

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXII, 2

SECTIO C

1967

Z Katedry Mikrobiologii Szczegółowej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS
Kierownik: doc. dr Zbigniew Kawecki

Z Katedry Biologii Wydziału Lekarskiego AM w Lublinie
Kierownik: doc. dr Wanda Stojałowska

Zdzisław ILCZUK, Roman GIERYNG

**Das Auftreten von Citronensäure bei erwachsenen Formen
der Wirbellosen**

Występowanie kwasu cytrynowego u form dorosłych niektórych bezkręgowców

EINLEITUNG

Die Citronensäure gehört zweifelsohne zu den wesentlichen Bestandteilen von lebenden Wesen. Ihre beträchtlichen Mengen treten im Pflanzenmaterial sowohl in freier Form wie auch in Gestalt von Salzen auf. Es wurde festgestellt, dass sie einen charakteristischen Bestandteil nicht nur in den Früchten von Pflanzen, besonders der Citrusartigen, sondern auch in ihren anderen anatomischen Teilen ausmacht, wo sie ebenfalls in sehr hohen Konzentrationen auftreten kann, wie dies in den Blättern von Tabak, Baumwolle, Bohnen, Soja und Kartoffeln der Fall ist (7).

Verbesserte Methoden zur Bestimmung der Citronensäure ermöglichten die Feststellung, dass ebenfalls eine gewisse Menge von ihr fast immer anwesend ist. Über dieses Thema gibt es zahlreiche Mitteilungen besonders, wenn es sich um Wirbeltiere und Menschen handelt (13). Im Bereich der Wirbellosen sind zur Zeit Untersuchungen bekannt, die das Auftreten dieser Säure besonders aber in betreff einiger Insekten feststellen (4, 10, 11, 12, 14).

Man kann behaupten, dass die Citronensäure eine vielartige Bedeutung für das Leben der Organismen hat. Ihre Rolle besteht nicht nur in der Funktion eines von den vielen strukturellen Bestandteilen der einzelnen Gewebe z.B. der Knochen oder anderer Skelettelemente, wo sie in Form von Kalkverbindungen in beträchtlichen Mengen auftritt, aber sie betrifft auch Prozesse des Stoffwechsels, in denen sie einen direkten Anteil hat, wie dies während des Oxydierens von Kohlenhydraten durch die Reaktion des Krebszyklus stattfindet (8).

Da die bisherigen Untersuchungen, die den Gehalt der Citronensäure bei niederen Tieren betrafen, sich hauptsächlich auf die Klasse der Insecta begrenzten, hielten wir es für interessant, andere Tiere zu untersuchen, die verschiedene Typen der Wirbellosen repräsentieren.

MATERIAL UND METHODE

Als Untersuchungsmaterial dienten lebende, erwachsene Individuen, die zu den fünf Typen der Wirbellosen gehören: *Plathelminthes*, *Nemathelminthes*, *Annelida*, *Mollusca* und *Arthropoda*. Dieses Material erhielten wir aus verschiedenen Stellen. In der Mehrzahl wurde es in der näheren und weiteren Umgebung von Lublin gesammelt. Einige Arten stammten aus der eigenen Zucht (*Helix pomatia*, *Grillus domesticus*, *Culex pipiens*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Lymantria dispar*). Die Parasiten *Fasciola hepatica* und *Ascaris suis* wurden in dem Städtischen Schlachthaus in Lublin gleich nach Tötung der Tiere entnommen, aber *Taenia* sp. vom Hund erhielten wir aus dem Katheder für Parasitologie der Landwirtschaftlichen Hochschule in Lublin.

Die Citronensäure wurde photokolorimetrisch in den Extrakten von Trichloresigsäure, die von den Homogenisaten der Trockensubstanz (TS) ganzer Tiere stammen, bestimmt (4). Die Gewichtsmasse zur Extraktion betrug zirka 100 bis 300 mg.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Gehalt an Citronensäure wurde bei niederen Tieren auf 30 verschiedenen Arten von Wirbellosen durchanalysiert. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen wurden auf Tab. 1 dargestellt. Bei vier niederen Typen (*Plathelminthes*, *Nemathelminthes*, *Annelida* und *Mollusca*) hielt sich die Citronensäure auf einem verhältnismässig niedrigen Niveau zirka 0,1 mg/g TS und sie überstieg 0,5 mg/g TS nicht. Von den untersuchten Arten näherten sich nur drei, die zu verschiedenen Typen angehörig waren, zu diesen Werten an (*Dendrocoelum lacteum* 0,469; *Hirudo medicinalis* 0,500; *Helix pomatia* 0,400 mg/g TS). Bei *Arthropoda* konnte man dagegen grössere Konzentrationen der Citronensäure beobachten, aber mit dem Vermerk, dass die *Diplopoda* im Vergleich mit *Crustacea*, *Chilopoda* und *Insecta* eine grössere Menge von ihr aufweisen.

Wie es aus der Zusammenstellung hervorgeht, schwankt die Citronensäuremenge bei den einzelnen Vertretern der Wirbellosen, die verschiedene systematische Einheiten repräsentieren, in weiten Grenzen und sie verbleibt in keinem deutlichen Zusammenhang mit dem Grad der philogenetischen Entwicklung.

Das niedrige Niveau des Citronensäuregehaltes bei den parasitischen *Plathelminthes* scheint mit den Vermutungen von Agosin u. a. (1) im Einklang zu sein, die der Meinung sind, dass *Echinococcus granulosus* nicht einen ganz ausgebildeten Krebszyklus besitzt. Davon zeugt vor allem das Fehlen eines Effektes von Tätigkeitshemmung bei Atmungsprozessen durch die Malonsäure. Es soll auch unterstrichen werden, dass Agosin (2) unter den Produkten der Kohlenhydratoxydierung bei *Echinococcus granulosus* keine Citronensäure feststellte, trotz Anwesenheit solcher Metaboliten wie Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure und Brenztraubensäure.

Der Behauptung einiger Autoren zuwider (10, 15) bilden die Insekten keine Tiergruppe mit den grössten Fähigkeiten zur Synthese der Citronensäure. Die Eigenschaft der Ansammlung einer grossen Menge scheint nämlich im Lichte unserer Untersuchungen bei den *Diplopoda* besonders deutlich zu sein unter denen *Glomeris connexa* ein in dieser Hinsicht besonders deutliches Beispiel darstellt (Männchen 9,550 mg/g TS).

Es muss unterstrichen werden, dass unter den untersuchten Insekten eine gewisse Regelmässigkeit in Hinsicht des Gehaltes von Citronensäure in Abhängigkeit vom Typ der Metamorphose zu bestehen scheint. Wie es aus den Angaben in Tab. 1 ersichtlich ist, ist das Niveau der Citronensäure bei Insekten mit unvollkommener Verwandlung (*Hemimetabola*) niedriger als bei Insekten mit vollkommener Verwandlung (*Holometabola*).

Tabelle 2. Unterschiede im Citronensäuregehalt in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Culex pipiens*

Stadium	Citronensäure in mg/g Trockensubstanz	%
Larve	0,450	0,045
Puppe	3,225	0,322
Imago ♀	0,450	0,045
Imago ♂	0,225	0,022

Auf Grund unserer Untersuchungen wie auch der anderen Autoren, kann festgestellt werden, dass das Niveau der Citronensäure weiten Schwankungen im Zusammenhang mit der individuellen Entwicklung der Tiere unterliegt. Ein Beispiel dafür können die verschiedenen Entwicklungsstadien von *Culex pipiens* darstellen (Tab. 2). Gewisse Unterschiede im Gehalt der Citronensäure kann man ebenfalls in den verschiedenen Lebensperioden der Erwachsenen, in Abhängigkeit von ihrem physiologischen Zustand, feststellen. Davon zeugen eingehende Untersuchungen, die auf *Leptinotarsa decemlineata* (5) durchgeführt worden sind, bei denen festgestellt worden ist, dass bei erwachsenen Individuen der Gehalt an Citronensäure beträchtlich schwanken kann. Individuen im Alter von 4 Tagen enthielten 6,353 mg/g TS, aber Insekten, die 1 Jahr alt waren, nur zirka 1,0 mg/g TS. Ähnliche Veränderungen, wenn auch nicht immer von solch grosser Spannweite, konnte ebenfalls im Leben der erwachsenen Formen von *Orthomorpha gracilis* (9) und bei einigen *Diptera* (15) festgestellt werden. In unseren jetzigen Untersuchungen wurden nur erwachsene Formen von Wirbellosen ohne ihrer Altersbestimmung berücksichtigt. Unsere erhaltenen Ergebnisse haben daher nur einen allgemeinen Charakter und betreffen nicht einen genau bestimmten physiologischen Zustand der Tiere.

In der Zusammenstellung der Angaben in Tab. 1 wird die Aufmerksamkeit auf einen gewissen manchmal ziemlich grossen Unterschied gelenkt, der in der Akkumulation der Citronensäure in Abhängigkeit vom Geschlecht des Tieres hervortritt. In der Regel weisen Weibchen einen grösseren Gehalt an Citronensäure auf. Wahrscheinlich hängt dies mit dem Metabolismus der Atmung zusammen. Es liess sich nämlich auf dem Beispiel von *Periplaneta americana* (6) und *Hyalophora cercopia* (3) beweisen, dass die Intensität des Atmens bei Männchen grösser ist im Vergleich mit den Weibchen. Das höhere Niveau der Citronensäure im Tierorganismus ist jedoch mit dem schwachen Tempo der Absorption des Sauerstoffes korreliert, was durch P a t t e r s o n (12) in der Puppenentwicklung von *Tenebrio molitor* erwiesen worden ist.

Es wurde nicht festgestellt, dass die Lebensweise der untersuchten Tiere einen Einfluss auf das Niveau der Citronensäure hatte, wofür als Beispiel die Plattwürmer dienen können.

Beide untersuchten Arten von Strudelwürmern unterschieden sich trotz ähnlicher Lebensweise in bezug der Menge an Citronensäure, aber bei *Policelis* sp., *Fasciola hepatica* und *Taenia* sp. sind keine Unterschiede festgestellt worden, obwohl diese Tiere eine verschiedene Lebensweise repräsentieren.

Es scheint, dass der hohe Citronensäuregehalt bei einigen von den untersuchten Wirbellosen im Zusammenhang mit ihrer endogenen Herkunft verbleibt und dass sie als Mass der Intensität der Prozesse des Stoffwechsels dienen kann, in dem wahrscheinlich der Krebszyklus teilnimmt. Im Gegensatz dazu tritt der Krebszyklus bei Formen, die keine Anwesenheit von Citronensäure oder nur eine geringe aufweisen, wahrscheinlich in unkompletter Form oder überhaupt im Metabolismus dieser Tiere nicht auf. Eine eventuelle geringe Menge an Citronensäure kann bei ihnen von exogener Herkunft sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Analyse des Citronensäuregehaltes in Homogenisaten der Trockensubstanz von 30 Arten durchgeführt, die zu fünf Typen von Wirbellosen angehörig waren. Die grösste Menge an Citronensäure wurde bei *Arthropoda* und besonders bei *Diplopoda* und *Insecta* festgestellt. Die verschiedene Lebensweise und die Stufe der phylogenetischen Entwicklung der untersuchten Tiere stand nicht im deutlichen Zusammenhang mit dem Niveau der Citronensäure. Allgemein betrachtet wiesen Weibchen eine grössere Konzentration auf als Männchen.

Es scheint, dass bei Insekten der Typ der Metamorphose einen Zusammenhang mit der Akkumulation der Citronensäure hat; bei *Holometabola* akkumuliert sie sich in grösserer Menge als bei *Hemimetabola*.

Man kann vermuten, dass bei den Wirbellosen, bei denen eine größere Konzentration der Citronensäure auftritt, diese von endogener Herkunft ist und dass diese mit dem Vorhandensein des Krebszyklus bei diesen Tieren verbunden ist.

SCHRIFTENVERZEICHNIS

1. Agosin M., Brand T., Rivera G., Mc Mahon P.: Studies on the Metabolism of *Echinococcus granulosus*. I. General Chemical Composition and Respiratory Reactions. Exptl. Parasitol., 6, 1957.
2. Agosin M.; Studies on the Metabolism of *Echinococcus granulosus*. II. Some Observations on the Carbohydrate Metabolism of Hydatid Cyst Scolices. Exptl. Parasitol., 6, 1957.
3. Domroese K., Gilbert L.: The Role of Lipid in Adult Development and Flight-muscle Metabolism in *Hyalophora cercopia*. J. Exptl. Biol., 41, 3, 1964.
4. Gieryng R., Ilczuk Z.: Unterschiede in der Gehaltmenge an Citronensäure in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Calliphora erythrocephala* Meig (*Diptera*). Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, XXI, 1966.
5. Gieryng R., Ilczuk Z.: A Quantitative Analysis of Citric Acid Content during Ontogenesis of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Zool. Pol., 18, 2, 1968.
6. Gilmour D.: The Biochemistry of Insects. Academic Press, New York 1961.
7. Ilczuk Z.: Nowe surowce do produkcji kwasu cytrynowego. Przem. Ferm. i Rolny, 8, 8—9, 1965.
8. Ilczuk Z.: Występowanie i rola kwasu cytrynowego w ustroju żywym. Kosmos, seria A, 15, 6, 1966.
9. Ilczuk Z., Stojalowska W., Gieryng R.: Occurrence of Citric Acid in *Diplopoda*. Folia Biol., 15, 2, 1967.
10. Levenbook L., Hollis V.: Organic Acids in Insects. I. Citric Acid. J. Ins. Physiol., 6, 1, 1961.
11. Parker K., Rudall K.: Calcium Citrate in an Insect. Biochim. Biophys. Acta, 17, 1955.
12. Patterson D.: The Accumulation of Citrate in Insect Tissues. Arch. Int. Physiol. Biochim., 64, 4, 1956.
13. Thunberg T.: Occurrence and Significance of Citric Acid in the Animal Organism. Physiol. Rev., 33, 1, 1953.
14. Wyskriebienca E.: Putr přewrasczeniija uglewodow w polostnoj židkosti tutowogo szelkopriada w period mietamorfoza. Biochimija, 22, 1957.
15. Zahavi M., Tahori A.: Citric Acid Accumulation with Age in Houseflies and other *Diptera*. J. Ins. Physiol., 11, 1965.

Występowanie kwasu cytrynowego u form dorosłych niektórych bezkręgowców

Streszczenie

Dokonano analizy zawartości kwasu cytrynowego w homogenizatach suchej masy 30 gatunków należących do 5 typów bezkręgowców. Naj-

większą ilość kwasu cytrynowego stwierdzono u *Arthropoda*, a zwłaszcza u *Diplopoda* i *Insecta*. Różny tryb życia i stopień rozwoju filogenetycznego badanych zwierząt nie pozostawał w wyraźnym związku z poziomem kwasu cytrynowego. Na ogół samice wykazywały większe jego stężenia niż samce.

Wydaje się, że u owadów typ metamorfozy ma związek z akumulacją kwasu cytrynowego; u *Holometabola* nagromadza się on w większej ilości niż u *Hemimetabola*.

Można przypuszczać, że u bezkręgowców, u których występuje większe stężenie kwasu cytrynowego, ma on pochodzenie endogenne i jest związany z istnieniem u tych zwierząt cyklu Krebsa.

Содержание лимонной кислоты во взрослых формах некоторых беспозвоночных

Резюме

Проведен анализ содержания лимонной кислоты в гомогенизатах сухой массы 30 видов животных, принадлежащих к 5 типам беспозвоночных. Самое большое количество лимонной кислоты констатировали у *Arthropoda*, особенно у *Diplopoda* и *Insecta*. Различный образ жизни и степень филогенетического развития изучаемых животных не имели отчетливой связи с содержанием лимонной кислоты. Концентрация лимонной кислоты у самок была больше, чем у самцов.

Возможно, что у насекомых тип метаморфоза связан с аккумуляцией лимонной кислоты; у *Holometabola* накапливается она в больших количествах, чем у *Hemimetabola*.

Предполагается, что высокая концентрация лимонной кислоты у беспозвоночных имеет эндогенное происхождение, связанное с присутствием у животных цикла Krebsa.