

Biokemijska istraživanja planktona u Jadranu

I Dio Preliminarna ispitivanja biokemijskog sastava
sveukupnog zooplanktona Kaštelanskog zaljeva

Biochemical Studies of Plankton in Adriatic

Preliminary study of biochemical composition
of zooplankton of the Kaštela Bay

T. Vučetić*, A. Damjanić** i A. Čubretović**

* Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split

** Zavod za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split

U V O D

U ekologiji mora sve se više pristupa ispitivanjima variranja kemijskog sastava organizama, a naročito pri utvrđivanju uvjeta za produktivnost morskih populacija.

Za bolje razumjevanje kretanja energije, tj. pretvaranja anorganske materije u organsku preko različitih lanaca ishrane u moru, posvećuje se pažnja sadržaju energije kod planktonskih organizama. Kod tog prijenosa uloga planktona (fitoplanktona i zooplanktona) studira se kvantitativno. Naročito su potrebni podaci o zooplanktonskim organizmima ili drugoj karici u produkcionom lancu u moru, a važno je za ishranu treće ili posljednje nama najinteresantnije karike-ribama. Naročito je potrebno detaljnije poznavanje fiziologije i biokemije pojedinačnih vrsta zooplanktona.

Do sada je u Jadranu samo ispitivan kemijski sastav riba i školjkaša (Krvarić, 1955; Marinković, 1968), dok za planktonske organizme nema nikakvih podataka pa se smatralo potrebnim da se pristupi i ovoj vrsti istraživanja.

U ovom radu iznose se rezultati preliminiranih biokemijskih istraživanja sveukupnog zooplanktona Kaštelanskog zaljeva iz razdoblja od lipnja do listopada 1968. godine. Svrha rada bila je da se ispituju u prvom redu metode analiza s obzirom na postojeće laboratorijske uvjete ili eksperimentalne mogućnosti te nakon toga utvrdi budući smjer istraživanja.

Biokemijska istraživanja planktona u Jadranu

I Dio Preliminarna ispitivanja biokemijskog sastava
sveukupnog zooplanktona Kaštelanskog zaljeva

Biochemical Studies of Plankton in Adriatic

Preliminary study of biochemical composition
of zooplankton of the Kaštela Bay

T. Vučetić,* A. Damjanić** i A. Čubretović**

* Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split

** Zavod za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split

U V O D

U ekologiji mora sve se više pristupa ispitivanjima variranja kemijskog sastava organizama, a naročito pri utvrđivanju uvjeta za produktivnost morskih populacija.

Za bolje razumjevanje kretanja energije, tj. pretvaranja anorganske materije u organsku preko različitih lanaca ishrane u moru, posvećuje se pažnja sadržaju energije kod planktonskih organizama. Kod tog prijenosa uloga planktona (fitoplanktona i zooplanktona) studira se kvantitativno. Naročito su potrebni podaci o zooplanktonskim organizmima ili drugoj karici u produkcijom lancu u moru, a važno je za ishranu treće ili posljednje nama najinteresantnije karice-ribama. Naročito je potrebno detaljnije poznavanje fiziologije i biokemije pojedinačnih vrsta zooplanktona.

Do sada je u Jadranu samo ispitivan kemijski sastav riba i školjkaša (Krvarić, 1955; Marinković, 1968), dok za planktonske organizme nema nikakvih podataka pa se smatralo potrebnim da se pristupi i ovoj vrsti istraživanja.

U ovom radu iznose se rezultati preliminiranih biokemijskih istraživanja sveukupnog zooplanktona Kaštelanskog zaljeva iz razdoblja od lipnja do listopada 1968. godine. Svrha rada bila je da se ispituju u prvom redu metode analiza s obzirom na postojeće laboratorijske uvjete ili eksperimentalne mogućnosti te nakon toga utvrdi budući smjer istraživanja.

MATERIJAL I METODIKA

Zooplanktonski materijal za biološku obradu [kvantitativno-kvalitativni sastav ili broj kopepoda, dekapoda i kopelata te suha težina sveukupnog zooplanktona (tab. I)] dobiven je vertikalnim potezima Hensenovom srezom 100/75-svila. No 3. Uzorci planktona za kemijske analize (tab. II) dobiveni su dijagonalnim i sinusoidalnim potezima većim svilenim mrežama (Nansen 100/svila No. 3.).

Prije laboratorijske obrade uzorci su makroskopski i mikroskopski pregledani i očišćeni od primjesa (od većih algi ili anorganskih onečišćenja).

Vlažni materijal sušen je u termostatu na temperaturi od 60°C, onda je u tarioniku usitnjen do brašnatog stanja te analiziran sadržaj: ukupna mast, pepeo, ukupan dušik i sastav amino-kiselina.

Tabela I

KOLIČINE (suha težina) I SASTAV ZOOPLANKTONA KAŠTELANSKOG ZALJEVA

	1	2	3	4	5	6	7	8
Datum	Zooplankton suha težina mg/m ³	Kope- poda No/m ³	Cala- nus h. No/m ³	Deka- poda No/m ³	Kope- lata No/m ³	Riblja jaja No/m ³	Larve No/m ³	Poliheta No/m ³
17. VI 1968.	5,8	268	62	35	140	3	2,1	0,4
1. VII „	5,8	408	14	58	183	2	2,2	1,1
28. IX „	4,2	165	—	41	113	0,6	1,2	1,7
14. X „	4,2	258	7	23	26,4	1	1	1,7
29. X „	4,2	258	7	23	26,6	—	—	—

Ukupne masti — Sadržaj masti kod zooplanktona prvi je proučavao Brandt (1898). Wimpenny je (1938) ustanovio da se najveće količine masti u Sjevernom moru javljaju u lipnju, studenom i prosincu, a Fischer i Hosking (1962) u travnju, svibnju i kolovozu. Klasičnu metodu za određivanje ukupne masti primijenili su Fischer (1961) i Giese (1967). Rayment i suradnici (1964) vršili su ekstrakciju sa smjesom kloroform-metanol (2:1). Ova metoda je modificirana miješanjem uzorka zooplanktona sa zrcima kvarca, kako bi se postigao što bolji kontakt otapala s uzorkom i skratilo vrijeme potrebno za ekstrakciju. Ekstrakciju smo vršili u Soxhlet-aparatu sa smjesom kloroform metanol (2:1) kroz 5 sati.

Pepeo — Određivanje pepela kod zooplanktona izvršili su Rayment i suradnici (1964) žarenjem uzoraka u mufolnoj peći na 500°C do konstantne težine. U našim ispitivanjima povećali smo temperaturu žarenja na 800°C a zatim smo prije vaganja uzorak hladili u eksikatoru.

Ukupan dušik — Prva određivanja ukupnog dušika zooplanktona (pretežno kopepodi) izvršio je Brandt (1898), a zatim Brandt i Raben (1919).

Standardna metoda određivanja ukupnog dušika u biološkim materijalima rad je po Kjeldahlu uz varijacije različitih reagenata i katalizatora Vogel (1958). Modificiranu Kjeldahlovu metodu primijenili su Corner i Cowey (1964). Raymont i suradnici (1964) upotrijebili su konc. H_2SO_4 , a kao katalizator bakar. Pare NH_3 uvodili su u bornu kiselinu destilacijom s vodenom parom uz dodatak NaOH.

Tabela II

KEMIJSKI SASTAV ZOOPLANKTONA KAŠTELANSKOG ZALJEVA

	1	2	3	4	5
Datum	Mast %	Pepeo %	Ukupni dušik (UN) %	Proteini %	Broj ustanovljenih amino-kiselina
17. VI 1968.	25,3				
1. VII „		32,5			
28. IX „			9,2	57,5	
14. X „					18
29. X „	41,0	15,8	6,1	38,1	18

Pri određivanju ukupnog dušika (UN) primijenili smo Kjeldahlovu metodu uz proces digestije i destilacije. Kao reagens kod digestije primijenjena je konc. H_2SO_4 , a kao prikladan i lako dostupan katalizator $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Nakon digestije dodana je NaOH te izvršena destilacija u aparatu prema konstrukciji J. L. Hoskinsa. Dobiveni dušik u obliku amonijaka apsorbiran je u 0,04 N HCl. Višak kiseline titriran je sa 0,04 N NaOH uz metiloranž. Izvršen je također i slijepi pokus uz glukozu. Proračun ukupnog dušika izveden je po formuli:

$$\% \text{ UN} = \frac{100 (V_1 - V_2) \cdot 0,5603}{W}$$

gdje je: V_1 = Volumen utrošene 0,04 N HCl (u ml)

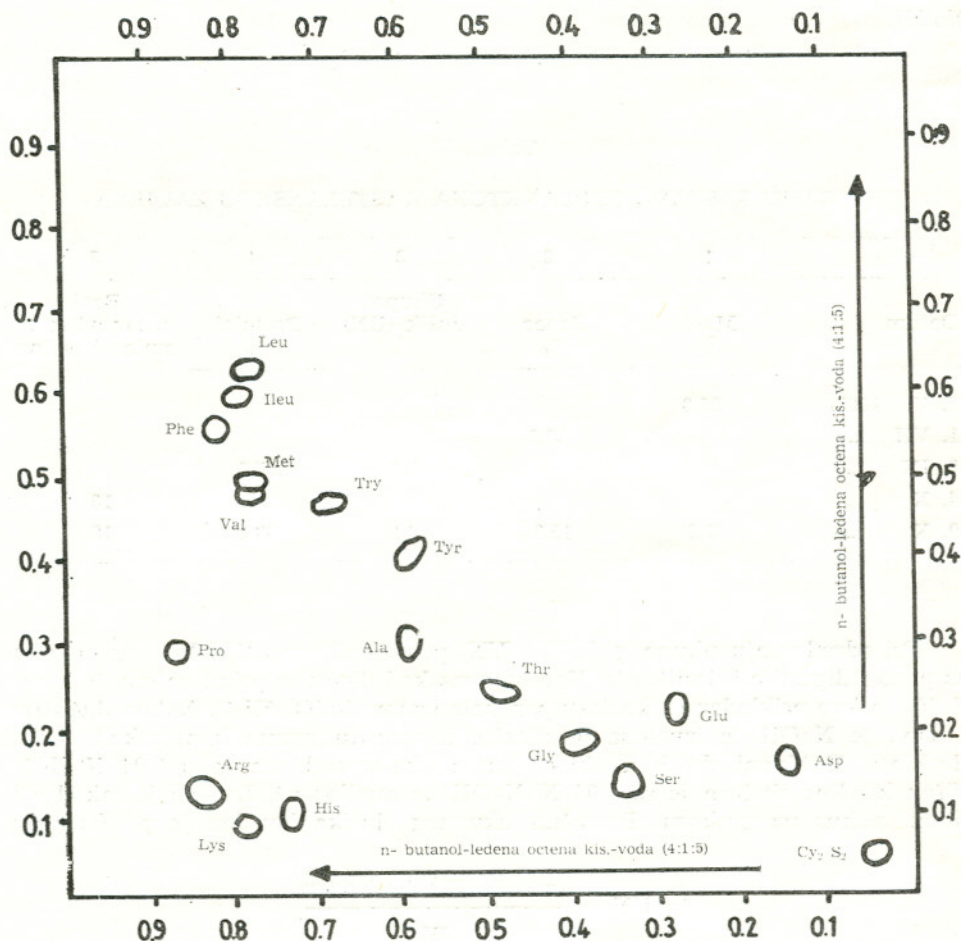
V_2 = Volumen utrošene 0,04 N NaOH za slijepi pokus (u ml)

W = težina ukupnog uzorka zooplanktona (u mg)

Proteini — Proteini se mogu odrediti analizom sa biuret reagensom Baymont i Linford (1966). Uobičajeno je da se količina bjelančevina dobije množenjem postotka za ukupni dušik (UN) protein-konverzionim faktorom 6,25. Primjenom tog faktora izrazili smo postotak ukupnih bjelančevina u uzorcima.

Amino-kiseline — Amino-kiseline u zooplanktonu postoje i kao slobodne i u sastavu bjelančevina. Za kvalitativno određivanje amino-kiselina primijenili smo metodu kromatografije na papiru.

Slika 1. KROMATOGRAM AMINOKISELINA
(dvodimenzionalna-uzlazna metoda)



Uzorci zooplanktona zagrijavani su sa 6 N HCl uz refluks kroz 24 sata. Ohlađena otopina je filtrirana i čuvana u tamnoj boci. Kao test supstancija pripremljena je otopina smjese pojedinih definiranih amino-kiselina te nanesena na papir za kromatografiju Whatman No 1 i razvijena u oba pravca uzlaznim postupkom sa sistemom otapala: n-butanol-ledena octena kiselina — voda (4:1:5, v/v). Ukupno vrijeme razvijanja kromatograma iznosilo je 83 sata (43 + 40 sati) kod temperature termostata 18,3°C. Ustanovljene su Rf — vrijednosti za svaku amino-kiselinu posebno te karakteristična obojenja prskanjem kromatograma sa 0,2%-tnom vodenom otopinom ninhidrina. Isti postupak primijenjen je kod uzorka zooplanktona sa 0,02 ml otopine, uz razvijanje kromatograma kroz 55 sati (29 + 26 sati) kod temperature 19,2°C. (Slika 1.)

REZULTATI I DISKUSIJA

Biološke analize — U području Kaštelanskog zaljeva ispituje se zooplankton već dugi niz godina u sklopu kompleksnih oceanografskih istraživanja (Vučetić, 1961). Kvalitativno-kvantitativnim istraživanjima utvrđene su sezonske i godišnje fluktuacije zooplanktona (Vučetić, 1968).

Za analize biokemijskog sastava upotrijebljeni su uzorci sveukupnog zooplanktona. Kvalitativno-kvantitativni podaci o sastavu zooplanktona u istraživanim mjesecima ukazuju na koje se grupe vrijednosti odnose. U tabeli I iznesene su vrijednosti (suhe težine u mg) zooplanktona na m³. Količine glavnih predstavnika ili nosilaca ove biomase izražene su brojem organizama na m³. Zooplankton Kaštelanskog zaljeva uglavnom je sastavljen od crustacea (kopepoda, dekapodnih larva i ostrakoda) i kopelata, dok ostali organizmi dolaze različito u pojedinim sezonama. Od tih organizama nešto značajniju ulogu igraju poliheti, riblja jaja i riblje larve.

Biokemijske analize — Iz dobivenih rezultata prikazanih u tabeli II proizlazi da je zooplankton u lipnju znatno siromašniji mastima nego u listopadu. Vrijednosti od 25,3 do 41,0% masti slične su vrijednostima koje je dobio Orr (1934) za kopepode (10,5 do 47%). Nakai je (1955) dobio vrijednosti od 53,9% te sugerira korelaciju vrijednosti masti i proteina u zooplanktonu.

Ukupna količina pepela računata na suhu težinu kretala se u granicama od 15,8 do 32,5%, dok količina ukupnog dušika od 6,1 do 9,2%. Primjenom protein-konverzionog faktora dobili smo količinu proteina od 38,1 do 57,5%. Te vrijednosti za kopepode u ispitivanjima Orra (1934) iznose do 77%, a kod Bascheri i Mazza 50—60% od suhe težine.

Kvalitativnim određivanjima amino-kiselina (sl. 1) ustanovili smo prisutnost 18 amino-kiselina čije Rf-vrijednosti i obojene reakcije odgovaraju literaturnim podacima Hais i Macek (1963). Ustanovili smo prisutnost sljedećih amino-kiselina: cistin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, serin, treonin, alanin, tirozin, triptofan, metionin, valin, fenil-alanin, izoleucin, leucin, prolin, arginin, lizin i histidin. Amino-kiseline cistin i triptofan Bascheri i suradnici (1968) ne spominju kod svojih analiza, dok su ostale amino-kiseline (za koje su oni dali i kvantitativne podatke) identične s našim rezultatima.

ZAKLJUČCI

Kako je u uvodu rečeno ovo su bili preliminarni pokusi radi ispitivanja eksperimentalnih uvjeta za rad. Prema dobivenim rezultatima sve vrijednosti se kreću u granicama vrijednosti drugih autora. Kompariranje podataka nije moguće na malom broju mjerenja, ali kao primjer o kojem se može diskutirati bila bi komparacija vrijednosti masti iz različitih sezona. Veći postotak masti u lovinu iz listopada može se pripisati drukčijem sastavu zooplanktona i to vjerojatno polihetnim crvima kojih je bilo 4 puta više nego u uzorku iz lipnja. To je samo pretpostavka, jer su vjerojatno i drugi zooplanktonski organizmi mogli imati veći broj uljnih kapljica, kao pohranjenu rezervnu hranu.

U budućim istraživanjima bilo bi dobro vršiti permanentni nadzor zooplanktona Kaštelanskog zaljeva na jednomjesečnim uzorcima, te, ako tehničke mogućnosti dozvole, vršiti kvantitativne analize amino-kiselina na pojedinim po biomasi jačim grupama ili zastupljenim zooplanktonskim organizmima.

KRATAK SADRŽAJ

Rad donosi podatke o prvim preliminarnim biokemijskim istraživanjima planktona istočne obale Jadrana.

Iznesene su eksperimentalne mogućnosti i uvjeti rada. Na materijalu iz Kaštelanskog zaljeva za razdoblje od lipnja do listopada 1968. izvršene su preliminarne analize biokemijskog sastava sveukupnog zooplanktona i dobivene su slijedeće vrijednosti u odnosu prema suhoj tvari: masti od 25,3—41,0%, pepeo 15,8—32,5% bjelancevine 38,1%—57,5, UN (ukupni dušik) 6,1—9,2% i kvalitativno je ustanovljeno 18 amino-kiselina.

BIOCHEMICAL STUDIES OF PLANKTON IN ADRIATIC

Preliminary study of biochemical composition of zooplankton of the Kaštela Bay

T. Vučetić*, A. Damjanić** and A. Čubretović**

* Institute of Oceanography and Fisheries, Split

** Institute of Organic Chemistry-Faculty of Chemical Technology, Split

SUMMARY

Presented in this paper are the results of a preliminary study to determine the biochemical composition of plankton from the eastern coast of Adriatic Sea.

Analytical procedures are described and results obtained from the analysis of zooplankton collected in the Bay of Kaštela from June — October 1968. are presented.

Preliminary analysis of the total zooplankton samples gave the following values (percentage of dry material): fat—from 25,3, to 41,0 ash 15,8—32,5, protein 38,1—57,5, total nitrogen 6,1—9,2. Eighteen amino acids were detected.

L I T E R A T U R A

- Bascheri, M. C. § Mazza J. 1968. Contribution à l'étude biochimique du plancton. II Variations des teneurs en glucides et en protéines des Copépodes du golfe de Marseille. Rapp. Comm. int. Mer. Médit. 19, 3, pp. 547—549.
- Bascheri, M. C. comp. 1968. Contribution à l'étude biochimique du plancton III Composition qualitative et quantitative en acides aminés de quelques prélèvements du golfe de Marseille. Rapp. Comm. int. Mer. Médit. 19, 3, pp. 553—556.
- Brandt, K. 1898. »Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Planktons«. Wiss. Meeresuntersuch. Abt. Kiel. 3:43—90.
- Brandt, K., Raben, E., 1919, »Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Planktons«. Wiss. Meeresuntersuch. Abt. Kiel. N. F. 19:175—210.
- Corner, E. D. S., Cowey C. B. 1964, »Some Nitrogenous Constituents of the Plankton«, Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 2:147—167.
- Fisher, L. R. 1962. »The Total Lipid Material in some species of Marine Zooplankton«, Rapp. et proc. -verbaux des reunions, 153:129—136.
- Fisher, L. R., Hosking, Z. D., 1962. »Vitamin A and fat in the herring (*Clupea harengus* L.) and in its food«, Mar. Res. No 4. Dept. Arg. Fisc. Scotl.
- Krvarić—Škare, M. 1955. Seasonal variations in the chemical composition and nutritive value of Sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) of the Central Adriatic. Proc. and tech. paper 3: 441—447.
- Giese A. C., 1967. »Some Methods for Study of the Biochemical Constitution of Marine Invertebrates«. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 5: 159—186.
- Hais I. M., Macek L., 1963. »Handbuch der Papierchromatographie«, Band I. G. Fisher Verlag, Jena str. 520—526.
- Marinković—Roje, M. 1968. Sezonske varijacije kemijskog sastava dagnji (*Mytilus galloprovincialis* Lamk.) iz Limskog kanala, Thalassia Jugoslavica, 4: 69—85.
- Nakai, Z., 1955. »The chemical composition, volume, weight and size of the important marine plankton« Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Spec. Publ., 5:12—23.
- Orr, H. P. 1934. On the biology of *Calanus finmarchicus* Part. IV. Seasonal changes in the weight and chemical composition in Loch Fyne J. Mar. biol. Ass. U. K., 19:613—32.
- Raymont J. E. G. Linford E., 1966., »Note on the Biochemical Composition of Some Mediterranean Zooplankton«, Int. Revue ges. Hydrobiol. 51:485—488.
- Raymont J. E. G. Austin J., Linford E., 1964. »Biochemical Studies on marine Zooplankton 1. The Biochemical Composition of *Neomysis integer*«, J. Cons. int. Explor. Mer. 28:354—363.
- Vogel, A. I. 1958. »Elementary Practical Organic Chemistry-Quantitative Organic Analysis«, Longmans Green — London, 652—657.
- Vučetić, T. 1967. Long term observations of zooplankton fluctuation in the Bay of Kaštela, Proc. gen. Fish. Coun. Médit., 8:261—65.
- Vučetić, T. § Pucher-Petković, 1969. Long term observation of plankton fluctuation in the central Adriatic. Stud. Rev. gen. Fish. Coun. Médit., 41:13—23.
- Wimpenny, R. S., »A routine method for the estimation of fat in plankton and its application to herring tissues«, J. Cons. int. Explor. Mer. 13:338—48.