

---

Z Zakładu Fizjologii Roślin Wydz. Biologii i Nauk o Ziemi U. M. C. S  
Kierownik: Prof. dr Adam Paszewski

Jerzy TROJANOWSKI

**Rozdział chromatograficzny kwasów hymatomelanowych na celulozie**

**Разделение гиматомелановых кислот при помощи хроматографии на целлюлозе**

**Chromatography of Hymatomelanic Acids upon the Cellulose**

**Wstęp**

Powszechnie dotychczas stosowane chemiczne metody przygotowywania preparatów substancji humusowych nie dają możliwości rozdzielania naturalnych kompleksów tych związków na pojedyncze składniki (1). Nieznajomość poszczególnych składników humusu i ich niedostateczny rozdział przy pomocy klasycznych metod znacznie utrudniają postęp w badaniach biochemizmu powstawania humusu i jego oddziaływania na rośliny. Postęp tych badań ma duże znaczenie zarówno teoretyczne, jak i praktyczno-rolnicze.

Zazwyczaj przyjmuje się za Odenem (14) podział związków humusowych na 3 główne grupy z uwagi na ich rozpuszczalność:

- I — kwasy fulwonowe — rozpuszczalne w wodzie,
- II — kwasy hymatomelanowe (albo ulminowe) — rozpuszczalne w etanolu,
- III — kwasy huminowe — rozpuszczają się w wodnych roztworach alkaliów, szczawianu sodu i fluorku sodu.

Między tymi umownie przyjętymi grupami związków istnieje szereg substancji o charakterze przejściowym (29), ponieważ wymię-

nione rozpuszczalniki nie działają ściśle wybiórczo w stosunku do poszczególnych grup. Podział Odena ma obecnie uzasadnienie raczej historyczne niż chemiczne. Kwasy fulwonowe i hymatomelanowe uważane są przez niektórych autorów (13) za stadium poprzedzające syntezę kwasów huminowych.

Przy pomocy konwencjonalnych metod ekstrakcji (23, 20, 21) otrzymuje się z gleb i torfów preparaty o dość złożonym składzie, zawierające głównie szeregi homologiczne związków humusowych o różnym stopniu polimeryzacji (18).

Zawierają one domieszkę substancji towarzyszących, jak np. estry kwasów żywicowych, poliuronidy, garbniki, kwas krzemowy i inne (16, 29). Skład tych preparatów trudno jest więc zdefiniować chemicznie, tym bardziej, gdy pochodzą one z różnych materiałów próchnicznych, powstających w niejednakowych warunkach klimatycznych i mikrobiologicznych. Używanie niezdefiniowanych chemicznie preparatów humusu do doświadczeń biologicznych powoduje duże trudności przy porównywaniu i ocenie wyników, podawanych przez badaczy tych zagadnień (29).

Wydaje się więc rzeczą celową poszukiwanie nowych sposobów izolowania i oczyszczania substancji humusowych w celu uzyskania jednostek określonych pod względem składu chemicznego i czystości. Mając to na uwadze, autor podjął próbę chromatograficznego rozdzielania kwasów hymatomelanowych na skalę preparatywną.

### **Dotychczasowe badania nad zastosowaniem chromatografii do wyodrębniania substancji humusowych**

W celu rozdzielania grupy kwasów fulwonowych zastosował Forsyth (6) w r. 1947 analizę adsorpcyjną na węglu aktywnym. Nie używano kolumn lecz lejki Büchnera, w których formowano warstwę adsorbenta o grubości 5 cm i średnicy 15 cm. Adsorpcja kwasów fulwonowych przebiegała z roztworu wodnego, zakwaszonego do pH 2,5—3. Przy pomocy eluowania adsorbenta różnymi rozpuszczalnikami (roztwór 0,1 n HCl, aceton + 10% wody, woda, roztwór 0,5 n NaOH) uzyskał Forsyth 4 frakcje kwasów fulwonowych oraz przeprowadził ich analizę elementarną i jakościową.

W r. 1952 rozdzielił Trojanowski (26) wyciąg etanolowy kwasów hymatomelanowych z torfu przy pomocy chromatografii kolumnowej na tlenku magnezu (MgO gruboziarnisty). Do rozwijania chromatogramu zastosowano układ: kwas olejowy — etanol (w stosunku 1:7,5 obj.). Postępowano się lampą analityczną kwarcową dla indykacji warstw na kolumnie. Mechanicznie wydzielone warstwy chromatogramu eluowano przy pomocy kwasu solnego przy pH 2. Autor wskazał

również na możliwość zastosowania pasków bibuly do analizy chromatograficznej kwasów hymatomelanowych.

Thiele i Kettner (24) ogłosili w roku 1953 metodę oddzielania grupy kwasów huminowych od frakcji kwasów fulwonowych i hymatomelanowych za pomocą elektroforezy na bibule. Rozdział tych grup prowadzono w roztworze zbuforowanym przy pH 8, pod napięciem 220—400 V.

Hayashi Tsunetomo i Nagai Takeo (9) rozdzielali uwolnione od substancji bitumicznych kwasy huminowe na 3 bądź 4 frakcje na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu. Dla indykacji warstw używano lampy kwarcowej.

Drozdowa (4) rozwinęła metodę Forsyth'a (6) przez wprowadzenie dodatkowego oczyszczania frakcji kwasów fulwonowych na kationicie.

### Badania własne

Jak wynika z piśmiennictwa grupa kwasów hymatomelanowych jest dotychczas najmniej zbadaną frakcją humusu. W niniejszej pracy podjęto próbę wyodrębnienia rozpuszczalnych w acetonie składników tej frakcji.

Przy opracowywaniu metody przyjęto następujące założenia:

- 1) Metoda powinna umożliwiać wyodrębnianie składników kwasów hymatomelanowych na skalę preparatywną.
- 2) Proces ekstrahowania wyjściowych materiałów próchnicznych oraz chromatograficznego rozdzielania uzyskanych przez ekstrakcję wyciągów powinien się odbywać bez użycia alkaliów, w temperaturze nie wyższej niż 60° oraz w warunkach zapobiegających utlenieniu preparatów. Istnieją bowiem wypowiedzi, że substancje humusowe łatwo utleniają się na powietrzu wobec alkaliów (2, 1), a nawet ulegają pod ich działaniem rozkładowi na związki prostsze (17, 20, 21, 22). Działanie rozkładające wywiera także temperatura ponad 100° (27), a nawet spotyka się wypowiedzi, że temp. 60° jest najwyższą dopuszczalną cieplotą, nie powodującą zmian chemicznych w substancjach humusowych (29).

Dopuszczono natomiast użycie w opracowywanej metodzie rozcieńczonych roztworów kwasu solnego, ponieważ powszechnie przyjmuje się, że związki humusowe są bardzo odporne na działanie rozcieńczonych kwasów mineralnych (8, 29). Traktowanie wyjściowych materiałów próchnicznych roztworem kwasu solnego przed właściwą ekstrakcją jest z reguły zalecane w celu rozłożenia nierozpuszczalnych w wodzie i alkoholu połączeń humusu z wapniem i żelazem (1, 2, 14, 20, 21, 29).

### Ekstrakcja materiału

Kwasy hymatomelanowe wydzielano z ziemi kompostowej i z torfu. Próbki ziemi kompostowej pochodziły z przyzmy dwu-, cztero-, i częściolletnich; materiałem do kompostowania były liście drzew różnych gatunków. Próbki torfu pochodziły z miejscowości Oborniki w woj. Poznańskim (torf wysoki) oraz z łąk nadbystrzyckich pod Lublinem (torf niski).

Materiał próchniczny powietrznie suchy rozdrobiono i przesiano. Substancje bitumiczne usuwano z materiału przez wyczerpującą ekstrakcję w aparatach Soxhleta przy pomocy mieszaniny benzenu z etanolem w stosunku 1:1, zgodnie z przyjętą zasadą (3, 7, 19).

Pozbawiony bitumin materiał mywano roztworem 0,2 n HCl w celu rozłożenia nierozpuszczalnych połączeń kwasów hymatomelanowych z Ca i Fe. Przemywanie prowadzono na lejkach Büchnera, utrzymując ciągle przepływ cieczy przez warstwę materiału. Gdy przesącz nie zawierał już jonów żelaza i wapnia przepłukano materiał wodą dest. wielokrotnie, aż do usunięcia jonów chloru. Tak przemity materiał pozbawiony był nie tylko wymywalnych roztworem 0,2 n HCl jonów nieorganicznych, lecz także wszystkich rozpuszczalnych w kwasie solnym i w wodzie związków organicznych towarzyszących humusowi (27) oraz kwasów fulwonowych.

W celu wydzielenia kwasów hymatomelanowych ekstrahowano przepłukany wodą materiał kilkakrotnie przy pomocy 95-procentowego etanolu w zamkniętych naczyniach, w temp. pokojowej. Z 1 kg materiału próchnicznego uzyskiwano łącznie około 20 litrów wyciągu etanolowego.

W celu zagęszczenia roztworu, a także częściowego oczyszczenia zawartych w nim substancji humusowych, wykorzystano zdolność kwasów hymatomelanowych do tworzenia nierozpuszczalnych połączeń z wapniem. Do wyciągu etanolowego dodano roztworu 5-procentowego octanu wapnia w stosunku 50 ml octanu na 1000 ml wyciągu. Kwasy hymatomelanowe wytrącały się w postaci ciemno brązowego, kłaczkowatego osadu (połączenia z Ca). Pozostały nad osadem roztwór niestrącalnych przy pomocy octanu wapnia związków towarzyszących miał barwę żółto-pomarańczową. Wartość pH = 6,8 podczas strącania ustalano przy pomocy pehametru lampowego z elektrodą szklaną i nasyconą kalomelową; w celu zobojętnienia kwasu octowego, uwalniającego się w toku reakcji, dodawano kilka ml roztworu 0,1 n NaOH.

Strącanie odbywało się w zamkniętych na szlif cylindrach szklanych o wysokości 75 cm i średnicy 8 cm, w których strął sedymentował przez 12 godzin. Osad po sedymentacji odwirowywano z szybkością 5000 obr./min. W celu uwolnienia odwirowywanego preparatu od wapnia poddawano go niezwłocznie wyplukiwaniu przy pomocy 0,5 n roztworu HCl aż do zaniku reakcji na Ca (ze szczawianem). Na koniec przemyto osad kwasów hymatomelanowych roztworem 0,1 n HCl i wodą dest. Całkowite wmywanie osadu z pozostałości HCl nie jest wskazane wobec łatwej peptyzacji wydzielonych substancji w wodzie. Podczas odwirowywania i przemywania osad pozostawał w tych samych naczyniach do wirowania, zamkniętych szczelną przykrywką celofanową.

Przemyty osad kwasów hymatomelanowych rozpuszczano w acetonie, nieznaczną pozostałość nierozpuszczalną w acetonie usuwano przez odwirowanie w szczelnie zamkniętym naczyniu. Uzyskane w ten sposób z różnych materiałów wyjściowych wyciągi acetonowe frakcjonowano przy pomocy chromatografii.

### **Chromatografia acetonowego wyciągu kwasów hymatomelanowych**

Przy opracowywaniu warunków chromatografowania autor starał się unikać stosowania takich odczynników, których ślady trudno byłoby usunąć potem całkowicie z preparatów, przeznaczonych między innymi i do doświadczeń biologicznych (np. pirydyna). Wykluczono również stosowanie alkaliów i silnych kwasów z przyczyn podanych poprzednio.

Kwasy hymatomelanowe rozpuszczają się dobrze tylko w niewielu rozpuszczalnikach organicznych. Przy dobieraniu układu rozpuszczalników do chromatografii należało więc wypróbować przede wszystkim alkohole i aceton, w których ta grupa substancji dobrze się rozpuszcza.

Wykonano szereg wstępnych prób z różnymi alkoholami (metylowy, etylowy, izopropylowy, n-butyłowy) oraz z mieszaninami alkoholów, acetonu i wody. Jako adsorbenta używano celulozy sproszkowanej Whatmana i hibuly Whatmana Nr 1 (stosując na hibule technikę wstępującą i krążkową).

Ponieważ ilość składników w badanych wyciągach acetonowych oraz ich zdolność adsorbowania się na celulozie były nieznane, więc

za kryterium przydatności układu rozpuszczalników przyjęto maksymalną ilość stref uzyskanych na chromatogramie bibulowym oraz możliwie duże zróżnicowanie wartości współczynników  $R_f$ . Po przeprowadzeniu kilkuset prób ustalono, że do rozdzielania acetonowego roztworu kwasów hymatomelanowych nadaje się układ n-butanol — aceton — woda. Dla indykacji stref posługiwano się analityczną lampą kwarcową z filtrem Wood'a.

W toku doświadczeń nad ustaleniem optymalnego stosunku n-butanolu do wody i acetonu poczyniono następujące obserwacje:

1) Optymalny stosunek objętościowy n-butanolu do acetonu wynosi 1:1.

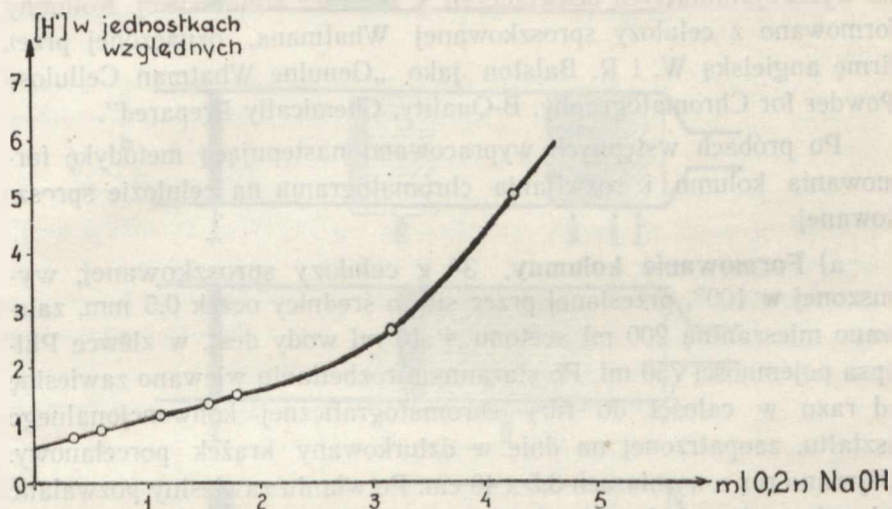
2) Wzrost od 2 — 50% zawartości wody w układzie zwiększa wartość współczynników  $R_f$ . Jednak przy zawartości wody powyżej 15% otrzymuje się zbyt małe różnice w wartościach  $R_f$  poszczególnych stref.

3) Zakwaszenie badanych roztworów acetonowych kwasem solnym powoduje wzrost wartości  $R_f$ . Ponieważ bezpośredni pomiar bezwzględnej wartości stężenia jonów wodorowych w roztworach niewodnych nie jest możliwy (28), określano to stężenie w jednostkach względnych. Przeprowadzono w tym celu następujące doświadczenia wstępne: Do 75 ml acetonowego roztworu kwasów hymatomelanowych o stężeniu 4 mg/ml dodano 0,6 ml roztworu 1n HCl. Tak zakwaszony roztwór miareczkowano przy pomocy 0,2 n NaOH, śledząc zmiany potencjału wobec elektrody szklanej i kalomelowej nasyconej (włączanej przez klucz agarowy). Na skali pH użytego pehametru lampowego dokonywano odczytu, uważając znalezione wartości za proporcjonalne do stężenia jonów wodorowych (w jednostkach względnych); pomiary są porównywalne tylko pod warunkiem zachowania identycznych parametrów doświadczenia (28). Na rys. 1 podana jest zależność między stężeniem HCl w roztworze acetonowym kwasów hymatomelanowych a potencjałem mierzonym między elektrodą szklaną a kalomelową.

Wykonano chromatogramy bibulowe odpowiadające poszczególnym etapom zakwaszenia roztworu. Znalezione w ten sposób optymalne dla celów chromatograficznych stężenie jonów wodorowych wynosiło 1 (w omówionej skali względnej).

Rozdział chromatograficzny kwasów hymatomelanowych według opisaney metody jest możliwy przy zakwaszeniu roztworu acetonowego kwasem solnym w zakresie od 0,6 do 2 przyjętych jednostek

względnych. Poniżej wartości 0,6 strefy na chromatogramie grupują się zbyt blisko czoła układu rozpuszczalników. Powyżej wartości 2 — strefy skupiają się w pobliżu linii startowej.



Rys. 1. Zależność potencjału roztworu acetonowego kwasów hymatomelanowych od zawartości kwasu solnego.

Na osi rzędnych podano odczyt na skali pH pehametru lampowego przy użyciu elektrody szklanej i kalomelowej nasyconej. Wielkość tę uważano za miarę stężenia jonów  $H^+$  w jednostkach względnych.

Na osi odciętych podane są objętości roztworu NaOH, którym miareczkowano zakwaszony kwasem solnym roztwór.

Określenie kwasowości roztworów acetonowych w jednostkach względnych przy pomocy pehametru przeprowadzono następnie we wszystkich dalszych doświadczeniach, ustalając ją na wartość optymalną = 1. Dbano o zachowanie jednakowej zawartości wody w badanych roztworach (1 ml wody na 100 ml), gdyż konieczne jest zachowanie jednakowych warunków doświadczenia.

4) Do rozdzielania na bibule nadają się także roztwory acetonowe kwasów hymatomelanowych pozbawione HCl przy pomocy kationitu; wyciągi takie chromatografowano na bibule nasyconej zakwaszonym układem rozpuszczalników i rozwijano w układzie z dodatkiem HCl. Bibulę nasycono techniką wstępującą w zamkniętej kamerze szklanej, przed naniesieniem próbek.

## Chromatografia kolumnowa na celulozie

Pomyślne wyniki wstępnych prób chromatografowania roztworu acetonowego kwasów hymatomelanowych na bibule skłoniły autora do wykorzystania tych doświadczeń w technice kolumnowej. Kolumny formowano z celulozy sproszkowanej Whatmana, oznaczonej przez firmę angielską W. i R. Balston jako „Genuine Whatman Cellulose Powder for Chromatography, B-Quality, Chemically Prepared”.

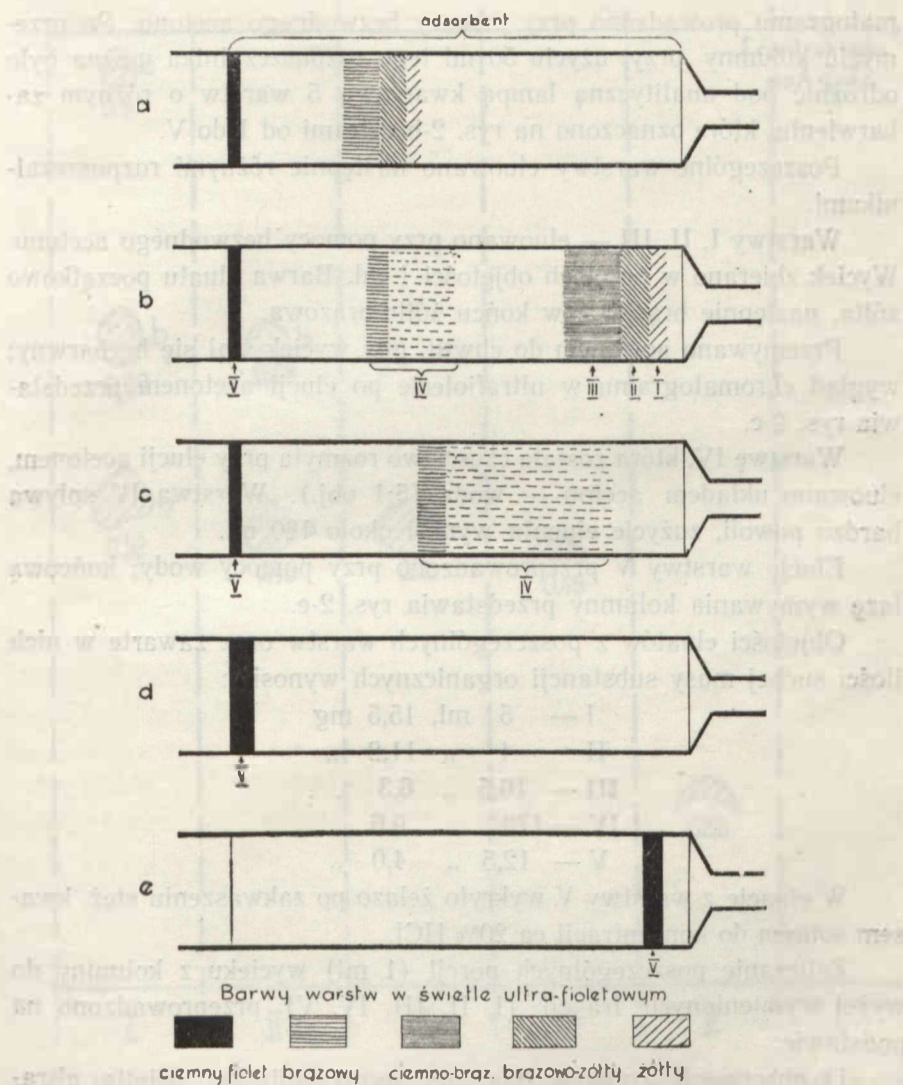
Po próbach wstępnych wypracowano następującą metodykę formowania kolumn i rozwijania chromatogramu na celulozie sproszkowanej:

a) **Formowanie kolumny.** 30 g celulozy sproszkowanej, wysuszonej w  $100^{\circ}$ , przesianej przez sito o średnicy oczek 0,5 mm, zalewano mieszaniną 200 ml acetonu + 10 ml wody dest. w zlewce Philipsa pojemności 750 ml. Po starannym rozbeltaniu wlewano zawiesinę od razu w całości do rury chromatograficznej konwencjonalnego kształtu, zaopatrzonej na dnie w dziurkowany krążek porcelanowy. Używano rur o wymiarach 3,5 x 40 cm. Po włąniu zawiesiny pozwalano jej sedymentować dopóki odciekał aceton. Następnie lekko naciskano prętym szklanym na górną powierzchnię uformowanego słupa celulozy, powodując tym wyciśnięcie dalszych ilości acetonu. Naciskanie powtarzano wielokrotnie, bardzo równomiernie i lekko. Osiąga się w ten sposób dokładne ułożenie adsorbenta w rurze i jego należytą przepuszczalność dla cieczy. Odsysanie nadmiaru acetonu pod zmniejszonym ciśnieniem nie jest tu odpowiednie, gdyż powoduje z reguły odstawanie słupa adsorbenta od ścian, co uniemożliwia chromatografowanie.

Na uformowany w ten sposób słup adsorbenta nakładano krążek porcelanowy dziurkowany (od tygla Goocha). Na kolumnę wlewano 8 ml acetonowego roztworu kwasów hymatomelanowych otrzymanego z ziemi kompostowej w sposób poprzednio opisany. Chromatografowany roztwór zawierał 6 mg/ml suchej substancji. Pozorna wartość pH (wobec elektrody szklanej i kalomelowej) wynosiła 1 w jednostkach względnych.

b) **Rozwijanie i elucja.** W celu rozwinięcia chromatogramu wlewano na kolumnę 25 ml układu: n-butanol nasycony  $H_2O$  — aceton (1:1 obj.). Wygląd kolumny w świetle ultrafioletowym po przemyciu powyższym układem przedstawia rysunek 2-a. Dalsze rozwijanie chro-





Rys. 2. Kolejne stadia rozwijania i elucji chromatogramu kolumnowego kwasów hymatomelanowych.

Rozdzielano wyciąg acetonowy z ziemi koinpostowej cztero-letniej, którego stężenie jonów  $H^+$  = 1,1 w jednostkach względnych, przyjętych poprzednio. Barwy podane na rysunku widoczne są pod lampą kwarcową analityczną. Kolejne stadia.

a = chromatogram po przeniesieniu przy pomocy 25 ml układu: n-butanol nasycony wodą — aceton (1:1 obj.).

b = chromatogram po rozwinięciu powyższym układem i przemyciu acetonem (50 ml).

c = chromatogram po elucji acetonem warstw I, II i III. Warstwa IV częściowo rozmyta.

d = chromatogram po elucji warstwy IV przy pomocy układu: aceton — woda (5:1 obj.).

e = końcowa faza elucji warstwy V.

matogramu prowadzono przy pomocy bezwodnego acetonu. Po przemyciu kolumny przy użyciu 50 ml tego rozpuszczalnika można było odróżnić pod analityczną lampą kwarcową 5 warstw o różnym zabarwieniu, które oznaczono na rys. 2-b cyframi od I do V.

Poszczególne warstwy eluowano następnie różnymi rozpuszczalnikami.

Warstwy I, II, III — eluowano przy pomocy bezwodnego acetonu. Wyciek zbierano w porcjach objętości 1 ml. Barwa eluatu początkowo żółta, następnie brązowa, w końcu żółto-brązowa.

Przemywano acetonem do chwili, gdy wyciek stał się bezbarwny; wygląd chromatogramu w ultrafiolecie po elucji acetonem przedstawia rys. 2-c.

Warstwę IV, która została częściowo rozmyta przy elucji acetonem, eluowano układem aceton — woda (5:1 obj.). Warstwa IV spływa bardzo powoli, zużycie eluentu wynosi około 180 ml.

Elucję warstwy V przeprowadzono przy pomocy wody; końcową fazę wymywania kolumny przedstawia rys. 2-e.

Objętości eluatów z poszczególnych warstw oraz zawarte w nich ilości suchej masy substancji organicznych wynosiły:

|       |        |         |
|-------|--------|---------|
| I —   | 5 ml,  | 15,5 mg |
| II —  | 4 „    | 11,2 „  |
| III — | 10,5 „ | 6,3 „   |
| IV —  | 178 „  | 9,6 „   |
| V —   | 12,5 „ | 4,0 „   |

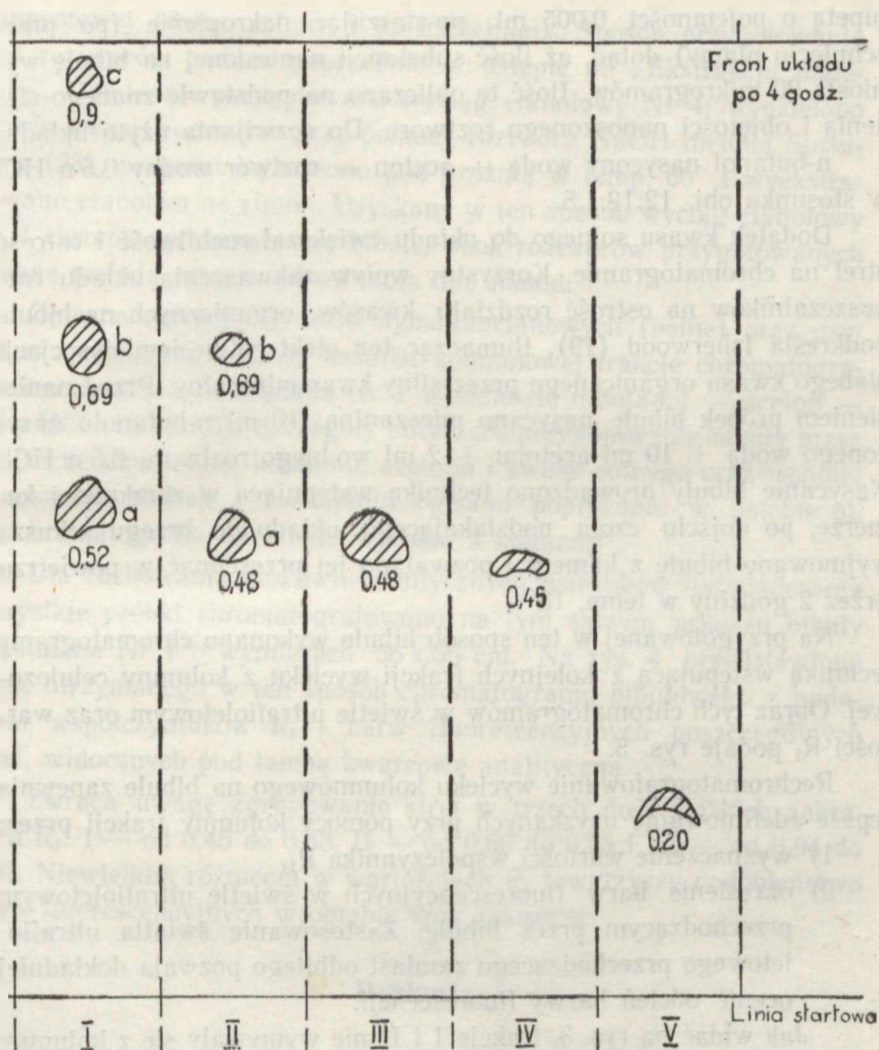
W eluacie z warstwy V wykryto żelazo po zakwaszeniu stęż. kwasem solnym do koncentracji ca 20% HCl.

Zaliczanie poszczególnych porcji (1 ml) wycieku z kolumny do wyżej wymienionych frakcji (I, II, III, IV, V) przeprowadzono na podstawie:

- 1) obserwacji kolumny podczas wymywania w świetle ultrafioletowym,
- 2) kontrolnej rechromatografii próbek wycieku na bibule Whatmana Nr 1 (opis zamieszczony poniżej).

### **Rechromatografia wycieku z kolumny na bibule**

Z każdego ml wycieku, odpowiadającego warstwom I, II, III, IV i V na kolumnie, pobierano próbki w celu wykonania rechromatografii na arkuszu bibuly Whatmana Nr 1. Roztwory nanoszono mikro-



Rys. 3. Chromatogramy bibułowe sporządzone z kolejnych próbek wycieku z kolumny celulozy.

Bibuła Whatmana Nr 1 impregnowana układem butanol — aceton — 0,5 n HCl; chromatogram rozwijany układem n-butanol — aceton — 0,5 n HCl (12:12:1,5).

Cyfry rzymskie oznaczają kolejne frakcje wymyte z kolumny; oznaczenie tych frakcji podane jest w objaśnieniu do rys. 2. Liczby ułamkowe oznaczają współczynniki  $R_f$ .

W świetle ultrafioletowym przechodzącym przez bibułę stwierdzono następujące barwy stref:

Ia — jasno oliwkowa, Ib — żółta, Ic — jasno żółta, IIa — oliwkowa, IIb — jasno żółta, III — brązowo oliwkowa, IV — ciemno oliwkowa, V — fioletowo brunatna.

pipetą o pojemności 0,005 ml, powtarzając nakropienie (po przeschnięciu plamy) dołąd, aż ilość substancji naniesionej na bibulę wyniosła 20 mikrogramów. Ilość tę obliczano na podstawie znanego stężenia i objętości nanoszonego roztworu. Do rozwijania, użyto układu:

n-butanol nasycony wodą — aceton — roztwór wodny 0,5 n HCl w stosunku obj. 12:12:1,5.

Dodatek kwasu solnego do układu zwiększał ruchliwość i ostrość stref na chromatogramie. Korzystny wpływ zakwaszenia układu rozpuszczalników na ostrość rozdzielu kwasów organicznych na bibule podkreśla Isherwood (19), tłumacząc ten efekt cofnięciem dysocjacji słabego kwasu organicznego przez silny kwas mineralny. Przed naniesieniem próbek bibulę nasycono mieszaniną: 10 ml n-butanolu nasyconego wodą + 10 ml acetonu + 2 ml wodnego roztworu 0,5 n HCl. Nasycanie bibuly prowadzono techniką wstępującą w zamkniętej kamrze, po dojściu czola podsiąkającego układu do brzegu arkusza wyjmowano bibulę z kamery i pozwalano jej przeschnąć w powietrzu przez 2 godziny w temp. 18°C.

Na przygotowanej w ten sposób bibule wykonano chromatogramy techniką wstępującą z kolejnych frakcji wycieku z kolumny celulozowej. Obraz tych chromatogramów w świetle ultrafioletowym oraz wartości  $R_f$  podaje rys. 3.

Rechromatografowanie wycieku kolumnowego na bibule zapewnia lepsze zdefiniowanie uzyskanych przy pomocy kolumny frakcji przez:

- 1) wyznaczenie wartości współczynnika  $R_f$ ,
- 2) określenie barw fluorescencyjnych w świetle ultrafioletowym przechodzącym przez bibulę. Zastosowanie światła ultrafioletowego przechodzącego zamiast odbitego pozwala dokładniej ocenić odcień barwy fluorescencji.

Jak widać na rys. 3, frakcje I i II nie wymywały się z kolumny celulozy selektywnie i muszą być celem oddzielenia rechromatografowane na bibule. Elucja poszczególnych plam z bibuly jest możliwa przy pomocy wody.

Frakcje III, IV i V przedstawiają się w opisanych warunkach na bibule jako jednorodne.

### Porównanie różnych materiałów wyjściowych

Przy użyciu opisanej metody chromatografii kolumnowej rozdzielono na celulozie roztwory acetonowe kwasów hymatomelanowych uzyskane z 2 próbek torfu (niskiego i wysokiego) oraz z 3 próbek ziemi

kompostowej (dwu-, cztero- i sześciolelniej). Sposób przygotowania tych roztworów podano poprzednio w ustępie pt. „Ekstrakcja materiału”. Odmienne przygotowano wyciąg etanolowy Nr 4; wydzielono z torfu kwasy huminowe przy pomocy roztworu NaOH metodą Springera (23), preparat wysuszone pod próżnią w temp. 60° i wyekstrahowano etanolem na zimno. Uzyskany w ten sposób wyciąg etanolowy Nr 4 chromatografowano na bibule, obok roztworów przygotowanych własną metodą, w celu porównania obu metod.

Opisane roztwory kwasów hymatomelanowych (pełne) oraz uzyskane z nich przy pomocy techniki kolumnowej frakcje chromatografowano na bibule Whatmana Nr 1 w układzie n-butanol — aceton — 0,5 n HCl (12:12:1,5). Szczegóły dotyczące przygotowania bibuły przez nasycenie mieszaniną butanolu, acetonu i kwasu solnego oraz techniki nanoszenia próbek i rozwijania opisano poprzednio w ustępie pt. „Rechromatografia na bibule wycieku z kolumny”.

Dla zachowania możliwie identycznych warunków doświadczenia wszystkie próbki chromatografowano na tym samym arkuszu bibuły Whatmana Nr 1 o wymiarach 56 x 56 cm. Na rys. 4 przedstawiono część otrzymanego w ten sposób chromatogramu bibułowego z podaniem współczynników  $R_f$  i barw fluorescencyjnych poszczególnych stref, widocznych pod lampą kwarcową analityczną.

Zwraca uwagę zgrupowanie stref w trzech dość wąskich zakresach  $R_f$ : I — od 0,45 do 0,53, II — od 0,69 do 0,73 i III — od 0,94 do 0,95. Niewielkim różnicom w wartościach  $R_f$  towarzyszy podobieństwo barw fluorescencyjnych w obrębie tych zakresów.

### Dyskusja

Opisana metoda rozdzielania kwasów hymatomelanowych na celulozie jest wynikiem dalszego ciągu badań nad frakcjonowaniem humusu, zapoczątkowanych przez autora w roku 1952 (26). Poprzednio ogłoszona metoda rozdziału chromatograficznego substancji humusowych na tlenku magnezu (26) nastroczała trudności w stadium elucji. Warstwy chromatogramu należało najpierw wydobyć mechanicznie z kolumny a potem dopiero kolejno eluować.

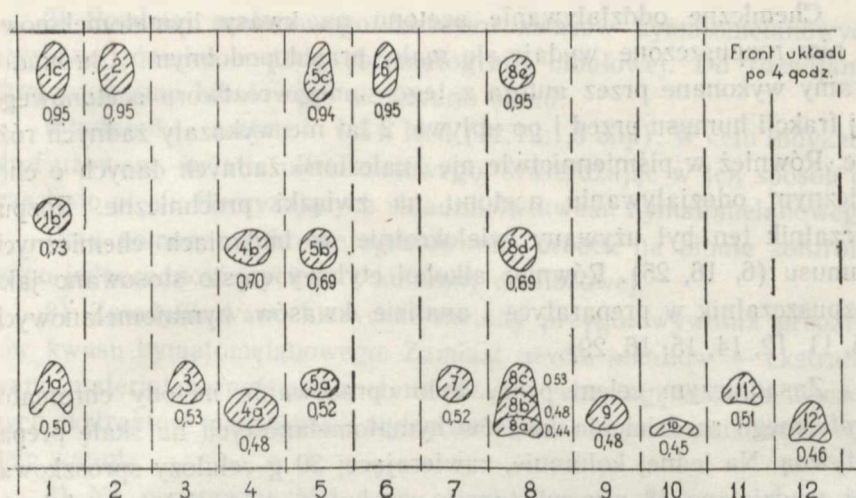
Obecnie opracowana metoda usuwa te trudności; elucję warstw z celulozy przeprowadza się przez wymywanie kolumny różnymi rozpuszczalnikami.

Zmodyfikowano również proces zagęszczenia wyciągów alkoholowych z materiałów próchnicznych. Zamiast uciążliwego oddestylowania alkoholu pod próżnią z wielu dziesiątków litrów ekstraktu (20 l z 1 kg materiału) zastosowano wytrącanie kwasów hymatomelanowych z roztworu etanolowego za pomocą octanu wapnia; wapń usuwano następnie przez wymywanie osadu roztworem kwasu solnego. Przez wytrącanie kwasów hymatomelanowych z wapniem osiąga się nadto częściowe usunięcie substancji nieswoistych — towarzyszących, niestrącalnych przez Ca. Działanie związkami wapnia na kwasy hymatomelanowe nie powoduje powstawania artefaktu, gdyż w naturalnych materiałach próchnicznych występują te kwasy często w połączeniach z wapniem.

Pewne ograniczenie w zakresie stosowalności opracowanej metody wynika z zastosowania acetonu jako ostatecznego rozpuszczalnika do chromatografii zamiast etanolu, w którym rozpuszcza się prawdopodobnie większa ilość składników humusu (16). Wybór acetonu podyktowany był m. in. koniecznością dostosowania rozpuszczalnika do charakteru sorbenta i warunków rozwijania chromatogramu. Acetonu używano tylko jako rozpuszczalnika do chromatografii, natomiast wydzielanie substancji humusowych z materiału odbywało się przez bezpośrednią ekstrakcję etanolem. Uzasadnienie tego sposobu ekstrakcji znajduje się zarówno w poprzedniej pracy autora (26), jak i na rys. 4 w niniejszej publikacji. Z porównania chromatogramów Nr 1 i Nr 4 na rys. 4 wynika, że roztwór kwasów hymatomelanowych uzyskany przez wyekstrahowanie etanolem preparatu humusowego, przygotowanego według Springera (23), różni się swymi składnikami od wyciągów otrzymanych metodą autora. Istotna różnica polega na braku składnika o wartości  $R_f$  0,94—0,95. Pozostałe strefy chromatogramów Nr 1 i Nr 4 wykazują zbliżone wartości  $R_f$ .

Wydaje się zatem, że bezpośrednia ekstrakcja materiału etanolem daje pełniejszy skład frakcji „kwasów hymatomelanowych”, niż zwykle stosowane metody pośrednie (5, 11, 12, 14, 15, 16, 29). Na podkreślenie zasługuje występowanie składnika o współczynniku  $R_f = 0,95$  zarówno w wyciągach z torfów, jak i ziemi kompostowej, przygotowanych według opisanej powyżej metody.

Użycie celulozy jako sorbenta usuwa prawdopodobieństwo przebiegu reakcji katalitycznych na jego powierzchni, zmniejszając tym samym ryzyko powstawania artefaktu. W tym celu wykluczono również użycie alkaliów.



Rys. 4. Chromatogramy bibulowe wyciągów kwasu hymatomelanowego, pochodzących z różnych materiałów wyjściowych oraz niektórych frakcji wydzielonych z tych wyciągów na kolumnie celulozy.

- 1 = wyciąg acetonowy Nr 1 (z torfu niskiego). Barwy stref: 1a — ciemno żółta, 1b — jasno brązowa, 1c — brązowo żółta.
- 2 = I frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu Nr 1. Barwa ciemno brązowa.
- 3 = III frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu Nr 1, barwa ciemno żółta.
- 4 = wyciąg etanolowy z preparatu humusowego, przygotowanego klasyczną metodą przy użyciu NaOH z torfu niskiego. 4a — barwa żółta, 4b — barwa żółta.
- 5 = wyciąg acetonowy Nr 5 (z torfu wysokiego). Barwy stref: 5a — oliwkowa, 5b — brązowa, 5c — brązowo oliwkowa.
- 6 = I frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu Nr 5. Barwa ciemno brązowa.
- 7 = III frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu Nr 5. Barwa oliwkowa.
- 8 = wyciąg acetonowy Nr 8 z ziemi kompostowej 4-letniej. Barwy stref: 8a — ciemno oliwkowa, 8b — brązowo oliwkowa, 8c — oliwkowa, 8d — jasno żółta, 8e — jasno żółta.
- 9 = III frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu Nr 8. Barwa brązowo oliwkowa.
- 10 = IV frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu Nr 8. Barwa ciemno oliwkowa.
- 11 = II frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu ziemi kompostowej dwuletniej. Barwa oliwkowa.
- 12 = III frakcja wydzielona techniką kolumnową z wyciągu ziemi kompostowej dwuletniej. Barwa oliwkowa.

UWAGA: podane barwy stref widoczne są w świetle ultrafioletowym przechodzącym. Liczby ułamkowe na rysunku oznaczają wartości  $R_f$ . Oznaczenia frakcji kolumnowych zgodnie z rys. 2.

Chemiczne oddziaływanie acetonu na kwasy hymatomelanowe w nim rozpuszczone wydaje się mało prawdopodobnym. Chromatogramy wykonane przez autora z tego samego roztworu acetonowego tej frakcji humusu przed i po upływie 2 lat nie wykazały żadnych różnic. Również w piśmiennictwie nie znaleziono żadnych danych o chemicznym oddziaływaniu acetonu na związki próchniczne. Rozpuszczalnik ten był używany wielokrotnie w badaniach chemicznych humusu (6, 16, 25). Również alkohol etylowy często stosowano jako rozpuszczalnik w preparatyce i analizie kwasów hymatomelanowych (5, 11, 12, 14, 15, 16, 29).

Zasadniczym celem pracy było opracowanie metody chromatograficznego rozdzielania kwasów hymatomelanowych na skalę preparatywną. Na jednej kolumnie, zawierającej 30 g celulozy sproszkowanej rozdzielano 48 mg substancji, uzyskując dość dobrą wydajność łączną eluatów (46,6 mg). Warstwy I i II z wyciągów z ziemi kompostowej nie udało się rozdzielić przy pomocy kolumny, lecz rozdział ich jest możliwy na bibule w układzie rozpuszczalników zakwaszonych kwasem solnym. Pozostałe warstwy chromatogramów kolumnowych z wyciągów z ziemi kompostowej wydają się być jednorodne także i na chromatogramie bibulowym w układzie z HCl. Warstwę I na chromatogramach z wyciągu z torfów udało się wyciągnąć z kolumny selektywnie, podobnie jak i pozostałe warstwy z tych wyciągów.

Wydaje się, że warstwa V na chromatogramie z wyciągu ziemi kompostowej (rys. 3) jest połączeniem żelazo-organicznym humusu, opisywanym przez Aleksandrową (1).

Niewielkie różnice w wartościach  $R_f$ , jakie znaleziono dla stref w zakresie  $R_f$  od 0,46 do 0,53 zdają się potwierdzać pogląd o możliwości występowaniu wśród związków humusowych homologicznych szeregów polimerów (18).

### Wnioski

1) Zastosowano metodę chromatografii kolumnowej na celulozie sproszkowanej Whatmana do rozdzielania i wyodrębnienia na skalę preparatywną składników frakcji humusu zwanej kwasem hymatomelanowym, rozpuszczalnych w acetonie.

Do rozwijania chromatogramu kolumnowego użyto układu: n-butanol nasycony wodą — aceton (1:1 obj.).



2) Rozdział acetonowego roztworu kwasów hymatomelanowych uzyskano również metodą chromatografii bibułowej. Do rozwijania chromatogramu bibułowego stosowano układ:

n-butanol — aceton — 0,5 n HCl (12:12:1,5 obj.). W celu indykacji stref używano światła ultrafioletowego, stwierdzając w ten sposób od trzech do pięciu fluoryzujących składników kwasu hymatomelanowego.

Przy pomocy rechromatografowania próbek na bibule kontrolowano jednorodność wycieku z kolumny celulozowej.

3) Zmodyfikowano klasyczne metody przygotowywania preparatów kwasu hymatomelanowego. Zamiast użycia alkaliów — ekstrahowano materiał bezpośrednio etanolem. W celu zagęszczenia uzyskanych ekstraktów etanolowych wytrącano kwasy hymatomelanowe octanem wapnia.

4) Na podstawie zbliżonego rozmieszczenia stref na chromatogramie (w trzech wąskich zakresach  $R_f$ ) można sądzić, że budowa chemiczna badanych składników kwasu hymatomelanowego, pochodzącego z różnych materiałów wyjściowych, jest zbliżona.

#### PISMIENICTWO

1. Aleksandrowa I. N. — Poczwoedienije, 1954, 1, 14.
2. Biber W. A. — Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1952, 83, 1.
3. Biber W. A., Bogolubow N. S. — Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1951, 76.
4. Drozdowa T. W. — Poczwoedienije, 1955, 1, 83.
5. Ehlandt H. K. — Die natürliche Huminsäuren, Diss. Techn. Hochsch. Breslau, 1924 (cytowane według Waksman S. A., „Humus“, London, 1936, na str. 53).
6. Forsyth W. G. C. — Biochem. J. 1947, 41, 176.
7. Fuchs W. — Die Chemie der Kohle. Berlin, 1931.
8. Grosskopf W. — Brennstoff — Chemie, 1926, 7, 295.
9. Hayashi Tsunetomo, Nagai Takeo — J. Sci. Soil Manure, Japan, 1955, 25, 285.
10. Isherwood F. — Biochem. J., 1946, 40, 688.
11. Kondratiew E. W. — Zurn. prikl. chimii, 1940, 12.
12. Kucharenko T. A. — Zurn. prikl. chimii, 1948, 21.
13. Laatsch W., Bauer I., Bieneck O. — Landw. Forsch. 1950, 2, 38.
14. Oden S. — „Die Huminsäuren“, Dresden u. Leipzig, 1922.
15. Samec M., Pirkmaier B. — Kolloid—Z. 1930, 51, 96.
16. Scheele W. — Kolloid—Beih. 1937, 46, 368.
17. Scheele W., Schulze W., Spandau H. — Kolloid—Z. 1935, 72, 301, ibidem 1935, 73, 84, ibidem 1936, 75, 73, ibidem 1936, 77, 312.

18. Scheffer F., Plotho O., Welte E. — Landw. Forsch. 1950, 1, 86.
19. Scheffer F., Welte E. — Landw. Forsch., 1950, 1, 81.
20. Simon K. — Zeitschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk. 1929, 14, 252.
21. Simon K. — Zeitschr. für Pfl.-ern., Düng. u. Bodenk. 1930, 18, 323.
22. Springer U. — Zeitschr. für Pfl.-rn., Düng., Bodenk., 1931, 22, 135.
23. Springer U. — Bodenk. u. Pfl.-ernähr., 1938, 312.
24. Thiele H., Kettner H. — Kolloid-Z. 1953, 130 (3), 131.
25. Thjessen G., Engelder C. — Chem. Zbl. 1931, 1, 291.
26. Trojanowski J. — Ann. Univ. M. C. Skłodowska, Sec. C, Pol., Lublin, 1952, 6, 297.
27. Waksman A. — „Humus“, London, 1936.
28. Weissberger A. — „Physical Methods of Organic Chemistry“, London, 1949, na str. 1751 i nast.
29. Welte E. — Zeitschr. für Pfl.-ernähr., Düng., Bodenk., 1952, 56, 109.

---

## Р Е З Ю М Е

1. Доказана возможность применения метода хроматографии на колонке на порошкообразной целлюлозе Уотмана для разделения и выделения для заготовки препаратов составных элементов фракции гумуса называемой „гиматомелановой (ульминовой) кислотой“, растворимых в ацетоне. Для проявления автор использовал систему:  $n$  — бутанол — ацетон — вода.

2. Применен метод хроматографии на бумаге для анализа ацетонового экстракта гиматомелановых кислот и их фракций. Для проявления была употреблена система:  $n$  — бутанол — ацетон — 0,5  $n$  HCl. Для определения зон был использован ультрафиолетовый свет, при помощи которого обнаружено от 3 до 5 флюоризирующих составных элементов.

3. Введены модификации в ходе экстракции исходного материала и в процессе сгущания полученных экстрактов, чтобы получить, по мере возможности, исчерпывающий, но мягко протекающий ход экстракции.

4. На хроматограммах экстрактов из разных исходных материалов установлено сближенное размещение зон в 3 пределах  $R_f$ .

## S U M M A R Y

A group of hymatomelanic acids (ulmic acids) is the least investigated fraction of humus till now. The separation method of the compounds of this fraction soluble in acetone by means of chromatography on the cellulose is described.

Hymatomelanic acids were isolated from several samples of compost plant residues and peats by introducing some modifications in the conventional method of preparation. The raw material was purified of bitumen with a mixture of benzene and ethanol. The calcium and the iron ion were removed from the experimental material by 0,2 n HCl. The material washed with HCl and H<sub>2</sub>O was next extracted with ethanol at the room temperature. Thus one obtained 20 l. of solution of hymatomelanic acids in ethanol from 1 kilogram of the material. The hymatomelanic acid were then precipitated from the solution by calcium acetate at the pH = 6,8. In order to remove calcium the sediment was washed with 0,5 n HCl and H<sub>2</sub>O by centrifuging. The washed sediment of hymatomelanic acids was dissolved in acetone, the insoluble remainder being removed by centrifuging. The acetone solution of hymatomelanic acids was separated on a column filled with Whatman cellulose powder produced by W. and R. Balton and described as „B-Quality. Chemically prepared”. Tubes of diameter 3,5 cm. were used. The column was filled with 30 g of cellulose in the form of a slurry saturated with 20 vol. of acetone + 1 vol. H<sub>2</sub>O. 8 ml. acetone solution containing 6 ml. hymatomelanic acid in 1 ml. was poured on the chromatographic column. The solution was acidified with HCl. The acidity of the solution was controlled by thermionic valve pH — Meter. The optimum concentration for columnar chromatography had in the acetone solution the seeming pH value = 1 against the glass electrode and the saturated calomel electrode. This value is only a relative measure of the potential of the non-aqueous solution which may be useful for comparative purposes (28).

The column chromatogram was developed with 25 ml. of the following solvent-mixture: n-butanol saturated with H<sub>2</sub>O — acetone (1:1 v/v) and next washed with acetone. After washing the column with 50 ml. acetone 5 fluorescent bands may be detected under the ultraviolet light. (Fig. 2-b). The bands Nos. I, II and III were eluted with acetone, the band No. IV being washed with the mixture of acetone and water (5:1 v/v). The band No. V was eluted with water. The eluates

from the chromatographic column were then rechromatographed on the Whatman paper No. 1 in order to check their homogeneity. The paper chromatogram was developed with the following solvent-mixture: water-saturated n-butanol — acetone — 0,5 n HCl (12:12:1,5 v/v). The filter paper was first impregnated with the mixture of 10 ml water-saturated n-butanol + 10 ml. acetone + 2 ml. 0,5 n HCl and dried at the room-temperature for 2 hours. Spots on the paper chromatogram were detected when viewed under ultraviolet light. The  $R_f$  values were then determined (fig. 3). The paper chromatograms of extracts obtained from various humus materials were worked out. Various methods were employed in preparing these extracts.

### Conclusions

1) The method of column chromatography on the powdered Whatman cellulose was applied in order to separate and to isolate on a large scale the compounds of the fraction of humus. The compounds of this fraction called hymatomelanic acid are soluble in acetone. The mixture of water-saturated n-butanol — acetone (1:1 v/v) was used for the development of the column chromatogram.

2. The separation of acetone of hymatomelanic acids was also worked out by the method of paper chromatography. The following solvent-mixture was employed to develop the paper chromatogram: n-butanol — acetone — 0,5 n HCl (12:12:1,5 v/v). The ultraviolet light was used to indicate the spots. 3 to 5 fluorescent compounds of hymatomelanic acid were thus detected. The rechromatography of samples on the paper was applied to control the homogeneity of the efflux from the cellulose column.

3. The conventional methods of producing the preparations of the hymatomelanic acid were modified. The material was extracted directly with ethanol instead of with alkalis. Hymatomelanic acids were precipitated with calcium acetate to condense the obtained ethanol extracts.

4. On the basis of the fact that the spots were located on the chromatogram in a similar way (in 3 narrow  $R_f$  values) one may assume that the chemical structure of the investigated compounds of hymatomelanic acid derived from various source materials is similar.

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. X, 12.

SECTIO C

15.III.1957

Z Zakładu Anatomii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi U. M. C. S.  
Kierownik: Prof. dr August Dehnel

Irena DZIERŻYKRAJ-ROGALSKA

**Die saisonale Veränderlichkeit der Schilddrüse bei  
der Wasserspitzmaus (*Neomys fodiens* Schreb.)**

**Sezonowa zmienność tarczycy u Rzęsorka rzerzka  
(*Neomys fodiens* Schreb.)**

**Сезонная изменчивость щитовидной железы  
у *Neomys fodiens* Schreb.**

|  |     |
|--|-----|
| Einleitung . . . . .                               | 295 |
| Material und Methode . . . . .                     | 296 |
| Biologie der Wasserspitzmaus . . . . .             | 297 |
| Histologische Beschreibung des Materials . . . . . | 299 |
| Ergebnisse . . . . .                               | 306 |
| Schrifttum . . . . .                               | 307 |
| Tafelbeschreibung . . . . .                        | 308 |
| Streszczenie . . . . .                             | 309 |
| Резюме . . . . .                                   | 310 |

**Einleitung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Anstalt für Vergleichende Anatomie U.M.C.S. und für Histologie und Embriologie der Medizinischen Akademie in Białystok ausgeführt.

Ich fühle mich verpflichtet Herrn Dr. Zdzisław Nowicki; dem damaligen Leiter der Anstalt für Histologie u. Embriologie der Medizinischen Akademie in Białystok, für Hilfe bei der Bearbeitung des Materiale meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenfalls danke ich Frau Doc. Dr. Helene Lewińska dem jetztzeitigen Leiter dieser Anstalt für gefällige Durchsicht des Manuscriptes und kritische An-

merkungen. Speziellen Dank pflichte ich Herrn Professor Dr August Dehnel dem Leiter der Untersuchungsanstalt für Säugetiere des Zoologischen Institutes P. A. N. in Białowieża für die Freistellung des Materials, Leitung der Arbeit und Hilfe bei ihrer Durchführung.

Die morphologische Analyse der Veränderlichkeit der Schilddrüse im Zusammenhang mit Veränderungen der physiologischen Zustände der untersuchten Tiere oder im Zusammenhang mit Einflüssen der Milieufaktoren ist speziell nichts Neues.

Zahlreiche Autoren (Engelhorn, Florentin, Glebina, Chmielarczyk, Soszka und Love) bewiesen die charakteristische Veränderlichkeit der Schilddrüse, welche mit dem Geschlechtszyklus verbunden ist. Terendelenburg untersuchte die Veränderungen der Schilddrüse, welche unter Einfluss von Hunger stattfinden. Ludford und Cramer erwiesen die von Temperaturschwankungen abhängigen tatsächlichen Veränderungen.

Dzierżykraj-Rogalska bewies in ihrer Arbeit über *Sorex araneus*, das wir deutliche Veränderungen in der Aktivität der Schilddrüse nicht nur im Zusammenhang mit der Geschlechtsreife und den Perioden der Geschlechtsaktivität beobachten, aber auch in der Herbstperiode, also in einer Zeit, wo die Tiere ihr Sommerhaar auf Winterhaar wechseln. Eine Zunahme der Schilddrüsenaktivität in der Periode des herbstlich-winterlichen Sinkens der Temperatur stellte sie jedoch nicht fest.

Die Wasserspitzmaus, welche das Thema der vorliegenden Arbeit bildet, ist verhältnismässig nahe mit der Spitzmaus verwandt. Ihre Biologie ähnelt unter gewissen Umständen mit derjenigen der Spitzmaus, aber aus andern Gründen unterscheidet sie sich gänzlich von ihr. Aus diesem Grunde halte ich es für zweckmässig, die saisonale Veränderlichkeit der Schilddrüse bei der Wasserspitzmaus durchzu analysieren, um sie mit der Veränderlichkeit der Drüse bei den Spitzmaus zu vergleichen.

### Material und Methode

Das Material zu der vorliegenden Arbeit wurde im Naturstaatspark in Białowieża gesammelt. Die Fangtechnik wurde in den Arbeiten von Dehnel u. Borowski und Dehnel (1949) genau beschrieben, die Präparierungstechnik der Schilddrüse bei *Insectivora* in der Arbeit von Dzierżykraj-Rogalska (1952).

Die untersuchten Schilddrüsen wurden meistens in überwiegender Menge im lebenden Zustande dem Laboratorium zugestellt, aber auch im Zustande der Todeserstarrung. Das Material wurde in Flüssigkeiten von Bouin, Orth oder neutralem Formol fixiert. Die Paraffinschnitte färbte man in Hämatoxylin-Eosin und nach Azan. Um retikuläre Fasern nachzuweisen silberte ich sie nach Laguess.

### Biologie der Wasserspitzmaus

Die Biologie der Wasserspitzmaus war schon mehrfach in wissenschaftlichen Publikationen besprochen. Es scheint mir dennoch dass sie bisher verhältnismässig wenig genau bekannt ist. Nur neuere Arbeiten berücksichtigend, kann man eine Reihe von Angaben bei Dehnel (1950), Price, Rudd und Bazan (1956) vorfinden. Für meine Untersuchungen ist die Arbeit der Letztgenannten besonders effektiv und zwar nicht nur aus dem Grunde, dass sie viele neue Angaben darbietet, aber vor allem daher, dass das Material aus demselben Gelände stammte und teilweise dieselben Individuen von mir ausgewertet wurden. Da nun meine Arbeit nicht nur für Zoologen aber auch für Histologen bestimmt ist, so erlaube ich es mir, in Kürze gewisse Angaben betreffs der Biologie der Wasserspitzmaus darzustellen und zwar mit Berücksichtigung dessen was sich mit dem Thema meiner Arbeit verknüpft.

Die Zeugungsperiode der Wasserspitzmaus beginnt im Vorfrühling. Die Geschlechtsreife tritt Ende März ein und in der ersten Hälfte des Monats April waren alle eingefangenen Individuen schon geschlechtsaktiv. (Dehnel betitelt solche Individuen als Überwinterlinge). Das sind Tiere, welche im vorhergehenden Kalenderjahr geboren wurden. Diese Tiere erleben ähnlich wie wir dieses bei Spitzmäusen beobachten, keinen zweiten Winter und sterben an Altersschwäche im zweiten Kalenderjahre ihres Lebens. Junge, aus den ersten Frühlingswürfen stammende, Wasserspitzmäuse werden im Gelände ungefähr ab ersten Juni eingefangen. Wie es die Arbeit von Bazan erwiesen hat, so reifen Individuen aus dem ersten Frühjahrwurf sogleich nach dem Verlassen des Nests an, so dass man schon Ende Juni überall junge schwangere Weibchen antrifft und junge Männchen besitzen voll entwickelte Gonaden. Junge aus dieser Generation verlieren schon im Frühherbst ihre Geschlechtsaktivität und ihre Gonaden unterliegen der Regression. Diejenigen von ihnen, welche den Winter überleben, werden zum zweiten Mal im frühen Frühjahr, das ist im zweiten Kalenderjahre ihres Lebens wieder geschlechtsaktiv.

Junge, welche in der ersten Sommerhälfte geboren werden, erleben nur eine kurze Periode der progressiven Entwicklung ihres Geschlechtsapparates, um nach dem der Gonadenregression zu unterliegen, ohne vorher die Geschlechtsreife gehabt zu haben.

Junge aus dem dritten und späteren Würfen, folgedessen Individuen, welche in der zweiten Sommerhälfte oder evtl. im Frühherbst geboren wurden, beginnen überhaupt keine Geschlechtsreifeprozesse und sie reifen erst zum ersten

Mal im Frühjahr als Überwinterlinge an. Überwinterlinge sind den ganzen Sommer lang bis zu ihrem Tode geschlechtsaktiv. Es sei aber vorgemerkt, dass wir bei Individuen welche bis zum Herbst leben einen Rückgang des Geschlechtsapparates beobachten können.

Wie es sich aus dem oben Erwähnte ergibt, haben wir im Material ab Vorfrühling bis Juli geschlechtsreife Individuen und zwar Überwinterlinge und Junge aber auch geschlechtsanreifende Junge oder solche, welche in den anfänglichen Phasen von progressiven Gonadenveränderungen stehen, aber auch noch Junge vor Anfang von Progressionsveränderungen stehen.

Ab Sommerende bis Herbst einschliesslich haben wir im Material geschlechtsreife Überwinterlinge und Junge aus den Frühlingswürfen, aber auch geschlechtsunreife Junge.

Im Spätherbst u. Winter besitzen wir im Material nur Individuen mit Gonaden vom jugendlichen Typus.

Wasserspitzmäuse haben zweimal einen regulären Haarkleidwechsel. In der frühen Frühlingsperiode beginnt bereits im Monat März das Anwachsen des Sommer-Haares. Im Herbst vollzieht sich bei Jungen der volle Haarkleidwechsel in dem Monaten September u. Oktober (Winterhaar) und im November trifft man eingefangene Tiere im vollen Winterpelz an. Überwinterlinge erleben im allgemeinen die Periode des Haarkleidwechsels nicht mehr und bei einigen noch ausnahmsweise Überlebenden vollzieht sich diese nur fragmentarisch.

Angaben betreffs der Überwinterung der Wasserspitzmäuse sind recht knapp. Man muss annehmen, dass sich diese Tiere in Bialowieża an den nichtzugefrorenen Wasserflächen konzentrieren. Alle Versuche diese Tiere im Winter einzufangen gaben jedoch keinen guten Erfolg. Meine Beobachtungen betreffs der Veränderlichkeit und der Funktion der Schilddrüse in der Periode, wo die Tiere in niedriger Temperatur ihr Dasein fristen, stützen sich auf eine kleine Anzahl des Materials. Sich auf die Beobachtungen von Dehnel (1950) und Borowski stützend, sollte man annehmen, dass Wasserspitzmäuse in der Winterperiode keiner so tiefen Depression unterliegen, welche sich durch Körpergewichtsabnahme, Ausmassenreduktion und Schädelabflachung bemerkbar macht, was man bei Spitzmäusen festgestellt hat. Dehnel klärt dieses wie folgt auf: Erstens sind diese Tiere an Wasserbiotopen gebunden, zweitens leben sie in weit mehr ausgeglichenen Lebensbedingungen besonders aber im Winter, drittens sind sie stärker und darum haben sie eine grössere Möglichkeit bei der Futtererbeutung.

In meiner Arbeit aus dem Jahre 1952 teilte ich die untersuchten Spitzmäuse in zwei Klassen und zwar auf geschlechtsunreife Junge im ersten Kalenderjahre ihres Lebens und auf geschlechtsreife Überwinterlinge im zweiten Kalenderjahre ihres Lebens. Diese Einleitung auf zwei Altersgruppen, welche bei Spitzmäusen die Lebensbedingungen besonders aber im Winter, drittens sind sie stärker nicht angewandt werden. Dehnel teilte sein Material in drei Klassen:

- 1) Junge geschlechtsunreife Individuen (M) ungeachtet des Geburtsmonates.
- 2) Junge Individuen (D), welche die Geschlechtsreife im ersten Kalenderjahre ihres Lebens erreicht hatten, ganz gleichgültig in welchem Monate sie eingefangen wurden.



3) Geschlechtsreife Individuen (P), im zweiten Kalenderjahre ihres Lebens, anders gesagt Oberwinterlinge.

Diese Einteilung erwies sich während meiner Arbeit als zu sehr statisch und sie deckte sich nicht mit den natürlichen physiologischen Gruppierungen der Tiere.

Aus diesem Grunde ordnete ich das untersuchte, histologische Material etwas anders an, als es Dehnel getan hatte und zwar:

- I. Junge (M).
- II. Geschlechtsreife Junge (D) und Oberwinterlinge (P).
- III. Individuen, welche im Herbst und Winter und zwar in dem Monaten von Oktober bis Februar eingefangen wurden und welche Gonaden vom jugendlichen Typus aufwiesen (ganz gleich ob mit primären oder regressiven Gonaden). Diese Individuen bezeichnete ich mit Symbol — „R“. Ich muss zugeben, dass ich vor allem die Schilddrüsen von Männchen untersucht hatte und zwar aus diesem Grunde, dass ich bei ihnen verhältnismässig leicht den jeweiligen Zustand der Gonaden feststellen konnte.

### Histologische Beschreibung des Materials

#### I. Gruppe „M“ — geschlechtsunreif.

Tiere aus dieser Gruppe haben, ganz gleichgültig in welchem Monat sie eingefangen wurden, Drüsen von folgendem charakteristischem Bilde. Die Schilddrüse dieser Tiere besteht aus feinen ziemlich regulär angeordneten Follikeln, welche einen kleinen Tropfen Kolloid enthalten. Im Epithelium, welches die Follikeln bekleidet, befinden sich die Hauptzellen in Überzahl, ab und zu aber kann man Kolloidalzellen (von Langendorff) feststellen, deren zahlenmässiges Verhältnis in den verschiedenen Bläschen veränderlich ist. Die Hauptzellen mit heller und feinkörnigem Cytoplasma haben unsichtbare Grenzen. Diese Zellen sind würfelförmig und machen den Eindruck, als wenn sie aufgeschwollen wären. Ihre Kerne sind bläschenförmig und so gross, dass sie fast die ganze Breite und Höhe des Epitheliums einnehmen. Zwischen den Follikeln liegen zahlreiche parafollikuläre Zellengruppen, welche aus 8 bis 12 Zellen bestehen. Sie weisen eine grosse Ähnlichkeit mit den Hauptzellen aus dem Follikel epithel auf, aber sie kennzeichnen sich jedoch durch eine bedeutend grössere Verwandtschaft mit den basischen Farbstoffen. Die Zellen dieser Inselchen sind vieleckig mit deutlichen Zellengrenzen. Ihr Cytoplasma ist dickflüssig, aber der Kern ist regulär mit sich stark färbender und kompakter Chromatinstroma.

Das Bindegewebe zwischen den Follikeln ist unauffällig. Es treten jedoch deutliche Überblutungen auf. Man kann hier eine grosse Anzahl von erweiterten Kapillaren ersehen, welche die Bläschen umschliessen, aber auch Gefässe von verschiedenem Kaliber, welche mit Blutkörperchen ausgefüllt sind.

Dieses oben beschriebene Schilddrüsenbild junger, geschlechtsunreifer Tiere, welches bei allen Individuen dieser Gruppe auftritt, weist auf den Stand der vollen Aktivität der Schilddrüse hin, was wohl höchstwahrscheinlich mit Entwicklungsprozessen dieser Individuen im Zusammenhang steht.

## II. Gruppe — geschlechtsreife Junge und Überwinterlinge.

a) Überwinterlinge, welche in den Monaten von März bis Juni gefangen wurden.

Wie ich es erwähnt habe, tritt im Vorfrühling bei Wasserspitzmäusen das Geschlechtsreifen ein. Die Frühjahrsbrunst verläuft bei diesen Tieren ähnlich wie bei anderen *Soricidae*.

Die Schilddrüsen der Wasserspitzmäuse aus dieser Periode enthalten kleine Follikeln, welche mit zylindrischen oder etwas niedrigerem Epithelium ausgekleidet sind. Diese Epitheliumzellen besitzen runde oder bläschenartige Kerne mit deutlicher Chrominstroma. Die Epitheliumzellen sind als wie geschwollen, regulär angeordnet und weisen deutliche Grenzen auf. (Phot. 1). Das Cytoplasma dieser Zellen ist feinkörnig. Neben kleinen Bläschen liegen zahlreiche Gruppen von parafollikulären Zellen, in welche man zahlreiche Teilungen erblicken kann. (Phot. 2). Das am meisten charakteristische Merkmal für diese Frühjahrsperiode ist die immer grösser werdende Vascularisation dieser Drüse. Fast bei jedem Bläschen sieht man ein Netzchen von Kapillargefässen. Zwischen den kleinen, sich erst bildenden Follikeln beobachtet man eine enorme Anzahl von Arteriolen und Kapillaren, welche mit Blut überfüllt sind. Hier und da kann man Endothelium der Kapillaren beobachten (Phot. 3).

Das oben beschriebene charakteristische Bild der Schilddrüsen von Überwinterlingen, welche im Frühjahr eingefangen wurden, zeugt von einer angeregten intensiven Tätigkeit der Schilddrüse.

Die Schilddrüsen von frühzeitig, frühjahrlichen Tieren kennzeichnen sich durch eine als ob noch mehr intensive Drüsenaktivität im Verhältnis zu Tieren, welche später eingefangen wurden. Ich möchte

wohl diese Erscheinung mit dem in dieser Periode verlaufenden Frühjahrshaarkleidwechsel in Einklang bringen, aber es fällt mir schwer bei dieser Äusserung zu verharren, denn das Material von Überwinterlingen aus dem Vorfrühjahr war sehr klein.

b) Überwinterlinge und geschlechtsreife Junge, von Juni bis October.

Die Tiere weisen in dieser Periode den mikroskopischen Bau der Schilddrüse von demselben Typus auf.

Es ist schwer die Schilddrüse der genannten Tiere als ein „funktionales Ganzes“ zu erörtern. Sehr oft liegen neben den Bläschen, deren Kolloid sich sehr intensiv färbt, andere kleine Follikeln mit hellem und vakuolisiertem also viel flüssigerem Kolloid. Dieses zeugt von einer gewissen Autonomie der einzelnen Bläschen. In der Regel jedoch besteht die Peripheriepartie der Drüse in dieser Periode aus grossen Bläschen, welche mit dickflüssigem Kolloid ausgefüllt sind. In ihnen vollziehen sich auch die Ausscheidungs u. Resorptionsprozesse sehr langsam, wobei sie sich am spätesten erblicken lassen. Seltener sieht man wässriges Kolloid, was sich beim Färben mit Azan sehr gut erblicken lässt.

Die Peripherie der Drüse besteht aus grossen Randfollikeln, welche mit unvakuolisiertem dickflüssigem und chlorophilen Kolloid ausgefüllt sind. Mit Azan färbt es sich auf rot. Hier und da ist jedoch die Peripheriepartie des Kolloides mehr wässrig und dann nimmt sie eine blaue Farbe an (Phot. 4).

Das Epithelium, welches die Bläschen bekleidet, kann verschieden aussehen. Es besteht aus würfelförmigen, gut abgegrenzten Zellen mit runden Kernen. Das Cytoplasma dieser Zellen ist hell und vakuolisiert. Am häufigsten treffen wir jedoch ein ganz niedriges Epithelium an, welche, dunkle, abgeflachte und fast einheitlich ausgefärbte Kerne aufweist. In vereinzelt Drüsen der beschriebenen Periode tritt sehr oft die Abblätterung der Zellen zum (gegen das) Licht der Bläschen auf. Die abgeblätterten Zellen sind zweierlei Art nämlich: Die Einen besitzen sehr grosse Kerne mit gut erhaltener Chromatinstroma und körnigem Cytoplasma (Phot. 5), die Anderen sind kleine Zelle mit piknotischen Kernen, welche sich intensiv ausfärben.

Die Zentralpartie der Drüse kennzeichnet in dieser Periode das Erscheinen einer grossen Menge von ausserfollikulärem Kolloid. In den Drüsen in welchen der Ausflussprozess des Kolloides ausserhalb der Bläschen nur einen Teil der Drüse miteingegriffen hat, erhalten sich noch in der Zentralpartie grosse Bläschen, welche mit stark vakuolisiertem, flüssigem Kolloid ausgefüllt sind. Ihr Epithelium besteht aus Hauptzellen und Kolloidzellen (Zellen von Langendorff). Die Hauptzellen des Epitheliums sind sehr vergrössert und besitzen ein sich blass ausfärbendes, gewöhnlich stark vakuolisiertes Cytoplasma. Die Haupt—wie auch die Kolloidzellen besitzen auf ihren Gipfelpunkten zahlreiche Ausbeutungen von verschiedener Gestalt und Ausmassen. Die Gipfelpartien dieser Zellen werden entweder durch stark gewässerte und vakuolisierte Cytoplasma gebildet, oder sie stellen sich als kleine Gebilde dar, welche sich so wie Kolloid färben (Phot. 6). Manchmal ist die ganze Gipfelpartie aufgedunsen und nimmt das Aussehen einer einzigen grossen Blase an.

Im mehr avancierten Stadium dieses Prozesses beobachten wir eine immer kleinere Anzahl von regulär gebauten Bläschen und eine immer grösser werdende Fläche der Drüse, welche durch das sich ausgeschiedene Kolloid eingenommen wird. In vereinzelt Follikeln, welche noch Kolloid enthalten, verbleiben nur noch etliche Zellen von der Epithelbekleidung (Phot. 7), der Rest aber drang in das Licht des Bläschens und erlag dort der Auflösung. Durch eine Lücke, welche in der Follikelwand entstand, bildet sich der Weg für das, sich ausserhalb der Bläschen, ausgiessende Kolloid. Gleichzeitig sieht man in der stark vakuolisierten Zellenmasse, welche ab und zu feinkörnig ist, schwimmende Epithelschnüre (Phot. 8), welche von ehemaligen Bläschen stammen und welche aus Zellen bestehen, deren Kerne sich einheitlich und intensiv ausfärben (Phot. 8). In manchen Drüsen verbleiben grosse regulär geformte Bläschen nur noch auf der Peripherie. Die Zentralpartie der Drüse weist keinen follikelförmigen Bau auf und sie ist mit Kolloid übergrössen.

Die mikroskopischen Schilddrüsenbilder der Tiere aus der beschriebenen Gruppe (Juni—Oktober) weisen ganz gewiss auf eine volle ja sogar verstärkte Aktivität der Drüse hin.

Man kann zwar hier und dort regressive Erscheinungen beobachten, welche auf der Verkleinerung und Abflachung der Drüsenzellen aber auch auf der Kernpyknose beruhen, aber diese treten jedoch, wenn

man das ganze Drüsenbild in Anspruch nimmt auf den weiteren Plan. Die Bläschen können in dieser Periode zusammenschrumpfen und ihre Wände können sich biegen und platzen. Auf solche Weise entstehen Epitheliumschnüre und sich dunkel färbende Kerngruppen, welche direkt in dem überall ausgegossenen ausserbläslichen Kolloid „schwimmen“. Dank den im Follikel epithelium entstandenen Spalten durchtrifft das Kolloid durch das schwache Bindegewebe, welches ein System von Lücken und Spalten hat, in die Gefässe und es gleicht höchstwahrscheinlich auf diese Weise den grösseren Bedarf an Hormonen im Organismus aus. Während der Zeit der erhöhten Tätigkeit beobachtet man nicht eine gleichzeitige Vermehrung der Blutgefässe. Die peripherisch liegenden Bläschen sind zwar mit einem deutlichen Kapillarenetzchen umgeben, aber in der Medialpartie der Drüse, welche nur von der Kolloidmasse eingenommen ist, sieht man keine Gefässe.

III. Gruppe mit regressivem Geschlechtsapparat, welche von Oktober bis Februar eingefangen wurden.

Alle Individuen aus dieser Gruppe befinden sich in der Vorbereitungsphase zum Winter. Wie ich es schon erwähnt habe, so rechne ich zu dieser Gruppe junge Tiere, welche im ersten Kalenderjahre ihres Lebens noch nicht geschlechtsreif waren wie auch diejenigen Jungen, welche geschlechtlich reiften und sogar geschlechtsaktiv waren und welche im Spätherbst regressiv Gonaden aufwiesen. Nebenbei sei bemerkt, dass der Geschlechtsapparat im Winter einer so starken Regression unterliegt, dass er sogar kleinere Ausmassen hat, als wir dieses bei jungen geschlechtsunreifen Individuen im Sommer beobachten (B a z a n 1955).

Die Schilddrüse der Tiere aus dem Monat Oktober kennzeichnet sich in ihrem ganzen Durchschnitt durch einen einheitlichen Bau. Es hebt sich hier die Grenze zwischen der Drüsenperipherie und ihrer Medialpartie nicht so deutlich ab. Ihre Struktur ist im allgemeinen den bekannten Buchbeschreibungen der Schilddrüse angenähert (Phot. 9).

Fast alle Bläschen sind mit hypostatischem, dickflüssigem Kolloid ausgefüllt, welches sich mit Azan dunkelrot anfärbt. Es weist keine Vakualisation auf, aber es ist dagegen stark aufgesprungen. Das Bläschenepithelium ist vielmehr niedrig und besteht aus wenig differenzierten Zellen mit fast durchsichtigem Protoplasma.

Aus der oben erwähnten Beschreibung könnte man die Folgerung ziehen, dass in dieser Periode sich ein allmählicher Schwund der Drüsenfunktion vollzieht. In den Monaten November und Dezember treffen wir eine immer stärker werdende Regression der Schilddrüse an. Die Schilddrüse aus dem Winter kennzeichnet sich durch ein dickflüssiges, sich stark anfärbendes Kolloid. Gleichzeitig beobachten wir eine Verminderung der Vakularisation und einen Anwuchs der Bindegewebebasis.

Wir treffen hier auf eine Invasion von fremden Zellenelementen mit länglichen Kernen von mezenchymatischer Abstammung, welche durch ihr Anwachsen gewisse Partien der Drüse einnehmen.

Bei einem im Januar eingefangenen Individuum (es muss unterstrichen werden, dass im Jahre 1955 im Januar in Białowieża fast Frühlingswetter herrschte) hat das Drüsenbild ein schon etwas anderes Aussehen. Auf der Peripherie treffen wir wiederum grössere Follikel in deren Licht sich die Zellen des Epitheliums abblättern. Das Epithelium dieser Zellen ist noch flach. Sie bestehen aus homogenen Zellen mit dunklen verlängerten Kernen, welche parallel zur Längsachse der Zelle liegen. In den Zentralpartien (Medialpartien) der Drüsen beginnen parafollikuläre Gruppen zu erscheinen.

Aus diesem Bau folgernd, könnte man in diesem Falle behaupten, dass wir hier mit irgendwelchen einleitenden Vorbereitungen für die zukünftige intensive Drüsenfunktion zu tun haben. Es fällt aber schwer irgendwelche Behauptungen auf Grund nur eines Falles und während eines so untypischen Winters, wie im Jahre 1955, aufzustellen.

Wie es aus der Beschreibung des histologischen Materials, was schliesslich vorauszusehen war, hervorgeht, besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Geschlechtszyklus der Tiere (Männchen) und der morphologischen Veränderlichkeit der Schilddrüse. Diese Erscheinung ist ganz unabhängig vom Alter des Tieres (Dieselben Bilder bei Exemplaren „D“ u. bei „P“). Folgendes ist aber interessant, dass bei frühjahrlichen Überwinterlingen in der Zeitspanne ihrer ersten Brunst und Geschlechtsreifung die Aktivität der Schilddrüse viel stärker ist als in der Sommer u. Herbstperiode, wo wir gleichfalls Individuen in der Brunstperiode (P) oder Geschlechtsanreifungs u. Brunstperiode (D) antreffen. Diese Erscheinung könnte man auf verschiedene Weise auslegen. Es kann sein, dass sie nur mit dem Ge-

schlechtszyklus verbunden ist. Wie es wohl bekannt ist (Bazan 1955) kennzeichnen sich frühjährliche Überwinterlinge von Wasserspitzmäusen durch besonders stark entwickelte Gonaden, welche ihren Ausmassen nach diejenigen von Überwinterlingen oder von Individuen aus der Klasse „D“ aus dem Sommer u. Herbst überschreiten. Wie ich es schon erwähnt habe, verläuft die Brunst selbst bei diesen Tieren in der Frühjahrsperiode bedeutend gewaltsamer im Vergleich mit der Sommerperiode.

Man könnte jedoch die besonders intensive Funktion der Schilddrüse in der Frühjahrsperiode auch damit auslegen, dass gerade dann ganz unabhängig von Geschlechtsprozessen gleichzeitig der Frühjahrsaarkleidwechsel verläuft. Es ist allgemein bekannt, dass bei Insektenfresser und speziell bei der Spitzmaus (Dzierżykraj-Rogalska, 1952) diese Erscheinung von einer sehr intensiven Funktion der Schilddrüse begleitet wird. Die frühjährlichen, histologischen Bilder der Schilddrüse, welche bei Wasserspitzmäusen beobachtet wurden, können etwa aus dem Zusammenspiel der beiden an sich ganz unabhängigen physiologischen Prozessen entstehen.

Einen gewissen Beweis dafür, dass die Schilddrüse bei den Wasserspitzmäusen in der Periode des Haarkleidwechsels sich aktivisiert, bieten die von mir beobachteten und beschriebenen Schilddrüsenbilder von Tieren und zwar von Jungen aus der Gruppe („D“, welche im Herbst eingefangen wurden.

Unzweifelhaft am interessantesten bei diesen Tieren ist das Verhalten der Schilddrüse in der Herbst- und Winterperiode. In dieser Periode treffen wir nämlich auf eine deutliche Hemmung in der Arbeit der Drüse. Eine ähnliche Erscheinung fand ich bei Spitzmäusen vor. (Dzierżykraj-Rogalska, 1952). Solch ein Drüsenbild steht im Widerspruch mit dem, was man erwarten sollte. Es sollte eigentlich dünken, dass wir bei den *Soricidae* gerade irgend eine Hyperfunktion der Schilddrüse erwarten sollten und dieses, wenn auch nur im Zusammenhang mit der Notwendigkeit der Stärkung des Metabolismus zur Erhaltung der Körpertemperatur in der Periode der schweren Winterkälte. Solche Erscheinungen des Tätigkeitsrückganges der Schilddrüse treffen wir bei Winterschläfern (Chmielarczyk, 1948) an. Im gegebenen Falle fallen weder die Spitzmaus noch die Wasserspitzmaus während des Winters in den Winterschlaf.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass wir bei der Spitzmaus wie auch bei der Wasserspitzmaus auf sehr charakteristische Gebilde aber besonders bei in den Winterschlaf fallenden Tieren treffen und zwar auf die sogenannten Winterdrüsen (braunes Fett). Diese Drüsen sind bei den *Soricidae* sehr gut entwickelt und ihre Anwesenheit zeugt meiner Meinung nach davon, dass diese Tiere einst wahrscheinlich in den Winterschlaf fielen. Bei diesen Insektenfresser treffen wir gleichfalls auf eine stark angedeutete Erscheinung der Winterdepression (Abnahme des Körpergewichtes, der Ausmassen, Knochenveränderungen). Die Depressionserscheinungen können wir natürlich nicht ausschliesslich als Konsequenz von Futtermangel in der Winterperiode halten, wenn sie auch dennoch in einem gewissen Grade von den Hungererscheinungen abhängig sind. Es kann also sein, dass die von mir beobachtete Hypofunktion der Schilddrüse in der Winterperiode mit der Verringerung der Prozesse des Metabolismus bei diesen Tieren im Zusammenhang steht. Dieses wäre eine eigenartige Anpassungsfähigkeit zur Überwindung der schweren Winterperiode.

Eine Antwort auf diese Frage können nur eigentlich angesetzte physiologische Untersuchungen dieser Tiere ergeben.

### Ergebnisse

1. Die Schilddrüse von *Neomys jodiens* Schreb. weist eine deutliche Veränderlichkeit im Lebenszyklus des Tieres auf.
2. Die Schilddrüsen von jungen, geschlechtsunreifen Tieren (M) weisen ganz unabhängig vom Monate, in welchem sie gefangen wurden einen einheitlichen Bau der Drüse auf.
3. Die intensivste Funktion der Schilddrüse beobachten wir in der Frühjahrsperiode bei Überwinterlingen (Geschlechtsanreifung und erste Brunst).
4. Schilddrüsen von geschlechtsreifen Jungen (D) und Überwinterlingen (P) weisen in der Sommerperiode analogische Veränderungen auf, welche sich im Zustande einer angeregten Aktivität erhalten.
5. In der Herbst- und Winterperiode beobachten wir in den Schilddrüsen der Tiere, deren Gonaden sich in der Phase der Winterregression befinden, eine Hemmung der Schilddrüsentätigkeit.



6. Eine angeregte Tätigkeit der Schilddrüse beobachten wir in der Periode des herbstlichen Haarkleidwechsels. Während des frühjährlichen Haarkleidwechsels findet die Brunstperiode statt, welche es unmöglich macht den Einfluss dieses Prozesses auf die Schilddrüse gesondert zu betrachten.

#### SCHRIFTTUM

1. Bazan I. — Untersuchungen über die Veränderlichkeit des Geschlechtsapparates und des Thymus der Wasserspitzmaus. Annales UMCS. Sectio C, Vol. IX, Lublin, 1955.
2. Borowski St. i Dehnel A. — Materiały do biologii *Soricidae*. Annales UMCS. Sectio C, Vol. VII. Lublin, 1952.
3. Borowski St. — Sezonowe zmiany uwłosienia u *Soricidae*. Annales UMCS. Sectio C, Vol. VII. Lublin, 1952.
4. Chmielarczyk W. — Badania nad systemem dokrewnym jeża, IV. Zmiany w gruczole tarczowym w czasie cyklu rocznego. Rozpr. Wydz. Matem. Przyr. Polsk. Ak. Umiej. 72. Dz. B. 4. Kraków, 1948.
5. Cramer W., Ludford R. J. — On Cellular Activity and Cellular Structure as Studied in the Thyroid Gland. The Journal of Physiology 1926, 61.
6. Dehnel A. — Badania nad rodzajem *Sorex* L. Annales UMCS, Sectio C. Vol. IV, Lublin, 1949.
7. Dehnel A. — Badania nad rodzajem *Neomys* Kaup. Annales UMCS, Sectio C, Vol. V, Lublin 1950.
8. Dehnel A. — Biologia rozmnażania *Sorex araneus* L. w warunkach laboratoryjnych. Annales UMCS, Sectio C, Vol. VI. Lublin 1952.
9. Dzierżykraj - Rogalska I. — Zmiany histomorfologiczne tarczycy *Sorex araneus* L. Annales UMCS. Sectio C, Vol. VIII. Lublin 1952.
10. Dzierżykraj - Rogalska I. — Die Veränderlichkeit der Parathyreoidea des *Sorex araneus* L. in seinen Lebenszyklus. Annales UMCS, Sectio C, Vol. IX. Lublin 1954.
11. Florentin P. — Recherches sur l'histologie et l'histophysiologie de la glande thyroïde des Mammiferes. Thèse à faculté des sciences, Nancy, 1952.
12. Glebina H. — Zyklische Veränderungen der Schilddrüse bei Füchsen. Zeitschr. für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. Berlin, 1937.
13. Lowe E. — Seasonal and Sexual Variations in the Thyroid Glands of Cats. O. Jour. Micr. Sc. LXXIII, 1930.
14. Lowe E. — Variation in the Histological Condition of the Thyroid Glands of Sheep with regard to Season, Sex, Age and Locality. O. Journ. Micr. Sc. LXXVIII, 1930.
15. Ludford R. J., Cramer W. — The Mechanism of Secretion in the Thyroid Gland. Proceed. of the Roy. Soc. of London. Ser. B. 104. London, 1929.
16. Rogalska vide Dzierżykraj - Rogalska.
17. Price M. — The Reproduction Cycle of the Water Shrew *Neomys fodiens bicolor* Shaw. Proc. Zool Soc. 123. London, 1953.

18. Soszka S. — Histologiczne badania nad tarczycą świnki morskiej w przebiegu cyklu płciowego. Rozpr. Wydz. Matemat.-Przyr. P. A. U. 73. Dz. B. I. Kraków 1948.
19. Robertis E. — Cytological and Cytochemical Bases of Thyroid Function Annales of the New York Academy of Sciences. New York, 1949, 50.
20. Terendelenburg — Die Hormone — Berlin—Springer, 1934.
21. Wolska J. — Rozwój aparatu płciowego *Sorex araneus* L. w cyklu życiowym. Annales UMCS. Sectio C, Vol. VII. Lublin 1952.

---

## TAFELBESCHREIBUNG

### Tafel VIII.

- Phot. 1. Im April gefangener Überwinterling. Epithelzellen wie geschwollen. Deutliche Zellengrenzen.
- Phot. 2. Im April gefangener Überwinterling. Gruppen von parafollikulären Zellen in denen man zahlreiche Teilungen sieht.

### Tafel IX.

- Phot. 3. Im April gefangener Überwinterling. Zwischen den kleinen sich erst bildenden Follikeln beobachtet man eine grosse Anzahl von Arteriolen und Kapillaren, welche mit Blut überfüllt sind.
- Phot. 4. Geschlechtsreifer Junge, welcher im Juli gefangen wurde. Die Drüsenperipherie ist aus grossen Randfollikel geformt, welche mit unvakuolisiertem, dickflüssigem und chromophilem Kolloid ausgefüllt sind.

### Tafel X.

- Phot. 5. Geschlechtsreifer Junge welcher im Juli gefangen wurde. Zellenabblätterung in den Innenraum des Follikels.
- Phot. 6. Überwinterling im Juli gefangen. Die Gipfelpartien der Epitheliumzellen färben sich wie Kolloid

### Tafel XI.

- Phot. 7. Geschlechtsreifer Junge im August gefangen. In etlichen Follikeln welche noch Kolloid enthalten verblieben nur noch einige Epitheliumzellen.
- Phot. 8. Überwinterling in September gefangen. Im abgesonderten Kolloid schwimmen Epitheliumschnüre, welche von ehemaligen Follikeln stammen. Die Kernen von Epithelzellen färben sich intensiv und einheitlich.

### Tafel XII.

- Phot. 9. Junges Tier welches im Oktober gefangen wurde. Die Drüsenstruktur ist im allgemeinen den Buchbeschreibungen der Schilddrüse angenähert. Die Follikel sind mit dickflüssigem Kolloid ausgefüllt.
-

## STRESZCZENIE

1. Tarczycza *Neomys fodiens* Schreb. wykazuje wyraźną zmienność w cyklu życiowym zwierzęcia.
  2. Tarczycza zwierząt młodych (M) — niedojrzałych płciowo, bez względu na miesiąc, w którym zostały schwytane wykazuje jednakową budowę.
  3. Najbardziej wzmożoną funkcję gruczołu tarczycznego obserwujemy u przezimków w okresie wiosennym (dojrzewanie płciowe i pierwsza ruja).
  4. Tarczycza młodych dojrzałych płciowo (D) i przezimków (P) w okresie letnim wykazuje analogiczne zmiany utrzymując się w stanie pobudzonej aktywności.
  5. W okresie jesienno-zimowym, u zwierząt których gonady znajdują się w fazie regresji zimowej, obserwujemy wyraźne zahamowanie czynności tarczycy.
  6. Pobudzoną czynność tarczycy obserwuje się w okresie jesiennej zmiany uwłosienia. W okresie wiosennej zmiany uwłosienia zachodzi okres rui, co uniemożliwia wyodrębnienie wpływu tego procesu na tarczycę.
-

## Р Е З Ю М Е

1. Щитовидная железа *Neomys fodiens* Schreb. обнаруживает ясно выраженную изменчивость в жизненном цикле животного.

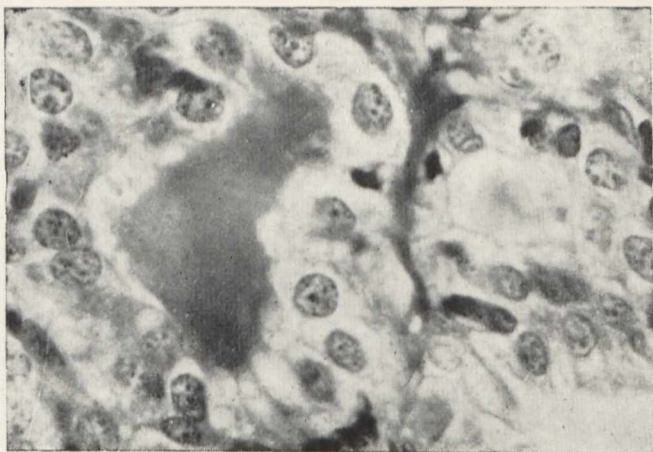
2. Щитовидные железы молодых особей (М) — не достигнувшие еще половой зрелости — независимо от месяца, во время которого были словлены, характеризуются одинаковым строением.

3. Наиболее интенсивная деятельность щитовидной железы наблюдается у перезимовавших особей весной (половое созревание и первая течка).

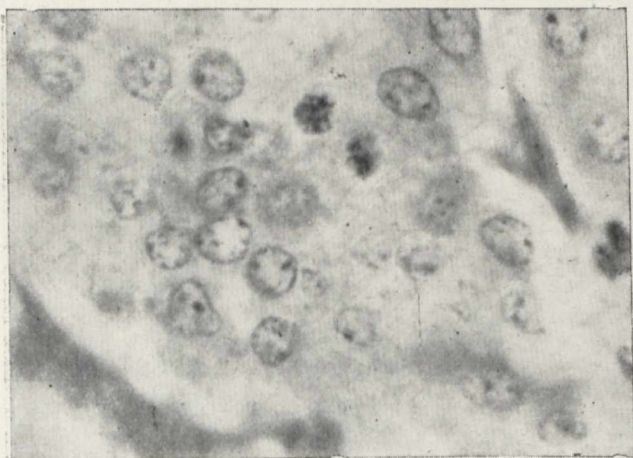
4. Щитовидная железа молодых половозрелых особей (D) и перезимовавших особей обнаруживает летом аналогичные изменения, удерживаясь в состоянии возбужденной активности.

5. В осенне-зимний период у животных гонады которых находятся в стадии зимней регрессии, наблюдается ясно выраженное заторможение деятельности щитовидных желез.

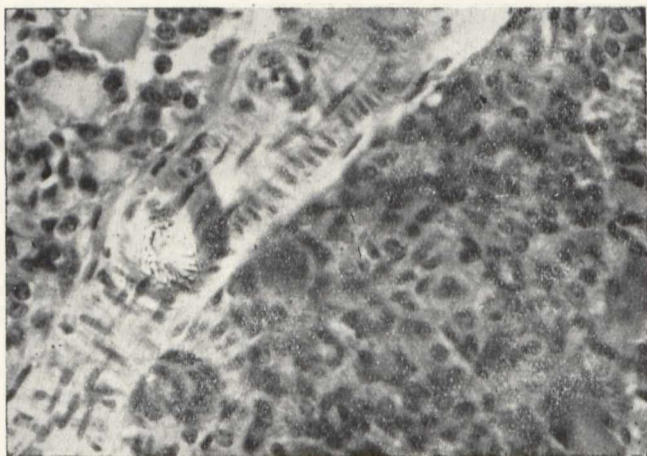
6. Возбужденная деятельность щитовидной железы выступает в период осенней смены волос. Во время весенней смены волос наступает период течки, вследствие чего нет возможности определить точно, какое влияние этот процесс оказывает на щитовидную железу.



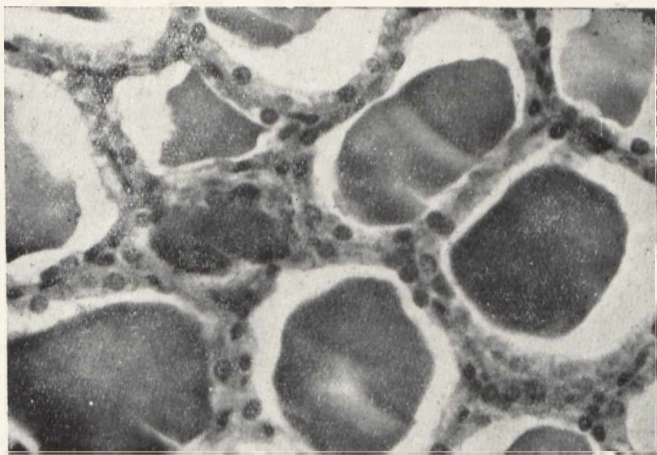
1



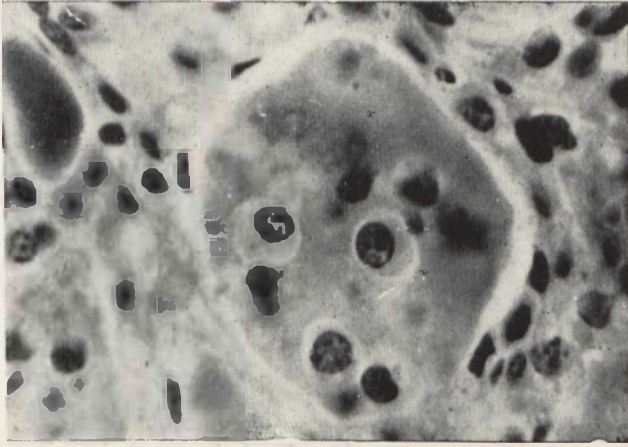
2



5



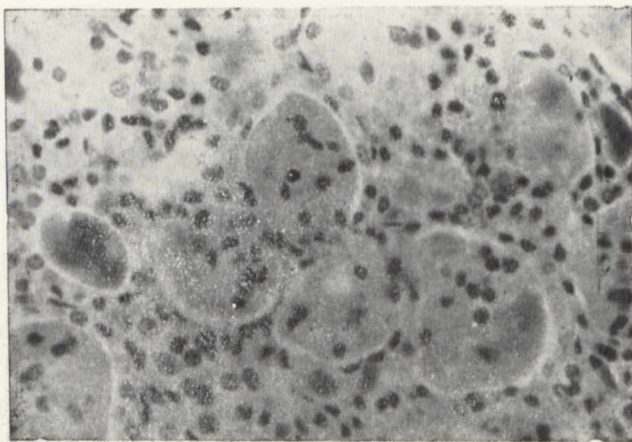
4



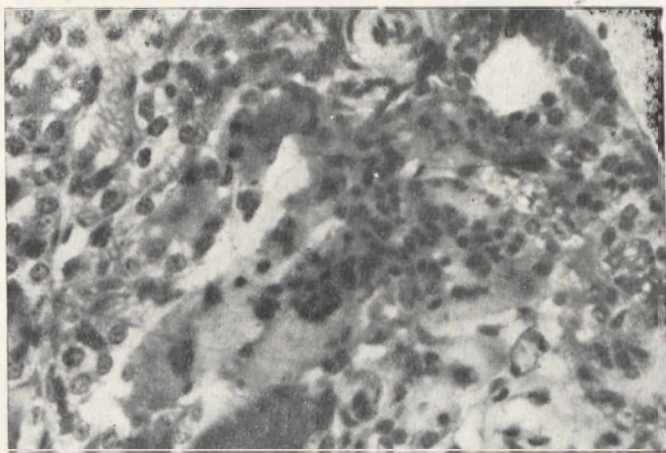
5



6



7



8



