconcentratie over een zeker concentratieverschil te verschuiven.

Het is duidelijk, dat de, in de inleiding reeds genoemde bezwaren, tegen de osmotische opvatting der cel zich hier met volle kracht doen gelden. Inplaats van de permeabiliteit wordt eigenlijk de snelheid gemeten, waarmee het water zich in de cel begeeft, onder invloed van een groot aantal factoren, van welke FITTING slechts de endosmose der opgeloste stof in aanmerking heeft genomen. Versnellend op de deplasmolyse werken endosmose en anatonose, evenals verhooging van den zwellingsdruk van het protoplasma. Vertragend werken daarentegen exosmose van stoffen uit het celsap, katatonose, binding van de binnengedrongen stof in de cel, uitwisseling van ionen en verlaging van den zwellingsdruk der celcolloïden.

Ofschoon FITTING's proeven de permeabiliteit van de cel voor een aantal electrolyten zeer waarschijnlijk maken, vormen ze geen absoluut bewijs, en laten ze tevens geen quantitative meting der permeabiliteit toe. Ook is de conclusie, dat het verblijf in de zoutoplossingen bv. in KNO_3 de permeabiliteit vermindert, niet geoorloofd. De vertraging der deplasmolyse in deze oplossingen kan geheel verklaard worden door aan te nemen, dat de teruggang het uitsluitend gevolg is van anatonose. Is het reserve materiaal, waaruit de osmotisch werkzame stof wordt gevormd, geheel verbruikt, dan kan geen verdere deplasmolyse optreden. Aan den anderen kant is het mogelijk, dat de stof weliswaar in de cel dringt, maar daar geadsobeerd wordt, zoodat de hydratatiegraad der colloïden toeneemt. De deplasmolyse, die hierdoor versneld wordt, houdt op zoodra de celcolloïden adsorbatief verzadigd zijn. Schijnbaar is nu de cel impermeabel geworden. Dat een dergelijke beïnvloeding van den hydratatiegraad van colloïden mogelijk is, bleek uit onderzoekingen van SH. DOKAN (14), die o.a. proeven deed over de zwellingsdruk van agar-agar en glycogeen in electrolytoplossingen.

Een werkwijze, welke veel overeenkomst heeft met die van FITTING is:

3. HÖFLER's *plasmometrische methode* (45, 46, 47, 48).

Het principe dezer methode is gebaseerd op de wet van

BOYLE-MARIOTTE-VAN 'T HOFF, $p \times v = const.$, waarin p den osmotischen druk en v het volume van de oplossing voorstelt.

Een cel, waarin het volume (V_z) van den turgorloozen nog niet geplasmolyseerden protoplast nauwkeurig bekend is, wordt in een hypertonische oplossing met een concentratie C krachtig geplasmolyseerd en nu wordt nogmaals het volume nauwkeurig bepaald (V_p .) Geldt de wet van BOYLE-MARIOTTE-VAN 'T HOFF, dan is de plasmolytische grensconcentratie $O = C \times \frac{V_p}{V_z}$. Is nu geplasmolyseerd met een permeabele stof, dan neemt na eenigen tijd het volume weer toe en wordt V'_p en de grensconcentratie is nu $O' = C \times \frac{V'_p}{V_z}$. De snelheid der stofopname wordt nu uitgedrukt door $\frac{O'-O}{t}$, waarin t de tijd is, die tusschen twee metingen is verlopen.

Ook hier wordt dus de verschuiving der plasmolytische grensconcentratie als een functie van den tijd bepaald. Deze verschuiving wordt dan uitsluitend aan de doorlatendheid van het protoplasma toegeschreven. Voor bedenkingen, die hier tegen bestaan, kan naar bovenstaande worden verwezen. Ook is het de vraag, in hoeverre het geoorloofd is, den geheelen protoplast als een door een semipermeabele membraan omgeven oplossing te beschouwen. Slechts bij cellen met een zeer dun wandstandig protoplasma is „HÖFLER's methode misschien toelaatbaar. Althans werden door hem met langgerekte, regelmatig gevormde cellen uit stengels van *Tradescantia guianensis* waarnemingen gedaan, waarbij de betrekking $O = C \times \frac{V_p}{V_z}$ binnen ruime grenzen constant bleef. Bij deze proeven diende saccharose als plasmolyticum.

Door OVERTON (92) werd met protoplasmarijke spiercellen echter duidelijk aangetoond, dat het volume der cellen in een minder eenvoudige verhouding tot den osmotischen druk der oplossing staat. Ook door HÖFLER (45) werden met andere cellen afwijkingen waargenomen, die hij toeschrijft aan het protoplasma. Met stijgende concentraties vormden de O -waarden een opklimmende reeks, m.a.w. de inkrimping was relatief te klein. Aangezien echter in deze proeven met kaliumnitraat werd geplasmolyseerd, is deze geringere inkrimping waarschijnlijk ook voor een deel aan permeabiliteit toe te schrijven.

HÖFLER's methode is verder slechts bruikbaar, wanneer van de cellen de inhoud van den protoplast zeer nauwkeurig kan worden berekend, zooals het geval is bij de cilindrische cellen uit stengels van *Trad. guianensis*.

Een andere methode, welke eveneens op osmotische eigenschappen van de cel berust, is die, waarbij:

4. *Gewichts- of Volume-veranderingen* van weefsels of van een groot aantal cellen worden gemeten.

OVERTON (92) heeft op deze wijze de permeabiliteit van spiercellen voor een groot aantal stoffen bepaald. In een keukenzoutoplossing, die met de spiercellen isotonisch is, verandert het gewicht der levende spier niet; wanneer echter een deel van het keukenzout door een opneembare stof wordt vervangen, neemt de spier evenveel water op alsof deze stof niet aanwezig was. De snelheid, waarmee de evenwichtstoestand wordt bereikt, hangt af van de permeabiliteit der spiercellen voor de toegevoegde stof, echter ook van andere factoren.

Een geheel andere verklaring wordt door M. H. FISCHER (24, 25) van deze gewichtsveranderingen gegeven. Hij ontkennt het bestaan van semipermeabele membranen om den protoplast. Het gewicht of volume van een cel hangt volgens FISCHER uitsluitend af van het zwellingsvermogen der protoplasmacolloïden. Physiologische oplossingen zijn die, waarin de zwellingstoestand niet verandert. De hydratatie wordt vooral vergroot door de vorming van zuren in de spier. Nu wordt in physiologische zoutoplossingen deze hydratatie geremd, zoodat de zwelling niet optreedt.

Ook Miss D. J. LLOYD (67), J. LOEB (69) en F. E. LLOYD (68) nemen aan, dat de zwelling in de eerste plaats aan hydratatie der colloïden is toe te schrijven. Door HÖBER (43) wordt FISCHER's opvatting echter onaannemelijk geacht, daar spieren in isotonische oplossingen van talrijke organische verbindingen, die niet in de spier dringen en de hydratatie niet beïnvloeden, zooals bv. suikers, hun normale gewicht behouden, wat door OVERTON werd aangetoond. Ook de door HÖFLER gevonden evenredigheid tusschen osmotischen druk en volume bewijzen, dat in vele gevallen althans osmotische verschijnselen en halfdoorlatende wanden den inhoud van den protoplast bepalen.

Volumeveranderingen van roode bloedlichaampjes werden

gemeten door HAMBURGER (34), HEDIN (38, 39) en KOEPPE (61). Een bepaalde hoeveelheid bloedlichaampjes werd in verschillende zoutoplossingen gecentrifugeerd. Concentraties, die een evengroot sediment leveren als bloedserum, zijn isotonisch. Door RICHARD EGE (15) is op deze wijze aangetoond, dat de wet van BOYLE-MARIOTTE-VAN 'T HOFF ook voor bloedlichaampjes geldt, wanneer op het volume der cellen een correctie voor de disperse phase, de gehydrateerde protoplasmacolloïden, wordt toegepast. Ook voor vacuolevrije cellen schijnt dus de osmotische opvatting te gelden.

HYLKEMA (50) paste een sedimentmethode toe voor de bepaling der permeabiliteit van gistcellen. In dit geval is deze methode echter niet juist; de celwand der gist volgt het inkrimpen van den protoplast niet voldoende, terwijl de elasticiteit van den wand de uiteenzetting belemmert.

5. GRIJNS (32,33) paste voor de bepaling der permeabiliteit van roode bloedlichaampjes een methode toe, die, ofschoon zij tot de osmotische methoden behoort, een geheel aparte plaats inneemt. Zij berust op het verschijnsel, dat bij een bepaald verschil tusschen den osmotischen druk in de bloedlichaampjes en die der buitenvloeistof de roode bloedkleurstof naar buiten treedt. Stoffen, die bij hogere concentratie dan NaCl aanleiding geven tot het uittreden der bloedkleurstof, zijn permeant. Dezelfde methode werd later door HAMBURGER (35) toegepast.

De osmotische methoden der permeabiliteitsbepaling zijn alle indirecte; zij stellen ons in staat de verhouding der cellen en weefsels tot het water onder invloed van verschillende factoren meer of minder goed te leeren kennen, zonder dat precies kan nagegaan worden, welk aandeel elk dezer factoren op den bereikten eindtoestand heeft. OVERTON (93) maakte dan ook de opmerking, dat plasmolytische methoden alléén nooit zekerheid geven omtrent het al of niet permeabel zijn der stoffen. Slechts door contrôle met andere methoden kan men betrouwbare gegevens verzamelen.

Op een beter beginsel berusten daarom de:

B. *Chemische methoden der permeabiliteitsbepaling*, waarbij concentratieveranderingen der naar binnendringende stof scheikundig worden aangetoond, of waarbij op de opgenomen verbinding binnen de cel of in het perssap chemisch wordt gereageerd.

Reeds JANSE (51, 52), die de opneembaarheid van nitraten langs plasmolytischen weg had aangetoond, bewees door chemische reactie met sterk zwavelzuur en diphenylamine de aanwezigheid van het nitraat-ion in de cel. VAN RIJSSELBERGHE (113) merkte echter op, dat ook vele cellen, die niet in nitraatoplossingen gelegen hadden, met dit reagens een positieve reactie op nitraat gaven.

Een stapje verder ging NATHANSOHN (76), die de concentratie van de stof in de oplossing bepaalde, zowel als in het perssap der plantendeelen, welke in deze oplossing hadden gelegen en tot de conclusie kwam, dat de cel in staat is de opname der zouten te regelen. Nooit werd de concentratie *in* het celsap even groot als die er *buiten*. Het is echter niet waarschijnlijk, dat de uitkomsten van zijn onderzoek den werkelijken toestand weergeven. Schijven van 3 mm. dik van Dahliaknollen werden gedurende een bepaalden tijd in oplossingen gelegd, waarna zij met filtreerpapier gedroogd en dan uitgeperst werden. Bij dit persen treedt in de eerste plaats de interstitiële vloeistof en het imbibitievocht van de celwanden uit de weefsels. Daarna volgt het vrije celvocht en ten slotte misschien nog een deel van het imbibitiewater der protoplasmacolloïden, al naar gelang van den bij het persen uitgeoefenden druk. Het is duidelijk, dat de door het weefsel opgenomen stof in deze drie bestanddeelen van het perssap in verschillende concentraties aanwezig kan zijn.

Ook STILES (118) bepaalde de permeabiliteit van weefsels van aardappelknollen en rapen door scheikundige analyse. Nadat reeds door STILES en JØRGENSEN (121) en STILES en KIDD (123, 124) de endosmose en exosmose waren gemeten door de veranderingen van de geleidbaarheid der oplossing na te gaan, bevestigde dit onderzoek het vroeger gevonden resultaat, nl. dat de hoeveelheid van een zout of ion, die geabsorbeerd wordt in verhouding tot de concentratie, afhangt van de concentratie. Deze afhankelijkheid voldoet aan de formule van FREUNDLICH $y = k \times c^m$ (waarin y = inwendige eindconcentratie, c = uitwendige eindconcentratie en k en m constanten voorstellen). Uit lagere concentraties wordt meer stof geabsorbeerd dan uit hoogere, zoodat in groote verdunningen de concentratie in de cel vele malen die der vloeistof kan bedragen. Op grond van deze waarnemingen nemen STILES c.s. aan, dat de opgenomen stof

aan de celcolloïden wordt geadsorbeerd. De stofopname kan daarom niet als een eenvoudige diffusie door membranen worden opgevat. Althans dient de osmotische opvatting zoodanig te worden herzien, dat adsorbtië-evenwichten den eindtoestand beheerschen.

Nu is het niet duidelijk, op welke wijze door STILES en medewerkers de concentratie der opgenomen stof is bepaald. Volgens de formule van FREUNDLICH $y = k \times c^m$, is $y = \frac{a}{m}$ de hoeveelheid der stof, die door de eenheid van het adsorbtiemiddel is geadsorbeerd. Het is nu voor de beteekenis van de uitkomsten van STILES c.s. niet onverschillig of het geheele weefsel, dan wel de celcolloïden als adsorbens worden beschouwd.

Terecht meent STILES (120), dat zijn waarnemingen niet in strijd behoeven te zijn met die volgens plasmolytische methoden gedaan. Bij deze laatste wordt steeds met tamelijk hooge concentraties gewerkt, waarbij misschien slechts een betrekkelijk geringe hoeveelheid stof wordt geadsorbeerd; vooral zal dit het geval zijn in protoplasma-arme cellen, voor welke de plasmolytische methoden het best bruikbaar zijn.

SYDNEY G. PAINE (94) bepaalde de opname van stoffen in gistcellen chemisch, door zoowel de gist als de vloeistof te analyseeren, waarna de verhouding der concentratie in het celvocht der gist tot die in de vloeistof werd berekend. PAINE verkeerde in het onzekere in hoeverre de door hem waargenomen absorbtie mocht worden toegeschreven aan permeabiliteit. Hij zegt n.l. (blz. 306): „Since the yeast must of necessity be analysed as a whole, the question as to how far into the cells the various substances have penetrated, must at present remain in doubt.” De geringe opname van anorganische zouten schrijft hij geheel toe aan adsorbtië door den celwand. Waarschijnlijker lijkt het mij, dat deze zouten hoofdzakelijk in het imbibitiewater der celwanden waren opgelost.

Aschanalyses van levende planten uit water- of zandcultures of onder normale omstandigheden gegroeid, hebben ons geleerd, dat waarschijnlijk elk element, dat aan de planten geboden wordt, in de asch voorkomt. Het is echter van vele daarvan niet bekend, in welken vorm en wáár zij een deel van de plant uitmaken, in den protoplast, den celwand of in de interstitiële vloe-

stof. Over het permeabiliteitsvraagstuk leeren deze aschanalyses ons weinig.

De hier besproken chemische methoden, die bij eerste beschouwing den indruk maken van quantitative werkwijzen, zijn dit toch niet. Wel is het mogelijk concentratieveranderingen zeer nauwkeurig te bepalen; deze kunnen echter nog zeer verschillende oorzaken hebben. Zij kunnen geheel of gedeeltelijk ontstaan zijn door vermenging met de interstitiële vloeistof der weefsels, of het imbibitiewater der celwanden of door veranderingen in den zwellingsstoestand der cel of der celcolloïden.

In dezelfde mate geldt dit voor de:

C. Permeabiliteitsbepaling volgens *Physische methoden*, waarbij concentratieveranderingen met physische middelen worden gemeten.

Sommige van deze methoden sluiten zich zeer nauw bij de chemische aan, wanneer bv. concentratieveranderingen worden gemeten door bepaling der verandering van de vriespuntsverlaging of van de geleidbaarheid der oplossing, nadat cellen of weefsels daarin gedurende een zekeren tijd gesuspendeerd zijn geweest.

1. HEDIN (38, 39) en WARBURG en WIESEL (147) bepaalden de permeabiliteit van bloedlichaampjes door de *vriespuntsveranderingen* van oplossingen na te gaan.

2. STILES en JØRGENSEN (121) onderzochten den invloed van verschillende stoffen op de exosmose van electrolyten uit plantaardige weefsels door het meten van de *geleidbaarheid* der uitwendige vloeistof, terwijl door STILES en KIDD (123, 124) de opname van stoffen met deze methode werd bepaald. De resultaten van dit onderzoek zijn volgens STILES (119) dikwijls moeilijk te interpreteren. Zij beschouwen de door hen gevonden waarden als minimumwaarden voor de absorbtie.

3. Op een geheel ander beginsel berust de methode, waarbij de *geleidbaarheidsveranderingen van suspensies van cellen* worden gemeten.

Wanneer stoffen, die den electricen stroom niet geleiden, in een electrolyt-oplossing gesuspendeerd worden, veroorzaken zij daarin een daling van de geleidbaarheid, welke o.a. het gevolg is van verandering van het *geleidend volume*. Dit geldt ook voor plantaardige en dierlijke cellen en wel des te volkomener, naar-

mate zij minder voor het electrolyt doorlaatbaar zijn. De betrekking, die er bestaat tusschen de geleidbaarheid van de suspensie (x_s), die van het suspensiemiddel (x_d), en het percentage der niet geleidende ruimte (n), kan in het algemeen worden uitgedrukt door de formule:

$$x_s = \frac{1}{q} \times \left(1 - \frac{n}{100}\right) x_d$$

waarin $\frac{1}{q}$ aangeeft, welk deel van de geleidbaarheid van het suspensiemiddel tot zijn recht komt. $\frac{1}{q}$ is een variabele grootte, die zoowel van den aard als van de hoeveelheid der gesuspendeerde deeltjes afhangt. Bij verschillende verhoudingen tusschen serum en bloedlichaampjes is het verband tusschen x_s , x_d en n empirisch nagegaan door OKER-BLOM, TANGL en BUGARSKY, STEWART e.a. (zie HÖBER, 43) Uit de door hen gegeven empirische formules kan n berekend worden, wanneer x_s en x_d bekend zijn. Aan den anderen kant kan $\frac{1}{q}$ berekend worden, wanneer n bekend is. Naar gelang van de permeabiliteit wordt voor $\frac{1}{q}$ een andere waarde gevonden.

HYLKEMA (50) berekende uit het relatieve geleidingsvermogen $\frac{x_s}{x_d}$ de inkrimping van gistcellen in verschillende hypertonische zoutoplossingen en trok daaruit conclusies over de permeabiliteit.

4. Een werkwijze, die met de bovenstaande eenige overeenkomst heeft, is die van OSTERHOUT (84, 85), waarbij geleidbaarheidsveranderingen van weefsels worden gemeten. Hij bepaalde den weerstand van een kolommetje van 80—200 schijfjes van het thallus van *Laminaria saccharina*. De weerstand van zoo'n cylindertje in zeewater werd als norm aangenomen. Vermindering van den weerstand wijst volgens OSTERHOUT op grootere permeabiliteit. STILES (119) voert hiertegen aan, dat de geleidbaarheid van een stuk weefsel afhangt van een groot aantal fasen in dat weefsel. Wanneer de geleidbaarheid verandert, kan dit veroorzaakt zijn door veranderingen in elke van deze fasen. In levende weefsels hangt echter vermoedelijk de geleidbaarheid vooral af van de electrolytoplossing, die zich in de intercellulaire ruimten bevindt, zoodat veranderingen in de samenstelling van deze oplossing en in de doorlaatbaarheid van

deze ruimten voor ionen, een grooten invloed op de geleidbaarheid moeten hebben. Quantitatieve permeabiliteitsbepalingen zijn met deze methode van OSTERHOUT in elk geval niet uit te voeren.

5. BROOKS (6, 7) bepaalde de diffusiesnelheid van een zout door membranen uit plantenweefsels. Schijven van *Laminaria Agardhii* werden tusschen zoutoplossingen van verschillende concentratie geplaatst. De concentratieveranderingen aan beide zijden van de membraan, bepaalde hij door de afname of toename van de geleidbaarheid der beide oplossingen te meten. Zoo kon hij nagaan, hoeveel zout in de eenheid van tijd door de eenheid van oppervlakte diffundeerde bij de eenheid van concentratieverval. Oogenshijnlijk is dit het ideale geval; in werkelijkheid heeft deze permeabiliteit echter niets met die van het protoplasma uit te staan.

Zeer belangrijk voor onze kennis van het permeabiliteitsprobleem zijn de onderzoekingsmethoden geweest, waarbij de opneembaarheid van stoffen bepaald werd door:

D. *Directe waarneming van veranderingen binnen de cel veroorzaakt door de binnengedrongen stof.*

1. Stoffen, die in staat zijn levende cellen te kleuren, kunnen het protoplasma doordringen. PFEFFER (101) heeft van een groot aantal kleurstoffen de opneembaarheid door levende cellen nagegaan. Het bleek, dat vele kleurstoffen in zeer verdunde oplossing in staat waren, de cellen zeer intensief te kleuren. Zij worden in de cellen opgehoopt in een concentratie, welke vele malen die der oplossing kunnen bedragen. Soms wordt de vacuole (methyleenblauw), soms het protoplasma (rosolzuur) gekleurd. In de meeste gevallen echter kleuren zich zoowel de één als het andere. De sterke kleuring der cel schreef PFEFFER toe aan binding der kleurstof door bepaalde stoffen in de cel aanwezig, zooals bv. tannine. Het is ook mogelijk, dat de kleurstof door colloïden in de cel geadsobeerd wordt. Men zou dan echter verwachten, dat het protoplasma sterk gekleurd werd, wat in strijd is met de waarnemingen.

De vitale kleuring werd door OVERTON (90) verklaard in overeenstemming met de door hem opgestelde *lipoid-theorie*. In vetten oplozende kleurstoffen kunnen de cel binnen dringen, andere niet. RUHLAND (108) was daarentegen oorspronkelijk de

meening toegedaan, dat basische kleurstoffen de cel vitaal kunnen kleuren, terwijl zuren dit vermogen missen.

Nu wordt OVERTON's meening voor een groot deel gedekt door die van RUHLAND. In het algemeen nl. zijn de basische kleurstoffen oplosbaar in lipoiden, de zure niet. Er zijn daarentegen een aantal zure en basische kleurstoffen, die zoowel op de theorie van OVERTON, als op die van RUHLAND een uitzondering vormen. Eenige basische, grofdisperse kleurstoffen kleuren niet vitaal, ondanks hun oplosbaarheid in lipoiden. Sommige colloïdale zure kleurstoffen lossen op in lipoïdmengsels, maar zijn niet in staat de levende cel te kleuren (RUHLAND 110), terwijl volgens onderzoekingen van HÖBER (41, 42), KÜSTER (63), RUHLAND (110) en COLLANDER (8) een aantal zure kleurstoffen door bepaalde cellen goed wordt opgenomen.

NIRENSTEIN (82) trachtte de lipoid-theorie te redden, door als criterium der permeabiliteit de oplosbaarheid in een mengsel van oliezuur en diamylamine te stellen. Ofschoon een deel der uitzonderingen zoo onder den algemeenen regel kon worden gebracht, bleven andere kleurstoffen er toch buiten vallen (COLLANDER 8).

RUHLAND (111) heeft uit zijn proeven de conclusie getrokken, dat de grootte der opgeloste kleurstofdeeltjes bepaalt, welke de levende cel kunnen kleuren en welke niet. Het protoplasma is volgens hem te vergelijken met een ultrafilter. Zijn onderzoekingen over diffusie van kleurstoffen in gelatine-gels toonden aan, dat er volkomen paralleliteit bestond tusschen dispersiegraad en diffusiesnelheid in deze gels en de opneembaarheid door cellen. Ook uit de proeven van BILTZ (2) bleek, dat de grootte der kleurstofdeeltjes de diffundeerbaarheid door collodium membranen bepaalt. Ook hier zijn echter uitzonderingen op den regel.

HÖBER meent, dat naast de passieve kleurstofopname, die door de lipoid-theorie verklaard wordt, een actieve zg. *physiologische permeabiliteit* bestaat, „die von den Zellen regulativ zur Deckung ihres Bedarfs in Function gesetzt wird” (HÖBER 43, 5° A. bl. 521). Het is echter niet duidelijk, waarom bepaalde cellen behoefte zouden hebben aan zure aniline kleurstoffen.

R. COLLANDER (8) bepaalde de opname van sulfozure kleurstoffen quantitatief, door na bepaalde tijden de kleurstofconcentratie in de cel colorimetrisch te vergelijken met die der oplossing. Het

bleek, dat de meeste van deze kleurstoffen niet merkbaar in de cel drongen. De kleurstofconcentratie der oplossing bleef 8 tot 160 maal zoo sterk als die in de cel. De meening van RUHLAND, dat de sulfozure kleurstoffen in de cel niet worden waargenomen, omdat zij daar niet door adsorbtie worden opgehoopt, is daarom volgens COLLANDER niet juist. Hij meent, dat naast de lipoid-oplosbaarheid, bij de opname der kleurstoffen vooral adsorbtieverschijnselen en elektrische krachten van belang zijn.

Bij de beoordeeling der vitale kleuring van cellen moet bedacht worden, dat vele kleurstoffen indicatoreigenschappen hebben, zoodat zij in de cel een geheel andere kleur kunnen aannemen. Andere worden meer of minder ontkleurd, zoodat het kleurloos blijven der cel nog niet een bewijs is voor de impermeabiliteit t.o.v. de kleurstof.

2. Behalve van kleurstoffen kan ook de directe opname van stoffen worden aangetoond, als deze een neerslag in de cel veroorzaken. Dit is o.a. het geval met alcaloïden, die in vele plantencellen met tannine een neerslag geven. Het bleek aan OVERTON (88), dat de ongedissocieerde alcaloïd-basen vooral zeer snel worden opgenomen. Door RUHLAND werd dit bevestigd.

De snelheid van het naarbinnen dringen, wordt bij de alcaloïden zeer gemakkelijk overschat, aangezien deze reacties zoo uiterst gevoelig zijn. RUHLAND en HOFFMANN (112) wezen er op, dat volgens OVERTON strychnine in een verdunning van 1 op 10 tot 20 miljoen in spirogyra cellen nog een tannineneerslag veroorzaakt. Waarneming der permeabiliteit hangt hier dus af van de gevoeligheid der reactie. Daarom mogen de uitkomsten bij de verschillende alcaloïden verkregen niet met elkaar worden vergeleken en hebben de bepalingen slechts kwalitatieve waarde.

3. Van vele zuren en basen is de opneembaarheid bepaald door in anthocyaan bevattende cellen den kleuromslag na te gaan (BRENNER 5), terwijl in andere gevallen de cellen opzettelijk gekleurd werden met een indicator bv. neutraalrood. Zoo vond NEWTON HARVEY (37), dat zwakke basen zeer snel worden opgenomen, terwijl de sterke basen zeer langzaam naar binnen diffundeeren. Bij dezen kleuromslag, door zuren en basen veroorzaakt, moet men voorzichtig zijn met het trekken van conclusies over de diffusiesnelheid. De kleuromslag wordt niet bepaald door de hoeveelheid naar binnen gedrongen zuur of base, maar door de

waterstofionenconcentratie. Het onderscheid tusschen de sterke basen en zuren eenerzijds en de zwakke anderzijds is daarom des te treffender. Vele zwakke zuren, die stellig snel worden opgenomen, zijn door hun geringe dissociatie niet in staat de celkleurstof te doen omslaan. Een andere mogelijkheid is echter, dat de zuren en basen niet als zoodanig in de cel blijven bestaan, doch gebonden worden.

Bij het hier gegeven overzicht van de belangrijkste methoden der permeabiliteitsbepaling, waarop nog vele variaties mogelijk zijn, treft ons de enorme gecompliceerdheid van het schijnbaar zoo eenvoudige vraagstuk van het meten der diffusiesnelheid door celmembranen. De complicaties, die de quantitative bepaling der stofopname door de cel bemoeilijken, zijn voor het grootste deel toe te schrijven aan onbekendheid met de verschijnselen, welke zich afspelen in de verschillende fasen, waaruit de cel is opgebouwd. Deze fasen zelf kennen we nog zeer onvoldoende. Het permeabiliteitsprobleem zal ten zeerste gebaat zijn bij een beter inzicht in het aandeel, dat het water aan deze verschillende fasen neemt. Het meten van waterverplaatsingen, die tot nu toe nooit bepaald zijn, neemt daarom een belangrijke plaats in bij de quantitative bepaling der permeabiliteit.

Het volgende hoofdstuk handelt over een methode, waarmee deze waterverplaatsingen kunnen worden gemeten en over de betrekking, die tusschen de vaste en de vloeibare fase in de cel bestaat.

HOOFDSTUK II.

DE WATERHUISHOUDING VAN DE CEL.

Het moge uit het voorgaande hoofdstuk gebleken zijn, dat het bij de exacte bepaling der permeabiliteit in de eerste plaats aankomt op meting van concentratieveranderingen, waarbij de oorzaken van deze concentratieveranderingen nauwkeurig in het oog moeten worden gehouden. We dienen ons dus rekenschap te geven van wat er gebeurt, wanneer cellen of weefsels in een oplossing worden gesuspendeerd.

Wanneer een bepaalde hoeveelheid weefsel of cellen in een oplossing van bekende sterkte wordt gebracht, dan zal in het algemeen gesproken de concentratie der oplossing veranderen. Daling der concentratie kan het gevolg zijn van vermengen met het intercellulaire water der weefsels of het aanhangende water der cellen. Is de wandsubstantie der cellen permeabel voor de opgeloste stof, dan voegt zich hier nog bij het imbibitiewater der celwanden, voor zoover dit niet colloïdaal gebonden is. Een verdere daling zal nog optreden, wanneer het protoplasma de opgeloste stof doorlaat, zoodat tenslotte de opgeloste stof zich gelijkmatig over oplossing en vrij celvocht kan verdeelen. De eindconcentratie der oplossing kan echter nog beïnvloed worden door grootere oplosbaarheid der stof in bepaalde bouwstoffen der cel, door vorming van niet diffundeerende chemische verbindingen, door adsorbtie en door de vorming van „*Donnan-evenwichten*”, terwijl in sommige gevallen door assimilatie- en dissimilatieprocessen de stof geheel uit de oplossing kan verdwijnen. Concentratiedaling treedt voorts nog op in hypertoonische oplossingen of door verlaging van den zwellingsstoestand van de celcolloïden. Aan den anderen kant kan in hypotonische oplossingen of door verhooging van den zwellingsdruk water worden opgenomen voor zoover de celwand dat toelaat. Katatonose en

anatonose beïnvloeden deze waterverplaatsing in tegengestelden zin.

Het voor de levende cellen zoo belangrijke water komt daarin voor op zeer verschillende wijzen, nl. als aanhangend of intercellulair water, als imbibitiewater der celwanden, als oplosmiddel in het protoplasma en tenslotte als hydratatie water der colloïdaal- of moleculairdisperse stoffen of der electrolyt-ionen. Een deel van het vocht bevindt zich dus buiten, een ander deel binnen het protoplasma.

Een nader inzicht te krijgen in de verdeling van de vloeistof over de cel en de wijze, waarop deze verdeling onder invloed van uitwendige factoren staat, was de bedoeling van het onderzoek, dat aan de eigenlijke permeabiliteitsbepaling voorafging. Dit inzicht werd verkregen door het meten van concentratieveranderingen van oplossingen, wanneer daarin cellen worden gesuspendeerd. Voor het onderzoek is de keuze van het object van het grootste belang. Waar het aankomt op het meten van concentratieverschillen, is het wenschelijk, dat deze zoo groot mogelijk worden. Om groote verschillen te krijgen, moeten we echter over veel cellen beschikken, welke, in de oplossing gesuspendeerd, zoo snel mogelijk door de vloeistof worden omgeven. Daardoor ontstaat een groot diffusieoppervlak en komt het aanhangende- en imbititiewater der celwanden in direct contact met de oplossing. Concentratieveranderingen grijpen dan overal gelijktijdig en gelijkmatig plaats. Voor het onderzoek werd persgist, van de Ned. Gist- en Spir.-fabriek te Delft gekozen.

Hiervan werd nu in de eerste plaats het *totale vochtgehalte* bepaald door een afgewogen hoeveelheid gist (ongeveer 5 g.) innig te mengen met een gewogen hoeveelheid infusoriënaarde van bekend vochtgehalte. Van een zestal monsters varieerde het uit het drooggewicht berekende vochtgehalte van 73 % tot 76,8 % en bedroeg gemiddeld ongeveer 75 %.

Meer moeilijkheden leverde de bepaling op van het in en op de celwanden aanwezige vocht. Mej. J. VAN AMSTEL (1) geeft de volgende methode aan, die haar in staat stelde, dit vocht te bepalen:

„40 g. persgist van de Ned. Gist- en Spir.-fabriek te Delft worden met 50 cm³ eener 5 % glucoseoplossing snel bij lage temperatuur aangewreven en dan onmiddellijk afgefiltreerd. In

het filtraat werd de glucose bepaald volgens de titratie-methode van SCHOORL. De glucoseconcentratie was gedaald van 5 % op 3,9 %. Uit deze concentratiedaling werd het watergehalte der gist buiten het protoplasma berekend op 35 %."

Deze daling is waarschijnlijk niet aan permeabiliteit der gist voor de suiker toe te schrijven. SWELLENGREBEL (125) immers, die de permeabiliteit bij *Saccharomyces cerevisiae* naging met behulp van de deplasmolyse, vond dat 24 uur nodig was om deplasmolyse van juist door glucose geplasmolyseerde gist te verkrijgen. Glucose wordt dus volgens SWELLENGREBEL zeer langzaam opgenomen door de gist. Ook is een 5 % glucose-oplossing niet in staat water aan de gist te onttrekken, daar volgens SWELLENGREBEL's onderzoek de gist isotonisch is met 8 % glucose, terwijl Mej. VAN AMSTEL een plasmolytische grensconcentratie van 7 % glucose vond, waarbij als kenmerk voor de plasmolyse gold: „het kleiner worden der vacuole en het dientengevolge samenballen der granula rondom de vacuole." Nu kan het gehalte van 35 % vocht buiten het protoplasma aanwezig, volgens Mej. VAN AMSTEL nog te hoog gevonden zijn tengevolge van adsorbtie der suiker op de gist. De grootte van deze adsorbtie werd niet nader bepaald.

Dat deze adsorbtie in geringe concentraties waarschijnlijk vrij belangrijk is, blijkt uit de volgende proef:

Suspensies van 50 gram persgist in 50 cm³ glucose-oplossingen van verschillende concentraties, werden zoo snel mogelijk gecentrifugeerd. Ofschoon zoo vlug mogelijk gewerkt werd, was de gist toch nog gedurende ongeveer 15 min. in de glucose-oplossingen. Door de temperatuur der oplossingen op 0° C. te brengen, was de vergisting der suiker zoo veel mogelijk tegengehouden. Toen we nu uit de dalingen der glucose-concentraties, die volgens SCHOORL bepaald werden, de verdunning door het aanhangende- en het imbibitiewater der celwanden berekenden, bleek deze bij de lagere suikerconcentraties zeer hoog te zijn. Bij 0,24 % glucose bedroeg zij zelfs 600 cm³ per 100 gram gist. Immers het aantal cm³ water (V), dat aan 100 cm³ eener oplossing met een concentratie C moet worden toegevoegd om een concentratie C_1 te verkrijgen, bedraagt:

$$V = \frac{(C - C_1)100}{C_1} \dots (1).$$

Deze groote concentratiedalingen moeten een andere oorzaak hebben; misschien zijn zij grootendeels toe te schrijven aan adsorbtie der glucose op de gist. Bij de beginconcentratie van 0,24 % was $V = \frac{(0.24-0.06)100}{0,06} = 300 \text{ cm}^3$. Aangezien in 100 cm^3 oplossing 50 gram gist werd gesuspendeerd, zouden zich dan op 100 gr. gist $2 \times V = 600 \text{ cm}^3$ water bevonden hebben. Op dezelfde wijze werden de andere waarden voor V berekend (zie Tabel I).

TABEL I.

Concentratie der gluc. in %		Daling ($C - C_1$)	Verdunning met % H_2O (V)	% Water op de gist ($2 \times V$)
Oorspr. (C)	Na centr. (C_1)			
0,24	0,06	0,18	300	600
0,485	0,28	0,205	73	146
0,73	0,5	0,23	46	92
1,21	0,92	0,29	31,5	63
1,47	1,15	0,32	28	56
2,90	2,55	0,35	13,7	27,4
8,70	7,57	1,13	15	30

Tot een concentratie van 2,90 % daalt V , terwijl bij 8,70 % glucose weer een hoogere waarde voor V gevonden werd. Deze laatste toename van V moet waarschijnlijk aan wateronttrekking worden toegeschreven.

Dezelfde proef werd nu herhaald met een niet vergistbare suiker, nl. met lactose. Nu waren de voor V gevonden waarden veel geringer, en tevens waren zij in veel geringere mate afhankelijk van de beginconcentratie (zie tabel II).

TABEL II.

Concentr. lact. in %		Daling ($C - C_1$)	Verdunning met % water (V)	% Water op de gist ($2 \times V$)
Oorspr. (C)	Na centr. (C_1)			
0,485	0,45	0,035	7,8	15,6
1,47	1,37	0,10	7,3	14,6
2,90	2,72	0,18	6,6	13,2
5,80	5,45	0,35	6,4	12,8
8,70	8,00	0,70	8,75	17,5

Aanvankelijk daalt V iets met de concentratie, wat op een

geringe adsorbtie door de gistcellen wijst, terwijl bij de hoogere concentraties water aan de gist wordt onttrokken.

Om nu uit te maken voor welk deel een verdunning door het imbibitiewater der celwanden en voor welk deel door wateronttrekking aan het protoplasma moet worden toegeschreven, is het noodig de concentratie te kennen, die nog juist water onttrekt aan de normale, dus turgescente gistcel. Uit tabel II blijkt, dat bij een lactose concentratie van 8.70 % een belangrijk grootere daling optreedt dan bij de lagere concentraties. Deze groote daling kan worden veroorzaakt, doordat water uit de cel treedt, of doordat lactose naar binnen is gediffundeerd.

SÖHNGEN en WIERINGA (114) hebben nu een methode aangegeven, die hen in staat stelde, het uittreden van water uit de cel quantitatief te bepalen.

Door aan de oplossing een derde stof toe te voegen, die niet in de cel dringt, niet noemenswaard bijdraagt tot de verhooging van den osmotischen druk der oplossing en die tevens gemakkelijk quantitatief te bepalen is, is het mogelijk, de waterverplaatsing te meten en daarmee ook tegelijkertijd de opname der opgeloste stof door de cel te bepalen.

Als derde stof werd nu in de eerste plaats gedacht aan kleurstoffen. Een groot aantal kleurstoffen werd aan gistsuspensies toegevoegd, die daarna werden gecentrifugeerd. Daarbij bleek, dat van sommige kleurstoffen een deel met de gist uit de oplossing verdween, tengevolge van het centrifugeeren of door adsorbtie op de gistcellen, terwijl bij andere in de gecentrifugeerde oplossingen de kleur zoodanig was veranderd, dat van een colorimetrische bepaling geen sprake meer kon zijn. Deze kleurveranderingen zijn gedeeltelijk toe te schrijven aan indicator-eigenschappen der kleurstoffen, gedeeltelijk ook aan troebeling der gecentrifugeerde oplossing.

Ook oplosbare amyllum was onbruikbaar. Na het centrifugeeren met de gist was het zetmeel niet meer jodometrisch te bepalen. Gedeeltelijk wordt misschien de amyllum op de gist geadsorbeerd, terwijl tevens jodiumbindende stoffen van de gist in het centrifugaat komen.

Tenslotte viel de keuze op gelatine, die volkomen aan de gestelde eischen bleek te voldoen. Door toevoeging van een geringe hoeveelheid gelatine aan de oplossingen is het mogelijk, de ver-

plaatsing van water in en uit de cel nauwkeurig te meten. Dit moge blijken uit de volgende proeven met lactose en natrium chloride.

Lactose werd tot verschillende concentraties opgelost in een 0,5 procentige gelatine-oplossing (zie tabel III). Door nu telkens 100 g. persgist met 200 cm³ dezer lactose-gelatineoplossingen snel aan te wrijven en daarna te centrifugeeren, kon in het centrifugaat de invloed van deze bewerking op de concentratie worden nagegaan. De lactose bepaling geschiedde volgens de titratie-methode van SCHOORL. Verdunnen we de oplossingen zoodanig, dat 10 cm³ der verdunning het aantal m.g. lactose bevatten, dat in kolommen 2 en 3 (tabel III) vermeld staat, dan vinden we door vermenigvuldiging dezer cijfers met die van kolom 1, de juiste hoeveelheid suiker per 10 cm³ der onverdunde oplossing.

De gelatine werd bepaald door 50 cm³ der oplossingen te kjeldahlen. Kolom 6 en 7 geven aan hoeveel cm³ 0,1 N. zwavelzuur het destillaat verbruikte voor en na de bewerking. De daling, welke de gelatine-titers in kolom 6 bij stijgende lactoseconcentraties vertoonen, is ontstaan, doordat een deel der oplossing door lactose is ingenomen. Uit de concentratiedaling $C - C_1$ der lactose (kolom 4) en der gelatine (kolom 8) volgt volgens formule (1) het aantal cm³ water, dat aan 100 cm³ der oorspronkelijke oplossing moet worden toegevoegd om deze daling te veroorzaken. De verdunning der lactose V_{lact} geeft kolom 5, die der gelatine V_{gel} geeft kolom 9 weer. In fig. I zijn V_{lact} en V_{gel} graphisch uitgezet in hun afhankelijkheid van de concentratie.

TABEL III.

Lact. in %	Titer lactose		$C - C_1$ lact.	V lact.	Titer gel.		$C - C_1$ gel.	V. gel.	V lact. — V gel.
	C	C_1			C	C_1			
0	0	0	—	—	23,8	23,75	0,05	0,2	—
1	99,0	91,0	8,0	8,8	23,8	23,75	0,05	0,2	8,6
2,5	98,75	90,25	8,5	8,8	23,4	23,25	0,15	0,6	8,2
5	99,0	90,5	8,5	9,4	23,1	23,05	0,05	0,2	9,2
10	100,0	89,0	11,0	12,4	22,05	21,4	0,65	3	9,4
15	100,0	87,5	12,5	14,3	20,95	20,15	0,8	4	10,1
20	99,5	86,0	13,5	15,7	20,5	19,15	0,9	4,7	11,0

Uit tabel III blijkt, dat de lactose bij concentraties tot 5 % een tamelijk constante verdunning ondergaat; V_{lact} bedraagt

gemiddeld 8,8 %. Bij concentraties van 10 % en meer lactose stijgt dat bedrag aanmerkelijk, en wel in toenemende mate met de concentratie. De dalingen der gelatine titers gaan hiermee parallel; alleen zijn ze geringer en beginnen ze pas bij de lactoseoplossingen van 10 %. Op ongedwongen wijze is dit verschillend gedrag der gelatine en lactose te verklaren door aan te nemen, dat de wandsubstantie der gist voor de gelatine ondoordringbaar is, terwijl zij voor de lactose moleculen geen belemmering vormt. Daardoor wordt bij de lagere concentraties de lactose verdund met het imbibitiewater der celwand, het water dus dat buiten het protoplasma der gist aanwezig is. Dit bedraagt hier 8,8 % van het oorspronkelijke vloeistofvolume of $17,6 \text{ cm}^3$ per 100 gram gist. Zooals reeds werd opgemerkt, kan dit cijfer iets aan den hoogen kant zijn door een gedeeltelijke adsorbtie der lactose aan de gist, waarvoor volgens de voorgaande proef een aanwijzing bestaat. De daling der gelatine-titer in de hoogere lactoseconcentraties wordt veroorzaakt, doordat water uit de gistcel treedt. Het volume der cel wordt geringer. De concentratiedaling der lactose in de sterkere oplossingen ontstaat door het imbibitiewater (I) en door water, dat aan de cel wordt onttrokken, waarvan een deel geheel buiten de cel komt, (V_{gel}), terwijl een ander deel zich tusschen celwanden en protoplasma bevindt. Dit deel (P) geeft dus aan, hoe sterk de plasmolyse is. $P = V_{lact} - (I + V_{gel}) \dots (2)$.

In een oplossing van 20 % lactose is $P = 15,7 - (8,8 + 4,7) = 2,2$ % van het volume der lactoseoplossing of $4,4 \text{ cm}^3$ per 100 gram gist. Zoo kan voor elke concentratie de mate der plasmolyse berekend worden.

Op geheel overeenkomstige wijze werd met keukenzoutoplossingen gewerkt. In tabel IV is de concentratie NaCl in grammen per 100 cm^3 vermeld. Hierbij dient opgemerkt te worden, dat het afwegen van het NaCl niet met de uiterste zorg geschiedde, daar de juiste concentratie bepaald werd door titratie van het Cl⁻ ion. Daar de titratie van het Cl⁻ volgens MOHR niet nauwkeurig is voor grootere hoeveelheden Cl⁻, werden oplossingen boven 1 % zoodanig verdund, dat 10 cm^3 der verdunning het in kolommen 2 en 3 vermelde aantal cm^3 zilvernitraat oplossing verbruikten. Vermenigvuldiging van de cijfers uit kolom 2 en 3 met die uit kolom 1 geven de juiste verhoudingen der chloor-

titers van de onverdunde oplossingen weer. De gelatine bepaling geschiedde door kjeldahlen van 80 cm³ der oplossingen.

TABEL IV. (Fig. II).

NaCl. in %	Titer Cl.		C - C _i Cl.	V Cl.	Titer gel.		C - C _i gel.	V gel.	V Cl. V gel.
	C	C _i			C	C _i			
0	0	0	—	—	42,4	42,4	0	—	—
0,1	18	16,9	1,1	6	42,0	41,9	0,1	0,2	5,8
0,2	18	17,0	1,1	6	42,4	42,4	0	0	6
0,4	17,9	16,8	1,1	6,5	41,8	41,6	0,2	0,4	6,1
0,6	17,7	16,4	1,3	7,8	41,5	41,2	0,3	0,7	7,1
1	17,8	16,2	1,6	9,9	40,8	39,1	1,7	4,4	5,5
1,5	17,7	15,3	2,4	13,5	41,6	39,4	2,2	5,6	7,9
2	17,7	15,0	2,7	15,3	41,7	38,6	3,1	8,0	7,3
3	17,6	14,6	3,0	17,9	41,6	38,0	3,6	9,4	7,6
4	17,6	14,2	3,4	19,3	42,4	38,0	4,4	11,5	7,8
5	17,9	14,0	3,9	21,7	42,3	37,6	4,7	12,5	9,2

De verdunning van het NaCl is bij concentraties beneden 0,6 % tamelijk constant. Vanaf 0,6 % neemt ze toe, terwijl ook de gelatine dan een verdunning ondergaat, die met stijgende NaCl concentratie toeneemt. Hier begint dus het water uit de gist te treden, terwijl bij de hogere concentraties de gist geplasmolyseerd is. Stellen we $I = 6,5$ % dan is de plasmolyse bij 5 % NaCl $P_5 = 21,7 - (6,5 + 12,5) = 2,7$ % van de vloeistof of 5,4 cm³ per 100 gram gist. Zoo kan ook hier voor elke concentratie P worden berekend. De fout van de P -waarden is tamelijk groot, daar alle analysefouten zich in het voor de plasmolyse berekende bedrag ophoopen, welke op de gist omgerekend, nog met 2 worden vermenigvuldigd.

Geringe hoeveelheden stikstofverbindingen, welke van de gist worden afgespoeld, of daaruit diffundeeren, werden bepaald door het centrifugaat van gistsuspensies in 0,5 % keukenzoutoplossingen te kjeldahlen. Met de zoo gevonden cijfers zijn de gelatine titers in deze en de volgende proeven verminderd. Eveneens geschiedde met de chloortiters, die verminderd werden met blanco bepalingen, verkregen uit centrifugaten van 0,5 % gelatine oplossingen.

De plasmolyse kon evenmin als bij de hooge lactoseconcen-

traties microscopisch worden waargenomen. Dit moet waarschijnlijk gedeeltelijk worden toegeschreven aan vormveranderingen, die de gistcel in geplasmolyseerden toestand ondergaat. Vele cellen nemen onregelmatige vormen aan, zoodat plooiën in den celwand ontstaan.

Het uittreden van water uit de gistcellen gaat gepaard met het kleiner worden der cellen. Door nauwkeurige meting der lengte en breedte der cellen, was het misschien mogelijk, de met de beschreven methode gevonden waterverplaatsing te controleren. Teneinde na te gaan in hoeverre nauwkeurige meting van lengte en breedte der gistcellen in NaCl oplossingen van verschillende concentraties betrouwbare cijfers konden geven omtrent volumeverandering en vochtverlies van de cel, werd een groot aantal gistcellen in keukenzoutoplossingen van 2 % en 5 % en in leidingwater gemeten. De heer F. NIJDAM, aan wien ik bij dezen mijn hartelijken dank betuig voor de groote nauwgezetheid, waarmee hij de metingen en berekeningen uitvoerde, onderzocht daartoe 6 gistmonsters. Van elk dezer monsters werd telkens 0,25 gram gesuspendeerd in 100 cm³ oplossing, bevattende 0 g., 2 g. of 5 g. NaCl. Van elk dezer suspensies zijn telkens 100 cellen onder den microscoop nauwkeurig geteekend met behulp van een Abbe-teekenspiegel, terwijl als vergrootings-systeem een Zeiss-apochromaat 16 mm. en een compensatie oculair 12 werden gebruikt, waarmee mooie scherp-omlijnde beelden der gistcellen kunnen worden waargenomen. Van elke geteekende cel werden lengte en breedte gemeten. Bij de drie concentraties ontstonden zoo 6 reeksen van 100 varianten, zoodat voor de lengte als voor de breedte, waaruit telkens het arithmetisch gemiddelde is berekend. Uit de gemiddelden der zes reeksen is opnieuw voor elke concentratie het arithmetisch gemiddelde berekend, zoo ook de middelbare fout en de fout van het verschil, waardoor een inzicht kan worden verkregen in het al of niet reëel zijn van de gevonden verschillen.

De arithmetisch gemiddelden voor lengte en breedte der 6 gistmonsters en de daaruit berekende arithmetisch gemiddelden (M_l en M_b), middelbare fouten (μ) en fouten van het verschil ($\mu_{diff.}$) volgen hieronder in tabel V en VI.

TABEL V.

LENGTE VAN 100 GISTCELLEN IN NACL OPLOSSINGEN VAN:

Monster	0 % Arithm. gem.	Dev.	2 % Arithm. gem.	Dev.	5 % Arithm. gem.	Dev.
A	6,81	+ 0,02	6,45	— 0,01	6,09	— 0,09
B	6,50	— 0,29	6,40	— 0,06	6,12	— 0,06
C	6,77	— 0,02	6,15	— 0,31	6,17	— 0,01
D	6,57	— 0,22	6,35	— 0,11	6,25	+ 0,07
E	6,91	+ 0,12	6,84	+ 0,38	6,24	+ 0,06
F	7,15	+ 0,36	6,56	+ 0,10	6,21	+ 0,03
Ar. gem.	$M_{l_0} = 6,79$		$M_{l_2} = 6,46$		$M_{l_5} = 6,18$	
μ	$\mu = \pm \sqrt{0,009}$		$\mu = \pm \sqrt{0,0085}$		$\mu = \pm \sqrt{0,0007}$	

$$\mu \text{ diff. } 0-2 \% = \pm \sqrt{0,009 + 0,0085} = \pm 0,13$$

$$\mu \text{ diff. } 2-5 \% = \pm \sqrt{0,0085 + 0,0007} = \pm 0,1$$

$$\text{Diff. } M_{l_0} - M_{l_2} = 0,33 \pm 0,13$$

$$\text{Diff. } M_{l_2} - M_{l_5} = 0,28 \pm 0,1$$

TABEL VI.

BREEDTE VAN 100 GISTCELLEN IN NACL OPLOSSINGEN VAN:

Monster	% Arithm. gem.	Dev.	2 % Arithm. gem.	Dev.	5 % Arithm. gem.	Dev.
A	4,88	— 0,04	4,59	+ 0,07	4,34	+ 0,1
B	4,95	+ 0,03	4,30	— 0,22	4,02	— 0,20
C	4,88	— 0,04	4,31	— 0,21	4,05	— 0,19
D	4,76	— 0,16	4,42	— 0,10	4,30	+ 0,06
E	4,88	— 0,04	4,93	+ 0,41	4,45	+ 0,21
F	5,16	+ 0,24	4,56	+ 0,04	4,26	+ 0,02
Ar. gem.	$M_{b_0} = 4,92$		$M_{b_2} = 4,52$		$M_{b_5} = 4,24$	
μ	$\mu = \pm \sqrt{0,003}$		$\mu = \pm \sqrt{0,009}$		$\mu = \pm \sqrt{0,004}$	

$$\mu \text{ diff. } b_0 - b_2 = \pm \sqrt{0,003 + 0,009} = \pm 0,11$$

$$\mu \text{ diff. } b_2 - b_5 = \pm 0,12$$

$$\text{Diff. } M_{b_0} - M_{b_2} = 0,40 \pm 0,11$$

$$\text{Diff. } M_{b_2} - M_{b_5} = 0,28 \pm 0,12$$

Uit de tabellen V en VI blijkt, dat de lengte en de breedte der gistcellen in geconcentreerde oplossingen weliswaar afnemen, maar tevens, dat deze metingen tamelijk onnauwkeurig zijn. De lengte der gistcellen is grooter in keukenzoutoplossingen van 2 %, dan in 5 % oplossingen. Bij een concentratietoename van 0 tot 2 % staat de lengte-afname niet met dezelfde zekerheid vast, daar de fout van het verschil meer bedraagt dan $\frac{1}{3}$ van het verschil der arithm. gem. M_{10} en M_5 . Het omgekeerde nemen we waar bij de afname van de breedte met stijgende concentratie. De afname der breedte met stijgen der concentratie van 0 tot 2 % ($M_{b_2} - M_{b_5} = 0.40 \pm 0.11$) is met wiskundige zekerheid vastgesteld, terwijl het breedteverschil tusschen de cellen uit 2 % en uit 5 % oplossingen minder zeker is. De volumevermindering is in de lagere concentraties vooral toe te schrijven aan de afname der breedte, terwijl in de hogere concentraties vooral de lengte kleiner wordt. De betrekkelijk geringe zekerheid der verschillen in lengte en breedte in de diverse oplossingen met groote concentratieverschillen, noodigde niet uit tot het doen van meer metingen van cellen, welke in oplossingen met kleinere concentratieverschillen gelegen hadden, daar niet te verwachten was, dat zoo de concentratie, die nog juist water aan de cel onttrekt, met voldoende nauwkeurigheid zou kunnen worden bepaald.

Nog op andere wijze werd getracht de concentratie te vinden, die aan de gistcellen nog juist geen water onttrekt, dus het volume niet verandert.

HÖFLER (45) berekende de plasmolytische grensconcentratie door toepassing van de wet van BOYLE-MARIOTTE-VAN 'T HOFF op plantencellen. Daarbij wees hij erop, dat bij protoplasmarijke cellen aan deze wet slechts voldaan werd, wanneer een correctiefactor werd aangebracht. De volumeveranderingen van den protoplast moeten hoofdzakelijk, zoo niet uitsluitend worden toegeschreven aan volumeveranderingen der vacuole. Het protoplasma houdt zijn zwellingswater vast en doet niet mee aan de volumeveranderingen.

OVERTON (92) nam in 1902 reeds verschijnselen waar, die daarmee overeenstemmen. Spieren, welke uit een 0.7 % NaCl-oplossing in 0.35 % NaCl werden gebracht, verkregen lang niet het dubbele gewicht. Zoo vermeerderde bv. een spier die 300 mg.

woog, zijn gewicht tot 505 mg. Stel dat $\frac{1}{5}$ der spier uit lympe en bindweefsel bestond en de eigenlijke spierfibrillen in 0,7 % NaCl dus slechts 240 mg. wogen, dat bovendien door de zwelling 30 mg. lympe werd uitgeperst en de spier 20 % droge stof bevatte, dan zou bij verlaging van den osmotischen druk der oplossing tot de helft, het gewicht in die oplossing moeten bedragen $\frac{20 + 2 \times 80}{100} \times 240 + 30 = 462$ mg., dus 60 mg. meer dan in werkelijkheid het geval was. Uit deze door OVERTON gegeven cijfers kan nu berekend worden, hoe groot het zwellingswater der protoplasmacolloïden is. Stellen we deze zwelling op x , dan is $\frac{20 + x + 2 \times (80 - x)}{100} \times 240 + 30 = 405$ en dus $x = 24$. Voor het vrije celvocht blijft dan 56 % over, terwijl 44 % der cel als niet oplossende ruimte kan worden beschouwd. HAMBURGER (35) berekende voor bloedlichaampjes een gehalte van 40 tot 50 % vrije oplossing, terwijl het totale vochtgehalte ongeveer 60 % bedroeg.

In den laatsten tijd is o.a. door NETTER (80) gewezen op de groote beteekenis voor physiologische vraagstukken van de juiste kennis van de ruimte, die door de disperse phase (de niet oplossende ruimte) wordt ingenomen. Hij berekende deze met de wet van BOYLE-MARIOTTE-VAN 'T HOFF $P \times V = K$. Als V het totale volume der cel voorstelt, en N de disperse phase, dan is $V - N$ het veranderlijke volume en geldt: $P \times (V - N) = K$, wanneer $V - N$ onbelemmerd kan zwellen of krimpen. Dergelijke metingen zijn door EGE (15) gedaan voor roode bloedcellen en door NETTER (79) voor zenuwcellen. Wanneer aangenomen werd, dat de zenuwen voor 30 % uit bindweefsel bestaan, kan voor de disperse phase een ruimte van 40 % berekend worden.

Voor de gistcellen is nu op dezelfde wijze de disperse phase bepaald, welke hier belangrijk grooter gevonden werd, doordat de celwanden daarbij meegeteld werden. Hoeveelheden van 50 gram gist, gesuspendeerd in 100 cm³ NaCl oplossingen met een concentratie C_0 (Tabel VII) en een Chloortiter T_0 , werden gecentrifugeerd, waarna de Cl-titer T_1 geworden was, overeenkomende met een concentratie $C_1 \cdot 2 V_{Cl}$, op de reeds beschreven wijze berekend, is nu de hoeveelheid water, die zich per 100 gram gist buiten de cel als vrij oplosmiddel bevindt. Nemen we nu

het door KUSSEROW (62) opgegeven sp.gew. van 1,1 voor de gist aan, dan is het volume V , dat door 100 gram gist in de oplossing wordt ingenomen $V = \frac{100}{s} - 2V_{Cl}$. De relatieve osmotische druk ($P_{rel.}$) der oplossingen, waarmee de gist na de behandeling in osmotisch evenwicht is, is berekend uit de vriespuntsverlagingen der NaCl-oplossingen met concentraties C_1 . Deze vriespuntsverlagingen werden door interpolatie gevonden uit cijfers van H. C. JONES (55). De osmotische druk van een 0,55 % NaCl oplossing werd daarbij op 1 gesteld. De berekening der disperse phase N volgt nu uit de formule:

$$P_1 (V_1 - N) = P_2 (V_2 - N).$$

waaruit volgt:

$$N = \frac{P_2 V_2 - P_1 V_1}{P_2 - P_1} \dots \dots \dots (3)$$

TABEL VII.

DE DISPERSE PHASE (N) DER GISTCEL.

Concentr. en Titer				2 Vcl = cm ³ per 100 gram gist	P. rel.	Vol. v. 100 g. gist	(V - N)	P(V - N)
Oorspronk.		Na bewerking						
Co %	To	T ₁	C ₂ %					
0,6	10,67	9,78	0,550	18,2	1	72,8	8,4	8,4
0,7	12,45	11,36	0,648	19,2	1,17	71,8	7,4	8,6
0,9	15,92	14,42	0,815	20,8	1,45	70,2	5,8	8,4
1,0	17,24	15,58	0,919	21,4	1,64	69,6	5,2	8,5
1,1	19,08	17,20	0,992	21,8	1,76	69,2	4,8	8,4
1,2	20,95	18,68	1,070	24,4	1,9	66,6		

Uit 5 verschillende waarden voor P en V volgden 10 verschillende waarden voor N (tabel VIII), waaruit voor N een gemiddelde van 64,4 % berekend werd.

De disperse phase der gistcel, welke gevormd wordt door de celwanden en het protoplasma, bedraagt dus 64,4 % van het totale volume. Hierbij is aangenomen, dat de colloïden in het geheel geen volumeveranderingen ondergaan in de verschillende concentraties. Dit is waarschijnlijk slechts binnen zeer beperkte grenzen het geval, wat blijkt uit de afname van N met stijgende concentraties. Nog duidelijker wordt dit, wanneer N berekend wordt uit de cijfers, die bij 1,2 % NaCl gevonden werden. Een

groepeering van de waarden voor N , waaruit de invloed van de concentratie blijkt, vindt men in tabel IX.

TABEL VIII.

N.	Berek. uit Conc.
67	0,6 en 0,7 %
65	0,6 „ 0,9 „
64,8	0,6 „ 1,0 „
64,4	0,6 „ 1,1 „
63,6	0,7 „ 0,9 „
63,8	0,7 „ 1,0 „
63,8	0,7 „ 1,1 „
64,2	0,9 „ 1,0 „
64	0,9 „ 1,1 „
63,4	1,0 „ 1,1 „

TABEL IX.

0,6	0,7	0,9	1,0	1,1	1,2	Conc. NaCl
						1,2
					35,5	1,1
				63,4	48,6	1,0
			64,2	64	55,5	0,9
		63,6	63,8	63,8	58,4	0,7
	67	65	64,8	64,4	60	0,6

Uit de laatste kolom van tabel VII. waar de producten $P (V - N)$ vermeld staan, blijkt, dat aan de wet van BOYLE-MARIOTTE-VAN 'T HOFF is voldaan. Het product van volume en druk bedraagt gemiddeld 8,5.

Met eenige reserve kan nu berekend worden, welk volume de oplossende ruimte inneemt in 100 gr. gist, waaraan nog geen water onttrokken is. Dit volume $V_o - N = \frac{100}{s} - I - N = 13,6 \text{ cm}^3$ per 100 gr. gist, wanneer het sp.g. der gist op 1,1 wordt gerekend en het imbibitiewater $I = 13 \text{ cm}^3$. De bij dit volume behorende relatieve osmotische druk, bedraagt $\frac{8,5}{13,6} = 0,625$, overeenkomende met een concentratie van 0,375 % NaCl. De reserve, die bij deze berekening in acht moet worden genomen, is deze, dat de waarde van $V_o - N$ door extrapolatie werd gevonden in de veronderstelling, dat N constant was.

In Fig. III, waar de relatieve osmotische druk ($P \text{ rel.}$) werd uitgezet tegen het volume der oplossing ($V - N$) valt de zoo geconstrueerde kromme zeer goed samen met de theoretische, die geconstrueerd werd door $P (V - N) = 8,5$ als gemiddelde uit de gevonden waarden te stellen.

We kunnen nu een poging wagen, de verdeling van het water over de verschillende fasen van de cel nader te bepalen. Is W de totale hoeveelheid water in 100 gr. gist, I het vrije oplosmiddel buiten het protoplasma aanwezig, $V - N$ het vrije op-

losmiddel in de cel en Z het zwellingswater der colloïden, dan is $W = 75 \%$, $I = 13 \%$ en $V - N = 13,6 \%$, zoodat voor Z overblijft $75 - 13 - 13,6 = 48,4 \%$. De disperse phase, welke $64,4$ vol. $\%$ bedraagt, bestaat dan voor 16 vol. $\%$ uit droge stof. Als het geoorloofd is het s.g. der droge stof op $1,5$ te stellen, wat gezien het hooge aschgehalte niet al te onwaarschijnlijk lijkt, dan wegen 16 cm^3 droge stof 25 gram.

Aanspraak op groote nauwkeurigheid kunnen de hier berekende waarden voor zwellingswater, disperse phase en oplossende ruimte niet maken. Zij geven dan ook slechts aan, van welke orde wij ons deze grootheden moeten voorstellen. Waarschijnlijk is de waarde voor N in concentraties beneden $0,6 \%$ grooter dan aangenomen werd, zoodat dan voor de oplossende ruimte een kleiner volume overblijft. Hierop wijzen vooral de cijfers van tabel IX.

Het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek heeft aangetoond, dat we protoplasmarijke cellen als die der persgist niet mogen beschouwen als een oplossing, omgeven door een semiepermeabele membraan, die zich als een osmometer gedraagt. Het is dan ook niet geoorloofd, de quantitative bepaling van de permeabiliteit der gist op dit principe te baseeren.

HOOFDSTUK III.

DE BEPALING DER PERMEABILITEIT.

Nu door de, in het vorige hoofdstuk besproken onderzoekingen de verdeeling van het water in de cel nader bekend geworden is, kan redelijkerwijze verwacht worden, dat het permeabiliteits-onderzoek resultaten zal opleveren, waaruit conclusies kunnen worden getrokken, niet alleen wat betreft de hoeveelheid en de snelheid, waarmee een stof wordt opgenomen, doch dat het misschien ook mogelijk is aan te geven, hoe het komt, dat deze hoeveelheden en snelheden zoo sterk kunnen uiteenloopen bij de verschillende stoffen.

De methode van onderzoek, welke hierbij gevolgd werd, was de reeds vroeger door SÖHNGEN en WIERINGA beschreven werkwijze. Bij deze methode is rekening gehouden met de mogelijkheid, dat concentratieveranderingen zoowel het gevolg kunnen zijn van waterverplaatsing, als van stofopname. Waterverplaatsingen worden ook hier gemeten door de concentratieveranderingen te bepalen, die de eveneens in de oplossingen aanwezige gelatine ondergaat. Door van een gistsuspensie in een zoutgelatine-oplossing op bepaalde tijden een deel te centrifugeeren en de concentratieveranderingen van het zout en van de gelatine te bepalen, is het mogelijk, de juiste hoeveelheid zout, welke door de cellen werd opgenomen, te berekenen.

De proeven in het vorige hoofdstuk beschreven, waarbij het gedrag van gistsuspensies in keukenzoutoplossingen van verschillende sterkte werd nagegaan, zijn genomen in de veronderstelling, dat de cellen geen keukenzout uit de oplossing opnamen. De bepaling van het imbibitiewater, het vrije celvocht en het zwellingswater der celcolloïden is op deze veronderstelling gebaseerd. Teneinde de gegrondheid van deze veronderstelling te verifieeren, werd 500 gr. gist gesuspendeerd in 1 L. van een

0,5 % gelatine oplossing, waaraan 10 gr. NaCl was toegevoegd. Op verschillende tijden werden nu de concentratieveranderingen der beide stoffen nagegaan. Het bleek, dat een tamelijk sterke daling optrad gedurende de eerste 15 min. d.i. de tijd, die noodig is voor het aanmengen der gist. We zagen reeds, dat deze daling moet worden toegeschreven aan het imbibitiewater der celwanden en tevens aan het water, dat aan het protoplasma wordt onttrokken. De bij deze proef gevonden waarden, in tabel X weergegeven, toonen verder aan, dat de chloortiter weliswaar daarna

TABEL X.

DIFFUSIE VAN 1 % NaCl.

Tijd.	Titer Cl.	V Cl.	Titer gel.	V gel.
0	16,2	—	23,85	—
15'	14,3	13,3	22,85	4,3
4 u.	14,25	13,7	22,5	6,0
12 u.	14,2	14,1	22,6	5,3
24 u.	14,2	14,1	22,95	3,9
48 u.	14,1	14,9	22,6	5,3

nog iets daalde, nl. per 10 cm³ der oplossing nog 0,2 cm³ zilvernitraat oplossing, doch zij bewijzen tevens, dat slechts zeer weinig NaCl door de gist kan zijn opgenomen gedurende de 48 uren, die de gist in de oplossing verbleef. Aangezien per 10 cm³ oplossing 5 gr. gist aanwezig was, bedroeg de daling per gram gist slechts 0,04 cm³ AgNO₃ of ongeveer 0,25 mgr. NaCl. Een gram gist echter heeft een totaal celoppervlak van ongeveer 1 M², zoodat de diffusie wel een uiterst langzame is. Nu is in de persgist steeds een gering percentage doode cellen aanwezig, zoodat het wel mogelijk is, dat de zeer geringe hoeveelheid zout door deze cellen is geabsorbeerd. De gelatine-cijfers wijzen er althans op, dat in de levende cellen geen zout is opgenomen. Was dit wel het geval, dan zou verwacht kunnen worden, dat door verhooging van den osmotischen druk van het celvocht, de gist het oorspronkelijk afgestane water weer zou hebben opgenomen.

Bij deze redeneering is stilzwijgend aangenomen, dat verandering der Cl-titer identiek is met opname van het keukenzout. Dit behoeft echter geenszins het geval te zijn. Het is immers

zeer goed mogelijk. dat het Na⁺-ion wel door de gist wordt opgenomen, doch door een ander kation, dat uit de gist diffundeerde, is vervangen, terwijl het Cl⁻-ion niet in de gist dringt. Zodoende zou het osmotisch evenwicht kunnen blijven bestaan, terwijl toch belangrijke hoeveelheden stof waren verplaatst. Laten we echter voorloopig veronderstellen, dat het NaCl niet wordt opgenomen: ook dan nog is deze proef geen bewijs voor de impermeabiliteit van het protoplasma voor NaCl. De cel zou immers reeds van te voren verzadigd kunnen zijn met NaCl. Hoe het ook zij, het keukenzout wordt door de gistcellen, om welke reden dan ook, niet noemenswaard opgenomen, zoodat de conclusies, welke in het vorige hoofdstuk uit de proeven met keukenzout getrokken werden, gerechtvaardigd zijn.

Als nu het protoplasma impermeabel is voor keukenzout, kan dit veroorzaakt zijn door niet opneembaarheid van het Na⁺-ion of van het Cl⁻-ion of wel van beide ionen. Hoe het met de opneembaarheid van het Cl⁻-ion staat, kunnen we zien uit een onderzoek met NH₄Cl, waarvan de uitkomsten in tabel XI te vinden zijn.

TABEL XI.

AMM. CHLORIDE 0,1 N. (Fig. IV).

Tijd.	Titer amm.	V amm.	Titer Cl ⁻	V Cl	Titer gel.	V gel.
0	47,8	—	10,4	—	24,4	—
15'	43,3	10,4	9,3	11,8	23,4	4,3
4 u.	42,7	11,9	9,2	13,1	24,1	1,2
24 u.	41,7	14,6	9,05	14,9	24,4	0,0
48 u.	40,9	16,9	8,9	16,9	24,4	0,0

In deze proef is zoowel de opname van het NH₄⁺-ion als die van het Cl⁻-ion bepaald. De bepaling van het NH₄⁺ naast de gelatine geschiedde door 50 cm³ der oplossing met magnesiumoxyde in vacuüm tusschen 30° en 40° C. te destilleeren. Hierdoor wordt afsplitsing van ammoniak uit gelatine voorkomen, hetgeen bij hogere temperaturen in alkalisch milieu plaats vindt. Het blijkt dan, dat het Cl⁻-ion wel degelijk door de gist wordt opgenomen uit dit zout, zij het dan ook langzaam. Ook het NH₄⁺ wordt opgenomen en wel met vrijwel dezelfde snelheid als het Cl⁻-ion. De verdunning van het Cl⁻, (V_{Cl}) en die van het NH₄⁺, ($V_{amm.}$) zijn ten naastenbij gelijk. Ook de stijging der

gelatine-titer en de daarmee overeenkomende afname der verdunning van de gelatine ($V_{gel.}$) wijst op opname van het ammoniumchloride. De osmotische druk van het celsap is daardoor verhoogd, zoodat ook water door de cellen is opgenomen, nadat dit eerst was afgestaan aan de NH_4Cl oplossing. Uit deze proef volgt, dat de niet opneembaarheid van het keukenzout niet door het Cl' -ion kan veroorzaakt zijn, zoodat het Na' -ion daarvoor aansprakelijk moet worden gesteld. Ook volgt uit deze twee proeven, dat het Cl' -ion niet tegen een ander anion uit de gist wordt omgewisseld.

Wil men de hoeveelheid NH_4Cl berekenen, die na een bepaald tijdsverloop door de gist is opgenomen, daarbij als uitgangspunt de daling der Cl' - of NH_4' -titer nemende, dan moet tevens de hoeveelheid water, die door de gist werd geabsorbeerd, daarbij in aanmerking worden genomen. Immers zonder deze wateropname zou de concentratie van het NH_4Cl nog meer gedaald zijn.

Laat D het aantal mg. stof voorstellen, dat door 100 g. gist geabsorbeerd is, dan is

$$D = [2V_t - (I + 2V_{gel.})] \times \frac{C_t}{C_o} \times m \dots\dots\dots (4)$$

als V_t de verdunning der stof na een tijd t beteekent, I het imbibitiewater, C_t de titer op het tijdstip t en C_o die aan het begin der proef, terwijl m de hoeveelheid stof in mg. weergeeft, die één cm^3 der oplossing oorspronkelijk bevatte. In deze formule is $\frac{C_t}{C_o} \times m$ de hoeveelheid stof, die de oplossing na den tijd t per cm^3 bevat, terwijl $2V_t - (I + 2V_{gel.})$ het aantal cm^3 water aangeeft, waarmee de oplossing tengevolge der stofopname door 100 gr. gist schijnt verdund te zijn. Immers 100 grammen gist bevatten $I \text{ cm}^3$ imbibitiewater, terwijl 50 g. gist een verdunning V_t der stof en $V_{gel.}$ der gelatine hebben veroorzaakt.

Volgens deze formule is de opname van het NH_4Cl na 4, 24 en 48 uur berekend uit de daling der Cl' -titer (D_{Cl}) en uit de daling der NH_4' -titer ($D_{amm.}$) waarbij I evenals vroeger op 13 cm^3 gesteld werd. $D_{(\text{NH}_4\text{Cl})}$ is daarna berekend als gemiddelde van $D_{(Cl)}$ en $D_{(amm.)}$.

De hoeveelheid NH_4Cl welke per uur door 100 gr. gist werd opgenomen, bedraagt na 4 uur gemiddeld 12,1 mg. per uur. In het tijdsverloop van 4 tot 24 uur na het begin was dit bedrag

gedaald tot 1,7 mg. en na 24 tot 48 uur bedroeg het nog slechts 0,47 mg.

Geheel overeenkomstige bepalingen werden uitgevoerd met een aantal andere Ammoniumzouten nl. met het nitraat (XII), sulfaat XIII), formiaat (XIV), tartraat (XV), acetaat (XVI), en citraat (XVII), waarvan bij het nitraat evenals bij het chloride, zoowel de opname van het anion, als van het kation bepaald werd.

TABEL XII.

AMM. NITRAAT 0,1 N. (Fig. V).

Tijd.	Titer amm.	V amm.	Titer nitr.	V nitr.	Titer gel.	V gel.
0	49,2	—	49,25	—	26,6	—
30'	44,1	11,6	44,35	11,1	25,8	3,1
4 u.	43,1	14,1	43,25	13,9	26,6	0,0
24 u.	42,4	16,0	—	—	26,65	-0,2
48 u.	41,3	19,1	41,1	19,8	26,9	-1,1

TABEL XIII.

AMM. SULFAAT 0,1 M.

Tijd.	Titer amm.	V amm.
0	96,7	—
15'	86,8	11,4
8 u.	86,3	12,1
24 u.	85,6	13,0
48 u.	85,1	13,6

TABEL XIV.

AMM. FORMIAAT 0,1 N.

Tijd.	Titer amm.	V amm.	Titer gel.	V gel.
0	44,7	—	24,1	—
15'	40,3	10,9	24,0	0,2
5 u.	34,6	29,2	—	—
24 u.	33,3	34,2	24,1	0
48 u.	33,3	34,2	24,1	0

TABEL XV.

AMM. TARTRAAT 0,1 M.

Tijd.	Titer amm.	V amm.
0	99,1	—
15'	86,9	14,0
8 u.	85,1	16,5
24 u.	82,9	19,6
48 u.	82,3	20,4

TABEL XVI.

AMM. ACETAAT 0,1 N.

Tijd.	Titer amm.	V. amm.	Titer gel.	V gel.
0	67,6	—	24,9	—
15'	58,1	16,4	24,9	0
5 u.	53,5	26,4	24,9	0
24 u.	52,0	30,0	—	—
48 u.	51,8	30,5	24,5	1

TABEL XVII.

AMM. CITRAAT 0,1 N. (Fig. VI).

Tijd.	Titer amm.	V amm.	Titer gel.	V gel.
0	36,85	—	24,7	—
15'	32,7	12,7	23,7	4,2
5 u.	31,7	16,2	24,3	1,6
24 u.	30,2	22,1	24,5	0,8
48 u.	28,5	29,3	24,5	0,8

Alle ammoniumzouten, behalve het sulfaat, worden klaarblijkelijk goed opgenomen, in het bijzonder de organische zouten. Het amm. chloride en het nitraat worden veel minder snel geabsorbeerd dan het formiaat, acetaat, citraat en tartraat, terwijl het sulfaat practisch gesproken niet wordt opgenomen.

Bij de anorganische amm. zouten stijgt de opneembaarheid in de volgorde: $\text{SO}_4'' < \text{Cl}' < \text{NO}_3'$. Bij de organische zouten is deze reeks: tartraat < citraat < acetaat < formiaat. Bij het sulfaat en het tartraat werden concentraties van 0,1 mol. aangewend, terwijl van de andere zouten 0,1 N. oplossingen gebruikt werden.

Ook van eenige chloriden is de opneembaarheid nagegaan. Behalve het reeds genoemde NaCl in het NH_4Cl zijn nog onderzocht het KCl, het CaCl_2 en het MgCl_2 (tabel XVIII).

TABEL XVIII.

NaCl 0,1 N. 1.					KCl. 0,1 N. 2.			
Tyd.	Titer Cl.	V Cl.	Titer gel.	V gel.	Titer Cl.	V Cl.	Titer gel.	V gel.
0	5,0	—	25,5	—	5,225	—	25,5	—
15'	4,59	8,9	25,6	— 0,4	4,83	8,2	25,2	1,2
24 u.	4,56	9,6	25,3	0,8	4,60	13,6	25,5	0
48 u.	4,48	11,6	25,1	1,6	4,48	6,6	25,1	1,6
CaCl ₂ 0,1 N. 3.					MgCl ₂ 0,1 N. 4.			
Tyd.	Titer Cl.	V Cl.	Titer gel.	V gel.	Titer Cl.	V Cl.	Titer gel.	V gel.
0	5,25	—	25,5	—	5,25	—	25,5	—
15'	4,82	8,9	25,3	0,8	4,78	9,8	25,4	0,4
24 u.	4,78	9,8	25,6	— 0,4	4,77	10,1	25,3	0,8
48 u.	4,65	12,9	25,0	2,0	4,69	11,9	25,0	2,0

Van deze chloriden werden slechts het NH_4Cl (XI) en het KCl (XVIII₂) in eenigszins belangrijke hoeveelheden opgenomen.

In tabel XIX zijn nog de uitkomsten van een permeabiliteitsonderzoek met de nitraten van Na⁺, K⁺ en Ca⁺⁺ weergegeven. Bij deze nitraten werd aan de oplossing geen gelatine toegevoegd, aangezien de gelatine de nitraatbepaling zeer bemoeilijkt.

TABEL XIX.

Tijd.	Na-nitraat 0,1 N.		K-nitraat 0,1 N.		Ca-nitraat 0,1 N.	
	Titer nitr.	V nitr.	Titer nitr.	V nitr.	Titer nitr.	V nitr.
0	24,9	—	24,85	—	18,4	—
15'	21,85	14,0	21,75	14,3	16,25	13,2
4 u.	21,4	16,4	21,3	16,7	16,3	12,9
24 u.	21,0	18,6	20,0	24,2	15,95	15,4
48 u.	20,3	22,7	19,3	28,6	15,3	20,2

Uit alle 3 onderzochte nitraten wordt het NO_3' -ion tamelijk goed geabsorbeerd, evenals uit het ammonium nitraat (XII). De volgorde der opname met stijgende snelheid wordt weergegeven door de kationenreeks $\text{Ca} \cdot \cdot < \text{Na} \cdot < \text{K} \cdot$.

Van het $\text{Ca} \cdot \cdot$ -ion is de opneembaarheid nagegaan bij het Ca-formiaat (XX) (waarbij tevens de opname van het mierenzuur werd bepaald) en bij het Ca-nitraat.

TABEL XX.

CALCIUM FORMIAAT 0,1 N. (Fig. VII).

Tijd.	Titer Ca.	V Ca.	Titer form.	V form.	Titer gel.	V gel.
0	10,0	—	16,3	—	25,3	—
15'	9,0	11,1	13,2	23,5	—	—
5 u.	9,0	11,1	12,5	30,4	25,4	0
24 u.	9,0	11,1	12,1	34,7	—	—
48 u.	9,0	11,1	12,2	33,6	25,2	0

In beide gevallen bleef de $\text{Ca} \cdot \cdot$ -titer, nadat eerst de gewone daling was opgetreden, geheel constant, niettegenstaande de proeven gedurende 24-resp. 20 uren werden voortgezet. Van het Ca-formiaat heeft daarentegen de opname van het anion zoo snel plaats, dat reeds na 4 uren de maximale hoeveelheid mierenzuur is opgenomen, terwijl ook volgens tabel XIX₃ uit het Ca-nitraat het anion wordt geabsorbeerd.

Tabel XXI toont tenslotte aan, dat ureum evenals de ammoniumzouten der organische zuren zeer snel wordt opgenomen.

TABEL XXI.

UREUM 1 %.

Tijd.	Titer ur.	V ur.	Titer gel.	V gel.
0	27,7	—	24,7	—
15'	24,4	13,5	24,35	1,4
3 u.	22,9	21,0	24,75	0
12 u.	21,7	27,6	24,65	0,2
24 u.	21,35	29,8	24,7	0
48 u.	19,95	38,8	24,7	0

In overeenstemming met de verwachting gaat opname der stof gepaard met opname van water, wanneer dit eerst door de gistcellen was afgestaan. Het duidelijkst is dit verschijnsel weergegeven door de graphieken IV t.m. VI. De lijn, welke de verdunning der gelatine-concentratie in beeld brengt, daalt reeds in den aanvang der proef tot de absis.

Wanneer we nu de uitkomsten van dit onderzoek overzien, valt het op, dat bij de opneembaarheid van alle zouten een volgorde optreedt, die overeenkomt met die der lyotrope reeksen.

Sinds door FRANZ HOFMEISTER (49) onderzoekingen werden verricht over de uitvloeking van globuline uit kippeneiwit door middel van zoutoplossingen, waaruit bleek, dat de zouten de coagulatie in een zeer bepaalde volgorde bevorderen, is een stroom van onderzoekingen gevolgd, die aantoonen, dat een groot aantal chemische-, fysisch-chemische- en physiologische verschijnselen op dezelfde wijze en in dezelfde volgorde door zouten worden beïnvloed. HOFMEISTER, die verband zag tusschen eiwit-coagulatie, purgeerende- en diuretische werking en diffusievermogen, schreef al deze verschijnselen toe aan een gemeenschappelijke eigenschap der zouten nl. aan de wateraantrekkende kracht. Sedert we gewend zijn de zouten te beschouwen, als opgebouwd uit twee of meer ionen, lag het voor de hand deze werkingen toe te kennen aan ionen. De wateraantrekkende kracht van het zout is dan de algebraïsche som van die der ionen. Met FREUNDLICH (26) spreken we thans van lyotrope werking en lyotrope reeksen.

Lyotrope invloeden doen zich gelden bij zeer uiteenlopende processen, waaronder zoowel chemische als fysisch-chemische

en physiologische. Zoo wordt de oppervlaktespanning van water door anorganische zouten verhoogd volgens de reeks: $\text{Li} \cdot > \text{Na} \cdot > \text{K} \cdot > \text{NH}_4 \cdot$, terwijl voor de anionen deze volgorde is $\text{CO}_3'' > \text{SO}_4'' > \text{Cl}' > \text{NO}_3' > \text{J}'$. De vrije zuren verlagen de oppervlaktespanning in de volgorde $\text{NO}_3' > \text{Cl}' > \text{SO}_4''$, waarvan het zwavelzuur de oppervlaktespanning verhoogt. Ook de katalyse der suikerinversie en der esterverzeeping door neutrale zouten geschiedt volgens lyotrope reeksen. De stollingssnelheid van gelatinegels wordt vergroot door sulfaten, acetaten en tartraten, daarentegen verkleind door chloriden nitraten en bromiden, zoodat de reeks $\text{SO}_4'' > \text{CH}_3\text{CO}_2' > \text{Cl}' > \text{NO}_3'$, $\text{Br}' > \text{J}' > \text{SCN}'$ ontstaat. In dezelfde volgorde wordt de uitzouting van eiwitten door electrolyten beïnvloed (PASCHELES 96), terwijl de zwelling van gelatine eveneens volgens lyotrope reeksen door zouten wordt bevorderd of geremd (HOFMEISTER).

Over den invloed van zouten op de uitvlokking van het glycoeensol met alcohol en met tannine werden door SH. DOKAN (14) belangrijke onderzoeken verricht, waaruit blijkt, dat ook voor zwelling en coagulatie van andere stoffen dan eiwitten lyotrope reeksen gelden. Van belang is het, dat deze reeksen omgekeerd worden, wanneer in plaats van hoge zoutconcentraties lage worden genomen. DOKAN kent de ionen twee werkingen toe, die beide op hydratatie der ionen berusten. In lage concentraties worden relatief vele ionen geadsorbeerd; deze verhoogen de hydratatie van het colloïd en dus ook de stabiliteit volgens de reeks $\text{Li} \cdot > \text{Na} \cdot > \text{K} \cdot > \text{Rb} \cdot$. In hoge concentraties daarentegen zijn relatief vele ionen in de vloeistof achter gebleven. Zij dehydrateeren de colloïden volgens de reeks $\text{Rb} \cdot < \text{K} \cdot < \text{Na} \cdot < \text{Li} \cdot$ en bevorderen dus de uitvlokking. Hetzelfde concentratie-effect bereikte DOKAN bij de zwelling van agar-agar.

Bij geheel andere verschijnselen vond L. MICHAELIS (71, 72, 73, 74) met A. FUJITA (28, 29, 30), SH. DOKAN en K. HAJASHI een rangschikking der kationen volgens lyotrope reeksen. Wanneer een electrolyt-oplossing van gedestilleerd water, of van een oplossing van hetzelfde zout in andere concentratie, is gescheiden door een zeer dichte collodiummembraan, dan treedt tusschen beide vloeistoffen een potentiaalverschil op, dat des te grooter is naarmate het kation beweeglijker is. Zoo ontstaat weer de volgorde $\text{Rb} \cdot > \text{NH}_4 \cdot > \text{K} \cdot > \text{Na} \cdot > \text{Li} \cdot$, de lyotrope

reeks der kationen dus. De aard van het anion heeft op deze potentiaalverschillen geen invloed.

KOLTHOFF (60), die de onderzoekingen van BARTELL en MILLER betreffende adsorbtie aan zuivere kool bevestigde, vond, dat de zuren worden geadsorbeerd volgens de reeks: $\text{HCNS} > \text{HJ} > \text{HNO}_3 > \text{HJO}_3 > \text{HCl} = \text{HBr} = \text{HClO}_4 > > \text{H}_2\text{SO}_4$ en organische sulfozuren; H_3PO_4 werd niet geadsorbeerd. Zouten worden hydrolytisch geadsorbeerd, d.w.z. dat slechts het zuur door de kool wordt gebonden en wel des te sterker naarmate het in bovenstaande reeks meer naar links staat, dus geheel dezelfde volgorde als die, welke geldt voor de adsorbtie aan het grensvlak water-lucht.

Dat de opname van zouten door organismen of cellen afhankelijk is van de plaats, welke de ionen in de lyotrope reeks innemen, bleek reeds uit de onderzoekingen van FITTING en die van TRÖNDLE, terwijl KAHHO (56, 57, 58) de eerste was, die van dit verschijnsel een verklaring gaf. KAHHO nam proeven over de giftigheid van zouten bij *Tradescantia zebrina* en bij roode kool. Wanneer na het verblijf in de zoutoplossingen geen normale plasmolyse meer met saccharose kon worden verkregen, werden de cellen als dood beschouwd. KAHHO, die hierbij uitging van de veronderstelling, dat de afsterving het gevolg was van coagulatie van het protoplasma, vond nu afnemende giftigheid in de kationenreeks $\text{K} \cdot > \text{NH}_4 \cdot > \text{Na} \cdot > \text{Sr} \cdot\cdot, \text{Mg} \cdot\cdot, \text{Ba} \cdot\cdot, \text{Ca} \cdot\cdot$ en in de anionenreeks $\text{CNS}' > \text{J}' > \text{NO}_3' > \text{Cl}' > \text{tatraat} > \text{sulfaat} > \text{citraat}$. Nu is dit de omgekeerde volgorde van die, welke wordt waargenomen bij de uitvlokking van alkali-eiwit. Moeten we nu het protoplasma opvatten als een zuur eiwit, dus als een positief geladen colloïd? Volgens KAHHO is dit niet waarschijnlijk; alle zouten zouden dan gelijke permeabiliteit moeten hebben, wat in strijd is met de onderzoekingen van PANTANELLI (95), LUNDEGÅRDH (70), FITTING en die van TRÖNDLE (134, 135, 136, 137, 138, 139) e.a. Waarschijnlijker is daarom een andere verklaring, voorgestaan door KAHHO, volgens welke de protoplasma-coagulatie moet worden opgevat als een secundair verschijnsel, nl. als een functie van de permeabiliteit. Dat de permeabiliteit der zouten afneemt volgens de reeks $\text{CNS}' > \dots > \text{SO}_4''$, toonde KAHHO aan met een permeabiliteitsonderzoek volgens de methode van LUNDEGÅRDH, waarbij lengteveranderingen van

worteltoppen in zoutoplossingen gemeten worden. De verklaring van den invloed der lyotropie op de permeabiliteit denkt KAHHO zich in verband met de onderzoekingen van HANSTEEN-CRANNER (36), volgens welke het protoplasma en ook de celwand als het ware doortrokken zijn met lipoiden, terwijl PORGES en NEUBAUER (103) voor de uitvloeking der lipoiden de reeks $\text{CNS}' > \dots > \text{SO}_4''$ vonden. Tengevolge van de lyotrope invloed der ionen worden de lipoiden meer of minder samen getrokken, waardoor een verdichting van het protoplasmaoppervlak optreedt.

Ook den invloed, welke zouten op de oppervlakte hebben, wil KAHHO niet geheel verwaarloozen. Volgens de „Haftdruck“-theorie van TRAUBE (129, 130, 131, 132) worden stoffen door het protoplasma des te sneller opgenomen naarmate zij minder goed in de vloeistof „haften“ en dus de oppervlaktetensioning meer verlagen. Anionen verlagen nu de oppervlaktetensioning waterlucht in de volgorde $\text{CNS}' > \dots > \text{SO}_4''$. Beide eigenschappen der ionen beïnvloeden dus de permeabiliteit in dezelfde richting, die afneemt volgens de reeks $\text{CNS}' > \dots > \text{SO}_4''$, dus parallel aan de giftigheid. KAHHO wijst er op, dat we met een additieve werking der beide ionen te doen hebben en wel met een coagulerende werking van de kationen in de volgorde $\text{K} \cdot < \text{Na} \cdot < \text{Li} \cdot < \text{Mg} \cdot \cdot < \text{Ba} \cdot \cdot < \text{Ca} \cdot \cdot$ en een peptiseerende werking van de anionen ($\text{CNS}' > \dots > \text{SO}_4''$). Een sterk peptiseerenden invloed hebben het jodide-, het bromide- en het nitraat-ion, zoodat bij de zouten dezer anionen de peptiseerende werking de coagulerende overtreft. Daarom kunnen deze zouten het protoplasma binnen dringen.

Ook RUHLAND en HOFFMANN (112) vonden evenals KAHHO, dat de opneembaarheid der anorganische zouten bepaald wordt door de lyotrope eigenschappen hunner ionen. Zij leggen echter meer nadruk op de beïnvloeding van den zwellingsgraad van de protoplasmacolloïden, dan op de coagulerende werking. De kationen verminderen den zwellingsgraad, en vertragen daarom de permeabiliteit, terwijl de anionen de colloïden peptiseeren en daardoor de opneembaarheid bevorderen, alles volgens lyotrope reeksen.

Nu is van den invloed, welke electrolyten in physiologische concentraties op den zwellingsstoestand der biocolloïden hebben,

weinig met zekerheid bekend. Wel weten we, dat eiwitten door anorganische zouten worden uitgevlokt volgens HOFMEISTERS reeksen. Dit geschiedt echter slechts bij hogere concentraties. In de proeven van HOFMEISTER (49) varieeren deze bv. tusschen 1,5 en 6 N. In concentraties beneden 0,1 N. is van coagulatie echter weinig waarneembaar.

Wel worden de lipoïden volgens de onderzoeken van Wo. PAULI en K. HANDOWSKY (97, 98) en van PORGES en NEUBAUER (103) bij veel geringere concentraties uitgevlokt, echter is niet te voorspellen of uitvloking de permeabiliteit zal verhoogen dan wel verlagen. Bij verschillende onderzoekers zijn dan ook de meeningen verdeeld. Terwijl bv. GELLHORN (31) het ionenantagonisme wil verklaren door aan te nemen, dat zoutmengsels veel zwakker coaguleeren dan de enkele zouten, die dientengevolge schadelijk zijn, is SPEK (117) de meening toegedaan, dat de best geëquilibreerde oplossingen die zijn, welke binnen physiologische grenzen het sterkst coaguleeren en daardoor de celmembranen „ambesten abdichten”. Te zwakke coagulatie der enkelvoudige zoutoplossingen eenerzijds, evenals te sterke niet meer physiologische coagulatie anderzijds, verhoogt de permeabiliteit.

Keeren we terug tot de gemeenschappelijke eigenschap der ionen, dan is dit om met HOFMEISTER te spreken, hun „water-aantrekkende kracht”. Door physisch-chemische onderzoeken der laatste decennia, vooral die van HARRY C. JONES (53, 54, 55) en medewerkers, K. FAJANS (16) W. BILTZ (3) FRICKE (27) en vele andere, heeft het begrip der water-aantrekkende kracht meer omljnde vormen aangenomen. De onderzoeken van JONES en zijn medewerkers over het abnormale gedrag van electrolytoplossingen, wat betreft hun vriespuntsverlagingen en hun kookpuntsverhoogingen, mede in verband met hun kristalwater, die van FAJANS (16) over ionengrootte en oplosbaarheid, leiden alle tot hetzelfde punt; de verschijnselen zijn alle te verklaren door hydratatie der ionen aan te nemen. Ook de volgorde der ionenbeweeglijkheid is slechts te verklaren, als men aanneemt, dat de ionen gehydrateerd zijn en wel in afnemende mate met de lengte van den atoom-radius. Ook de hydratatie warmte stijgt volgens FAJANS en SACHTLEBEN (17) en volgens BORN (4) in dezelfde volgorde, hetgeen volgens FAJANS wijst op electrostatische werking der ionen op de watermoleculen.

Wanneer we ons de watermoleculen voorstellen als dipolen, dan worden deze gericht door de electrisch geladen ionen, waarbij zij elkander wederzijds aantrekken. Hoe kleiner het geladen deeltje en hoe grooter de lading, hoe sterker deze aantrekking. Het resultaat van deze ionenhydratatie is, dat ten slotte alle ionen ongeveer gelijke beweeglijkheid hebben, met dien verstande echter, dat hierbij duidelijk de lyotrope volgorde naar voren komt. Een indruk van de hoeveelheid water, welke door een molecule van een electrolyt kan worden gebonden, geven ons de berekeningen van JONES en GETMAN (55), volgens welke door een molecule magnesium-chloride in concentraties varieerende tusschen 0,15 en 2,3 mol. een hoeveelheid water van 52,1 tot 17,4 moleculen kan worden gebonden. Zoo ontstaan dus in de oplossing belangrijk vergrootte eenheden, doordat de ionen als het ware door watermantels omgeven zijn, en wanneer we vasthouden aan de *Molecuulzeef-theorie* van RUHLAND, is het geheel niet ondenkbaar, dat de ionen hydratatie de oorzaak is, dat de permeabiliteit der electrolyten bepaald wordt door de plaats, die de electrolyt-ionen in de lyotrope reeks innemen. Te aannemelijker wordt deze verklaring waar het gebleken is, dat de opneembaarheid der zouten van de organische zuren in het algemeen veel grooter is, dan die der anorganische, zoodat voor de anionen duidelijk twee verschillende reeksen zijn te onderscheiden, nl. voor de anorganische: $\text{SO}_4'' < \text{Cl}' < \text{NO}_3'$, en voor de organische: tartraat < citraat < acetaat < formiaat. Het lag nu voor de hand, dit verschillend gedrag der organische en der anorganische zouten in verband te brengen met een verschillenden dissociatiegraad dezer zouten, waarbij uitgegaan werd van de veronderstelling, dat de moleculen minder sterk gehydrateerd zijn dan de ionen.

Feiten, welke op grootere permeabiliteit der ongedissocieerde moleculen wijzen, zijn uit de litteratuur vele bekend. In het eerste hoofdstuk werd reeds gewezen op de proeven van NEWTON HARVEY en die van BRENNER met zuren en basen, waaruit blijkt, dat zwakke zuren en basen veel sneller in de cellen dringen dan de sterke. Aan den anderen kant werd door de onderzoekingen van VAN DAM (10, 11, 12) aangetoond, dat de melkzuurgisting eerder wordt gestopt door een te hooge concentratie van ongedissocieerde melkzuur-moleculen, dan door de water-

stof-ionen. Uit de proeven van OVERTON (88) en die van RUHLAND (109) met alkaloïdbasen blijkt eveneens, dat de ongedissocieerde basen sneller worden opgenomen dan hun zouten.

Ook de proeven van TEKELENBURG (128) over de afsterving van microorganismen onder invloed van temperatuur, waterstof-ionen en ongedissocieerde moleculen wijzen in dezelfde richting. Ook WERTHEIMER (148), die met kikkerhuiden experimenteerde, waardoor hij zuren en basen tegen een keukenzoutoplossing liet diffundeeren, die met neutraalrood gekleurd was, vond, dat de sterke zuren en basen niet door de membraan gingen, doch de zwakke, weinig gedissocieerde wel.

Wanneer nu de ongedissocieerde moleculen sneller in de cel dringen dan de ionen, dan moet terugdringen van den dissociatiegraad de diffusiesnelheid verhoogen. Door de diffusiesnelheid te meten van electrolyten uit zoutmengsels, was het mogelijk, dit na te gaan. Een onderzoek over de opname van het Cl uit mengsels van amm. chl. met amm. sulfaat vergeleken met die uit een mengsel van amm. chlor. met natr. sulf. toonde aan, dat aan de verwachting geheel en al werd voldaan (tabel XXII). Het blijkt, dat in die concentratieverhouding, waarbij de dissociatie van het amm. chlor. het meest teruggedrongen moet zijn, de opname van het chloor het snelst geschiedt.

TABEL XXII. (Fig. VIII, IX, X).

Tijd.	CONCENTRATIES						
	Amm. chl.	0,08	0,08	0,06	0,06	0,04	0,04
	Amm. sulf.	0,0	0,02	0,0	0,04	0,0	0,06
	Natr. sulf.	0,02	0,0	0,04	0,0	0,06	0,0
0.		—	—	—	—	—	—
15'.		11,0	10,5	8,9	9,8	10,2	10,5
5 u.		12,6	12,5	11,2	11,7	12,0	13,3
24 u.		13,6	14,3	12,7	14,0	14,3	16,0
52 u.		15,7	16,0	14,0	16,2	16,0	18,4
74 u.		17,4	18,4	16,9	18,5	17,0	20,5

Nu is deze proef veel minder eenvoudig, dan zij op het eerste gezicht lijkt. Een mengsel van amm. chlor. en natr. sulfaat

kunnen we evengoed beschouwen als een mengsel van amm. sulfaat en natr. chlor., twee stoffen. die in veel mindere mate door de cel worden opgenomen dan het ammonium chloride.

Hetzelfde geldt van de onderzoeken van JAAN PORT (104) over den invloed van neutraalzouten op de diffusiesnelheid van OH-ionen van NH_4OH , $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{OH}$ en KOH . die bepaald werd door den kleuromslag in de donkerviolette cellen van *Viola tricolor* kroonbladeren na te gaan. Het bleek, dat de NH_4 -zouten de diffusie bevorderen van het NH_4OH en van het $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{OH}$. terwijl alle andere zouten den kleuromslag vertragen. De anionen werken hierbij volgens lyotrope reeksen. Bij toevoeging van NH_4 -zouten aan oplossingen van NH_4OH wordt de dissociatie van het NH_4OH teruggedrongen, terwijl geen ander hydroxyde ontstaat; alle andere zouten verhoogden de dissociatie van het NH_4OH en wel des te sterker, naarmate zij meer gedissocieerd zijn.

Door aanwezigheid van Na^+ , K^+ , Li^+ , Mg^{++} of Ca^{++} -ionen kan echter ook de zwellingsstoestand der protoplasmacolloïden beïnvloed zijn, zoodat ook deze proeven niet voor een enkelen uitleg vatbaar zijn.

Het vraagstuk van het ionenantagonisme, waarop bij dit onderzoek niet verder werd ingegaan, staat met deze questie in het nauwste verband. Zeer waarschijnlijk lijkt het echter, dat zoowel de zwellingsstoestand der colloïden als de hydratatiegraad der ionen en der moleculen, beide in verband met de porienwijdte van het protoplasma, de permeabiliteit bepalen.

In het bijzonder moet thans nog gewezen worden op de permeabiliteit van het Ca-formiaat, waarvan Ca^{++} -ion niet, het formiaat-ion daarentegen zeer snel werd opgenomen. Opvallend is hierbij nog, dat de opneembaarheid van het formiaat klaarblijkelijk geen hinder ondervond van het sterk coaguleerende Ca^{++} -ion. Hoe men zich moet voorstellen, dat het eene ion wordt opgenomen, terwijl het andere in de vloeistof achter blijft, is tot nu toe niet volkomen duidelijk. We kunnen ons voorstellen, dat mierenzuur moleculen in de gist naar binnen dringen, terwijl calciumhydroxyde in de oplossing ontstaat. Is dit het geval, dan moet de waterstofionenconcentratie der oplossing aanmerkelijk stijgen. Dit bleek echter niet zoo te zijn. Een oplossing van 0.1 N Ca-formiaat had een p_H van 7.4. Nadat in deze oplossing gist was

gesuspenseerd, bleek de p_H gedaald te zijn tot 5,6, welke zelfs na 48 uren nog niet van beteekenis veranderd was (5,8). Nu was het mogelijk, dat koolzuur uit de gist afkomstig voor deze lage p_H aansprakelijk gesteld moest worden. Dan zou het gevormde CaHCO_3 door titratie met HCl , waarbij het koolzuur door koken werd uitgedreven, moeten kunnen worden bepaald. Ook dit bleek echter niet het geval te zijn, de oplossing bevatte geen titreerbaar carbonaat. Het is dus waarschijnlijk, dat door de gist een ander zuur wordt afgescheiden, dat het Ca^{++} -ion neutraliseert. Dit zuur zou bv. melkzuur kunnen zijn, wat in de persgist steeds in betrekkelijk groote hoeveelheid aanwezig is. Ook het phosphorzuur komt echter in aanmerking. Bij een onderzoek over de opneembaarheid van KH_2PO_4 door de gist bleek nl., dat de phosphaatconcentratie van een 0,4 % KH_2PO_4 -oplossing ongeveer verdubbeld was, nadat in deze oplossing gedurende 15 min. persgist was gesuspenseerd geweest.

Moeten we ons op grond van deze proef met Ca-formiaat nu voorstellen, dat de ionen van een zout zich geheel zelfstandig gedragen? Volgens mijn meening is het bewijs daarvoor niet geleverd. Immers het Ca-formiaat, een zout uit een sterke base en een zwak zuur, is, zij het dan ook in geringe mate, hydrolytisch gesplitst. Door de zwak zure reactie der gistsuspensie wordt de hydrolytische splitsing ongetwijfeld verhoogd en bevindt zich in de vloeistof een zekere hoeveelheid vrij mierenzuur, dat nu geheel onafhankelijk van het Ca^{++} -ion is en zich gedraagt alsof het alleen in de oplossing aanwezig was.

Aangezien in sommige gevallen moest worden omgezien naar speciale werkwijzen bij de quantitatief chemische bepalingen, welke voor dit onderzoek noodig waren, zal het misschien niet ondienstig zijn hier een korte beschrijving te laten volgen van de gebruikte:

Analytische methoden.

a. De *gelatine* werd, zooals reeds is gezegd, volgens de methode KJELDAHL bepaald in hoeveelheden vloeistof van meestal 50 cm^3 . Gewoonlijk geschiedde deze bepaling in de vloeistof als zoodanig. In enkele gevallen echter werd de gelatine van te voren uit de oplossing neergeslagen met natriumphosphowolframaat, aangezuurd met zwavelzuur. Het neerslag werd dan gefiltreerd,

uitgewasschen en met het filter gedestruerd. Op deze wijze is bv. de gelatinebepaling uitgevoerd in ureumoplossingen en in lactoseoplossingen. Groote hoeveelheden lactose bemoeilijken de destructie ten zeerste.

b. Ureum kan naast gelatine met voldoende nauwkeurigheid bepaald worden door deze twee stikstofhoudende verbindingen van elkander te scheiden met een zwavelzure oplossing van natriumphosphowolframaat, waarbij het ureum geheel in oplossing blijft en door uitwasschen quantitatief uit het gelatine neerslag kan worden verwijderd. Beide stoffen werden dan na destructie als NH_4OH door titratie bepaald.

Dat op deze wijze uitstekende uitkomsten verkregen werden, blijkt uit de volgende cijfers:

1). 50 cm^3 0,5 % gelatine werden gedestruerd en daarna afgedestilleerd op de gebruikelijke wijze. Het destillaat verbruikte $25,65 \text{ cm}^3$ 0,1 N. H_2SO_4 .

2). 100 mg. ureum werden op dezelfde wijze gekjeldahld. Het destillaat verbruikte $33,4 \text{ cm}^3$ 0,1 N. zwavelzuur, wat overeenkomt met 100,2 m.g. ureum.

3). Aan 50 cm^3 der onder 1. genoemde oplossing werden 100 m.g. ureum toegevoegd. Daarna werd de gelatine volledig neergeslagen met een zwavelzure natriumphosphowolframaat oplossing en het neerslag afgefiltreerd en uitgewasschen. Het filtrum met filter werd gekjeldahld en leverde een destillaat op, dat $25,85 \text{ cm}^3$ zuur verbruikte. Het destillaat van het eveneens gekjeldahlde filtraat verbruikte $33,25 \text{ cm}^3$ 0,1 N. H_2SO_4 en bevatte dus 100,05 m.g. ureum.

De onder 3. gevonden cijfers stemmen op zeer bevredigende wijze overeen met die onder 1. en 2. gevonden. Bij deze bepalingen, die in duplo werden uitgevoerd, werden blanco bepalingen met de voor de analyse gebruikte chemicaliën in rekening gebracht.

c. Het ammonium-ion werd bepaald door afdestilleeren van 50 cm^3 der ammoniumzoutoplossing met magnesium-oxyde. Was er tevens gelatine in de vloeistof aanwezig, dan geschiedde dit bij verlaagden druk waarbij een kooktemperatuur van 45°C . niet werd overschreden. Na volledig uitdrijven van de NH_3 werd dan in het residu de gelatine volgens kjeldahl bepaald.

d. Het Ca^{++} -ion werd als oxalaat neergeslagen en daarna met 0,1 N. kaliumpermanganaat getitreerd.

e. Bij de titratie van het Cl' -ion met zilvernitraat volgens MOHR werd het $AgNO_3$ afgemeten in een buretje met een verdeling in $0,01\text{ cm}^3$. Zodoende konden met geringe hoeveelheden chlorideoplossingen kleine concentratieverschillen zeer goed worden waargenomen.

f. Het *nitraat*-ion, waarvan aanvankelijk de concentratie volgens DEWARDA werd gemeten, werd later bepaald volgens de methode van NIEUWENBURG en DE GROOT (81), volgens welke het nitraat gereduceerd wordt met aluminiumkrullen, terwijl aan de vloeistof een weinig $CuSO_4$ wordt toegevoegd. Behalve dat deze methode belangrijk goedkoper is dan die van DEWARDA, heeft zij nog het voordeel, dat het schuimen veel minder hinderlijk is. Het verdient aanbeveling 5 à 10 cm^3 alcohol toe te voegen, waardoor het schuimen nog aanmerkelijk wordt verminderd.

In ammoniumnitraat werd het nitraat naast het ammonium-ion en de gelatine bepaald door eerst de NH_3 met MgO af te destilleeren in vacuüm en bij lage temperatuur, daarna het nitraat-ion te recudeeren en de zoo gevormde ammoniak tevens in vacuüm af te destilleeren en tenslotte de gelatine door kjeldahlen te bepalen.

g. De quantitative bepaling van het *mierenzuur* baarde aanvankelijk nog al moeilijkheden. Na eenig zoeken werd echter tenslotte een werkwijze gevonden, die het mogelijk maakte ook dit organische anion in het onderzoek te betrekken. Het mierenzuur, na aanzuren der oplossing met een geringe overmaat wijnsteen zuur afgedestilleerd met een stoomstraal en in een MgO suspensie opgevangen (FINKE 18, 19), werd volgens de Calomelmethode bepaald door verhitting van de neutrale tot zwak zure mierenzuur oplossing in een stoombad, nadat voldoende sublimaat, natriumacetaat en $NaCl$ waren toegevoegd. De methode was geschikt voor serie-onderzoek, doordat gebruik gemaakt werd van een stoomketel van ongeveer 20 L. inhoud, waaraan door middel van 6 uitlaten met kraan 6 destillaties gelijktijdig konden worden aangesloten. Het was noodig de stoomdestillatie, waarbij de MgO -suspensie door middel van een kleine vlam op constant volume werd gehouden, gedurende 5 à 6 uren voort te zetten, alvorens voldoende zekerheid was verkregen, dat alle mierenzuur was overgegaan. De reductie van het sublimaat tot

calomel geschiedde in Erlenmeyerkolven van 500 cm³ inhoud, welke waren voorzien van een gummistop met glazen opzetbuis van 40 cm. hoogte. In deze Erlenmeyers, die tot aan den hals door stoom waren omgeven, werd de vloeistof gedurende 4 uren verhit, waarna de reductie geheel was afgelopen. Daarna werd het calomel volgens RIESSER (106, 107) jodometrisch getitreerd (Zie ook L. UTKIN-LJUBOWZOFF (141)).

Wanneer we ons aan de resultaten der in dit hoofdstuk besproken proeven houden, dan is de conclusie, dat de opneembaarheid der zouten in de eerste plaats door de lyotropie der ionen wordt bepaald. Welke beteekenis hierbij moet worden toegeschreven aan hydratatie der moleculen en ionen eenerzijds en die der celcolloïden anderzijds, moet voorloopig in het midden worden gelaten.

HOOFDSTUK IV.

DE SNELHEID DER STOFOPNAME.

In den aanvang van het eerste hoofdstuk werd er op gewezen, dat de snelheid der stofopname niet alleen afhangt van de doorlatendheid van het protoplasma, maar ook van het concentratieverval. Het concentratieverval hangt weer af van datgene, wat er binnen de cel met de opgenomen stof gebeurt. Wanneer deze binnen de cel onveranderd in oplossing blijft, zal het evenwicht van diffusie eerder zijn bereikt, dan wanneer ze gebonden wordt of in een der celbestanddeelen meer oplost dan in water. In het minst gecompliceerde geval, bv. bij diffusie in water of in gels, of bij eenvoudige membraandiffusie —, geldt voor de diffusiesnelheid de wet van FICK (18), volgens welke de snelheid evenredig is met een diffusieconstante (k), — die voor elke stof specifiek is —, met het diffusieoppervlak (q) en met het concentratieverval. We kunnen deze wet schrijven in formule:

$$\frac{dD}{dt} = - k \times q \times \frac{dC}{dx}$$

waarin $\frac{dC}{dx}$ de concentratiegradiënt, dus de verandering van de concentratie met den afstand voorstelt.

Door verschillende onderzoekers is nu nagegaan of deze wet voor de diffusie in plantencellen mag worden toegepast, o.a. door LEPESCHKIN, door TRÖNDLE en door Szücs. Een moeilijkheid levert bij dit onderzoek de bepaling van het concentratieverval op. Op ingenieuze wijze is door genoemde onderzoekers deze moeilijkheid ondervangen.

Zoo bepaalde LEPESCHKIN (64) de snelheid der exosmose uit blad-okselcellen van Leguminosen langs indirecten weg, door op verschillende tijden den osmotischen druk te bepalen van cellen, die in gedestilleerd water lagen. Hij stelde nu het concentratie-

verval gelijk aan de plasmolytische grensconcentratie (C) dus aan de concentratie van het celsap, wat geoorloofd is, aangezien in het gedestilleerde water de concentratie gelijk nul kan worden gerekend. Is de inhoud der cel V , dan luidt de wet van FICK: $\frac{dD}{dt} = \frac{V \times dC}{dt} = k \times q \times C$ of $-\frac{dC}{C} = \frac{k \times q}{V} \times dt$ en na integratie $-\lg.C = \frac{q \times k \times t}{V} + M$, waarbij M een constante voorstelt. Op een tijdstip $t_0 = 0$, is $-\lg.C' = M$, dus $\lg.C' - \lg.C = \frac{q \times k \times t}{V}$, of daar k , q , en V constanten zijn, is $\lg. \frac{C'}{C} = a \times t$. Wanneer nu de wet van FICK voor de exosmose uit plantencellen geldt, dan moet dus voor het quotient der plasmolytische grensconcentraties, op verschillende tijden bepaald, gedeeld door het tijdsverschil een constante waarde worden gevonden. Dit bleek inderdaad het geval te zijn.

Door TRÖNDLE (139) werd de diffusiesnelheid van alkaloid-basen in *Spirogyracellen* gemeten, waarbij de tijd bepaald werd, die noodig was om een looizuurneerslag in de cel te verkrijgen. Aangezien het alkaloid binnen de cel direct wordt neergeslagen, blijft de concentratie daar 0 , zoodat volgens de wet van FICK de tijd, waarop het neerslag binnen de cel zichtbaar wordt, evenredig moet zijn met de concentratie, wat door TRÖNDLE ook werd gevonden. Daarom beschouwt TRÖNDLE de opname van de alkaloidbasen als een eenvoudige membraandiffusie.

Geheel anders is het volgens denzelfden schrijver met de opname van alkali-zouten gesteld, waarvan de opneembaarheid werd bepaald met FITTING's methode. Van deze zouten was de opgenomen hoeveelheid in den aanvang althans, per tijdseenheid dezelfde, wanneer intacte cellen genomen werden. TRÖNDLE meent, dat de levende cel de opname der zouten actief regelt.

Ook Szücs (126), die *Spirogyracellen* kleurde met methyl-violet-oplossingen van verschillende concentraties, vond, dat voor de snelheid, waarmee de kleurstof wordt opgenomen, de wet van FICK geldt. Szücs neemt aan, dat het concentratieverval gedurende de proef constant blijft, daar de buitenconcentratie niet noemenswaard verandert, terwijl de kleurstof binnen de cel gebonden wordt tot een osmotisch inactieven vorm. De wet van FICK kan dan als volgt geschreven worden: $D = k \times C \times t$, waarin D de opgenomen hoeveelheid kleurstof voorstelt, ter-

wijl k een constante is, die afhangt van de diffusiecoëfficiënt van de kleurstof en van de afmetingen der cel; C is de concentratie der kleurstof en t de tijd, die noodig is om een bepaalde kleurdiepte te verkrijgen. Daar steeds tot denzelfden graad werd gekleurd, was D steeds gelijk, zoodat $t \times C$ een constante moet zijn. Wanneer de kleurstof door den wand wordt geadsorbeerd, zooals bij *Lemna minor* met neutraalrood het geval was werd voor $t \times C$ geen constante waarde gevonden; zoodra echter door toevoeging van OH'-ionen de adsorbtie van de kleurstof aan den celwand werd voorkomen, gold ook hier de wet van FICK.

Wanneer we nu nagaan, hoe de hoeveelheid stof, die door de gist wordt opgenomen, van den tijd afhangt, dan is in het vorige hoofdstuk aangegeven, op welke wijze deze hoeveelheid kan worden bepaald. Thans werden op een grooter aantal nauwkeurig bekende tijdstippen dan bij de vorige proeven het geval was, de concentratieveranderingen in de vloeistof nagegaan. Vooral de juiste bepaling van het beginpunt der proef bleek bij dit onderzoek van groote beteekenis, in het bijzonder bij stoffen als ureum, die zeer snel in de cel dringen. Wanneer de gist met de oplossing wordt aangewreven, dan kost het steeds een tamelijk langen tijd, voordat alles met de oplossing gemengd is. Teneinde nu de mengtijd zoo kort mogelijk te maken, werd de gelatineoplossing in twee helften gescheiden, waarvan de eene gebruikt werd om de gist in suspensie te brengen, terwijl de andere helft, waarin de te onderzoeken stof was opgelost, zoo snel mogelijk aan de suspensie werd toegevoegd. Op deze wijze duurt het mengen slechts enkele seconden, en is voor het begin der proef een tijdstip aan te geven. Een tweede belangrijke vraag is, wat er tijdens het centrifugeeren gebeurt. Wanneer is in de centrifugebuizen een zoodanige ontmenging opgetreden, dat de gist practisch gesproken van de vloeistof gescheiden is? Dit is waarschijnlijk reeds zeer spoedig het geval, ofschoon het geruimen tijd duurt, voordat de laatste cellen uit de vloeistof zijn verwijderd.

In de eerste plaats is op deze wijze de snelheid van de opname van het ureum bepaald. Aan twee K.G. gist, aangemengd met 2 L. 0,5 % gelatineoplossing, werd 2 L. van een 2 % ureumoplossing toegevoegd. Na 13 min. werd met centrifugeeren begonnen wat 20 min. duurde. Ook op de volgende tijdstippen is steeds

gedurende 20 min. gecentrifugeerd. Door tevens 1 K.G. gist aan te mengen met 2 L. 0,5 % gelatineoplossing en deze suspensie op bepaalde tijden te centrifugeeren, konden in de zoo gevonden centrifugaten blanco bepalingen der gelatine en der ureum worden uitgevoerd ter correctie van de in de eigenlijke proef gevonden waarden.

Met behulp van formule (4) $D = [2V_t - (I + 2V_{gel})] \times \frac{Ct}{C_0}$ $\times m$ is D , de hoeveelheid stof, die na een tijd t in 100 gram gist is gediffundeerd, berekend uit de cijfers van tabel XXIII, evenals uit die van Tabel XXIV, waar dezelfde bewerkingen en berekeningen zijn uitgevoerd voor kaliumchloride.

TABEL XXIII.

DIFFUSIE SNELHEID VAN 1 % UREUM.

Tijden $\times 20$ min.	Titer Ureum.	$2 \times V.$ Ur.	Titer gel.	$2 \times V.$ gel.	D
0	169,2	—	27	—	—
0,5	146,6	30,8	26,6	0,4	128,2
3	138,3	44,7	26,7	0,3	237,2
6,5	136,8	47,3	27,0	0	277,3
9	135,1	50,5	27,0	0	299,4
12	132,1	56,2	27,0	0	337,0
15	129,1	62,1	27,0	0	374,5
21,5	127,3	65,8	27,3	— 2,2	413,8
27	126,0	68,6	27,4	— 2,9	435,6
36,5	123,25	74,6	27,5	— 3,6	474,9
48,5	121,6	78,3	27,7	— 5,0	505,2
72	122,3	76,7	27,8	— 5,8	502,4
84	122,3	76,7	27,8	— 5,8	502,4
93,5	122,4	76,5	28,2	— 8,9	523,7
109	121,8	77,5	28,3	— 9,6	535,4

TABEL XXIV.

DIFFUSIE SNELHEID VAN 0.6 % KALIUM CHLORIDE.

Tijden × 20 min.	Titer KCl.	2 × V. Cl.	Titer gel.	2 × V. gel.	D
0	8,14	—	26	—	—
1	7,28	23,6	25	8	14
7	7,22	25,6	25,3	5,6	34,1
13	7,13	28,4	25,6	3,2	64,3
25	7,07	30,4	25,8	1,4	83,5
37	6,99	33	26	0	103
49	6,95	34,4	26,3	—2,2	122,8
73	6,91	35,6	26,4	—3	130,6
85	6,91	35,6	26,4	—3	130,6
97	6,89	36,4	26,4	—3	133,8
109	6,81	39	26,3	—2,2	136,1
121	6,79	39,8	26,4	—3	149,3

Wanneer D graphisch wordt uitgezet als een functie van den tijd dan ontstaat een lijn (fig. XI) die een parabolisch¹⁾ verloop heeft. In fig. XII en XIII zijn de logarithmen van D uitgezet tegen die van den tijd en het blijkt dat de punten zich rangschikken tot een rechte lijn, waaruit volgt, dat het verloop der stofopname voldoet aan de formule: $D = k \times t^{1/n}$ (5)

Uit het verloop dezer rechte lijnen zijn de krommen van fig. XI geconstrueerd. Na een zekeren tijd, bij ureum na ongeveer 12 en bij kaliumchloride na 16 uur, wijken de cijfers van de logarithmische kromme af. Zij blijven er belangrijk beneden, wat ook te verwachten was, aangezien de kromme tot in het oneindige blijft stijgen, terwijl de diffusie tenslotte een evenwicht bereikt.

Nu de betrekking tusschen opgenomen hoeveelheid stof en tijd kan worden voorgesteld door een logarithmische lijn, welke voldoet aan de formule $D = k \times t^{1/n}$, is het mogelijk de snelheid van het proces op elk willekeurig tijdstip te bepalen. Differentieeren we D tot t , dan geldt de formule:

$$\frac{dD}{dt} = \frac{k}{n} \times t^{1/n-1} \dots \dots \dots (6)$$

¹⁾ De vergelijking $y = k \times x^m$ stelt voor $m = 2$ of $\frac{1}{2}$ een gewone parabool, voor m anders dan 2 of $\frac{1}{2}$ maar positief een z.g. hogere parabool voor.

Uit deze formule kennen we k ; het is nl. de hoeveelheid stof, die na een tijd $t = 1$ door 100 g. gist is opgenomen, terwijl $1/n$ wordt gevonden door de tangens van den hoek, die de lijnen uit fig. XII en XIII met den tijdlijn maken. Bij ureum bedragen k en $1/n$ 163,6 m.g. resp. 0,29 en bij kaliumchloride bedragen deze grootheden 14 m.g. resp. 0,55. Voor de „oogenblikkelijke” snelheid $\frac{dD}{dt}$ hebben we feitelijk de gemiddelde snelheid $\frac{\delta D}{\delta t}$ gedurende $\delta t = 20$ min. in rekening gebracht.

Ook de snelheid der diffusie in afhankelijkheid van den tijd verloopt volgens een parabolische kromme (fig. XII en XIII).

Hoe hangt nu de diffusiesnelheid af van het concentratieverval? Wanneer de uitwendige concentratie wordt aangeduid als C_u , de inwendige als C_i , dan is $(C_u - C_i)$ het concentratieverval. De uitwendige concentratie is bepaald door titratie; zij bedraagt $C_u = \frac{C_t}{C_o} \times m$. (zie blz. 42). De inwendige concentratie C_i kunnen we bepalen, als we het volume kennen, waarin de naar binnen gediffundeerde stof is opgelost en wanneer binnen de cel geen veranderingen optreden. Stellen we dit volume voor door V dan is $C_i = \frac{D}{V}$. Het concentratieverval is dus $C_u - \frac{D}{V}$. De formule van FICK kunnen we dan als volgt schrijven:

$$\frac{\delta D}{\delta t} = -k \times q \times (C_u - \frac{D}{V}) \text{ dus } -k \times q = \frac{\frac{\delta D}{\delta t}}{(C_u - \frac{D}{V})}$$

Op een ander tijdstip is de uitwendige concentratie $C_{u'}$, de inwendige $\frac{D'}{V}$ en dus $-k \times q = \frac{\frac{\delta D'}{\delta t}}{(C_{u'} - \frac{D'}{V})}$ Wanneer de wet van

FICK mag worden toegepast voor de diffusie van stoffen in de cel,

dan bestaat dus de volgende betrekking: $\frac{\frac{\delta D}{\delta t}}{C_u - \frac{D}{V}} = \frac{\frac{\delta D'}{\delta t}}{C_{u'} - \frac{D'}{V}}$,
 waaruit voor V volgt: $V = \frac{\frac{\delta D}{\delta t} \times D' - \frac{\delta D'}{\delta t} \times D}{\frac{\delta D}{\delta t} \times C_{u'} - \frac{\delta D'}{\delta t} \times C_u} \dots (7)$

Voor V moet dan bij alle combinaties van snelheid $\frac{\delta D}{\delta t}$ opgenomen hoeveelheid (D) en uitwendige concentratie (C_u'), dezelfde waarde gevonden worden. Dit blijkt echter geenszins het geval te zijn, zoomin bij het kaliumchloride als bij het ureum (tabel XXV).

TABEL XXV.
OPLOSSEND VOLUME IN DE CEL BEREKEND UIT DIFFUSIE-
SNELHEID $\frac{\delta D}{\delta t}$ OPGENOMEN HOEVEELHEID STOF D
EN UITWENDIGE CONCENTRATIE C_u .

UREUM					KALIUM CHLORIDE				
Tijd. \times 20 min.	$\frac{dD}{dt}$	D	C_u	V	Tijden \times 20 min.	$\frac{dD}{dt}$	D	C_u	V
0,5	78,5	133,7	8,67		1	7,68	14	5,59	
3	22,1	225,9	8,19	32,7	7	3,21	41,1	5,59	10,8
6,5	12,8	283,8	8,09	45,6	13	2,42	57,9	5,54	20,1
9	10,1	311,9	8,0	54,7	25	1,81	83,2	5,50	32,6
12	8,3	339,6	7,8	67,9	37	1,51	103	5,45	38,8
15	7,1	363,1	7,6	78,3	49	1,33	121	5,41	49,7
21,5	5,5	403,6	7,5	75,9					
27	4,7	431,5	7,4	87,4					
36,5	3,8	472,1	7,3	93,5					

Het oplossend volume is bij ureum aanmerkelijk groter dan bij kaliumchloride en neemt schijnbaar toe naarmate meer stof door de cel is opgenomen. De toename van V met den tijd heeft tengevolge, dat het concentratieverval veel langzamer afneemt, dan zonder deze toename het geval zou zijn.

Wat gebeurt er nu in de cel, waardoor deze schijnbare toename van V wordt veroorzaakt? Bij de proef met ureum is het niet mogelijk, dat deze stof tenslotte in ongeveer 93 cm³ per 100 gram gist is opgelost, aangezien de gist slechts 75 % vocht bevat. Zelfs, wanneer we in aanmerking nemen, dat gedurende de proef nog 3 à 4 cm³ water is opgenomen, is dit bedrag veel te hoog. Ook bij het kaliumchloride, waar V gedurende 12 u. 20 min. van ongeveer 11 cm³ tot ongeveer 50 cm³ stijgt, is het niet waarschijnlijk, dat al dit water aan de protoplasmacolloïden wordt onttrokken.

Ook op andere wijze kan evenwel het concentratieverval in

stand worden gehouden en wel, doordat telkens de naar binnen gediffundeerde stof geheel of gedeeltelijk uit de oplossing wordt weggenomen, bv. door adsorbtie. Nu zijn er meerdere proeven uit de litteratuur bekend, die er op wijzen, dat stoffen, die in cellen diffundeeren, daar worden geadsorbeerd. Zoo vonden bv. STILES en JØRGENSEN, en STILES en KIDD, dat de opname van een aantal electrolyten door plantaardige weefsels verliep volgens de formule van FREUNDLICH ($y = k \times c^m$).

Ook de opname van ammonium uit ammoniumformiaat in verschillende concentraties verloopt blijkens tabel XXVI zoodanig, dat uit de lagere concentraties naar verhouding meer wordt opgenomen dan uit de hogere. De verdunning van het ammonium daalde van 46,1 bij de laagste NH_4 -titer tot 43,4 cm^3 water per 50 g. gist bij de hoogste.

TABEL XXVI.

VERSCHILLENDE CONC. AMM. FORMIAAT.

Amm. titer		V amm. gev.	V. amm. ber. uit max. verd. met water der gist
voor	na 24 u.		
0	0	—	—
6,4	4,38	46,1	37,5
12,8	8,8	45,5	„
25,2	17,4	44,8	„
37,45	26,0	44,0	„
51,35	35,8	43,4	„

Daar de gist 75 % vocht bevat, kan de verdunning met het totale celvocht slechts 37,5 cm^3 per 50 g. gist bedragen. Is dan nog een deel van het water aan de protoplasmacolloïden gebonden, dat aan de oplossing niet meedoet, dan is de verdunning door het celvocht des te kleiner en moet er een grotere hoeveelheid NH_4 uit de oplossing verdwenen zijn door adsorbtie.

De in dit hoofdstuk beschreven proeven toonen aan dat binnen de cel belangrijke hoeveelheden stof kunnen worden geadsorbeerd. Dit is waarschijnlijk een der belangrijkste redenen, waardoor ureum en organische zouten en zuren zooveel sneller worden opgenomen dan anorganische verbindingen. Adsorbtie in de cel is ook de oorzaak, dat uit de wet van FICK de concentratie binnen de cel niet kan worden berekend.

SLOTBESCHOUWINGEN.

Nadat in de vorige hoofdstukken is beschreven, hoe inderdaad quantitative permeabiliteitsbepalingen kunnen worden verricht en de met deze methode verkregen resultaten uitvoerig zijn besproken, mogen thans nog eenige algemeene beschouwingen volgen over de theorie der permeabiliteit en het standpunt, dat in dezen moet worden ingenomen op grond van de genomen proeven.

Voor wie de omvangrijke litteratuur der permeabiliteitsonderzoekingen aandachtig heeft bestudeerd, is het duidelijk, dat de resultaten, die met de gevolgde werkwijzen verkregen werden, slechts zelden voor een enkelen uitleg vatbaar waren en dat dientengevolge een schromelijke wanverhouding bestaat tusschen experimenteel vaststaande feiten en het aantal opgeworpen permeabiliteitstheoriën. Volkomen terecht concludeert STILES dan ook in zijn uitstekende monographie over de permeabiliteit:

„In conclusion it should be emphasised how overloaded the whole subject of permeability is with theories, and with observations based on the assumption of the correctness of unproved theories. For this reason many of the conclusions drawn from their observations by various investigators are valueless. . . .”

„While the propounding of theories will continue to satisfy the minds of some, yet it can not be too strongly emphasized that what are wanted to lay the foundations of a proper understanding of phenomena of permeability in plants are facts, and particularly quantitative data. When these are abundant where they are now scanty we may be able to formulate more definitely the laws governing the interchange of substances between the cell and its surroundings, and so be in a much better position for understanding not merely the mechanism of celpermeability, but also the life of the plant as a whole.”

Het permeabiliteitsprobleem vraagt dan ook niet naar nieuwe theorieën; van meer beteekenis kan het geacht worden de bestaande zoo mogelijk nader tot elkander te brengen en wat zij voor gemeenschappelijks hebben te vereenigen. Het kan nauwelijks verwacht worden, dat alle verschijnselen, die zich bij de permeabiliteit voordoen, vanuit een enkel gezichtspunt kunnen worden verklaard. Toch is veel wat op zeer verschillende oorzaken schijnt te berusten dikwijls nader verwant dan op het eerste gezicht lijkt.

Uit de proeven van hoofdstuk IV met ureum en met kaliumchloride, waarbij bepaald werd, hoeveel er van deze stoffen werd opgenomen en met welke snelheid dit gebeurde, blijkt, dat de diffusiesnelheid in hooge mate afhangt van adsorbtie in de cel. Evenzoo zal oplosbaarheid in lipoiden de diffusie bevorderen en er toe bijdragen, dat in den evenwichtstoestand meer stof is opgenomen.

Aan den anderen kant is het volgens de proeven van КАННО, die van RUHLAND en HOFFMANN en de in hoofdstuk III besproken permeabiliteitsbepalingen zeer waarschijnlijk, dat verandering van den zwellingstoestand der celcolloïden, — door electrolytionen volgens lyotrope reeksen teweeggebracht —, de diffusie beïnvloeden.

Ongetwijfeld verloopt diffusie naast selectieve oplossing in bepaalde bestanddeelen der cel, waarbij in de eerste plaats aan de lipoiden gedacht moet worden en zij beïnvloeden elkander over en weer, terwijl colloïdale toestandsveranderingen der celcolloïden deze processen zoowel kwalitatief als quantitatief kunnen wijzigen. Al deze invloeden hangen op hun beurt weer samen met de lyotrope eigenschappen der opgeloste stoffen. De hydratatie der colloïden, zoowel als die der moleculen en ionen, is afhankelijk van de lyotropie dezer lichamen. Maar ook de deelingscoëfficiënt tusschen b.v. water en olie staat hiermee in het nauwste verband, evenals de verlaging van de oppervlaktespanning tusschen het grensvlak water—lucht. Het zijn vooral de polaire groepen en de electrisch geladen punten, die affiniteit tot het water hebben. Zoo richten volgens HARKINS in het grensvlak van isoamylalcohol en water de alcohol-moleculen zich zoodanig, dat hun polaire groepen, — de hydroxyl groepen —, naar het water gekeerd zijn. De valentieresten, aan de polaire

groep aanwezig, doen een elektrische lading ontstaan, welke op het water een aantrekkende kracht uitoefent.

Bij de ionen waar relatief veel lading aanwezig is op een klein deeltje, is de hydratatie des te sterker naarmate een kleiner deeltje sterker geladen is. Zoo neemt bij de alkali-ionen de grootte toe in de reeks: $\text{Li} \cdot < \text{Na} \cdot < \text{K} \cdot < \text{Rb} \cdot < \text{Cs} \cdot$. Het $\text{K} \cdot$ -ion is bv. ongeveer 2 maal zoo groot als het $\text{Na} \cdot$ -ion. De hydratatie neemt echter in de omgekeerde volgorde toe, zoodat de kleine ionen met zeer groote watermantels omgeven worden, de grootere daarentegen slechts weinig water binden. Dientengevolge neemt de beweeglijkheid af in de volgorde: $\text{Cs} \cdot > \text{Rb} \cdot > \text{K} \cdot > \text{Na} \cdot > \text{Li} \cdot$, zoodat het $\text{K} \cdot$ -ion ongeveer 1,5 maal zoo beweeglijk is als het $\text{Na} \cdot$ -ion, terwijl het $\text{Rb} \cdot$ -ion en het $\text{Cs} \cdot$ -ion zich ongeveer even snel voortbewegen als het $\text{K} \cdot$ -ion. Het groote verschil, dat tusschen de opneembaarheid van het $\text{Na} \cdot$ -ion en het $\text{K} \cdot$ -ion gevonden werd, is uit dit oogpunt beschouwd begrijpelijk. De aardalkali-ionen, welke kleiner zijn dan de overeenkomstige ionen der eerste groep, hebben een sterkere lading en zijn dientengevolge sterker gehydrateerd. In overeenstemming daarmee is hun opneembaarheid geringer.

Het is echter geenszins noodzakelijk de ionen een watermantel toe te kennen, waardoor grootere eenheden ontstaan. Het verschil in beweeglijkheid en ook in diffusie uit een oplossing in een cel kan verklaard worden, door aan te nemen, dat tengevolge van de elektrische krachten, welke de ionen en de water-dipolen over en weer op elkander uitoefenen, de beweeglijkheid meer of minder geremd is naar gelang van de grootte van het krachtveld. In het grensvlak tusschen oplossing en protoplasma is het krachtveld aan de zijde van de oplossing grooter dan aan die van het protoplasma, daar de protoplasmacolloïden de watermoleculen reeds gericht hebben, zoodat zij een geringeren invloed op het ion uitoefenen. De oplossing houdt het ion vast en wel des te sterker naarmate het krachtveld aan die zijde grooter is.

Niet alleen de beweeglijkheid, doch ook de capillairactiviteit der ionen hangt met de hydratatie, dus met de lading en met de grootte samen, en zij beïnvloedt de opneembaarheid in dezelfde richting. Zoo zijn het tenslotte elektrische krachten, die in eerste instantie de opneembaarheid der stoffen bepalen.

Van dit standpunt beschouwd is het tevens verklaarbaar,

waarom de ongedissocieerde moleculen, welke vooral bij de zwakke basen en zuren in grootere hoeveelheden in de oplossing voorkomen, zooveel beter door de cel worden opgenomen. De ongedissocieerde moleculen immers zijn minder geladen dan de ionen en dientengevolge is hun hydratatie geringer. Ook hebben zij een grootere oppervlakteactiviteit en worden dus gemakkelijker geadsorbeerd.

Of de cel mag worden opgevat als een oplossing omgeven door een semiepermeabele membraan, daarover geven de proeven, in het tweede hoofdstuk beschreven, uitsluitsel. Het bleek daarbij, dat de gistcel als zoodanig mag worden beschouwd. De afwijkingen van de wet van BOYLE — MARIOTTE — VAN 'T HOFF konden op ongezochte wijze verklaard worden door veranderingen in den zwellingstoestand der colloïden aan te nemen. Een andere vraag is het, welk deel van het protoplasma de doorlaatbaarheid bepaalt. Moeten we met PFEFFER aannemen, dat het protoplasma is omgeven door een semiepermeabele neerslagmembraan? In deze richting schijnen de proeven van KAHHO met electrolyten te wijzen, evenals die van KÜSTER, die verdichting in de grenslaag van het protoplasma waarnam, wanneer cellen in een oplossing van saccharose gelegen hadden. Of wordt de grenslaag gevormd door een zeer dun laagje lipoïdachtige stoffen, zooals door OVERTON werd aangenomen? Ook met deze opvatting zijn KAHHO's resultaten vereenigbaar, wanneer men ze beschouwt in verband met de onderzoekingen van HANSTEEN-CRANNER, die aantoonde, dat de lipoïden, zooals deze in de levende cellen voorkomen, geheel andere eigenschappen hebben, dan wanneer ze daaruit met organische extractiemiddelen zijn geïsoleerd. Tenslotte kan ook nog het protoplasma in zijn geheel als semiepermeabele membraan worden opgevat, waarvan de poriëngrootte in verband met de grootte der deeltjes bepaalt of een stof zal worden opgenomen of niet. Deze meening van RUHLAND wordt eveneens gesteund door de experimenten van KAHHO, evenals door die van RUHLAND en HOFFMANN en de hier beschreven onderzoekingen. Nu heeft STILES tegen de conclusies van KAHHO aangevoerd, dat zij gebaseerd zijn op resultaten verkregen met methoden, waarvan de waarde betwijfeld mag worden. Nu echter met de in hoofdstuk III beschreven quantitative proeven uitkomsten werden verkregen, die met die van

KAHHO en met die van RUHLAND en HOFFMANN in het algemeen goed overeenstemmen, winnen de resultaten verkregen met hunne werkwijzen aan beteekenis. Een andere vraag is het, hoe de gevonden lyotrope volgorde der ionen moet worden geïnterpreteerd. Quantitatieve bepaling van den invloed, welke verschillende stoffen op elkander uitoefen in hun opneembaarheid door de cel zullen voor een beter inzicht van groote beteekenis blijken te zijn.

OVERZICHT DER LITTERATUUR.

1. AMSTEL, J. VAN. *De temperatuursinvloed op physiologische processen der alcoholgist*. Proefschr. Delft, 1912..... 25.
2. BILTZ, W. Ueber Die dialisierbarkeit der Farbstoffe. *Gedenkboek Van Bemmelen*. **108**. Helder 1910..... 21.
3. ——— Zur Kenntnis der Lösungen anorganischer Salze in Wasser. *Zeitschr. f. Phys. Chem.* **40**, 185, 1902..... 50.
4. BORN, M. Volumen und Hydratationswärme der Ionen. *Zeitschr. f. Physik*, **1**, 45. 1920..... 50.
5. BRENNER, W. Ueber die Wirkung von Neutralsalzen auf die Säureresistenz, Permeabilität und Lebensdauer der Protoplasten. *Ber. deut. Bot. Ges.* **38**, 277. 1920..... 22, 51.
6. BROOKS, S. C. New determinations of permeability. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2**, 569. 1916..... 20.
7. ——— A new method of studying permeability. *Bot. gaz.* **64**, 306. 1917 20.
8. COLLANDER, R. Ueber die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für sulfosaure Farbstoffe. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **60**, 354. 1921.... 21.
9. ——— Einige Permeabilitätsversuche mit Gelatinemembranen. *Protoplasma*, **3**, 213. 1927..... 21.
10. DAM, W. VAN. *Opstellen over moderne Zuivelchemie*. Uitg. v. d. Algom. Nederl. Zuivelb. 51.
11. ——— *Biochem. Zeitschr.* **87**, 107. 1918..... 51.
12. ——— *Verlagen van Landbouw. Onderz.* **22**. 1918..... 51.
13. DARWIN, C. *Insectivorous plants*. Second thousand. London, 1875..... 7.
14. DOKAN, SH. Der Einfluss der Electrolyte auf das Glycogensol und die Entstehung und die Umkehrung der Hoffmeisterschen Ionenreihen. *Kolloid Zeitschr.* **37**, 283..... 12, 47.
15. EGE, R. Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen III. *Biochem. Zeitschr.* **150**, 99. 1922..... 15, 35.
16. FAJANS, K. Löslichkeit und Ionisation vom Standpunkte der Atomstructur. *Die Naturwiss.* **9**, 729. 1921..... 50.
17. ——— und K. SACHTLEBEN. *Zeitschr. f. Electrochem.* 1921.... 50.
18. FICK, A. Ueber Diffusion. *Pogg. Ann.* **94**, 59. 1855..... 58.
19. FINKE. Bepaling van het mierenzuur. *Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden* I. **6**, p. 652..... 56.
20. ——— *Zeitschr. f. Unters. Nahr. u. Genussmittel*, **21**, 1. 1911.. 56.
21. FITTING, H. Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. *Jahrb. f. Wiss. Bot.* **56**, (Pfeffer Festschrift) 1. 1915
5, 12.
22. ——— Untersuchungen über isotonische Koefizienten und ihren Nutzen für die permeabilitätsbestimmung. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, **57**, 553. 1917..... 10, 12.

23. ——— Untersuchungen über die Aufnahme und über anomale osmotische Koeffizienten von Glyzerin und Harnstof. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, **59**, 1. 1919..... 10, 12.
24. FISCHER, M. H. Ueber die Analogie zwischen die Wasserabsorbtion durch Fibrin und durch Muskeln. *Pflügers Arch.* **124**, 69. 1908.. 14.
25. ——— *Oedema. A study of the physiology and the pathology of water absorbtion by the living organism.* New York. 1910..... 14.
26. FREUNDLICH, H. *Kapillarchemie.* Leipzig. 1909..... 46
27. FRICKE, R. Ueber Molekül- und Ionenhydrate. *Zeitschr. f. Electrochem.* **28**, 161. 1922..... 50.
28. FUJITA, A. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und die Durchlässigkeit von Membranen. Potentiale an Pergamentmembranen. *Biochem. Zeitschr.* **159**, 370. 1925..... 47.
29. ——— Idem id. Die Eigenschaften der Membranen von amphotherem Character. *Biochem. Zeitschr.* **1**, 62, 245. 1926..... 47.
30. ——— Idem id. Die Permeabilität der getrockneten Kollodiummembranen für Nichtelectrolyte. *Biochem. Zeitschr.* **170**, 18. 1926.. 47.
31. GELLHORN, E. *Neuere Ergebnisse der Physiologie.* Gerefereerd door J. SPEK in *Protoplasma* **1**, 619..... 50.
32. GRIJNS, G. Bloedonderzoekingen. Over de invloed van opgeloste stoffen op de roode bloedcellen in verband met de verschijnselen van osmose en diffusie. *Jaarversl. v. h. Lab. v. Path. Anat. en Bact. Weltevreden.* 1894..... 15.
33. ——— Ueber den Einfluss gelöster Stoffe auf den rothen Blutzellen in Verbindung mit den Erscheinungen der Osmose und der Diffusion. *Pflügers Arch.*, **63**, 86. 1896..... 15.
34. HAMBURGER, H. J. Die isotonischen Koeffizienten und die roten Blutkörperchen. *Zeitschr. f. physik. Chemie* **6**, 319. 1890..... 15.
35. ——— *Osmotischer Druk und Ionenlehre*, Bd. I, 1902..... 15, 35.
36. HANSTEEN—CRANNER, B. Zum Biochemie und Physiologie der Grenzsichten lebender Pflanzenzellen. *Meldinger fra Norges Landbrukhoiskole*, Kristiania, **2**, 1. 1922..... 49.
37. HARVEY, E. NEWTON. Studies on the permeability of cells. *Journ. Exper. Zool.* **10**, 507. 1911..... 22, 51.
38. HEDIN, S. G. Ueber die Brauchbarkeit der centrifugalkraft für quantitative Blutuntersuchungen. *Pflügers Arch.* **60**, 369, 1895. 15, 18.
39. ——— Ueber die Bestimmung isotonischer Konzentrationen durch Zentrifugieren von Blutmischungen. *Zeitschr. f. phys. Chem.* **17**, 164. 1895..... 15, 18.
40. L'HERMITE. Recherches sur l'endosmose *Ann. chim. phys.*, **43**, 420. 1855 4.
41. HÖBER, R. Die Durchlässigkeit der Zellen für Farbstoff. *Biochem. Zeitschr.* **20**, 56. 1909..... 21.
42. ——— Zur physikalischen Chemie der Vitalfärbung. *Biochem. Zeitschr.* **67**, 420. 1914..... 21.
43. ——— *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe.* Fünfte Aufl. 1924 2, 14, 19, 21.
44. ——— BANUS, M. G. Zur Theorie der sog. physiologischen Permeabilität. *Pflügers Arch.* **201**, 14. 1923..... 21.
45. HÖFLER, K. Die plasmolytisch-volumetrische Methode und ihre Anwendbarkeit zur Messung des osmotischen Wertes lebender Pflanzenzellen. *Ber. deut. bot. Ges.* **35**, 706. 1917..... 12, 13, 34.

46. ——— Permeabilitätsbestimmung nach der plasmometrischen Methode. *Ber. deut. bot. Ges.* **36**, 414. 1918..... 12, 13.
47. ——— Ueber die Permeabilität der Stengelzellen von *Tradescantia elongata* für Kalisalpeter. *Ber. deut. bot. Ges.* **36**, 423. 1918..... 12.
48. ——— Ueber den Zeitlichen Verlauf der Plasmadurchlässigkeit in Salzlösung. *Ber. deut. bot. Ges.* **38**, 288, 1920..... 12.
49. HOFMEISTER, F. Zur lehre von der Wirkung der Salze. Ueber Regelmässigkeiten in der Eiweissfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum Physiologischen Verhalten derselben. *Arch. f. exper. Phath. u. Pharm.* **24**, 247. 1888..... 5, 46, 50.
50. HYLKEMA, B. *De permeabiliteitsverhoudingen bij gistcellen en bacteriën*. Proefschr. Utrecht. 1916..... 15, 19.
51. JANSE, J. M. Plasmolytische Versuche an Algen, *Bot. centralbl.* **32**, 21. 1887..... 2, 5, 16.
52. ——— *Versl. en Meded. d. K. Akad. v. Wetenschappen, Afd. Nat.* (3), **4**, 332. Amsterdam 1887..... 2, 5, 16.
53. JONES, H. C. Im hiesigen Laboratorium während der vergangenen zwölf Jahre erhaltene Anhaltspunkte. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **74**, 325. 1910..... 50.
54. ——— *The nature of Solution*. London, 1917..... 50.
 ——— (with the assistance of GETMAN, F. H., BASSET, H. P. McMASTER, L. and UHLER, H. S.). Hydrates in aqueous solution. *Carnegie Inst. of Washington* **60**. 1907..... 36, 50.
56. КАНО, H. Zur Kenntnis der Neutralsalzwirkung auf das Pflanzenplasma II. *Biochem. Zeitschr.* **120**, 125. 1921..... 5, 48.
57. ——— Ein Beitrag zur Permeabilität des Pflanzenplasmas für neutralsalze. IV. *Biochem. Zeitschr.* **123**, 284. 1921..... 5, 48.
58. ——— Ein Beitrag zur Theorie der antagonistischen Ionenwirkungen der Erdalkalien auf das Pflanzenplasma. *Biochem. Zeitschr.* **167**, 25. 1926..... 5, 48.
59. KLEBS, G. Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. *Ber. deut. bot. Ges.* **5**, 181. 1887..... 2.
60. KOLTHOFF, I. M. Die Electrolytadsorbition an reiner aschenfreier Kohle. *Receuil des Trav. Chim. Neerl.* **46**, 539. 1927..... 48.
61. KÖPPE, H. Eine neue Methode zur Bestimmung isotonischer Konzentration. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **16**, 261. 1895..... 15.
62. KUSSEROW, R. *Zeitschr. f. Spiritusindustrie* **8**, 84. 1897. Geciteerd uit LAFAR, *Handbuch der technischen Mykologie* **IV**, Jena 1905—1907. 36.
63. KÜSTER, E. Ueber die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **50**, 261. 1911..... 21.
64. LEPESCHKIN, W. W. Ueber osmotischen Eigenschaften und der Turgordruck der Blattgelenkzellen der Leguminosen. *Ber. deut. bot. Ges.* **26a**, 724. 1908..... 58.
65. ——— Ueber die Permeabilitätsbestimmung der Plasmamembran für gelöste Stoffe. *Ber. deut. bot. Ges.* **27**, 129. 1909..... 10.
66. ——— Ueber den Turgordruck der vacuolisierten Zellen. *Ber. deut. bot. Ges.* **26a**, 198. 1908..... 10.
67. LLOYD, D. J. The relation of the excised muscle to acids salts and bases. *Proc. Roy. Soc. London. B.* **89**, 277. 1916..... 14.
68. LLOYD, F. E. The behaviour of Protoplasm as a colloidal complex. *Yearb. Carnegie Instit. of Washington* **14**, 66. 1916..... 14.
 Geciteerd uit W. STILES, *Permeability*. 1924.

69. LOEB, J. Geciteerd uit W. STILES, *Permeability*. 1924..... 14.
70. LUNDEGÅRDH, H. Ueber die Permeabilität der Wurzelspitzen von *Vicia Faba* unter verschiedenen äusseren Bedingungen. *K. Svenska Vetenskapsakad. Handlingar* **47** (3) 1. 1911..... 48.
71. MICHAËLIS, L. en FUJITA, A. Untersuchungen über electrische Erscheinungen und die Durchlässigkeit von Membranen. Potentialdifferenzen und Permeabilität von Kollodiummembranen. *Biochem. Zeitschr.* **161**, 47. 1925..... 47.
72. ——— Id. id. Die Permeabilität der Kollodiummembranen für mehrwertige Kationen. *Biochem. Zeitschr.* **164**..... 47.
73. ——— en DOKAN, SH. Id. id. Membranen aus Paraffin, Wachs, Mastix, Kautschuk, *Biochem. Zeitschr.* **162**..... 47.
74. ——— en HAYASHI, K. Untersuchungen über electrische Erscheinungen und Ionendurchlässigkeit von Membranen. *Biochem. Zeitschr.* **173**, 411. 1916..... 47.
75. NÄGELI, C. *Pflanzenphysiologische Untersuchungen*. 1855..... 2.
76. NATHANSOHN, A. Ueber die Regulation der Aufnahme anorganischer Salze durch die Knollen von *Dahlia*. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **39**, 607. 1914 16.
77. NERNST, W. Ein osmotischer Versuch. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **6**, 37. 1890 4.
78. ——— Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmittel und zwischen Lösungsmittel und Dampfraum. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **8**, 110. 1891..... 4.
79. NETTER, H. Ueber die Permeabilitätseigenschaften der Nerven-hüllen. *Pfügers Arch.*, **215**, 373, 1927..... 35.
80. ——— Ueber den nichtlösenden Raum (sog. disperse Disperse Phase) und seine Bedeutung für zellphysiologische Probleme. Sammelref. *Das Protoplasma* **2**, 554. 1927..... 35.
81. NIEUWENBURG, VAN en DE GROOT. *Chem. Weekbl.* **24**, (1) 1927....56.
82. NIRENSTEIN, E. Ueber das Wesen der Vitalfärbung. *Pflügers Arch.*, **179**, 233. 1920..... 21.
83. OSTERHOUT, W. J. V. On the penetration of inorganic salts into living protoplasm. *Zeitschr. f. physik. Chemie* **70**, 408. 1910.... 7.
84. ——— The Permeability of Protoplasm to ions and the Theory of Antagonism. *Science N. S.* **35**, 112. 1912..... 19.
85. ——— Stetige Aenderungen in den Formen von Antagonismuskurven. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **54**, 645. 1914.....19.
86. OSTWALD, WILH. Electricische Eigenschaften halbdurchlässiger Scheidewände. *Zeitschr. f. physik. Chem.* **6**, 71. 1890..... 6.
87. OVERTON, E. Ueber die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Thierzelle. *Vierteljahrschr. d. Naturf. Ges. in Zürich* **40**, 159. 1895..... 3, 11.
88. ——— Ueber die osmotischen Eigenschaften der Zelle in ihrer Bedeutung für die Toxikologie und Pharmakologie. *Vierteljahrschr. d. Naturf. Ges. in Zürich* **40**, 383. 1897..... 3, 22, 52.
89. ——— Ueber die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermuthlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. *Vierteljahrschr. der Naturf. Ges. in Zürich* **44**, 88. 1899 3, 4.
90. ——— Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. *Jahrb. für wiss. Bot.* **34**, 669. 1900..... 3, 4, 20.

91. ——— *Studien über Narkose* Jena. 1901..... 3, 4.
92. ——— Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. *Pflügers Arch.* **92**, 115. 1902..... 3, 4, 13, 14, 34.
93. ——— *Nagels Handbuch der Physiologie des Menschen*. Bd. II, p. 810. 1907..... 4, 15.
94. PAINE, S. G. The permeability of the yeast cell. *Proc. Roy. Soc. London*, B. **84**, 289. 1911..... 17.
95. PANTANELLI, E. Ueber Ionenaufnahme. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **56**, (*Pfeffer Festschrift*) 689. 1915..... 48.
96. PASCHELES, W. Untersuchungen über den Quellvorgang. *Pflügers Arch.* **67**, 219. 1897..... 47.
97. PAULI, W. Die kolloidalen Zustandsänderungen vom Eiweiss und ihre physiologische Bedeutung. *Pflügers Archiv.* **136**, 483. 1910.. 50.
98. ——— en HANDOWSKY, H. *Biochem. Zeitschr.* **24**, 246. 1910.. 50.
99. PFEFFER, W. *Physiologische Untersuchungen*. Leipzig. 1873.... 2.
100. ——— *Osmotische Untersuchungen; Studien zur Zellmechanik*. Leipzig. 1876..... 2.
101. ——— Ueber Aufnahme von Anilinfarben in Lebende Zellen. *Unters. aus dem bot. Inst. zu Tübingen* **2**. 1886..... 7, 20.
102. ——— Zur Kenntniss der Plasmahaut und der Vacuolen. *Abh. Sächs. Ges. Wiss.* **16**, 178. 1890..... 6.
103. PORGES en NEUBAUER. Physikalisch-Chemische Untersuchungen über das Lecithin und Cholesterin. *Biochem. Zeitschr.* **7**, 152. 1907..... 49, 103.
104. PORT, J. Ueber die Wirkung der Neutralsalze auf das Durchdringen der OH'-ionen durch das Pflanzenplasma II. *Biochem. Zeitschr.* **170**, 377. 1926..... 53.
105. QUINCKE, G. Ueber periodische Ausbreitung an Flüssigkeitsoberflächen und dadurch hervorgerufenen Bewegungsercheinungen. *Wiedemanns Ann d. Phys.* **35**, 580. 1888..... 4.
106. RIESSER, O. Die Bestimmung der Ameisensäure in reinen Lösungen mit Hilfe eines neuen Kalomel-titrationsverfahrens. Die Bestimmung der Ameisensäure im Harn. *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **97**, 355, 1916..... 57.
107. ——— Eine neue titrimetrische Bestimmungsmethode der Ameisensäure. *Biochem. Zeitschr.* **142**, 280. 1923..... 57.
108. RUHLAND, W. Die Bedeutung der Kolloidnatur wässriger Farbstofflösungen für ihr Eindringen in die Zelle. *Ber. deut. bot. Ges.* **26a**, 772. 1908..... 20.
109. ——— Weitere Beiträge zur Kolloidchemie und physikalischen Chemie der Zelle. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **54**, 391. 1914..... 52.
110. ——— Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **51**, 376. 1912..... 20, 21.
111. ——— Die Plasmahaut als Ultrafilter bei der Kolloidaufnahme. *Ber. deut. bot. Ges.* **30**, 139. 1912..... 5, 21.
112. ——— en HOFFMANN, C. Die Permeabilität von *Beggiatoa mirabilis*. Ein Beitrag zur Ultrafiltertheorie des Protoplasmas. *Arch. f. wiss. Bot.* **1**, 1. 1924..... 5, 10, 22, 49.
113. RYSSELBERGHE, F. VAN. Reaction osmotique des cellules végétales à la concentration du milieu. *Mémoires couronnées Bruxelles*. LVIII. 1899..... 5, 16.
114. SÖHNGEN N. L. en WIERINGA, K. T. Permeabiliteitsbepalingen met

- Saccharomyces cerevisiae. *Versl. en Meded. v. d. Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam*..... 28.
115. ——— Id. id. *Nederl. Tijdschr. v. Hyg., Microb. en Serol.* 1. 88. 1926 28.
116. ——— Determinations of permeability with *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings* 29 (3)..... 28.
117. SPEK, J., Ernst Gellhorn. *Neuere Ergebnisse der Physiologie. Ref. Protoplasma* 1, 819..... 50.
118. STILES, W. The absorption of salts by storage tissues. *Ann. of Bot.* 38, 617. 1924..... 16.
119. ——— *Permeability*. London. 1924..... 6, 10, 18, 19.
120. ——— The exosmoses of dissolved substances from storage tissue into water. *Protoplasma* 2, 577. 1927..... 17.
121. ——— en JØRGENSEN. Studies in permeability IV. The action of various organic substances on the permeability of the plantcell, and its bearing on Czapek's theory of the plasma membranes. *Ann. of Bot.* 31, 47. 1917..... 16, 18.
122. ——— en JØRGENSEN, I. Studies in Permeability V. The swelling of plant tissue in water and its relation to temperature and various dissolved substances. *Ann of Bot.* 31, 415. 1917..... 7.
123. ——— en KIDD, F. The influence of external concentration on the position of equilibrium attained in the intake of salts by plant-cells. *Proc. Roy. Soc. London. B.* 90, 448. 1919..... 16, 18.
124. ——— ——— The comparative rate of absorption of various salts by plant tissue. *Proc. Roy. Soc. London* 90, 487. 1919. 7, 16, 18.
125. SWELLENGREBEL. Ueber Plasmolyse und Turgorregulation der Preszhefe. *Bacteriol. Centralbl. Orig.* 14, 374 en 481. 1905.... 26.
126. Szücs, J. Studien ueber Protoplasmapermeabilität. Ueber die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle und ihre Hemmung durch Electrolyte. *Sitzungsber. kais. Akad. Wiss. in Wien, Mat. — nat. Kl.* 119, Abt. 1737. 1910..... 59.
127. TAMMANN, G. Ueber die Permeabilität von Niederschlagsmembranen. *Zeitschr. f. physik. Chem.* 10, 255. 1892..... 4.
128. TEKELENBURG, F. *De afsterving van micro-organismen onder invloed van temperatuur, waterstof-ionen en ongedissocieerde zuren*. Proefschr. Utrecht. 1926..... 52.
129. TRAUBE, J. Theorie der Osmose und Narkose. *Pflügers Arch.* 105, 541. 1904..... 49.
130. ——— Die Oberflächendruck und seine Bedeutung im Organismus. *Pflügers Arch.* 105, 559. 1904..... 49.
131. ——— Die theorie des Haftdruckes (Oberflächendruckes) und die Resorptionsvorgänge besonders im Magen-darm-kanal. *Biochem. Zeitschr.* 24, 323. 1910..... 49.
132. ——— Lipoïdtheorie und Oberflächenaktivitätstheorie. *Biochem. Zeitschr.* 153, 358. 1924..... 49.
133. TRAUBE, M. Experimente zur Theorie der Zellbildung und Endosmose. *Arch. Anat. Physiol. u. wiss. Med.* 87 en 129. 1867..... 2.
134. TRÖNDLE, A. Permeabilitätsänderung und osmotischer Druck in den assimilierenden Zellen des Laubblattes. *Ber. deut. bot. Ges.* 27, 71. 1909 10, 48.
135. ——— Der Einfluss des lichtes auf die Permeabilität der Plasma-haut. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 48, 171. 1910..... 10, 48.

136. ——— Ueber die diosmotischen Eigenschaften der Pflanzenzelle. *Vierteljahrschr. d. Naturf. Ges. in Zürich* **61**, 465. 1916..... 48.
137. ——— Sur la permeabilité du protoplasma vivant pour quelques sels. *Arch. sci. phys. et nat. (4me Pér.)* **45**, 38. 117. 1918..... 48.
138. ——— Der Einfluss des Lichtes auf die Permeabilität der Plasmahaut und die Permeabilitätskoeffizienten. *Vierteljahrschr. der Naturf. Ges. in Zürich* **63**, 187. 1918..... 48.
139. ——— Neue Untersuchungen über die Aufnahme von Stoffen in die Zelle. *Biochem. Zeitschr.* **112**, 259. 1920..... 48, 59.
140. URSPRUNG, A. en BLUM, G. Dürfen wir die Ausdrücke Osmotischer Wert, osmotischer Druck, Turgordruk, Saugkraft synonym gebrauchen? *Biol. Zentrbl.* **40**, 193. 1920..... 6.
141. UTKIN—LJUBOWZOFF, L. Eine neue titrimetrische Bestimmungsmethode der Ameisensäure. *Biochemische Zeitschr.* **138**, 205. 1923 57.
142. VRIES, H. DE. Sur la permeabilité du protoplasme des betteraves rouges. *Arch. néerland.* **6**, 117. 1871..... 2.
143. ——— Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **14**, 427. 1884..... 3.
144. ——— Zur plasmolytischen Methodik. *Bot. Zeitschr.* **42**, 289. 1884..... 3.
145. ——— Ueber den Isotonischen Koeffizient des Glycerins. *Bot. Zeit.* **46**, 229. 1888..... 2.
146. ——— Ueber die Permeabilität der Protoplaste für Harnstoff. *Bot. Zeit.* **47**, 309 en 325. 1889..... 2.
147. WARBURG, O. en WIESEL. *Pflügers Arch.* **144**, 465. 1912..... 18.
148. WERTHEIMER, E. Weitere Studien ueber die Permeabilität lebender Membranen VI. *Pflügers Arch.* **203**, 542. 1924..... 52.
149. WODEHOUSE, R. P. Direct determinations of permeability. *Journ. biol. chem.* **29**, 453. 1917..... 2.

I N H O U D.

	Blz.
Inleiding	1

HOOFDSTUK I.

Historisch overzicht van de methoden der permeabiliteitsbepaling	9
A. Osmotische methoden.....	9
B. Chemische methoden der permeabiliteitsbepaling....	15
C. Physische methoden	18
D. Directe waarneming van veranderingen binnen de cel	20

HOOFDSTUK II.

De waterhuishouding van de cel	24
--------------------------------------	----

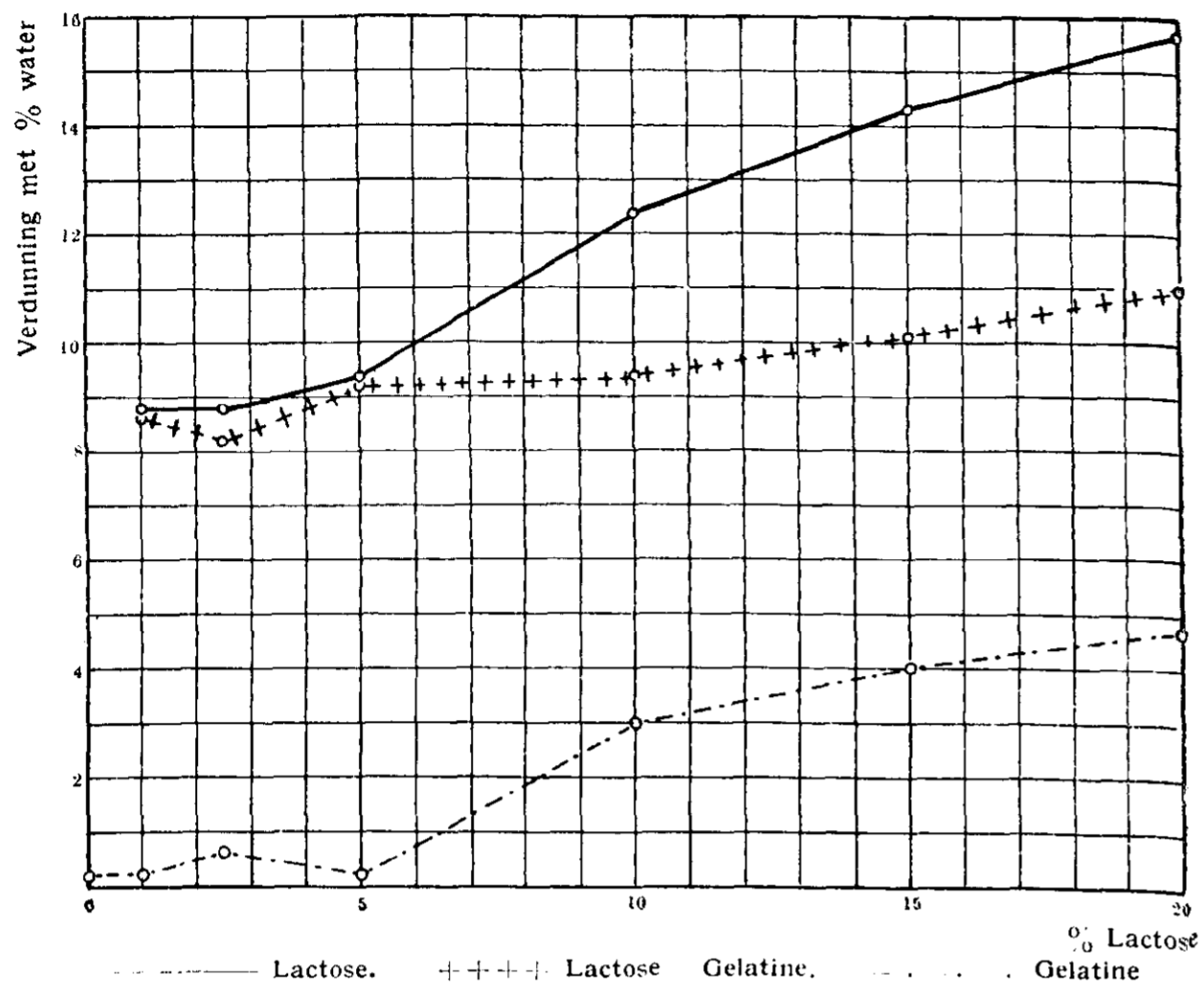
HOOFDSTUK III.

De bepaling der permeabiliteit	39
--------------------------------------	----

HOOFDSTUK IV.

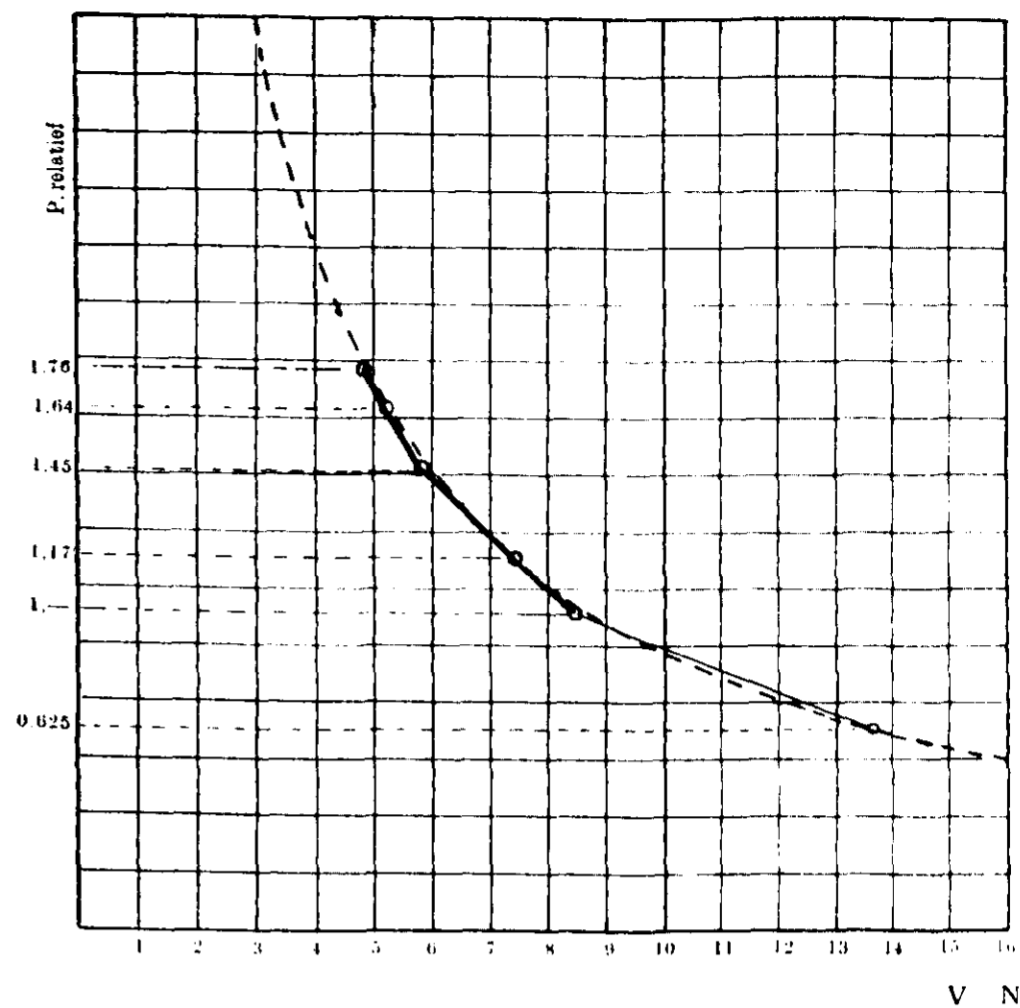
De snelheid der stofopname.....	58
Slotbeschouwingen	66
Overzicht der litteratuur.....	71

FIG. I



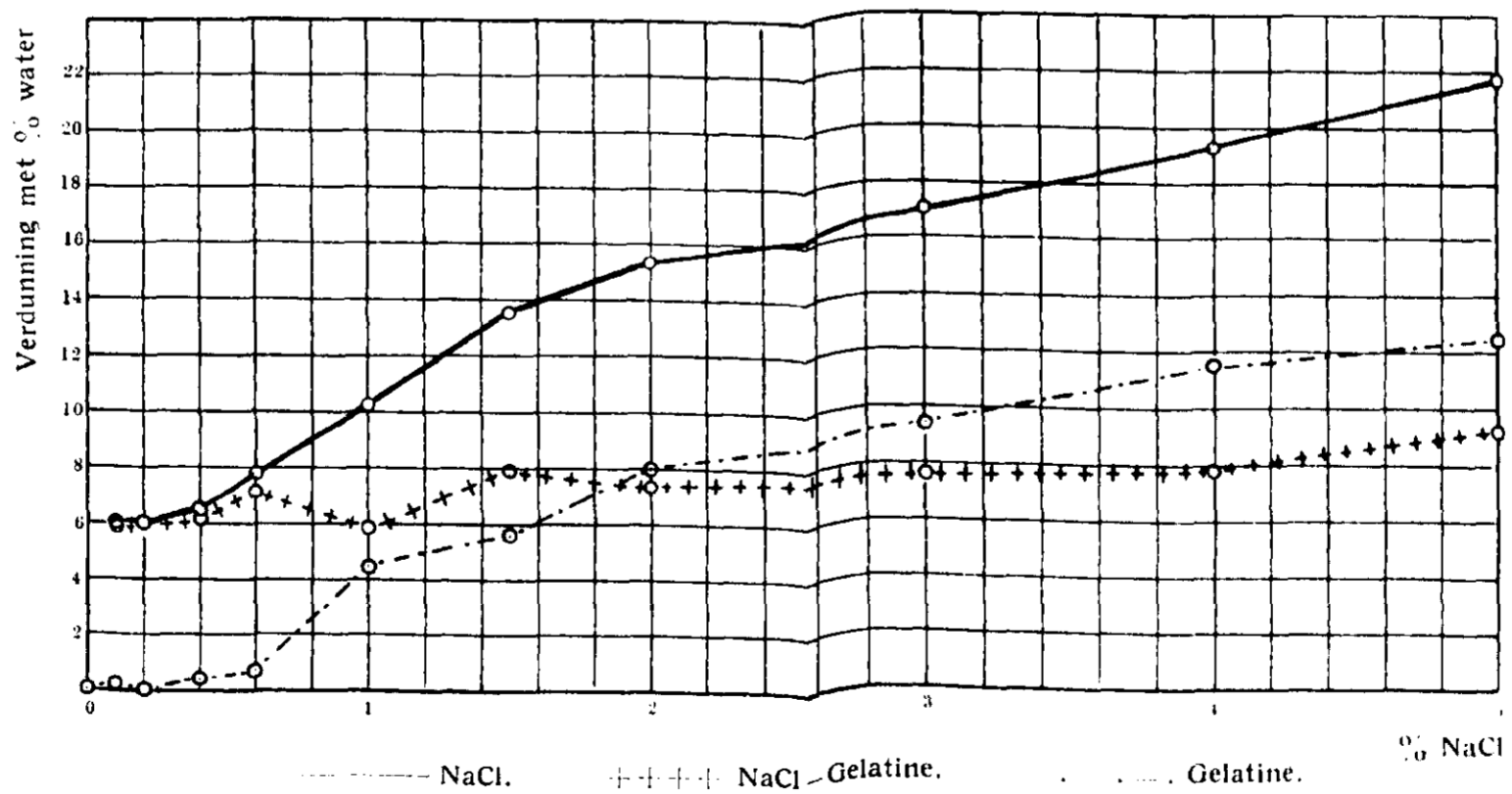
Verdunning der Lactose- en Gelatinetiters in lactose-oplossingen van verschillende concentraties.

FIG. III



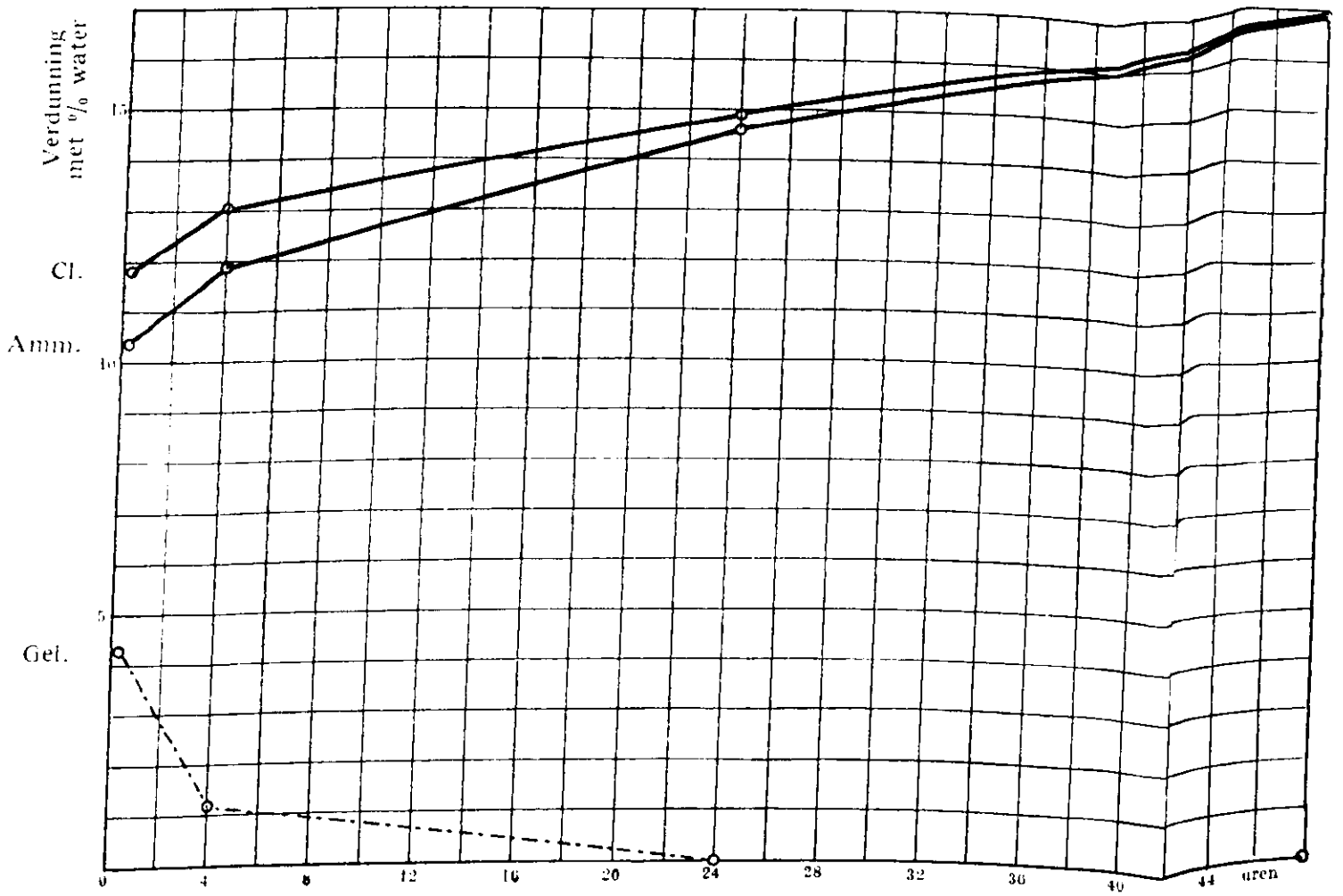
Verband tusschen Volume van het vrije Celvocht (V - N) en de osmotische Druk (P. rel.) der NaCl-oplossing.

FIG. II



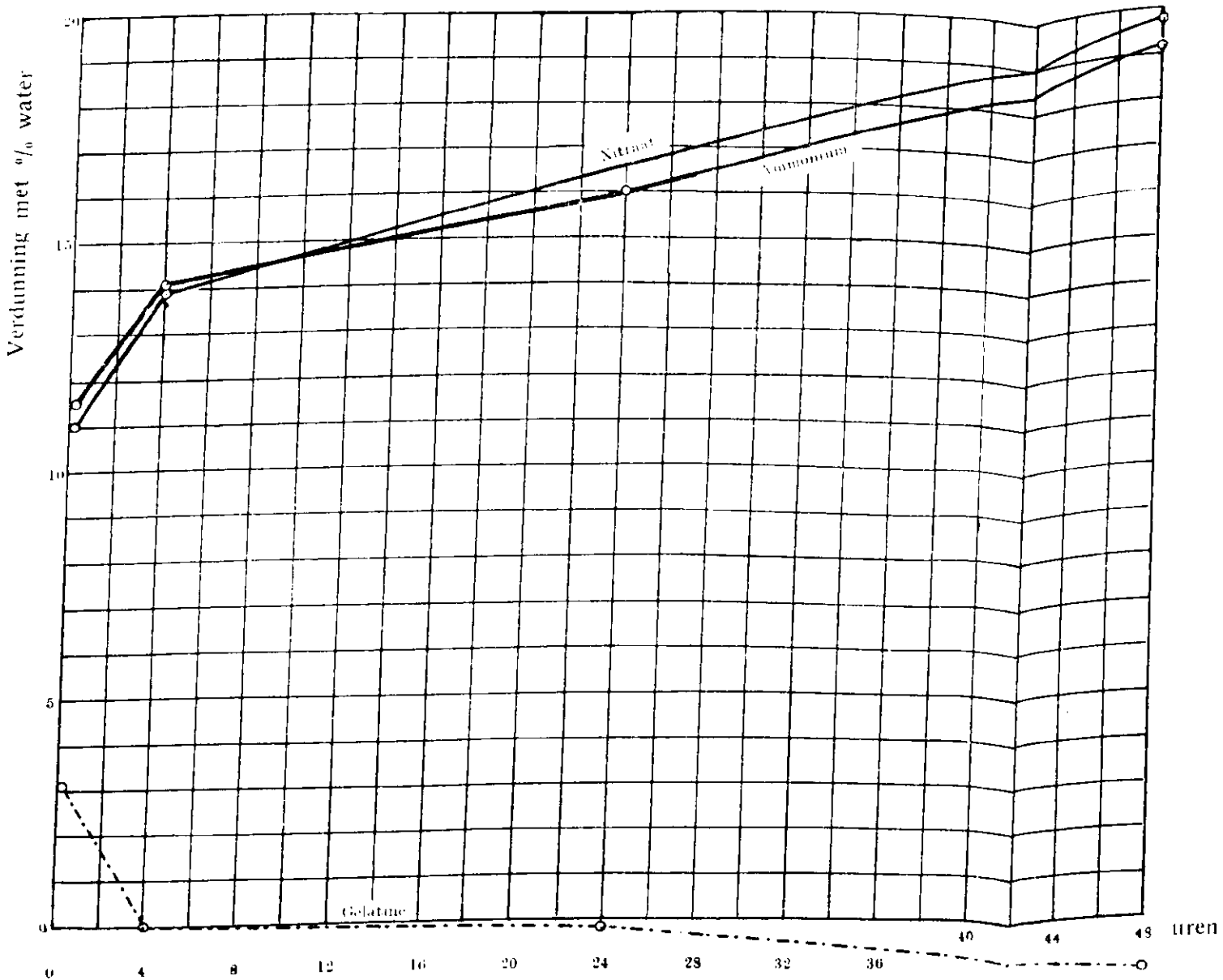
Verdunning der Cl- en Gelatinetiters in NaCl-oplossingen van verschillende concentraties.

FIG. IV

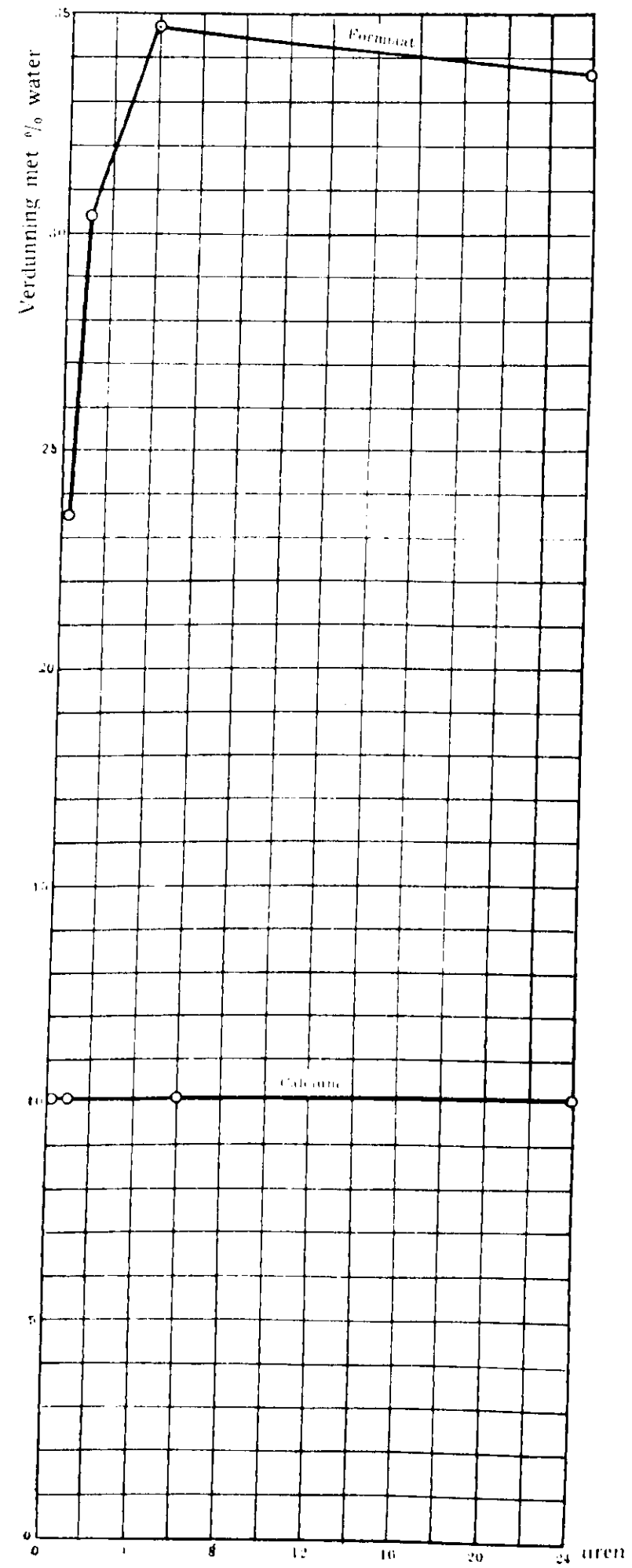


Opname van Ammonium en van Chloride uit Ammonium chloride.

FIG. V

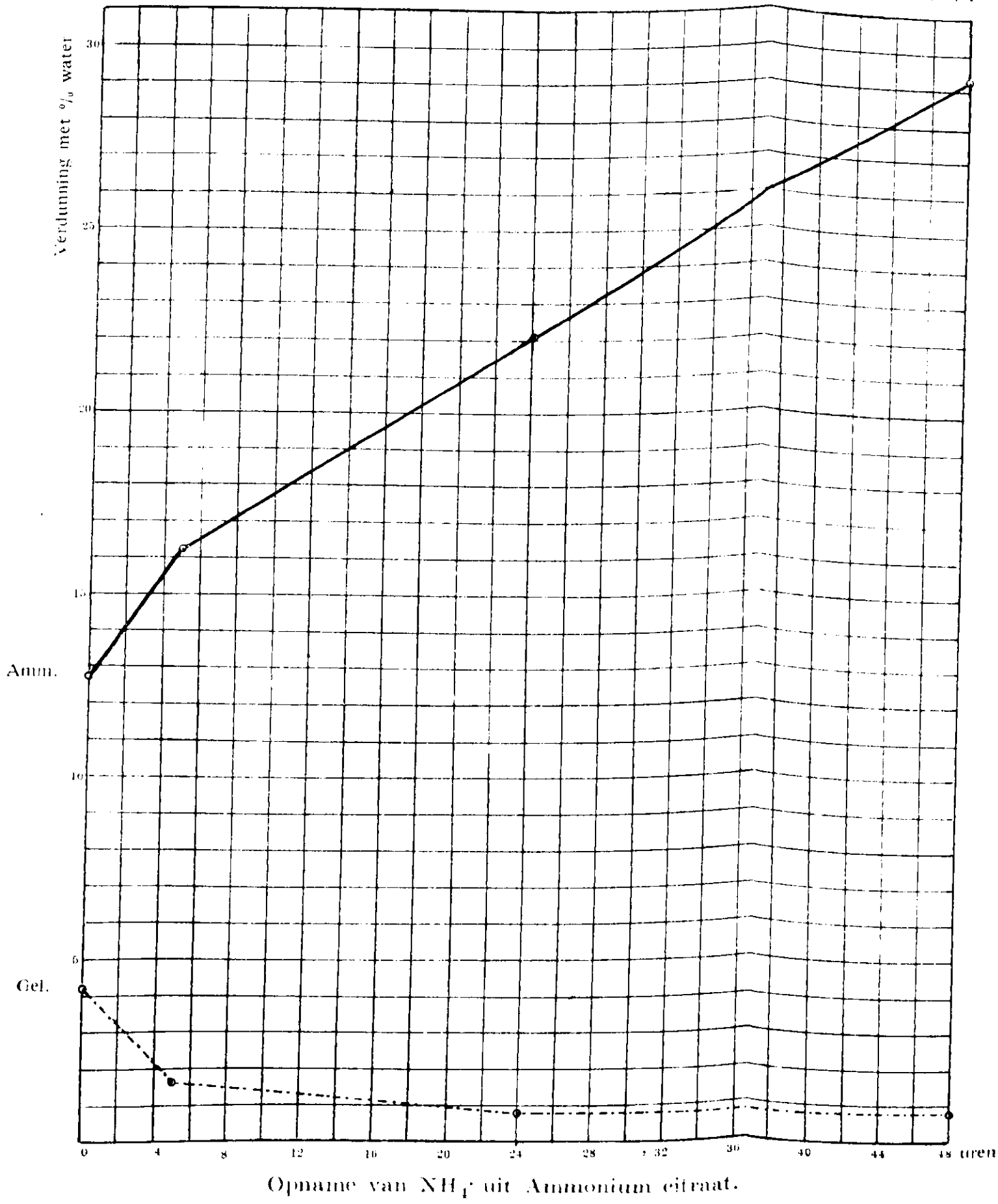


Opname van Ammonium en Nitraat uit Ammonium nitraat.

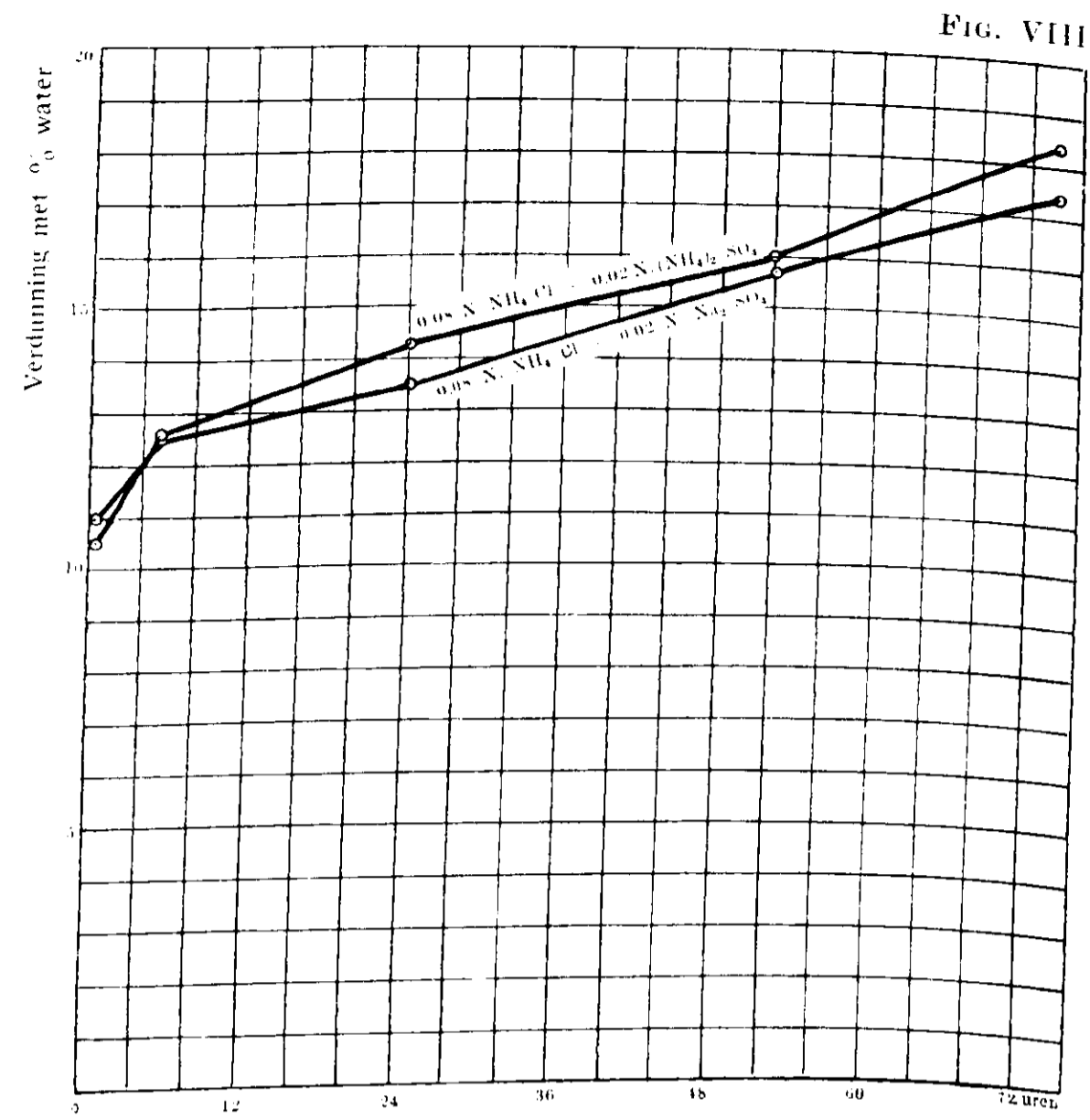


Opname van Ca en mierenzuur uit Calcium formiaat.

FIG. VI

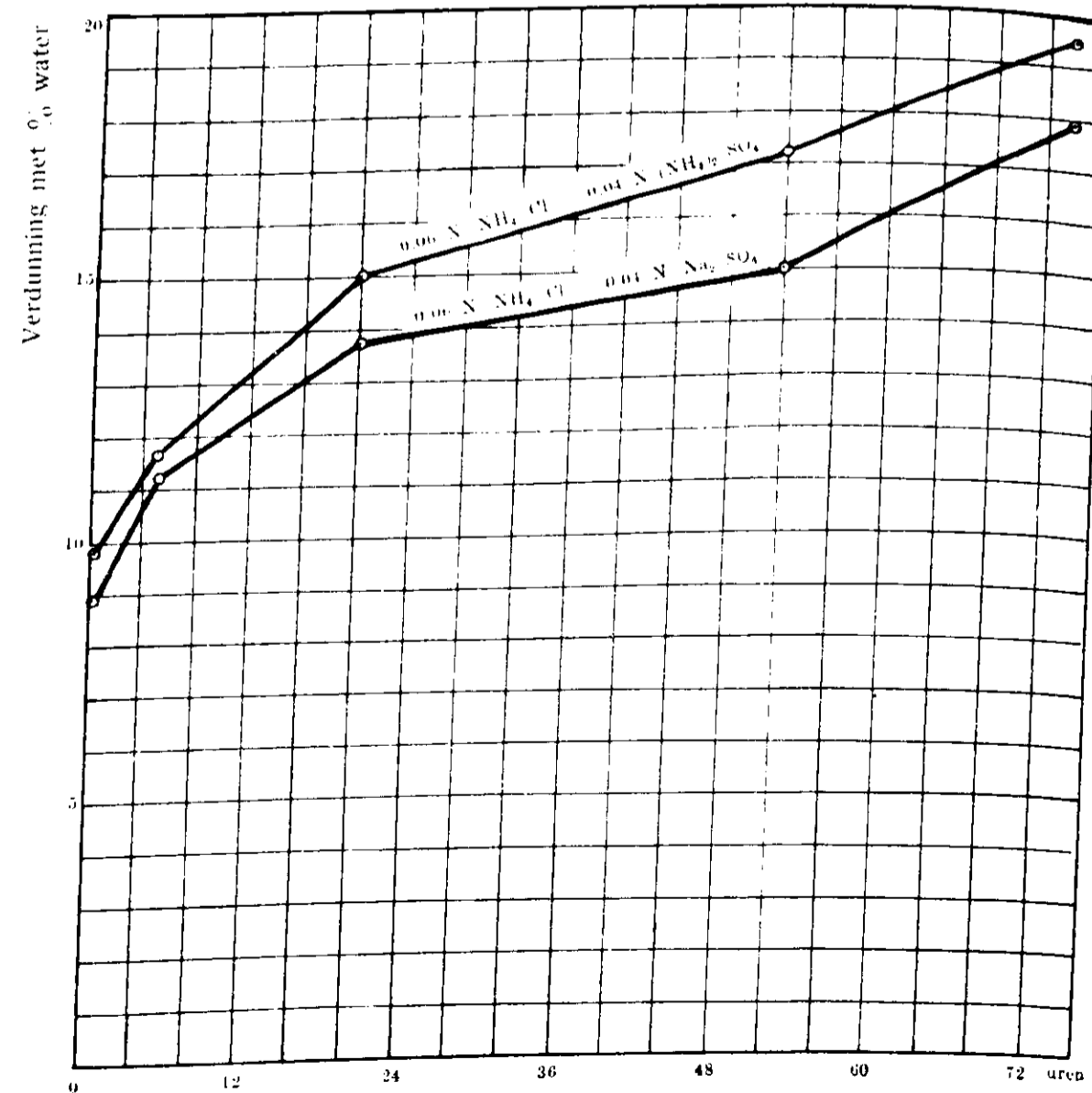


Opname van NH₄ uit Ammonium citraat.

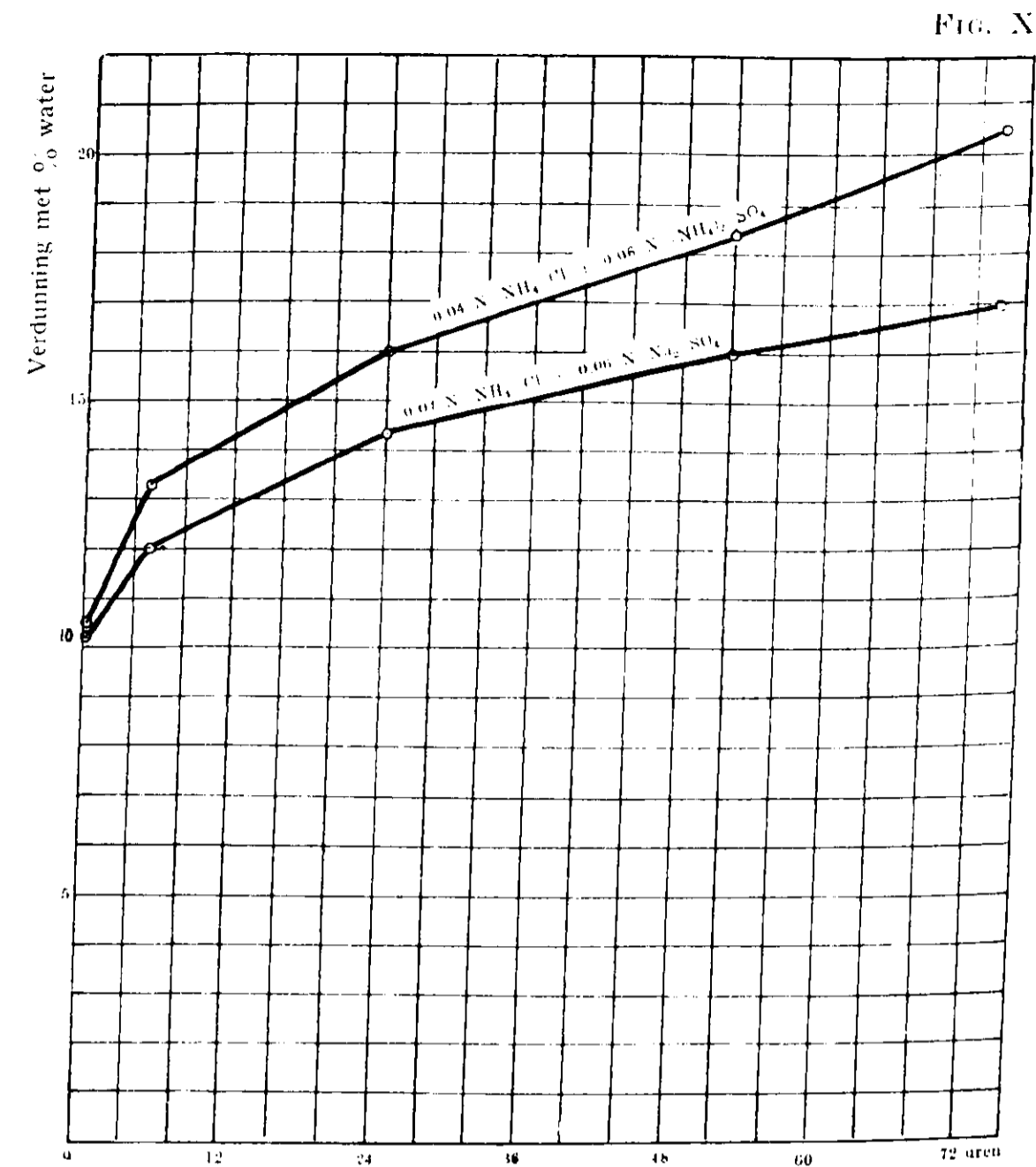


Invloed van Ammonium sulfaat en van Natrium sulfaat op de opname van Cl' uit Ammonium chloride.

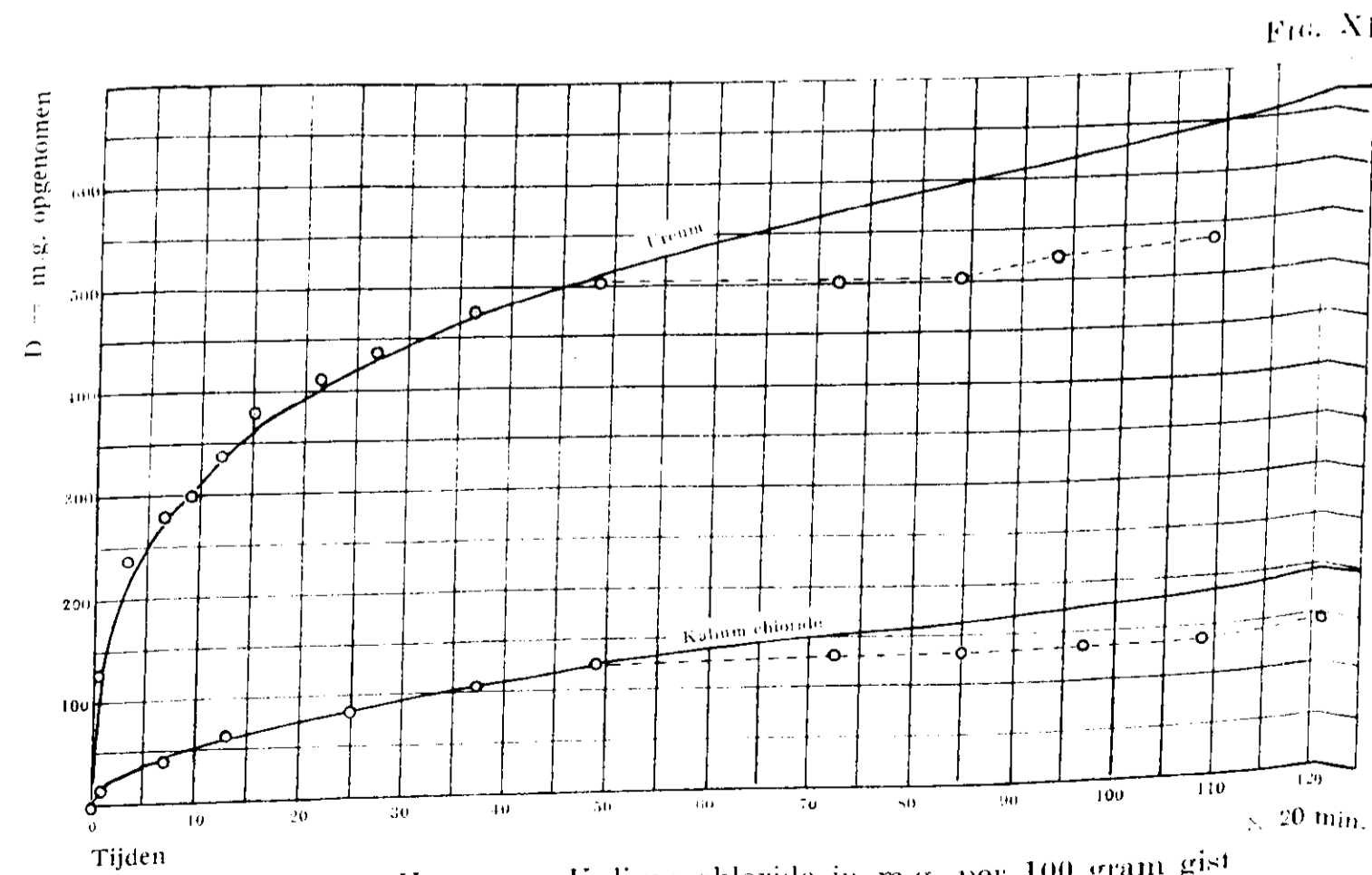
Fig. IX



Invloed van Ammonium sulfaat en van Natrium sulfaat op de opname van Cl' uit Ammonium chloride.



Invloed van Ammonium sulfaat en van Natrium sulfaat op de opname van Cl' uit Ammonium chloride.



Opname van Ureum en Kalium chloride in m.g. per 100 gram gist na verschillende tijden.

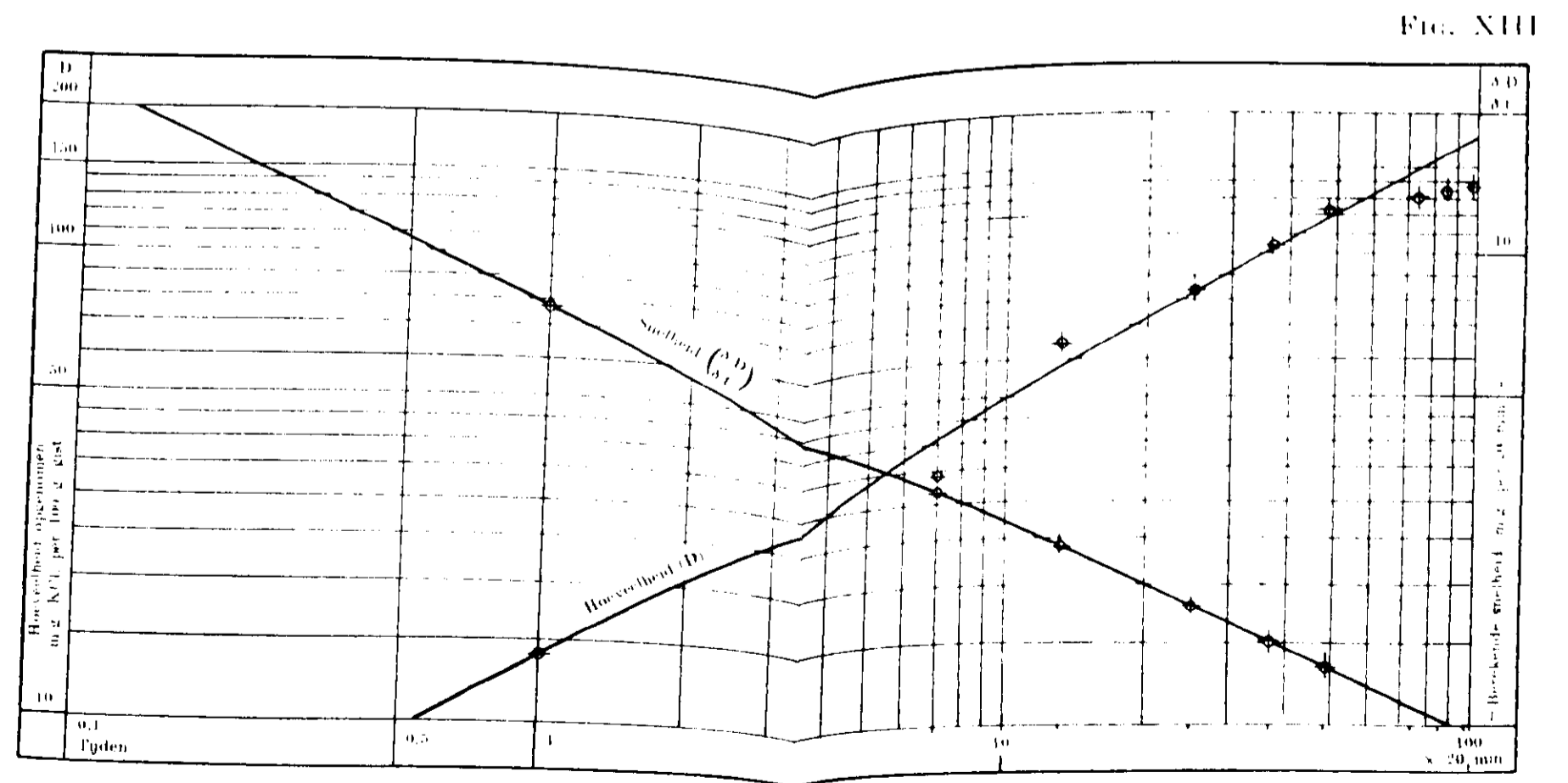
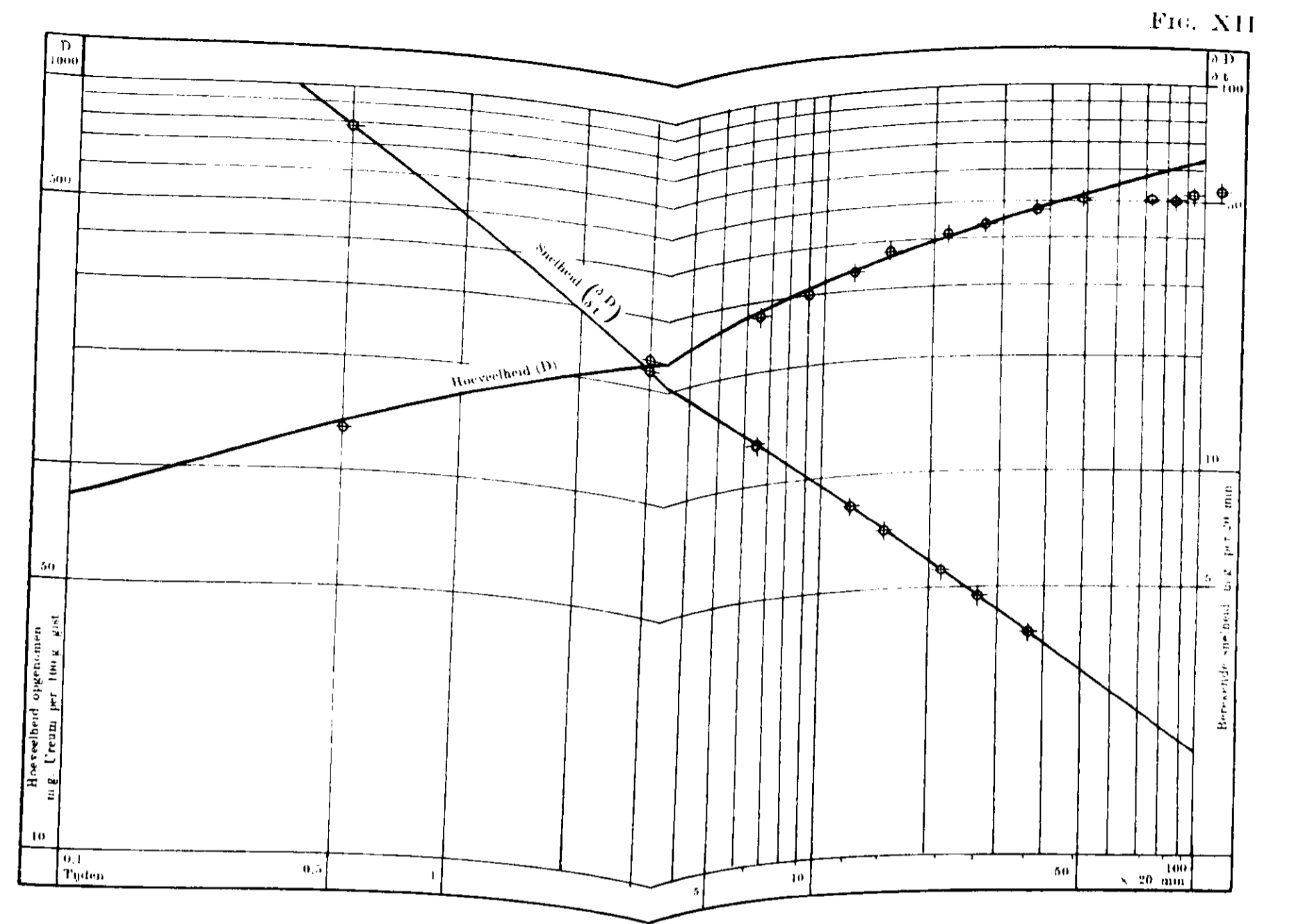
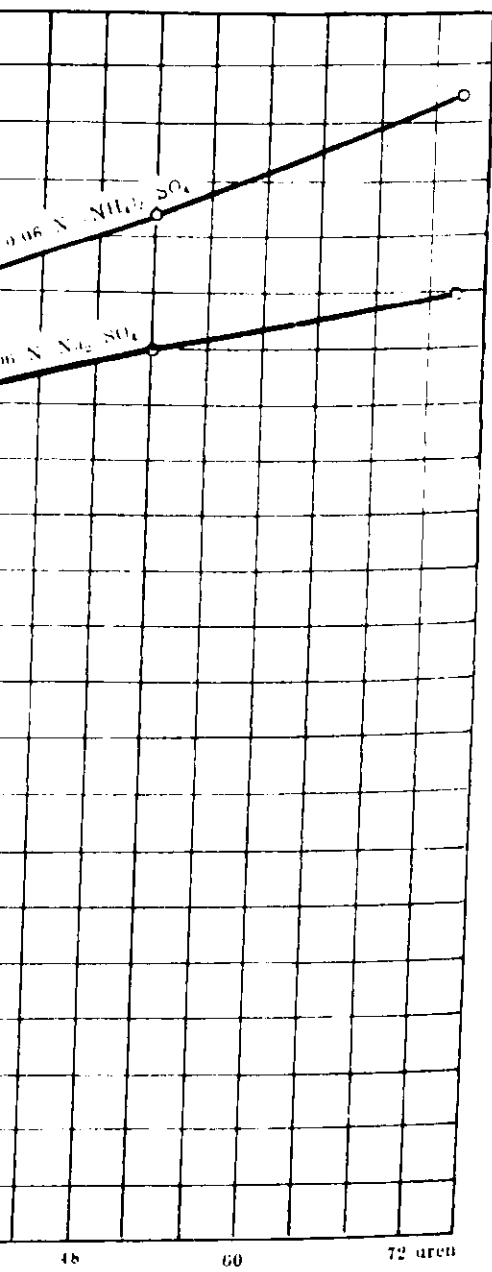
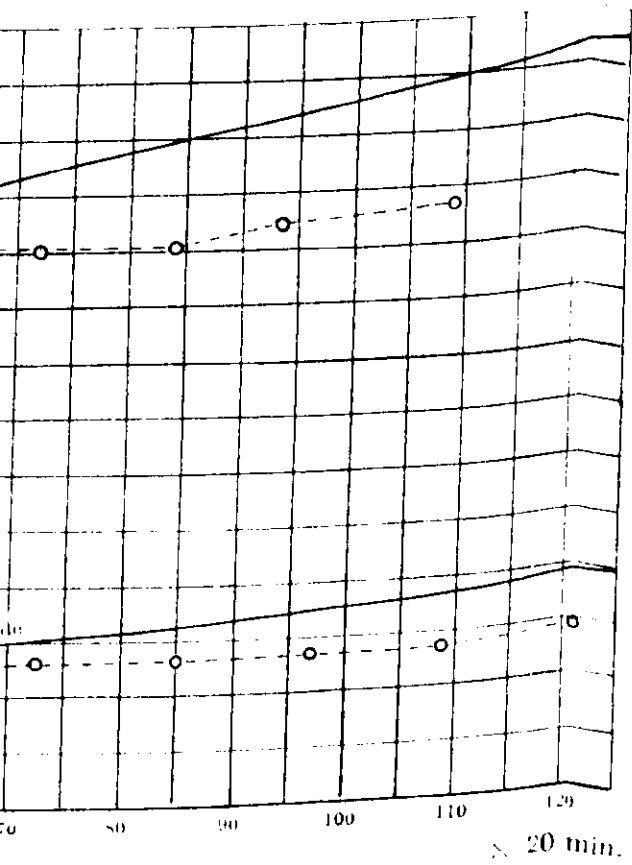


FIG. X



van Natrium sulfaat op de ammonium chloride.

FIG. XI



in m.g. per 100 gram gist
 20 min.

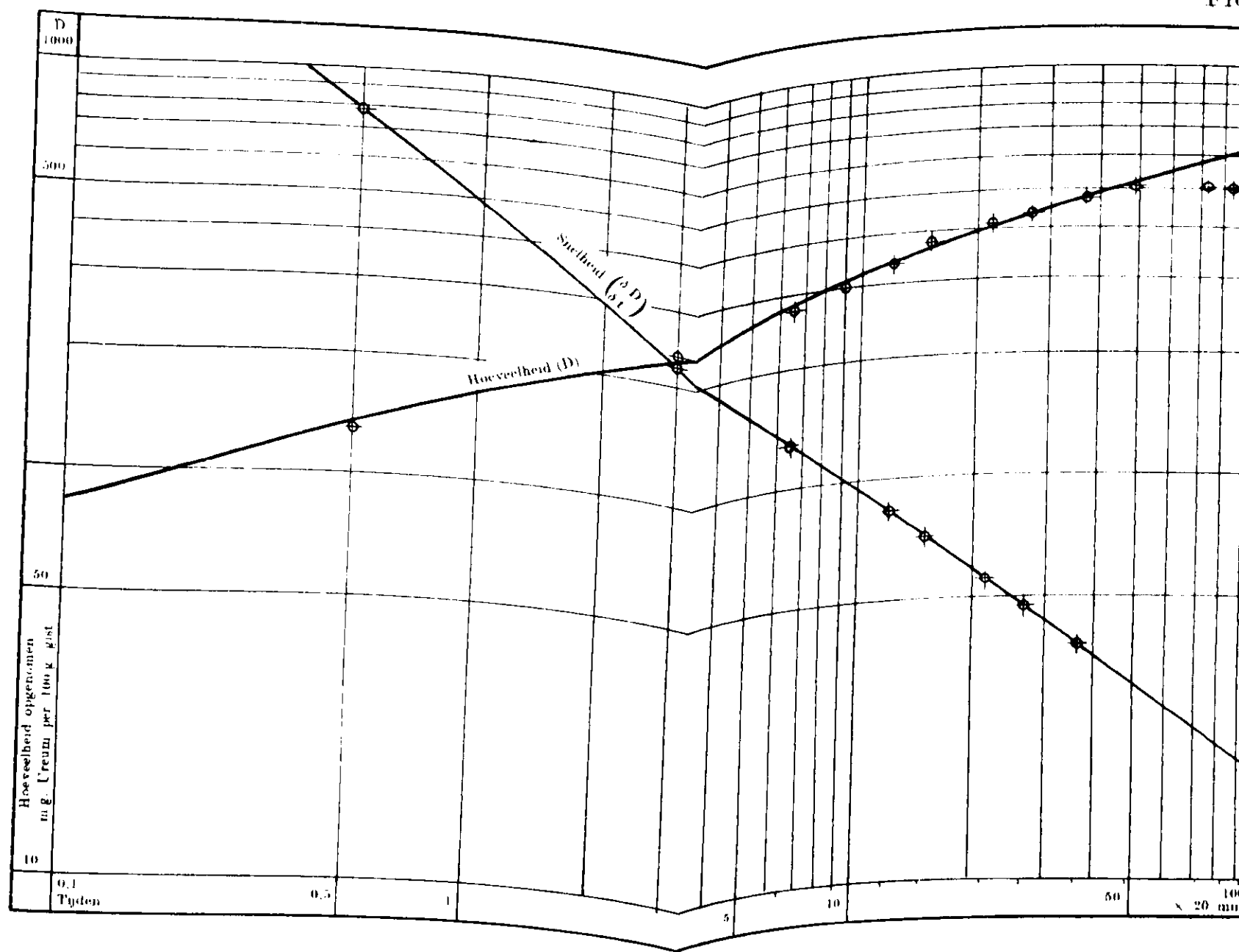


FIG.

