

МЕТОДИКА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СУХО ТЕГЛО И КАЛОРИЧНОСТ НА ЗООПЛАНКТОНА

Слава Динева

Резюме: В рамките на международния проект EUROGEL по V^{та} рамкова програма на Европейския Съюз в България е въведена методика за определяне на сухо тегло и калоричност на зоопланктона.

Направена е редакция на методите за определяне на сухо тегло и калоричност на зоопланктона. Въвеждането на тази методика в България се извършва за първи път. Не са намерени сведения за прилагането и' в национален мащаб преди това. Проучена е литература по темата, използван е руски и украински опит в това отношение, въз основа на което е изготвена по-пълна и редактирана методика.

Предимството на определяне на калоричността по метода на мокрото изгаряне е, че с достатъчна точност може да се определи калоричността и на малки количества сухо тегло (0,5 – 1,0 mg).

Ключови думи: методи, сухо тегло, калоричност, зоопланктон

Въведение

В рамките на международния проект EUROGEL по V^{та} рамкова програма на Европейския Съюз в България е въведена методика за определяне на сухо тегло и калоричност на зоопланктона [7].

Направена е редакция на методите за определяне на сухо тегло и калоричност на зоопланктона. Въвеждането на тази методика в България се извършва за първи път. Не са намерени сведения за прилагането и' в национален мащаб преди това. Проучена е литература по темата, използван е руски и украински опит в това отношение, въз основа на което е изготвена по-пълна и редактирана методика.

Принципа на определяне на калоричността по метода на мокрото изгаряне се състои в това, че изследваната проба се изгаря в разтвор на калиев бихромат в концентрирана сярна киселина при достатъчно силно нагриване [4]. По разликата между началното количество окислител и оставащото след окисление на пробата се определя количеството кислород, изразходено за окисление на органичното вещество и с помощта на оксикалоричен коефициент се изчислява калоричността на изследваното вещество.

Предимството на определяне на калоричността по метода на мокрото изгаряне [5; 4; 8; 1] е, че с достатъчна точност ($\pm 3\text{-}5\%$) може да се определи калоричността и на малки количества сухо тегло (0,5 – 1,0 mg).

Масата на организмите може да се изрази в единици сурово или сухо тегло, в пропорционални на тях величини (съдържание на въглерод, азот, количество кислород, необходимо за окисляване на органичното вещество) или в енергетични единици. Сухото тегло представлява постоянно тегло - напълно обезводненото вещество на телата на изследваните организми. Калоричността на ктенофорите [3] е енергетичната ценност на дадения организъм, отнесена към единица маса, така че определянето и' дава възможност да се изрази масата на изследваните организми в енергетични единици. Калоричната стойност може да се представи като kcal/g сурово или сухо тегло или съответно cal/mg.

Калоричната стойност представлява количеството топлина, което се отделя при пълното изгаряне на единица маса от твърдо тяло или течност. В SI калоричната стойност се изразява в J/kg. Понастоящем калорията се дефинира чрез джаула [3], нарича се международна таблична калория (cal_{IT}) и е равна на 4,1868 джаула [6]. Тази връзка позволява чрез оксикалоричния коефициент [2] да се определя калоричността на изследваното вещество.

Калоричността на сухото вещество на телата на водните организми варира в широки граници, което се дължи основно на различното съотношение на минералната и органичната фракция, докато различията в химичния състав на органичното вещество на телата на различните организми имат относително по-малко значение [3].

Метод за определяне на сухо тегло

Необходимо оборудване и стъклария

Сушилня
 Аналитична везна, 0-220 g
 Микроаналитична везна, 0-1 g
 Ексикатор с накален силикагел
 Стъклени тегловни шишенца с шлифт, 10 ml
 Филтърна хартия

Ход на тегловния анализ

Всяка проба от даден организъм се довежда до постоянно сухо тегло в сушилня при температура 60 °С. Времето необходимо за мнemiопсис е около 1-2 две денонощия.

Запълва се долната част на ексикатора с накален силикагел. Силикагелът се накалява в муфелна пещ при 400 °С в продължение на 2-3 часа до оцветяването му в тъмен (тъмно-виолетов, тъмно-кафяв цвят). Шлифтът на ексикатора се смазва леко със специална смазка или вазелин, за да се постигне херметизация.

Веднага след изсушаването пробите се поставят в така подготвения ексикатор. Там престояват един час, след което се теглят за сухо тегло. Всяка проба се суши и тегли, като това се повтаря до получаване на постоянно сухо тегло. Всички номерирани тегловни шишенца, в които вече има проби с постоянно сухо тегло, остават в ексикатора.

Метод за определяне калоричността на зоопланктона чрез мокро изгаряне

Необходимо оборудване и стъклария

Сушилня
 Аналитична везна, 0-220 g
 Микроаналитична везна, 0-1 g
 Ексикатор с накален силикагел
 Стъклени тегловни шишенца с шлифт, 10 ml
 Малки порцеланови хаванчета с пестик
 Ерленмайерови колби, термоустойчиви - 100 ml
 Мерителни колби, термоустойчиви - 100 ml; 1 l
 Пипети Резила - 2 ml; 5 ml; 25 ml
 Пипети Фол - 5 ml; 100 ml
 Пипети Мор - 10 ml; 15 ml
 Бюрета за титруване - автоматична - 50 ml, в комплект с помпичка и тъмен тубос - 2 l
 Магнитна бъркалка и магнитче с тефлоново покритие
 Реактивни шишета на шлифт, със стъклени запушалки, от тъмно стъкло - 100 ml; 1 l
 Стъклени фунийки
 Метални шпатули, малки, неръждаеми, дължина: 10-12 cm
 Метални пинсети, малки, неръждаеми, 7-8 cm
 Индикаторно шишенце с капаче на шлифт, от тъмно стъкло - 100 ml
 Пръскалка
 Алюминиево фолио
 Филтърна хартия

Необходими реактиви

Калиев бихромат ($K_2Cr_2O_7$) - 0,1 N p-p в концентрирана сярна киселина
 Сярна киселина (H_2SO_4 , х.ч.)
 Фенилантранилова киселина, х.ч. - 0,2 % в 0,2 % p-p на натриев карбонат (Na_2CO_3)
 Калиев бихромат ($K_2Cr_2O_7$) - 0,1 N воден p-p - фиксагал
 Морова сол (Фероамониев сулфат) - $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \times 6H_2O$, х.ч. - 0,2 N воден p-p. За продължително съхраняване се прибавя H_2SO_4 (20 ml на l).
 За титруването се приготвя работен 0,02 N p-p.

Сребърен сулфат (Ag_2SO_4) – х.ч.
 Фосфорна киселина (H_3PO_4): 83–98 %

Приготвяне на разтвори

Калиев бихромат ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) – 0,1 N р-р в концентрирана сярна киселина (H_2SO_4)

Използва се фиксанал или 4,9 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ се изсипват в термоустойчива колба. Добавят се 25 ml дестилирана вода за разтваряне, а след това на порции се прибавя концентрирана H_2SO_4 до 1 l като периодично се разклаща и охлажда колбата за да не се пръсне от загряването. Колбата се покрива с капаче от алуминиево фолио. Поставя се в студена сушилня, която се включва на 140 °C. При $t = 140$ °C се засичат 2 часа. Колбата се оставя да изстине и престои до другия ден. Получения р-р има тъмно-вишнев цвят и е готов за употреба. Налива се в реактивно шише от тъмно стъкло.

Фенилантранилова киселина – 0,2 % в 0,2 % р-р на натриев карбонат

За целта 200 mg фенилантранилова киселина и 200 mg натриев карбонат се разтварят в мерителна колба от 100 ml с малко дестилирана вода. Нагрива се на водна баня при 60° C до пълното им разтваряне. След изстиване на разтвора обемът се довежда до 100 ml с дестилирана вода. Този разтвор е индикаторен. Съхранява се в шишенце от тъмно стъкло.

Морова сол (Фероамониев сулфат) - $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Основен 0,2 N р-р

В мерителна колба от 1 l се разтварят 78,5 g Морова сол с дестилирана вода. За продължително съхранение в колбата се прибавят 20 ml концентрирана H_2SO_4 . Основният р-р се съхранява в реактивно шише от тъмно стъкло.

Работен 0,02 N р-р

За титруването се приготвя 0,02 N работен р-р. Вземат се 100 ml от основния р-р и се поставят в мерителна колба от 1 l. Разрежда се с дестилирана вода до 1 l (разреждане 10 пъти). Този р-р се поставя в бюретата, тубосът на която е от тъмно стъкло.

Определяне фактора на разтвора на Морова сол

В суха ерленмайерова колба се поставят 5 ml 0,1 N воден р-р на $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Добавят се 5 ml концентрирана H_2SO_4 . Закрива се с капаче от алуминиево фолио и се охлажда. Добавят се 2-3 капки фенилантранилова киселина и се титрува с 0,02 N р-р на Морова сол до поява на светло зелен цвят.

Извършват се 3 анализа и ако разликата между отчетените обеми на разтвора на Морова сол, изразходени за титруването не е по-голяма от 0,05 ml се взема средноаритметичната стойност.

Изчислява се фактора (F) на разтвора на Морова сол:

25

$$F = \frac{25}{\text{обем на разтвора на Морова сол, изразходен за титруването, ml}}$$

Ход на анализа

След изсушаването до постоянно сухо тегло, пробата се стрива в порцеланово хаванче, като за всяка проба се използва отделно, чисто и напълно сухо порцеланово хаванче и съответно отделен, чист и напълно сух порцеланов пестик. Всяка стрита проба се поставя в съответното номерирано стъклено тегловно шишенце с капаче на шлифт. Всички тегловни шишенца стоят в ексикатора.

Приготвят се малки чашки от алуминиево фолио с помощта на пинсета и се номерират. Последователно с помощта на пинсетата се поставят чашките в микроаналитичната везна (0-1 g) и се определят теглата им.

За всяка проба, от тегловното шишенце, където се държи съответното сухо тегло, с малка метална шпатула се взема малко количество сухо вещество и от него чрез пинсета се взема колкото трохичка (количеството сухо вещество да е не повече от 5 mg, за предпочитане е да бъде около 2 - 4 mg, но колкото се вземе от първия път, толкова се тегли – не се връща и не се добавя. Допустимо е да бъде 0,5-5,0 mg. Така взетите количества се поставят в съответните чашки от алуминиево фолио.

Тегли се всяка чашка с поставеното в нея сухо вещество. По разликата в теглата между пълната и празната чашка се изчислява теглото на сухо вещество, взетото за определяне на калоричност.

Всяка проба сухо вещество се прехвърля в съответна номерирана, суха, термоустойчива ерленмайерова колба от 100 ml, където ще се извършва мокрото изгаряне. Върху всяка колба се поставя капаче от алуминиево фолио. Операцията се повтаря за същото сухо вещество в друга номерирана, суха, термоустойчива ерленмайерова колба от 100 ml, т.е. от всяко сухо вещество се вземат по две проби за мокро изгаряне.

Във всяка колба, включително и в трите празни проби се поставя катализатор - 100 mg Ag_2SO_4 .

Трите празни проби представляват проби без сухо вещество в тях, които преминават през целия ход на анализа.

Включва се сушилният да се нагрее до 100 °C.

За елиминиране пречещото влияние на хлоридите [8] всяка проба от стрито сухо вещество се изгаря с 2 ml H_3PO_4 в съотношение 1:1 (1 обем концентрирана киселина : 1 обем дестилирана вода). Прибавят се по 2 ml H_3PO_4 1:1 във всяка колба със сухо вещество и в трите празни проби, като внимателно се отваря капачето от алуминиево фолио от единия край, поставя се киселината и веднага пак се затваря.

В продължение на 20 min пробите трябва да бъдат в сушилния при 100 °C. Поставят се всички проби едновременно. Температурата веднага спада. Изчаква се да се повиши отново до 100 °C и се засичат 20 min. Горещите колби се вадят от сушилния.

След като пробите са изстинали, много прецизно в тях се добавят с пипета Мор по 10 ml 0,1 N р-р $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ в концентрирана H_2SO_4 . Извършва се повторно изгаряне на пробите при температура 140 °C.

Отваря се сушилният, когато е с температура 140 °C и бързо се слагат всички проби с капачета от алуминиево фолио. Температурата веднага спада. Изчаква се отново да се повиши до 140 °C, след което се засичат 20 min. Изваждат се горещите проби и се оставят да изстинат.

Като се отваря по малко капачето от алуминиево фолио на всяка колба, към нейното съдържимо бавно, по стената на колбата, се добавят 15 ml дестилирана вода. При това колбите силно се загряват. Оставят се да изстинат при стайна температура, след което пробите са готови за титруване.

Във всяка проба излишъкът от нереагиращия калиев бихромат се титрува с 0,02 N р-р на Морова сол. За целта тубосът на автоматичната бюрета е запълнен с достатъчно количество от този разтвор, на който вече сме определили фактора.

Преди титруването във всяка проба се добавят 2-3 капки индикатор – фенилантранилова киселина. Докато титруваме пробите, те се разбъркват чрез магнитна бъркалка и магнитче с тефлоново покритие. Титруването продължава до изменение на цвета на пробата от тъмно-вишнев в светло зелен.

Започваме титруването от празните проби. Извършват се анализи на трите празни проби и ако разликата между отчетените обеми на разтвора на Морова сол, изразходени за титруването не е по-голяма от 0,05 ml се взема средноаритметичната стойност.

Изчисляване на калоричната стойност

Преходът към единиците за калоричност се осъществява с помощта на оксикалоричен коефициент, равен на 4,0 cal/mgO₂ [2]. Въз основа на това формулата за изчисляване на калоричност е следната:

$$C = \frac{(a - b) \cdot 0,16 \cdot F \cdot 4,0}{P}, \text{ cal/mg} = \text{kcal/g}$$

където:

a – обем на разтвора на Морова сол, изразходен за титруване на празната проба, ml.

b – обем на разтвора на Морова сол, изразходен за титруване на пробата с изследвано сухо вещество, ml

0,16 – разчетен коефициент (1 ml 0,02 M или N p-p на Морова сол съответствува на 0,16 mg O₂)

F – фактор на разтвора на Морова сол

4,0 – оксикалоричен коефициент

P - количество изследвано сухо вещество, mg

Благодарност

Това изследване е в рамките на проект EVK3-СТ-2002-00074: “Желеобразен зоопланктон в Европа: Механизми, определящи масовото развитие на желеобразния зоопланктон - екологични и социо-икономически последици” (EUROGEL), FP5, Европейски Съюз.

Литература

- [1] Винберг Г. (Ред.), 1968. Методы определения продукции водных животных. Вышэйшая школа, Минск, 245с.
- [2] Гигиняк Ю. Г., 1979. Калорийность водных беспозвоночных животных / Общие основы изучения водных экосистем. Ленинград, Наука, 43-57.
- [3] Динева С., Михнева В., 2004. Сухо тегло и калоричност на ктенофората *Mnemiopsis ledyi* пред българския черноморски бряг. Известия на Съюза на учените – Варна, Серия “Медицина и екология”, Варна, т. 2’2003/1’2004, 122-126.
- [4] Остапеня А. П., 1965. Полнота окисления органического вещества водных беспозвоночных методом бихроматного окисления. ДАН БССР, 9, 4, 273-276.
- [5] Строганов Н. С., 1962. Методики определения дыхания рыб / Руководство по методике исследований физиологии рыб. Москва, 35-96.
- [6] Химически енциклопедичен речник, 1993. Наука и изкуство, София, стр.189
- [7] Dineva S., 2003. Methods for determination of dry weight and caloricity of the zooplankton. In: Bulgarian Report for Project EVK3-2002-00074: "European gelatinous zooplankton: Mechanisms behind jellyfish blooms and their ecological and socio-economic effects", (EUROGEL), FP5, European Community.
- [8] Strickland J. D. H., Parsons T. R., 1965. Determination of organic (oxidizable) matter as carbon/ A manual of sea water analyses (Bull. Fish. Res. Board Can; № 125), 137-142.

За контакти:

гл. ас. д-р инж. Слава Иванова Динева

Институт по рибни ресурси

Бул. "Приморски" 4, П.К. 72, 9000 Варна, България

Тел.: +359 52 63 20 66

E-mail: dineva_slava@abv.bg