

Über die Oxydationen im Ei.

II. Mitteilung.

Von

Otto Warburg.

(Aus der zoologischen Station zu Neapel.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. Mai 1909.)

Jacques Loeb hat gefunden, daß man das unbefruchtete Ei des Seeigels dadurch zur Entwicklung veranlassen kann, daß man es einige Zeit in einer hypertonen Lösung hält und dann in Seewasser zurückbringt.¹⁾ In der hypertonen Lösung selbst fürchtet sich das Ei nicht. Es ist die Frage, was in der hypertonen Lösung mit dem Ei vor sich geht.

Wenn man aus der hypertonen Lösung den Sauerstoff austreibt oder der sauerstoffhaltigen Lösung Cyankali zufügt, so ist sie wirkungslos.¹⁾ Daraus schloß Loeb, daß durch die hypertone Lösung Oxydationsprozesse beschleunigt werden.

Ich habe voriges Jahr²⁾ gezeigt, daß man den Stoffwechsel des Seeigels recht genau messen kann. In der Tat wird nun in hypertonen Lösungen³⁾ viel mehr Sauerstoff verbraucht als in Seewasser, z. B. das zehnfache.

Auch nach der Befruchtung steigt der Sauerstoffverbrauch, etwa auf das sechs- bis siebenfache.²⁾ Ich habe dieses Jahr einige Versuche angestellt über die Beziehungen, die zwischen den Oxydationen nach der Befruchtung und denen in der hypertonen Lösung bestehen.

¹⁾ Jacques Loeb, Untersuchungen über die künstliche Parthenogenese, Leipzig 1906.

²⁾ Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigels, Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 1.

³⁾ In denen, wie nochmals hervorgehoben sei, das Ei sich nicht fürchtet.

I.

Im allgemeinen gelingt es durchaus nicht, die Verbrennungen in der lebendigen Substanz in dem Maße zu beeinflussen, wie es für die hypertonische Lösung nachgewiesen worden ist. Nun werden im Ei durch einen physiologischen Vorgang, die Befruchtung, die Verbrennungen in ähnlichem Umfang beeinflusst, wie durch die hypertonische Lösung. Es lag sehr nahe, beide Erscheinungen auf die gleiche Ursache zurückzuführen, etwa dergestalt, daß sowohl Befruchtung als auch hypertonische Lösung eine Hemmung beseitigen würden. Das Ei wäre dann einer arretierten Maschine vergleichbar, deren Arretierung leicht beseitigt werden könnte.

Offenbar trifft diese Vorstellung nicht zu, **denn auch in einem befruchteten Ei steigern hypertonische Lösungen¹⁾ die Verbrennungen.** (Versuche D I bis V.)

Die quantitativen Verhältnisse sind bemerkenswert. Setzen wir den Sauerstoffverbrauch der unbefruchteten Eier in Seewasser gleich eins, dann ist er für die befruchteten (einige Zeit nach der Befruchtung) in Seewasser sechs bis sieben,²⁾ für die unbefruchteten in der hypertonischen Lösung II etwa gleich vier bis fünf,²⁾ für die befruchteten in der hypertonischen Lösung (einige Zeit nach der Befruchtung) etwa gleich 20. (D III a) u. b), IV, V.)

Die Oxydationen in der hypertonischen Lösung haben also eine Beziehung zu den Oxydationen, die in Seewasser ablaufen. Und zwar ist der Sauerstoffverbrauch der befruchteten Eier in der hypertonischen Lösung nicht gleich dem der befruchteten Eier in Seewasser + dem der unbefruchteten Eier in der hypertonischen Lösung, sondern viel größer.

Auch diese Versuchsanordnung stammt von Jacques Loeb.³⁾ Er kombinierte die Methoden der natürlichen und künstlichen Entwicklungserregung, konnte jedoch nie eine schnellere,

¹⁾ Die hier in Betracht kommenden hypertonischen Lösungen verhindern sowohl Zell- als auch Kernteilung vollständig.

²⁾ Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigeelei. loc. cit., und diese Arbeit, experiment. Teil.

³⁾ Archiv f. Entwicklungsmechanik der Organismen, Bd. XXIII, S. 479.

sondern eher eine langsamere Entwicklung konstatieren, als wenn jede Methode allein zur Anwendung kam.

II.

Wir haben gesehen (in I), daß die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in der hypertonischen Lösung viel größer ist, wenn die Oxydationen schon vorher durch die Befruchtung beschleunigt worden sind. In diesem Zusammenhang kann man die Frage aufwerfen, ob auch die durch die hypertonische Lösung eingeleiteten Oxydationen eine Ursache für eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in der hypertonischen Lösung selbst sind, mit anderen Worten, ob in der hypertonischen Lösung in gleichen Zeiten gleich viel Sauerstoff verbraucht wird oder ob der Sauerstoffverbrauch mit der Zeit wächst. Gemessen war ja immer nur der in einer Stunde verbrauchte Sauerstoff.

Es hat sich gezeigt, daß in der hypertonischen Lösung in gleichen Zeiten gleich viel Sauerstoff verbraucht wird. (Versuch A I, a) und b.)

Diese Tatsache ist nicht ohne Bedeutung für die Vorstellung, die man sich von der Wirkungsweise der hypertonischen Lösung machen muß: ich will aber darauf noch nicht eingehen.

III.

Abgesehen von der Befruchtung und der Erhöhung des osmotischen Druckes gibt es noch ein drittes Mittel, die Oxydationen im Ei zu beschleunigen, nämlich die Erwärmung. So verbrauchten unbefruchtete Eier (in Seewasser) bei Erwärmung um 10° etwas mehr als die doppelte Sauerstoffmenge.

Es machte nun für die Atmung in der hypertonischen Lösung (die bei allen Versuchen 23° hatte) keinen Unterschied, ob das Seewasser, aus dem die Eier in die hypertonische Lösung gebracht wurden, 18 oder 23° hatte. (Versuch A II, a) u. b.) Das war vorauszusehen. Denn die Ursache für die verschiedene Atmung in Seewasser fällt ja weg, wenn die hypertonische Lösung in beiden Fällen die gleiche Temperatur hat. Man kann also nicht ganz allgemein sagen, die Atmung in der hypertonischen Lösung hat eine Beziehung zu der Atmung in See-

wasser, sondern es kommt darauf an, welches die Ursache der Oxydationen in Seewasser ist.

IV.

Ich habe mitgeteilt,¹⁾ daß im Gegensatz zu dem, was man vermutet hatte, der Sauerstoffverbrauch nach der Befruchtung im wesentlichen nicht die Folge der morphologischen Veränderungen ist. So ist z. B. die Oxydationsgröße zweier aufeinanderfolgender Furchungsstadien nicht sehr verschieden.

Dieses Jahr habe ich die Atmung der Eier sehr kurze Zeit nach der Befruchtung untersucht und zwar, um größere Unterschiede zu erhalten, in der hypertonen Lösung. Die folgende Tabelle gibt ein ganz schönes Bild von der Geschwindigkeit, mit der sich das Ei nach der Befruchtung verändert. (Die Temperatur des Seewassers war etwa 18°; unter diesen Bedingungen findet die erste Teilung etwa 100 Minuten nach der Befruchtung statt.)

In die hypertone Lösung gebracht Minuten nach der Befruchtung	Sauerstoffverbrauch pro Stunde auf 28 mg N in $\frac{1}{10}$ ccm O	Nr. im Protokoll
5	4,2	DIa
15	7,3	DIa
17	6,2	DIb
45	10,7	DIb
65	12,1	DIV
65	12,9	DIIIa
125	13,6	DIIIb

V.

Stärker hypertone Lösungen eignen sich weniger gut für diese Versuche, weil die **befruchteten** Eier durch sie bald geschädigt werden und die Versuchszeiten aus methodischen Gründen nicht kurz gewählt werden können. Die hypertone

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 1.

Lösung III (Versuch C) enthält auf 100 ccm Seewasser 4,3 g NaCl und 3 ccm $n/10$ -NaOH. In ihr verbrauchten **befruchtete** Eier pro Stunde etwa 1,9 ccm Sauerstoff, das heißt etwa 6 mal soviel als in Seewasser.

Bei dieser Versuchsanordnung verbrauchen die Eier 40 mal soviel Sauerstoff, als **unbefruchtete** Eier in Seewasser. Ich möchte an dieser Stelle nochmals hervorheben, daß in solchen Lösungen, in denen so enorm viel Sauerstoff verbraucht wird, die morphologischen Prozesse der Zell- und Kernteilung vollständig sistiert sind.

Methode.

Bei allen Messungen handelt es sich um den im Wasser gelösten Sauerstoff. Es wurde, wie voriges Jahr, vollständig unter Luftabschluß gearbeitet.

Der Sauerstoff wurde voriges Jahr nach Winkler titriert. Diese Methode ist sehr leicht auszuführen, sie hat aber den Nachteil, daß selbst geringe Mengen organischer (jodbindender) Substanzen ihre Anwendung unmöglich machen. Ich habe dieses Jahr das Verfahren von Schützenberger und Risler¹⁾ benutzt. Es beruht darauf, daß der Sauerstoff bei 45° mit Indigweiß in Reaktion gebracht und das gebildete Indigblau mit Natriumhydrosulfit zurücktitriert wird. Bei einiger Übung sind die Resultate sehr gut.

Der Titer wurde auf ammoniakalische Kupferlösung gestellt (als Indikator Indigo). 1 ccm der Kupferlösung entsprach $1/10$ ccm Sauerstoff. Es ist nötig, den Titer jeden Tag und zwar im Lauf der Stunden zu stellen, innerhalb deren die Bestimmungen ausgeführt werden. Das Hydrosulfit zersetzt sich auch ohne Mitwirkung des Sauerstoffs; es hat deshalb keinen Wert, die Lösung ganz streng von der Luft abzuschließen; sie befand sich, nach Montuori,²⁾ unter Vaselineöl; die Bürette war durch

¹⁾ Schützenberger und Risler, Die Gährungserscheinungen, Leipzig 1876.

Vgl. auch Pasteur, Etudes sur la bière, S. 345. — Tiemann und Gärtner, Untersuchung der Wässer (1895), S. 312. — Roscoe und Lunt, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXII.

²⁾ Gazzetta Internazionale di Medicina, 1906, S. 3.

ein Seitenrohr mit der Vorratsflasche verbunden; das obere Ende der Bürette kommunizierte nach einem Vorschlag von Herrn Dr. Henze mit einer doppelten Hempelschen Pyrogallolpipette. Man erreicht so, daß das überstehende Gas stets sauerstofffrei ist.

Roscoe hat den Titer auf sauerstoffhaltiges Wasser gestellt, unter Zugrundelegung des gasanalytisch ermittelten Absorptionskoeffizienten. Man erhält auf diese Art absolut richtige Werte, weil nur die gasanalytischen Bestimmungen absolut richtige Werte ergeben. Es handelt sich aber hierbei nur um wenige Prozente.

Der Fehler bei meinen Titrationen ist etwa $\frac{2}{10}$ ccm Hydro-sulfit; der prozentische Fehler ergibt sich damit aus den Protokollen und ist jedenfalls immer so groß, daß eine Umrechnung auf gasanalytisch ermittelte Werte keinen Zweck hat.

Die Differenzen, die Eier verschiedener Herkunft (von verschiedenen Tieren; zu verschiedenen Zeiten) unter gleichen Bedingungen in ihrem Sauerstoffverbrauch zeigen können, ¹⁾ sind etwa 30%.

Größer sind die Unterschiede auch nicht, wenn man die diesjährigen Resultate mit denen des vorigen Jahres vergleicht.

Versuche.

Der Sauerstoff ist in der letzten Spalte der Protokolle in $\frac{1}{10}$ ccm (0°; 760 mm) angegeben; diese Einheit wurde gewählt, weil 1 ccm der Hydrosulfitlösung Sauerstoffmengen von dieser Größenordnung anzeigte.

Inhalt der Versuchsflaschen: 300 ccm.

Inhalt der Bestimmungsflaschen: 220 ccm.

Temperatur des Thermostaten: 23°.

Hypertonische Lösung II: 2,3 g NaCl; 100 ccm Seewasser: 1,6 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH.

Hypertonische Lösung III: 4,3 g NaCl; 100 ccm Seewasser: 3 ccm $\frac{n}{10}$ -NaOH.

¹⁾ Immer bezogen auf die gleiche Stickstoffmenge.

A. Unbefruchtete Eier in der hypertonen Lösung II.

Versuch I.

Von einer Eiportion blieb ein Teil (a) 75, ein anderer (b) 105 Minuten auf der Drehscheibe im Thermostaten. Titer der Hydrosulfitlösung: 1 ccm = 0,0839 ccm Sauerstoff.

Nr.	N in ccm $n/_{10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Gesamt- abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $1/_{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
a	23,6	75	220 ccm : 10,7	220 ccm : 7,0	5,1	2,9 ± 0,2
b	14,6	105	220 ccm : 10,7	220 ccm : 7,2	4,8	3,2 ± 0,2

Versuch II.

Von einer Eiportion wurde ein Teil (a) bei 18°, ein anderer (b) bei 23° eine Stunde unter Bewegung gehalten. Dann kamen beide in die hypertone Lösung, die 23° hatte. Titer der Hydrosulfitlösung: 1 ccm = 0,0796 ccm Sauerstoff.

Nr.	N in ccm $n/_{10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Gesamt- abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $1/_{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
a	15,4	60	220 ccm : 11,1	220 ccm : 9,4	2,3	2,4 ± 0,3
b	15,9	60	220 ccm : 11,1	220 ccm : 9,6	2,0	2,0 ± 0,3

Im Mittel von 4 Versuchen verbrauchen also 28 mg N $2,6^{1/10}$ ccm Sauerstoff.

Voriges Jahr wurde bei 20° 1,8 und demnach bei 23° etwa $2,4^{1/10}$ ccm Sauerstoff auf die gleiche Stickstoffmenge gefunden.

B. Befruchtete Eier in Seewasser.

2 Versuche mit Eiern verschiedener Herkunft.

Versuch I begann 90 Minuten nach der Befruchtung. Temperatur des Seewassers 18° . Titer der Hydrosulfitlösung 1 ccm = 0,0814 ccm Sauerstoff.

Versuch II begann 210 Minuten nach der Befruchtung. Temperatur des Seewassers 18° . Titer der Hydrosulfitlösung 1 ccm = 0,0796 ccm Sauerstoff. 4 bis 8 Zellenstadien.

Nr.	N in ccm $n_{/10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $\frac{1}{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
I	7,5	70	220 ccm: 12,0	220 ccm: 10,8	1,6	$3 \pm 0,3$
II	23,7	63	220 ccm: 12,1	220 ccm: 8,7	4,6	$3 \pm 0,3$

Voriges Jahr wurde für derartige Stadien auf 28 mg N ein Sauerstoffverbrauch von 2,4 bis 3,0 gefunden; das wäre auf 23° umgerechnet 3,2 bis 4.

C. Befruchtete Eier in der hypertonischen Lösung III.

In die hypertonische Lösung gebracht $3\frac{1}{2}$ Stunden nach der Befruchtung. Titer der Hydrosulfitlösung 1 ccm = 0,0814 ccm Sauerstoff.

N in ccm $n_{/10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffverbrauch in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $\frac{1}{10}$ ccm Sauerstoff
		vor dem Versuch	nach dem Versuch		
7,5	30	220 = 10,0	220 = 6,8	4,4	19

Die unbefruchteten Eier verbrauchten voriges Jahr in dieser Lösung 3,6 bis 4,2 $\frac{1}{10}$ ccm Sauerstoff; auf 23° umgerechnet 4,5 bis 5,6.

D. Befruchtete Eier in der hypertonischen Lösung II.

Versuch I.

Befruchtete Eier wurden in 2 Teile geteilt. Ein Teil (a) kam 5 Minuten, der andere (b) 17 Minuten nach der Befruchtung in die hypertonische Lösung. Das Seewasser hatte 18°. Titer der Hydrosulfitlösung 1 ccm = 0,0839 ccm Sauerstoff.

Nr.	N in ccm $\frac{1}{10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $\frac{1}{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
a	12,1	60	220 = 10,7	220 = 8,5	3	4,2 + 0,4
b	9,2	60	220 = 10,7	220 = 8,2	3,4	6,2 + 0,5

Versuch II.

Befruchtete Eier wurden in 2 Teile geteilt. Ein Teil (a) kam 15 Minuten, der andere (b) 45 Minuten nach der Befruchtung in die hypertonische Lösung. (Seewasser 18°.) Titer der Hydrosulfitlösung: 1 ccm = 0,0896 ccm Sauerstoff.

Nr.	N in ccm $\frac{1}{10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $\frac{1}{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
a	9,8	60	220 = 10,0	220 = 7,1	4	7,3 + 0,4
b	5,8	60	220 = 10,0	220 = 7,5	3,4	10,7 + 0,9

Versuch III.

Befruchtete Eier wurden in 2 Teile geteilt. Ein Teil (a) kam 65, der andere (b) 125 Minuten nach der Befruchtung in die hypertonische Lösung. (Seewasser 18°.) Titer der Hydrosulfitlösung 1 ccm = 0,0758 ccm Sauerstoff.

Nr.	N in ccm $n/_{10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $1/_{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
a	11,8	60	220 = 11,9	220 = 4,6	10,0	12,9 ± 0,4
b	3,4	60	220 = 11,9	220 = 9,6	3,1	13,6 ± 1

Versuche IV und V

(mit verschiedenen Eiportionen).

Versuch IV: Eine Stunde nach der Befruchtung in die hypertonische Lösung gebracht. (Seewasser 18°.) Titer der Hydrosulfitlösung: 1 ccm = 0,0862 ccm Sauerstoff.

Versuch V: Eine Stunde nach der Befruchtung in die hypertonische Lösung gebracht. (Seewasser 18°.) Titer der Hydrosulfitlösung: 1 ccm = 0,0731 ccm Sauerstoff.

Nr.	N in ccm $n/_{10}$ - HCl	Dauer in Mi- nuten	Sauerstoffgehalt in ab- gelesenen ccm Hydrosulfit		Auf 300 ccm berechnete Abnahme des Sauerstoffs in ccm Hydrosulfit	28 mg N verbrauchen pro Stunde $1/_{10}$ ccm Sauerstoff
			vor dem Versuch	nach dem Versuch		
IV	5,5	60	220 = 10,4	220 = 7,6	3,8	12,1 ± 0,9
V	7,6	60	220 = 12,3	220 = 8,1	5,7	11 ± 0,6