

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXI, 7

SECTIO C

1966

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

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

Roman GIERYNG u. Zdzisław ILCZUK

Unterschiede in der Gehaltmenge an Citronensäure in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera)

Różnice w ilościowej zawartości kwasu cytrynowego w różnych stadiach rozwojowych *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera)

Различия в содержании лимонной кислоты у *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera) в различных стадиях развития

EINLEITUNG

Die Citronensäure wurde seit ihrer Entdeckung über 100 Jahre lang nur für die Pflanzenwelt als typisch anerkannt. Erst dank Anwendung genauerer analytischer Methoden konnte man beweisen, dass sie ebenfalls einen ständigen Bestandteil der Tiergewebe ausmacht. Die Rolle der Citronensäure im Gewebe und in den organischen Flüssigkeiten von Tieren ist zwar noch nicht immer genügend aufgeklärt, aber nichtsdestoweniger besteht die wissenschaftlich dokumentierte Tatsache weiter fest, dass die Citronensäure in verschiedenen Konzentrationen (manchmal in sehr beträchtlichen) in vielen Elementen des Tierkörpers auftritt wie z. B.: Blut, cerebro-spinale Flüssigkeit (*Liquor cerebro-spinale*) männlicher Samen, Muskel, Nieren, Leber und andere Organe; Knochen, Haare, Milch, aber auch in einigen Ausscheidungen z. B. Harn, Schweiß oder Kot (8).

Bei den Wirbellosen bilden die Citronensäure und ihre Salze ebenfalls einen normalen organischen Bestandteil. Es sind Fälle bekannt, wo sie in beträchtlichen Mengen auftritt wie z. B. bei *Mantis religiosa*, die in der Periode des Eierlegens in einer speziellen Drüse Kristalle von

Kalzium-Citrat erzeugt und zwar im Volumen von einigen mm^3 . Diese werden von dort später ausgeschieden und an die Eikapseln angeschlossen (5).

Man hatte beobachtet, dass der Citronensäuregehalt (schliesslich ähnlich wie auch bei einigen anderen Bestandteilen) in organischen Flüssigkeiten und im Gewebe der Insekten in der Entwicklungsperiode weitgehenden Schwankungen unterliegt. W y s k r e b i e n c e w a (9) hatte bei dem Maulbeerseidenspinner (*Bombyx mori*) in der Periode der Histolyse eine besonders gesteigerte Aktivität der Synthese der Citronensäure festgestellt. Ihrer Meinung nach ist die Synthese der Citronensäure bei diesem Insekt mit der Fettumwandlung verbunden. Es scheint jedoch, dass zur Zeit mehrere Angaben vorliegen, die vielmehr zugunsten des Anteiles der Citronensäure im Metabolismus der Insekten vorsprechen und zwar als Produkt der Kohlenhydratumwandlung. Prozesse dieser Umwandlung werden wahrscheinlich durch eine glykolytische Kettenreaktion realisiert (die in diesem Prozess auftretenden Enzyme wurden unter anderen bei der Schabe *Periplaneta americana* erwiesen), und danach werden sie nach der Zerlegung der Kohlenhydrate in Brenztraubensäure in den Umlauf der Umwandlungen des Krebszyklus eingeschlossen, in dem bekanntlich die Synthese der Citronensäure eine zentrale Lage einnimmt.

Das Problem der Anteilnahme des Krebszyklus in dem Metabolismus der Insekten war ein Gegenstand von zahlreichen Untersuchungen. R e s s (7) stellte die Anwesenheit von einigen Enzymen von diesem Zyklus bei *Locusta migratoria* fest, L e v e n b o o k (4) entdeckte sie alle bei *Prodenia eridania*. Auch P a t t e r s o n (6) ist der Meinung, dass Veränderungen des Citronensäuregehaltes in den einzelnen Entwicklungsstadien der Puppe *Tenebrio molitor* mit den Umwandlungen des Tricarbonsäurezyklus verbunden sind, besonders aber daher, dass sie in einer entsprechenden Korrelation mit der Menge des während dieser Zeit verbrauchten Sauerstoffes verbleiben.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

MATERIAL UND UNTERSUCHUNGSMETHODE

Zur Erlangung von Untersuchungsmaterial wurde die Zucht von *Calliphora erythrocephala* Meig. auf Fleisch im Thermostat bei einer Temperatur 28°C durchgeführt. In diesen Bedingungen dauerte die ganze Entwicklung dieser Fliegen vom Eiablegen bis zum Schlüpfen der erwachsenen Formen aus der Puppe von 12 bis 13 Tagen. Infolge einer so schnellen Entwicklung entnahm man das Untersuchungsmaterial in eintägigen (24 Std.) Abständen. Die Insekten wurden mit Chloroform

eingeschläfert und dann im Trockenapparat bei einer Temperatur von 105°C getrocknet. Zur Erlangung einer genügend grossen Menge an Trockengewicht wurde diese von vierzig bis einigen Hundert Exemplaren in Abhängigkeit von der Grösse eines gewissen Entwicklungsstadiums entnommen. Aus diesem Grunde wurde zur Erlangung des Materiales aus der ganzen Entwicklung die Aufzucht von durch 10 Weibchen gelegten Eiern benötigt.

Bestimmung der Citronensäure. Das zur Bestimmung des Citronensäuregehaltes ausgesuchte Material wurde einer genauen Homogenisierung untergeben. Die betreffenden Substanzmengen (von 0,3 bis 1,0 g), die im Mörser aus der Trockenmasse der Insekten zerrieben worden waren, wurden in einer 10%igen Lösung von Trichloressigsäure im Wasserbad bei einer Temperatur von zirka 60°C 15 Minuten lang extrahiert. Danach wurde der Extrakt von den festen Bestandteilen des Homogenisates durch Zentrifugieren im Laufe von 5 Minuten bei 2000 Umdrehungen pro Minute abgeteilt. Den in den Reagenzgläsern nach dem Dekantieren des Extraktes zurückgebliebenen Niederschlag spülte man mit einer neuen Portion von Trichloressigsäure durch und man extrahierte ihn wie beim ersten Mal. Die durch Fraktion erhaltenen Extrakte vereinigte man nach dem Durchfiltrieren vermittels Filterpapier von Whatman 3 miteinander und ergänzte sie mit Trichloressigsäure bis zum Volumen von 6 ml. Da die auf solch eine Weise erhaltenen Extrakte gewöhnlich noch einen beträchtlichen Grad an Trübung aufwiesen, wurden sie einem zusätzlichen klärenden Zentrifugieren 10 Minuten lang untergeben (3,5—4,0 Tausend Umdrehungen /Min.).

Die auf diese Weise zubereiteten Extrakte wurden bei Benutzung von Pirydin, Essigsäureanhydrid und dem Photokolorimeter KF-1A (2) zur kolorimetrischen Bestimmung der Citronensäure angewandt.

In den so erhaltenen Extrakten wurden je 3 gleichlaufende Bestimmungen zur Blindprobe durchgeführt, die ein mit destilliertem Wasser verdünnter Extrakt darstellt, bei einer Menge, die der Summe des Volumens der Reagenzien bei den Versuchsproben gleich ist.

Die Resultate der Citronensäurebestimmungen wurden im Verhältnis zu 1 g Trockengewicht des untersuchten Materiales umgerechnet.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie es sich aus den ausführlichen Angaben der Tabelle und der beigelegten Abbildung ergibt, unterliegt der Citronensäuregehalt in den Extrakten aus dem Trockengewicht von *Calliphora erythrocephala* sehr deutlichen Veränderungen in der Periode der Postembryonalentwicklung. Im allgemeinen kennzeichnet sich das Entwicklungsstadium der Larve

mit dem Laufe der Zeit durch einen fortwährenden Anwuchs, wenn man eine gewisse Schwankung in Minus während des letzten Entwicklungstages nicht in Betracht zieht (Abb. 1).

Tafel 1. Citronensäuregehalt in den Extrakten aus dem Trockengewicht verschiedener Entwicklungsstadien von *C. erythrocephala*

Reihenfolge der untersuchten Proben in Tagesabständen (je 24 Std.)		Citronensäure	
		mg/g des Trockengewichtes	%
Larve	1	0,2484	0,025
	2	0,3275	0,033
	3	0,4800	0,048
	4	1,2000	0,120
	5	1,6582	0,166
	6	1,4200	0,142
Puppe	7	1,8150	0,181
	8	2,0757	0,207
	9	1,3138	0,134
	10	0,9708	0,097
	11	1,3836	0,138
	12	1,0050	0,100
	13	1,2104	0,121
Imago	14	0,2539	0,025

Der erste Entwicklungstag der Puppe bildet die weitere Kontinuation der Anhäufung der Gesamtmenge der Citronensäure. In den weiteren Entwicklungstagen der Puppe kann man eine gewisse Stabilisation des Citronensäuregehaltes beobachten, dessen Menge in dieser Zeitspanne in den Grenzen von 0,097 bis 0,138% im Verhältnis zum Trockengewicht schwankt (Tafel 1).

Eine sehr deutliche Verminderung des Citronensäuregehaltes ist dagegen schon am ersten Tage nach der Beendigung der Metamorphose sichtbar. Seine Menge sinkt beim Imago ungefähr bis zu demjenigen Niveau ab, das man am Anfang der Entwicklung beobachten konnte d. i. wie bei der eintägigen Larve.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass der grösste Citronensäuregehalt auf die anfängliche Entwicklungsperiode der Puppe fällt, also mit den sich im zentralen Nervensystem vollziehenden intensivsten Umwandlungen konvergiert (1).

Es muss unterstrichen werden, dass *Levenbook* (3) den Citronensäuregehalt in der Entwicklung der Puppen *Phormia regina* und *Prode-nia eridania* untersuchend, eine Kurvenabnahme dieser Säure erhalten hat, die in Hinsicht ihres Verlaufes an unsere Resultate in der Entwicklung

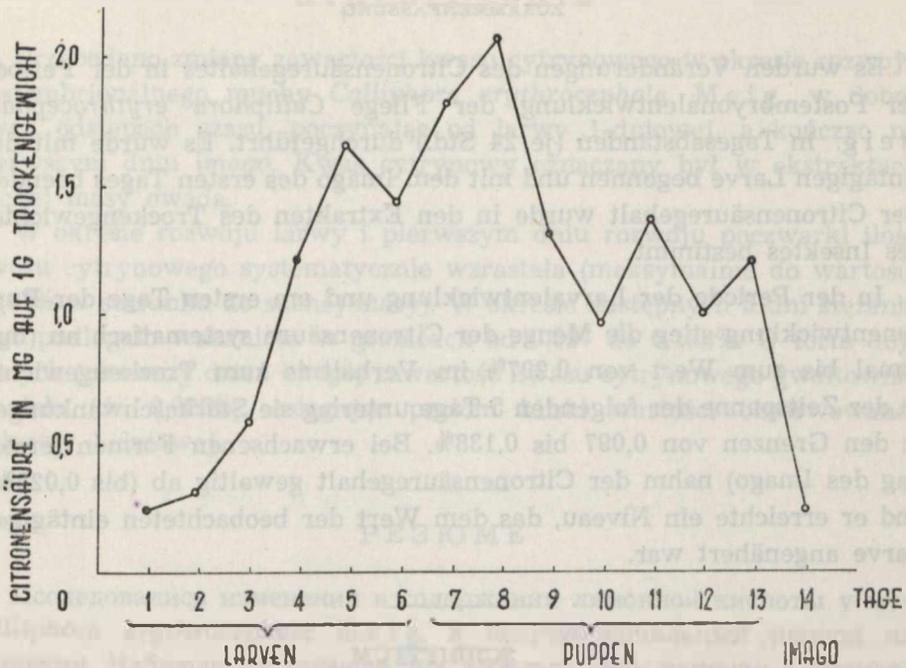


Abb. 1. Veränderungen im gesamten untersuchten Citronensäuregehalt in Tagesabständen (je 24 Std.) während der Postembryonalentwicklung von *Calliphora erythrocephala* bei 28°C

der Puppe *Calliphora erythrocephala* angenähert ist. Das Absinken des Citronensäuregehaltes während der Puppenentwicklung wie auch seine kleine Menge beim Imago legt der Autor, entweder mit der schwachen Synthese dieser Säure in dieser Periode oder ihrem grösseren Verbrauch im gesamten Metabolismus aus.

Ähnlich erwiesen Z a h a v i u. T a h o r i (10) bei *Musca domestica* L. ein starkes Absinken des ganzen Gehaltes an Citronensäure am ersten Entwicklungstage des Imago im Vergleich zur Puppe.

Es scheint, dass die während der Metamorphose von *Calliphora erythrocephala* beobachteten Veränderungen im Citronensäuregehalt, die Abspiegelung einer ungewöhnlich grossen Intensität von allgemeinen biochemischen Umwandlungen darstellen, die sich in dieser Periode im Tierorganismus vollziehen. Sie begleiten den gründlichen Umbau eines Organismus, in dem abwechselnd alle Gewebe dem Zerfall und wieder dem neuen Aufbau unterliegen. Unserem Erachten nach kann das beträchtliche Absinken des Citronensäuregehaltes beim Imago die Stabilisierung des Metabolismus bezeichnen, der sich aus der stürmischen Entwicklungsgestalt in eine ruhigere Form des trophischen Metabolismus umbildet.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Veränderungen des Citronensäuregehaltes in der Periode der Postembryonalentwicklung der Fliege *Calliphora erythrocephala* Meig. in Tagesabständen (je 24 Std.) durchgeführt. Es wurde mit der eintägigen Larve begonnen und mit dem Imago des ersten Tages beendet. Der Citronensäuregehalt wurde in den Extrakten des Trockengewichtes des Insektes bestimmt.

In der Periode der Larvalentwicklung und am ersten Tage der Puppenentwicklung stieg die Menge der Citronensäure systematisch an (maximal bis zum Wert von 0,207% im Verhältnis zum Trockengewicht). In der Zeitspanne der folgenden 5 Tage unterlag sie Stärkeschwankungen in den Grenzen von 0,097 bis 0,138%. Bei erwachsenen Formen (erster Tag des Imago) nahm der Citronensäuregehalt gewaltig ab (bis 0,025%), und er erreichte ein Niveau, das dem Wert der beobachteten eintägigen Larve angenähert war.

SCHRIFTTUM

1. Gieryng R.: Postembrionalny rozwój ośrodkowego układu nerwowego muchówek (Diptera). Cz. I, *Calliphora vomitoria* (L.). Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio D, vol. XIX, 10, 1964.
2. Ilczuk Z.: Metody analityczne oznaczania kwasu cytrynowego przydatne w badaniach nad fermentacją cytrynową. Przem. Ferm. i Rolny, 8, 1, 1965.
3. Levenbook L., Hollis V.: Organic Acid in Insects. I. Citric Acid. J. Ins. Physiol., 6, 1, 1961.
4. Levenbook L.: Tricarboxylic Acid Cycle and Related Enzymes in the Larva of Southern Armyworm. *Prodenia eridania*. Arch. Biochem. Biophys., 92, 1, 1961.
5. Parker K., Rudall K.: Calcium Citrate in an Insect. Biochim. Biophys. Acta, 17, 1955.
6. Patterson D.: The Accumulation of Citrate in Insect Tissues. Arch. int. Physiol. Biochim., 64, 4, 1956.
7. Ress K.: Aerobic Metabolism of the Muscle of *Locusta migratoria*. Biochem. Journ., 58, 7, 1954.
8. Thunberg T.: Occurrence and Significance of Citric Acid in the Animal Organism. Physiol. Rev., 33, 1, 1953.
9. Wyskrebieniewa E.: Puti priewraszczenija uglewodow w połostnoj zidkosti tutowego szelkopriada w period mietamorfoza. Biochimija, 22, 4, 1957.
10. Zahavi M., Tahori A. S.: Citric Acid Accumulation with Age in Houseflies and other Diptera. J. Ins. Physiol., 11, 6, 1965.

STRESZCZENIE

Przebadano zmiany zawartości kwasu cytrynowego w okresie rozwoju postembrionalnego muchy *Calliphora erythrocephala* Meig. w dobowych odstępach czasu, poczynając od larwy 1-dniowej, a kończąc na pierwszym dniu *imago*. Kwas cytrynowy oznaczany był w ekstraktach suchej masy owada.

W okresie rozwoju larwy i pierwszym dniu rozwoju poczwarki ilość kwasu cytrynowego systematycznie wzrastała (maksymalnie do wartości 0,207% w stosunku do suchej masy). W okresie następnych 5 dni stężenie jego podlegało wahaniom w granicach od 0,097 do 0,138%. U form dojrziałych (pierwszy dzień *imago*) zawartość kwasu cytrynowego gwałtownie zmalała (do 0,025%), osiągając poziom bliski wartości obserwowanej u larwy 1-dniowej.

РЕЗЮМЕ

Исследовались изменения в содержании лимонной кислоты у мух *Calliphora erythrocephala* Meig. в постэмбриональный период их развития. Наблюдения проводились каждый день начиная с личинок однодневного возраста и кончая в день появления имаго. Лимонная кислота определялась в экстрактах из сухого вещества насекомого.

В период развития личинки и в первый день развития куколки содержание лимонной кислоты постоянно возрастает, достигая максимального значения 0,207% от сухого вещества. В течение следующих 5-ти дней содержание лимонной кислоты варьировало в пределах 0,097—0,138%. У зрелых форм (первый день имаго) содержание лимонной кислоты внезапно уменьшилось (до 0,025%), т.е. приблизилось к уровню характерному для однодневной личинки.

STRESZCZENIE

W niniejszym podręczniku przedstawiono najważniejsze zagadnienia z dziedziny matematyki, które są niezbędne do zrozumienia i wykorzystania w praktyce. Podkreślono rolę matematyki w nauce i życiu, a także jej zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i techniki. Wskazano na konieczność systematycznej pracy i samodzielnego myślenia, które są kluczowe dla osiągnięcia sukcesu w nauce matematyki.

Podkreślono również, że matematyka jest językiem nauki i techniki, który umożliwia precyzyjne opisanie rzeczywistości. Wskazano na konieczność rozumienia i wykorzystania matematyki w nauce i życiu, a także jej zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i techniki. Wskazano na konieczność systematycznej pracy i samodzielnego myślenia, które są kluczowe dla osiągnięcia sukcesu w nauce matematyki.

Podkreślono również, że matematyka jest językiem nauki i techniki, który umożliwia precyzyjne opisanie rzeczywistości. Wskazano na konieczność rozumienia i wykorzystania matematyki w nauce i życiu, a także jej zastosowanie w różnych dziedzinach nauki i techniki. Wskazano na konieczność systematycznej pracy i samodzielnego myślenia, które są kluczowe dla osiągnięcia sukcesu w nauce matematyki.

LITERATURA

1. Kowalski J., *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

2. Leśniewski M., *Matematyka dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

3. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

4. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

5. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

6. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

7. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

8. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

9. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

10. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

11. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

12. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

13. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

14. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

15. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

16. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.

17. *Podręcznik matematyki dla gimnazjum*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.