

(Aus der zoologischen Station in Neapel.)

Notizen zur Entwicklungsphysiologie des Seeigeleies.

Von

Otto Warburg.

(Mitglied des Kaiser-Wilhelm-Instituts für Biologie.)

(Mit 1 Textfigur.)

Im Lauf des verflossenen Winters wurden einige Versuche wiederholt, die vor 6 Jahren¹⁾ mit den Geschlechtszellen von Seeigeln angestellt worden waren. Dabei konnten, durch Anwendung neuer Methoden, einige Fragestellungen befriedigender als früher beantwortet werden. So liess sich der „respiratorische Quotient“ mit einiger Genauigkeit berechnen; die Spermata-
atmung wurde genauer bestimmt; vor allem aber wurde die Änderung der Eiatmung in den ersten 24 Stunden der Entwicklung messend verfolgt.

Eine kurze Beschreibung der Versuche, die alle mit den Geschlechtsprodukten von *Strongylocentrotus lividus* angestellt wurden, sei im folgenden gegeben.

I. Die Atmungsgrösse der Spermatozoen.

Die Hoden von einem Tier wurden sauber präpariert in ein Glasschälchen gebracht. Nach etwa 10 Minuten, wenn eine genügende Menge Samen ausgeflossen war, wurden je 0,5 ccm in zwei Atmungsgläschen pipettiert, in das eine 0,5 ccm Seewasser, in das andere 1,5 ccm Seewasser gegeben, so dass das Sperma im ersten Glas mit 1 Vol., im zweiten Glas mit 3 Vol. Seewasser verdünnt

1) O. Warburg, Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 57 S. 1. 1908.

war. Dann wurde der Sauerstoffverbrauch nach der manometrischen Methode¹⁾ gemessen. Folgende Zahlen wurden beispielsweise erhalten:

		Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimetern (0,760 mm) bei 23° C.	
		Verdünnung 0,5:1	Verdünnung 0,5:2
Nach 20 Minuten	. .	20	19
„ 40 „	. .	37	35
„ 60 „	. .	53	49

Die Verdünnung mit Seewasser, ob 0,5:1 oder 0,5:2, war also ohne wesentlichen Einfluss auf die Grösse der Atmung, die im Lauf einer Stunde langsam absank. — Der Berechnung der Oxydationsgrösse wurde der Sauerstoffverbrauch der ersten 20 Minuten zugrunde gelegt, in denen er fast konstant war; er wurde auf 20 mg Spermastickstoff bezogen: 0,5 ccm Sperma gaben 6,1 mg Stickstoff nach Kjeldahl. Diese 6,1 mg verbrauchten bei 23° in 20 Minuten 20 cmm Sauerstoff oder **20 mg N bei 23° in 20 Minuten: 66 cmm Sauerstoff (0,760 mm).**

Sehr ähnliche Werte für die Spermaatmung wurden in anderen Versuchen gefunden. Der Abfall der Oxydationsgeschwindigkeit im Laufe einer Stunde war in einigen Fällen grösser als in dem angeführten Beispiel; wie mir schien, immer dann, wenn das Sperma aus den Hoden verschiedener Männchen gemischt war (Isolysine?)

II. Die Atmungsgrösse unbefruchteter Eier.

Wie schon früher erwähnt²⁾, steigt die Atmung unbefruchteter Eier beim Lagern in Seewasser häufig spontan, wobei das Material befruchtungsunfähig wird. Die Eier müssen also möglichst frisch zum Versuch verwendet und stets durch Spermazusatz auf Befruchtungsfähigkeit geprüft werden. Auch sollte das Zeitintervall, über das die Atmung gemessen wird, nicht grösser als eine Stunde sein.

Hält man diese Bedingungen ein und misst die Atmung in Seewasser, so sind die Atmungsgrössen, bezogen auf gleiche Stickstoffmengen, recht regelmässig. **20 mg Ei-N verbrauchen bei 23° in 20 Minuten 10—14 cmm Sauerstoff (0,760 mm).**

Es ist mir wahrscheinlich, dass die Atmung der Eier im Ovarium, in der Ovarialflüssigkeit, bedeutend kleiner ist als in See-

1) Siebeck in Abderhalden's Biochem. Arbeitsmethoden.

2) Pflüger's Arch. Bd. 158 S. 189. 1914.

wasser; denn einerseits sind in einem reifen Ovarium die Bedingungen für die Sauerstoffversorgung der Eier sehr schlecht, andererseits ist nicht anzunehmen, dass sich die Eier im Ovarium unter Sauerstoffmangel befinden.

III. Der Anstieg der Atmungsgrösse im Lauf der Entwicklung.

Die Temperatur, bei der die Eier sich entwickelten, war ca 16°. Die Atmung wurde in passenden Interwallen, bei 23° gemessen.

Es ergab sich, dass nach der Befruchtung die Oxydationsgeschwindigkeit sehr schnell, im Lauf von weniger als 10 Minuten, auf etwa das 6fache ansteigt; dass sie weiterhin viel langsamer steigt, beispielsweise nach 6 Stunden etwa das 12fache, nach 12 Stunden etwa das 16fache, nach 24 Stunden etwa das 22fache der Oxydationsgeschwindigkeit der unbefruchteten Eier beträgt. (Siehe Fig. 1.)

Die Oxydationsgeschwindigkeit wächst also dauernd im Laufe von 24 Stunden; wir haben kein Maximum, keine s-förmige Kurve¹⁾ und keine „rhythmische“²⁾ Atmung.

Im ganzen wurden vier 24stündige Versuche angestellt und gut übereinstimmende Zahlen erhalten; war in dem Experiment, das Fig. 1 wiedergibt, nach 24 Stunden die Oxydationsgeschwindigkeit auf das 22fache gestiegen, so betrug sie in den drei anderen Experimenten nach 24 Stunden das 26-, 24- und 20fache.

Die Grösse der Atmungssteigerung — mehr als 2000% im Laufe von 24 Stunden, in einem Zellmaterial, dem von aussen keine Stoffe zugeführt werden — ist eine ganz ausserordentliche. —

Die Frage, ob eine Proportionalität zwischen Oxydationsgeschwindigkeit und Geschwindigkeit der sichtbaren Veränderungen, wie Vermehrung der Kernmasse, des Kernvolums usw., besteht, lässt sich heute nicht beantworten, weil die notwendigen morphologischen Daten für einen Vergleich fehlen oder doch so voneinander abweichen, dass man je nach Benutzung der einen oder andern die verschiedensten Beziehungen herausrechnen kann. Nur

1) Wie sie Buglia für die Entwicklung von *Aplysia* beobachtete.

2) Wie sie nach Lyon (*Sciences N. S. t.* 19. 1904) die Seeigelleier zeigen sollen.

so viel können wir sagen, dass mit der Zunahme der sichtbaren Struktur eine Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit verbunden ist.

Die Technik der Versuche war folgende: Eine Stammsuspension frischer, in Seewasser gewaschener unbefruchteter Eier, die in 10 ccm etwa 10 mg Stickstoff enthielt, befand sich in Eis. Zur Messung

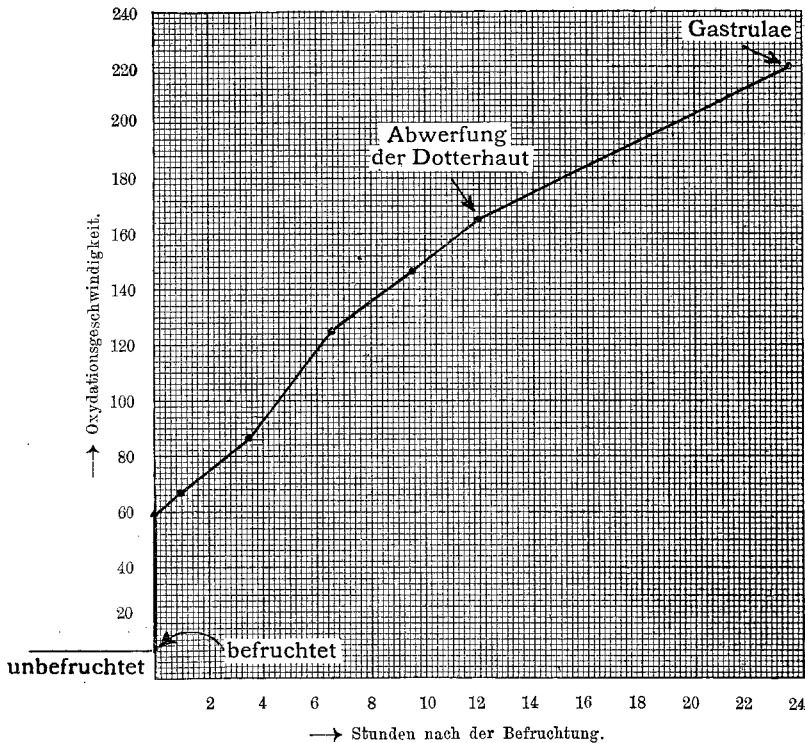


Fig. 1. Zunahme der Oxydationsgeschwindigkeit bei einer Entwicklungstemperatur von 16° C. (Oxydationsgeschwindigkeit = verbrauchte Kubikmillimeter Sauerstoff in 20 Minuten bei 23° , bezogen auf 20 mg Eistickstoff).

der Oxydationsgrösse der unbefruchteten Eier wurden 10 ccm herauspipettiert, die Eier durch Zentrifugieren auf 2,5 ccm gebracht, 2 ccm in ein Atmungsfläschchen eingefüllt und dann in der üblichen Weise mit dem Manometer verbunden. Nach einer Stunde wurde die Druckverminderung abgelesen und darauf der Inhalt des Fläschchens nach Kjeldahl verascht. — Zur Bestimmung des Anstiegs bei der Befruchtung wurden 10 ccm in ein Zentrifugierfläschchen

pipettiert, eine Spur Sperma zugegeben, gemischt und sofort auf ca. 2,5 ccm zusammenzentrifugiert. 2 ccm des Sediments wurden dann in ein Atmungsgläschen gefüllt, das samt Manometer so vorbereitet war, dass 10 Minuten nach der Befruchtung der Hahn geschlossen werden und die Messung beginnen konnte. Die Atmung wurde dann von 5 zu 5 Minuten beobachtet, wobei sich zeigte: erstens, dass sie sich innerhalb der ersten 20 Minuten merklich nicht änderte, und zweitens, dass sie, bezogen auf den später bestimmten N-Gehalt, von vornherein ca. sechsmal so gross war, wie die der unbefruchteten Eier. Der Oxydationsanstieg von 500% ist also 10 Minuten nach der Befruchtung schon da. Näher an den Augenblick der Befruchtung heranzukommen, ist mir bis jetzt aus verschiedenen Gründen nicht gelungen. — Zur Bestimmung des Atmungsanstiegs im Lauf der Entwicklung kamen je 10 ccm der Stammsuspension mit je 100 ccm Seewasser in flache, sich langsam bewegende Schalen. Von Zeit zu Zeit wurde das Wasser gewechselt, wobei Eiverluste nicht zu vermeiden waren; die Genauigkeit der Resultate wurde dadurch nicht beeinträchtigt, weil in jeder Probe nach der Atmungsmessung der Stickstoff bestimmt und alles auf gleiche Stickstoffmengen bezogen wurde. Der Inhalt der Schalen wurde nach den in der Figur markierten Zeiten durch Zentrifugieren auf 2,5 ccm gebracht, 2 ccm des Sediments in ein Atmungsgläschen pipettiert, innerhalb 20 Minuten der Sauerstoffverbrauch gemessen und schliesslich der Inhalt des Gläschens nach Kjeldahl verascht. Ein derartiger 24ständiger Versuch ist nicht gerade schwierig, aber recht mühsam. Damit sich keine Bakterien in den Kulturen entwickeln, muss das Seewasser zeitweise erneuert werden. Damit der Versuch brauchbar ist, muss die Kultur besser sein, als es für irgendwelche morphologischen Untersuchungen nötig ist. Praktisch alle Eier müssen befruchtet sein; sie müssen gleichzeitig befruchtet sein, und sie müssen sich alle gleichzeitig entwickeln. Bleibt ein nennenswerter Bruchteil der Eier in der Entwicklung stehen, entwickeln sich nicht praktisch alle Eier zu schwimmenden Blastulae und Gastrulae, so ist der Versuch unbrauchbar. — In den vier Versuchen, über die oben berichtet wurde, war diesen Bedingungen Genüge getan.

IV. Der respiratorische Quotient.

Wenn Zucker unter Sauerstoffaufnahme zu Kohlensäure und Wasser verbrennt, so erscheint an Stelle eines Moleküls verschwundenen Sauerstoffs ein Molekül Kohlensäure. Verbrennt dagegen Eiweiss oder Fett, so erscheint auf ein Molekül verschwundenen Sauerstoffs nicht ein Molekül Kohlensäure, sondern weniger. Der „respiratorische Quotient“

$$\frac{\text{Molzahl der produzierten Kohlensäure}}{\text{Molzahl des verschwundenen Sauerstoffs}}$$

ist für die Verbrennung der in Zellen verbreitetsten Brennstoffe 0,7—1,0.

Für die Atmung des befruchteten Eies ergab sich, dass der respiratorische Quotient ca. 0,9 ist, ein Wert, der mit einer Genauigkeit von etwa 5% gemessen werden konnte und der innerhalb des Bereichs der bei vollständiger Verbrennung zu erwartenden Quotienten liegt. Jedenfalls die Hauptmenge des veratmeten Sauerstoffs also geht im Molekül der Kohlensäure und des Wassers wieder aus dem Ei heraus. Durch die Reaktionen, in die der Sauerstoff eingeht, gewinnt die Eimaschine Arbeit, nicht aber eine sauerstoffreichere Zusammensetzung.

Was die Bestimmung des Quotienten anbetrifft, so wurden Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureproduktion gleichzeitig, in einer Probe, nach dem vor kurzem angegebenen Verfahren bestimmt¹⁾. Folgende Werte wurden beispielsweise erhalten. [Die Eier waren, wie stets für CO₂-Bestimmungen, nicht in Seewasser, sondern in einer praktisch bikarbonatfreien Salzlösung suspendiert²⁾.]

1. Sauerstoff: 2 ccm einer Suspension befruchteter Eier verbrauchten bei 23° C. in 180 Minuten 300 cmm Sauerstoff (0,760 mm).
2. Präformierte Kohlensäure: 2 ccm derselben Suspension gaben bei direktem Ansäuern mit Phosphorsäure 46 cmm CO₂ (0,760 mm).

1) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 92 S. 231. 1914.

2) Vgl. Pflüger's Arch. Bd. 158 S. 189. 1914.

3. Präformierte + neugebildete Kohlensäure: 2 ccm derselben Suspension gaben nach 180 Minuten langer Atmung bei 23° C. und darauffolgendem Ansäuern 318 cmm CO₂ (0,760 ccm).

Es waren also verbraucht nach 180 Minuten bei 23° C. 300 cmm Sauerstoff und nach der gleichen Zeit neugebildet 272 cmm Kohlensäure. Quotient $\frac{272}{300} = 0,9$.

V. Vergleich der Atmungsgrößen von Ei- und Samenzelle.

Vergleicht man die in Abschnitt I angegebene Atmungsgröße des Spermas mit der Atmungsgröße der Eier in ihren verschiedenen Stadien, so findet man, dass Sperma und frisch befruchtete Eier etwa gleich stark atmen, wenn man die Atmung auf gleiche Stickstoffmengen bezieht (20 mg N, Sperma-N oder Ei-N, verbrauchen bei 23° C. in 20 Minuten ca. 60 cmm Sauerstoff). Annähernd heisst das, dass gleiche Substanzmengen von Sperma und von frisch befruchteten Eiern gleich stark atmen. Da die Samenzelle sehr viel kleiner ist als die Eizelle, so haben wir hier zwei Zellen derselben Tierart, in deren Substanz unter gleichen Milieu- und Temperaturverhältnissen, trotz enorm verschiedener Entwicklung der Zelloberfläche, die gleiche Stoffwechselintensität herrscht. Wie gross der Unterschied der Oberflächenentwicklung in gleichen Substanzmengen von Ei- und Samenzelle zu schätzen ist, könnten wir berechnen, wenn wir die relative Zellenzahl von Sperma- und Eizelle in einer bestimmten Substanzmenge kennen würden.

Noch von einem anderen Gesichtspunkt aus ist die Kenntnis dieser Relation wichtig. Bei der Messung des bei der Befruchtung einsetzenden Atmungsanstiegs wurde die Atmung der zugefügten Spermatozoen selbst vernachlässigt und angenommen, dass weder die Atmung des in das Ei eingedrungenen Spermakopfes noch die Atmung überschüssiger, am Ei haftender Spermatozoen gegenüber der Eiatmung in Betracht käme. Zu dieser Annahme berechtigte ein früher¹⁾ vorgenommener Versuch, in dem einerseits die Atmung beider Zell-

1) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 57 S. 1. 1908.

an gemessen, andererseits ihre Zahl durch Auszählung bestimmt werden war. Damals ergab sich für den Quotienten

$$\frac{\text{Atmung eines Spermatozoons}}{\text{Atmung eines unbefruchteten Eies}} \text{ die Zahl } \frac{1}{500}$$

oder für den Quotienten

$$\frac{\text{Atmung eines Spermatozoons}}{\text{Atmung eines befruchteten Eies}} \text{ die Zahl } \frac{1}{3500}$$

Da die Auszählung, besonders der Spermatozoen, methodisch etwas bedenklich ist, so habe ich zur Bestimmung der gesuchten Beziehung einen anderen Weg eingeschlagen.

Von einer Spermasuspension in Seewasser (Sperma ganz frisch, von einem Männchen) wurden stufenweise Verdünnungen in Seewasser hergestellt und von diesen je 10 ccm zu gleichen Mengen unbefruchteter, in lebhafter Bewegung gehaltener Eier zugetropft. Es wurde dann beobachtet, welche Spermaverdünnung zur Befruchtung gerade ausreichte. Die Stickstoffgehalte der Spermaverdünnungen und der zu befruchtenden Eimengen waren bekannt, und so konnte berechnet werden, wieviel Spermastickstoff gerade ausreicht, um eine bestimmte Menge Eistickstoff zu befruchten. Es ergab sich dabei, dass mit 0,004—0,005 mg Spermastickstoff 7—8 mg Eistickstoff befruchtet werden konnte. Um eine Eimenge = 1 mg N zu befruchten, reicht also eine Spermamenge = $\frac{1}{1500}$ bis $\frac{1}{2000}$ mg N aus. Da nun, wie wir oben sahen, die Atmung von Spermazellen und frisch befruchteten Eizellen, bezogen auf gleiche N-Mengen, gleich ist, so folgt, dass die zur Befruchtung einer bestimmten Eimenge nötige Spermamenge 1500 bis 2000 mal so schwach atmet wie die befruchtete Eimenge, dass also die Spermaatmung in die Messungen der Eiatmung nicht einmal als Korrektionsglied eingeht¹⁾.

Die Daten, auf denen unsere Rechnung beruht, sind N-Bestimmungen, und das Resultat der Rechnung ist so sicher und genau wie eine N-Bestimmung nach Kjeldahl. Anders steht es mit dem Verhältnis der in gleichen Stickstoffmengen vorhandenen Zellenzahlen.

1) Natürlich vorausgesetzt, dass man zur Befruchtung nicht einen enormen Überschuss an Sperma nimmt.

Wenn es gelänge, die Befruchtung so zu leiten, dass jedes zugegebene Spermatozoon ein Ei befruchtete, so könnten wir aus unseren Daten, mit der Sicherheit der Kjeldahl-Bestimmung, die relativen Zellenzahlen berechnen. Hier stossen wir jedoch auf die Schwierigkeit dass man stets einen Überschuss an Spermatozoen zur Befruchtung braucht, auch wenn man noch so vorsichtig — unter Schütteln und mit ganz verdünntem Sperma — befruchtet. Unsere Zahlen geben uns also bezüglich der Zellenzahl nur eine Grenze, diese aber mit der Sicherheit der Kjeldahl-Bestimmung. Der N-Gehalt eines Spermatozoons ist mindestens 1500 bis 2000 mal so klein als der N-Gehalt einer Eizelle; ein Spermatozoon atmet mindestens 1500 bis 2000 mal so schwach wie eine eben befruchtete Eizelle.
