

Τ.Ε.Ι ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ  
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΣΕΙΡΑ

Μ Ε Θ Ο Δ Ο Ι Μ Ε Τ Ρ Η Σ Η Σ Χ Λ Ω Ρ Ο Φ Υ Λ Λ Ω Ν

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ  
ΧΑΤΖΗΣ ΜΙΧΑΗΛΣ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΕΣ  
ΚΟΝΤΟΣ ΜΙΛΤΙΑΔΗΣ  
ΜΟΛΑΡΗ ΕΛΕΝΗ  
ΤΣΑΤΣΟΥΛΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 1995

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ -  
Αριθμ. Εισαγωγής 491



## Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Φυτοπλαγκτόν

Το πλαγκτόν αποτελείται από το φυτοπλαγκτό και το ζωοπλαγκτό, το οποίο επιπλέει στη θάλασσα ή στο γλυκό νερό και κινείται από τον άνεμο ή τα θαλάσσια ρεύματα.

Το φυτοπλαγκτό είναι μικροσκοπικά φυτά τα οποία αποτελούν τους πρωτογενείς παράγοντες οργανικής ύλης στα υδάτινα οικοσυστήματα και εισφέρουν στη ροή ενέργειας στα οικοσυστήματα.

### 2. Χλωροπλάστες

Οι χλωροπλάστες είναι σημαντικοί για την αναγνώριση των φυτοπλαγκτονικών οργανισμών. Τα τρία βασικά χαρακτηριστικά είναι το χρώμα που εκφράζει την παρουσία των χρωστικών ουσιών, το σχήμα και ο αριθμός οργανιδίων με τα οποία ο οργανισμός παρουσιάζει μια επιφάνεια, έτσι ώστε να απορροφά το φως και να φωτοσυνθέτει.

Ο χλωροπλάστης στο φυτοπλαγκτό, είναι αυτός που παγιδεύει και χρησιμοποιεί την ηλιακή ενέργεια για να μετατρέψει το  $\text{CO}_2$  (διοξείδιο του άνθρακα) σε οργανική ύλη.

Οι χλωροπλάστες βρίσκονται βυθισμένοι μέσα στο κυτταρόπλασμα και περιβάλλονται από ιδιαίτερη μεμβράνη

ξανθοφύλλη . Οι παραπάνω χρωστικές είναι αδιάλυτες στο νερό αλλά διαλύονται στο οινόπνευμα , αιθέρα , βενζόλη , ακετόνη κ.λ.π. σχηματίζοντας πραγματικά διαλύματα . Επίσης διαλύονται στα λίπη . Η ποσότητα στα πράσινα όργανα των φυτών της περιεχόμενης χλωροφύλλης είναι πολύ μικρή , περίπου 0,5-1% της ξηράς αυτών ουσίας .

### 3.Χρωστικές ουσίες - Χλωροφύλλες

Η εξελικτική αντίδραση των περισσότερων ομάδων των θαλάσσιων φυτών οδηγεί στην συμπλήρωση της δυνατότητας απορρόφησης του φωτός μέσω της χλωροφύλλης με βοηθητικές χρωστικές (σχ.1) . Αυτές οι χρωστικές απορροφούν φωτεινή ενέργεια σε μήκη κύματος ευρείας περιοχής και μετά μεταφέρουν την ενέργεια στο κέντρο αντίδρασης της χλωροφύλλης για να χρησιμοποιηθεί αυτή στη φωτοσύνθεση . Οι χρωστικές αυτές απορροφούν το φως από περιοχές του φάσματος όπου η χλωροφύλλη δεν μπορεί . Το σχήμα 1 απεικονίζει την συμπληρωματική δράση της χλωροφύλλης α και των βοηθητικών χρωστικών όπως η φουκοξανθίνη , που βρίσκεται στα καφέ άλγη και στα δειάτομα . Η φουκοξανθίνη απορροφά το φως βασικά από την μπλε-πράσινη περιοχή του φάσματος , την περιοχή από όπου η χλωροφύλλη απορροφά το φως ελάχιστα . Σε συνδυασμό , η χλωροφύλλη και η φουκοξανθίνη είναι ικανές να απορροφήσουν ενέργεια από το μεγαλύτερο μέρος του φάσματος του ορατού φωτός . Μια άλλη ομάδα

βοηθητικών χρωστικών , οι φυκομπιλίνες , βρίσκονται στα κόκκινα άλγη και στα κυανοβακτήρια . Αυτές οι χρωστικές παρουσιάζουν απορρόφηση του φάσματος που μοιάζει πολύ με αυτή της φυκοξανθίνης .

Τα φωτοσυνθετικά άλγη έχουν χλωροφύλλη στους χλωροπλάστες τους . Η χλωροφύλλη αποτελείται από το δακτύλιο του πορφυρίου (porphyrin-ring system) που μοιάζει με αυτό της αιμογλοβίνης , μόνο που έχει ένα άτομο μαγνησίου αντί για ένα άτομο σιδήρου (σχ.2) . Τα Άλγη έχουν τέσσερεις τύπους χλωροφύλλης , α , b , c ( c1 και c2 ) και d . Η χλωροφύλλη α είναι η βασική φωτοσυνθετική χρωστική ( ο δέκτης του φωτός στο φωτοσύστημα I της αντίδρασης του φωτός) σε όλα τα φωτοσυνθέτοντα άλγη και κυμαίνεται από 0.3-3% του ξηρού βάρους αυτών . Η χλωροφύλλη α είναι αδιάλυτη στο νερό και στον πετρελαικό αιθέρα αλλά είναι διαλυτή στην αλκοόλη , στο διαιθυλαιθέρα , στη βενζίνη και στην ακετόνη . Η χρωστική εμφανίζει δύο κύρια μήκη κύματος απορρόφησης *in vitro* , το ένα μήκος κύματος στην περιοχή του κόκκινου φωτός στα 663 nm και το άλλο στα 435 nm .

Αν και η χλωροφύλλη α βρίσκεται σε όλα τα φωτοσυνθέτοντα άλγη , οι άλλες χλωροφύλλες των αλγών έχουν περιορισμένη εξάπλωση και λειτουργούν σαν βοηθητικές στη φωτοσύνθεση . Η χλωροφύλλη b βρίσκεται στα ευγλενόφυτα και στα χλωρόφυτα (σχ.2) . Η χλωροφύλλη

b λειτουργεί στη φωτοσυνθετική διαδικασία σαν χρωστική που εσοδεύει το φως μεταφέροντας την ενέργεια του απορροφημένου φωτός στην χλωροφύλλη a . Η αναλογία της χλωροφύλλης a προς την χλωροφύλλη b ποικίλει από 2:1-3:1 . Τα χαρακτηριστικά της διαλυτότητας της χλωροφύλλης a είναι όμοια με αυτά της χλωροφύλλης b και *in vitro* η χλωροφύλλη b εμφανίζει δύο κύρια μέγιστα απορρόφησης στην ακετόνη ή στη μεθανόλη , ένα στα 645 nm και το άλλο στα 435 nm (σχ.3) . Η χλωροφύλλη c (σχ.2) βρίσκεται στα Δινόφυτα , στα Κρυπτόφυτα , Ραφιδόφυτα στα Χρυσόφυτα , στα Φαιόφυτα . Η χλωροφύλλη c παρουσιάζει φασματικά δύο διαφορετικά συστατικά : την χλωροφύλλη c1 και την c2 . Η χλωροφύλλη c2 είναι πάντοτε παρούσα αλλά η χλωροφύλλη c1 απουσιάζει στα Δινόφυτα και στα Κρυπτόφυτα . Η αναλογία της χλωροφύλλης a προς την χλωροφύλλη c κυμαίνεται από 1.2:2 έως 5.5:1 . Η χλωροφύλλη c πιθανώς λειτουργεί σαν βοηθητική χρωστική στο φωτοσύστημα II . Η χρωστική είναι διαλυτή στον αιθέρα , στην ακετόνη , στην μεθανόλη και στην αιθυλακετάση , αλλά δεν διαλύεται στο νερό και στον πετρελαικό αιθέρα . Η αποσταγμένη χλωροφύλλη c1 έχει κύρια μέγιστα απορρόφησης στα 634 , 583 και 452nm στην μεθανόλη , ενώ η χλωροφύλλη c2 έχει μέγιστα στα 635 , 586 και 452 nm .

Όπως αναφέραμε παραπάνω η χλωροφύλλη a είναι μια σύνθετη ένωση , με χημική δομή ανάλογη της αιμογλοβίνης.

δηλαδή το μοριακό της θεμέλιο είναι ένας δακτύλιος πορφυρίνης, για την ακρίβεια μαγνησιοπορφυρίνης. Το κεντρικό άτομο, Mg (μαγνήσιο), ενώνεται σχηματίζοντας σύμπλοκα με τέσσερα άτομα N, τα οποία αντιπροσωπεύουν ετεροάτομα τεσσάρων πυρρολικών δακτυλίων, που συνδέονται μεταξύ τους με μεθυλικές γέφυρες (-CH-). Ανάμεσα στον τρίτο (III) πυρρολικό δακτύλιο και τον άνθρακα της γ μεθυλινικής ομάδας σχηματίζεται δακτύλιος κυκλοπεντανόνης, ο οποίος έχει την καρβοξυλική ομάδα εστεροποιημένη με μεθανόλη. Η υποκατάσταση πυρρολικών υδρογόνων με μη πολικές ομάδες δημιουργεί τις ακόλουθες πλευρικές αλυσίδες: 4 μεθυλικές, 1 αιθυλική, 1 βινυλική και 1 καρβοξυλική. Η τελευταία είναι εστεροποιημένη με το μόριο της μεγαλομοριακής αλκοόλης φυτόλης ( $C_{20}H_{39}OH$ ). Ο μοριακός τύπος της χλωροφύλλης α είναι  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ .

Η χλωροφύλλη b προκύπτει από την α με την αντικατάσταση της μεθυλικής ομάδας του II πυρρολικού δακτυλίου από μια αλδευδική ομάδα. Δε περιέχεται σε όλα τα φωτοαυτότροφα φυτά αλλά απουσιάζει από τα διάτομα, τα φαιοφύκη και τα ροδοφύκη τα οποία περιέχουν αντίστοιχα χλωροφύλλη c και d. Στα προκαρυωτικά φωτοσυνθετότα βακτήρια υπάρχουν ανάλογες, αλλά διαφορετικές χρωστικές με κυριότερο αντιπρόσωπό τους την βακτηριοχλωροφυλλεία που προκύπτει από την χλωροφύλλη α με προσθήκη υδρογόνων στις θέσεις C3 και

C4 και με υποκατάσταση της βινυλικής ομάδας από υδροξυαιθυλική ομάδα .

Όπως αναφέραμε και παραπάνω ο μοριακός τύπος της χλωροφύλλης α είναι  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  και της χλωροφύλλης b  $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$  . Αυτές είναι διεστέρες των χλωροφυλλινών δикаρβονικών οξέων όταν το εν-COOH εστεροποιηθεί με την φυτόλη  $C_{20}H_{39}OH$  και το δεύτερο με μεθυλική αλκοόλη  $CH_3OH$  . Το πράσινο χρώμα εξαρτάται από την πορφυρινική ρίζα του μορίου της χλωροφύλλης με το άτομο του Mg .

Η χλωροφύλλη α αποτελεί τα 72% περίπου των χρωστικών της χλωροφύλλης η δε χλωροφύλλη b τα 28% . Η ανίχνευση των δύο χλωροφυλλών ( α , b ) επιτυγχάνεται και φασματοσκοπικά , παρουσιάζοντας χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης που διαφέρει από το φάσμα το οποίο δίνει το δια εκχυλίσεως εκ των χρωματοφώρων λαμβανόμενο μίγμα των 2 άλλων χρωστικών καροτίνη και ξανθοφύλλη .

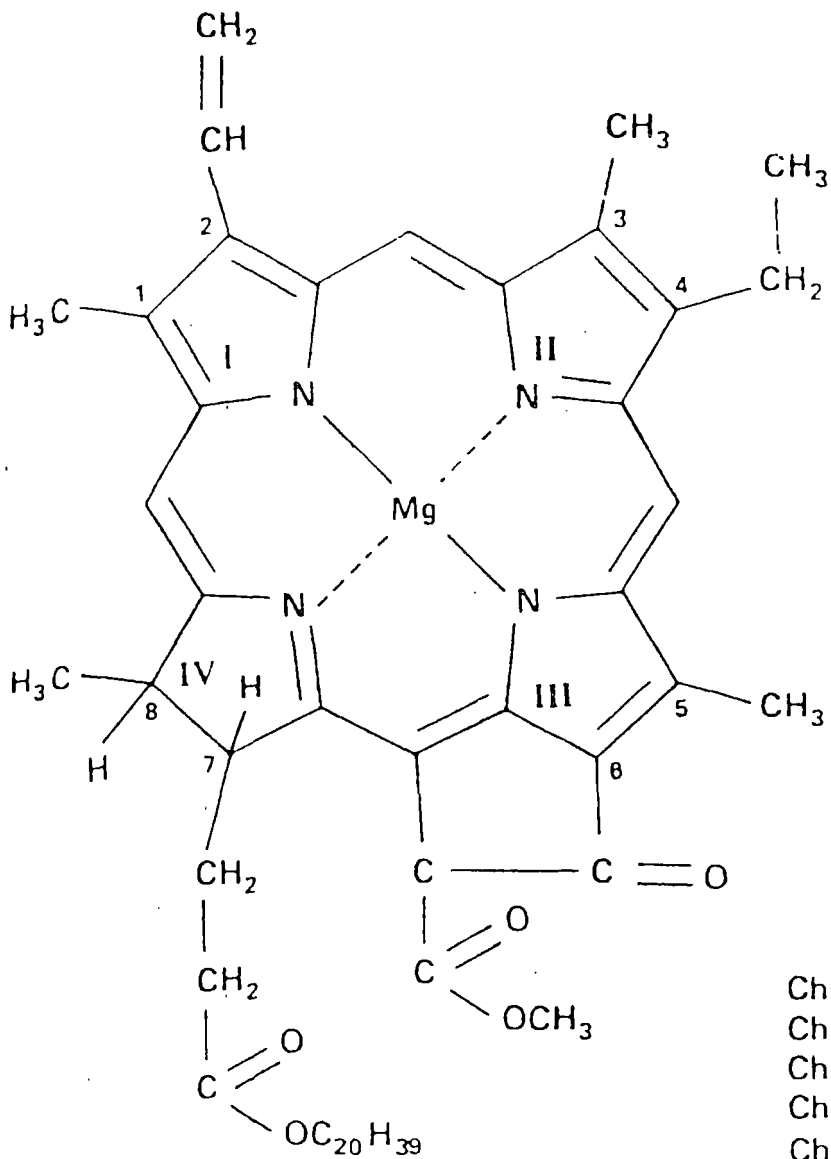
Η πρωταρχική χρωστική ουσία , που παίρνει μέρος στην φωτοσύνθεση είναι η χλωροφύλλη α και βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα . Η χλωροφύλλη α μετατρέπει την απορροφούμενη ακτινοβολία σε χημική ενέργεια . Οι άλλες χρωστικές λειτουργούν , σαν βοηθητικές με το να απορροφούν ενέργεια από συγκεκριμένα μήκη κύματος και να τη μεταφέρουν στην χλωροφύλλη α . Οι χρωστικές των χλωροπλαστών μπορούν να παραληφθούν με οργανικούς διαλύτες και να διαχωριστούν με χρωματογραφία λεπτού χαρτιού ή χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ( T L C ) .

Η διάταξη των χρωστικών είναι ίσης αξίας με άλλες ιδιότητες του κυττάρου, όσον αφορά την τοποθέτηση σε κατηγορίες νεοαναληφθέντων οργανισμών.

Η προέλευση του χρωματισμού του κυττάρου, είναι χρήσιμη στις βιοχημικές μετρήσεις, βιομάζας, ολικού φυτοπλαγκτού και στον καθορισμό της τάξης που εκπροσωπεί ο οργανισμός. Όταν υπάρχουν σημαντικές ποσότητες από φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς σε ένα φυτικό μέσο, τα κύτταρα μπορούν να φιλτραριστούν, να αποχωριστούν οι χρωστικές και τα χρωματισμένα υγρά να αναλυθούν με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρων για να καταταχθούν ανάλογα.

Ο προσδιορισμός των φυτικών χρωστικών μας δίνει πληροφορίες για τον φυτοπλαγκτονικό πληθυσμό ενός θαλάσσιου οικοσυστήματος.





Chl a:  
 Chl b:  
 Chl d:  
 Chl c<sub>1</sub>:  
 Chl c<sub>2</sub>:

as shown in structure

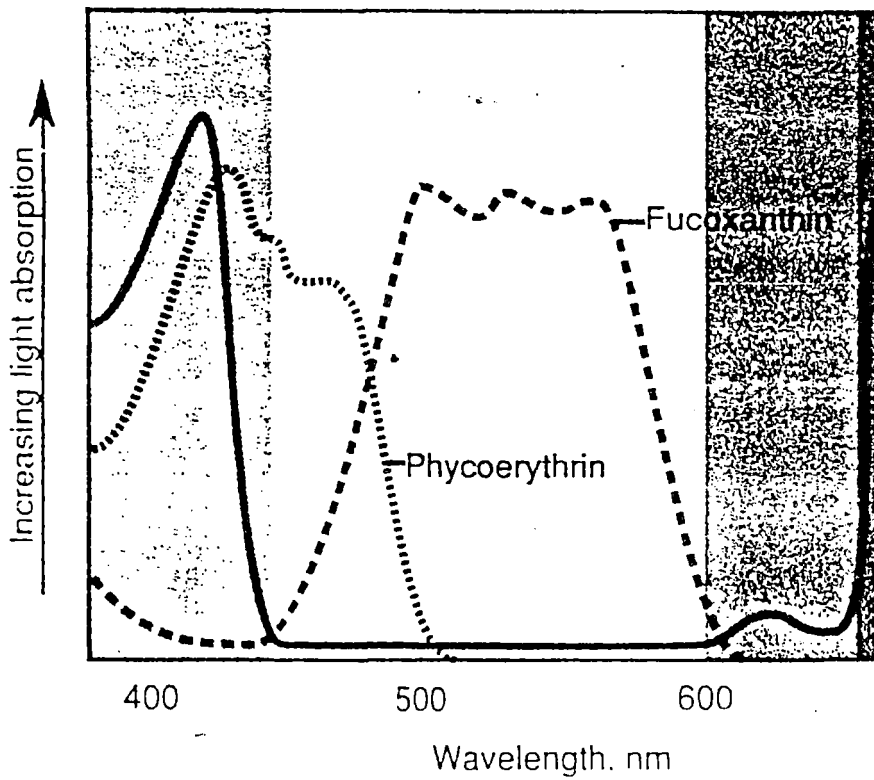
II-3 = CHO

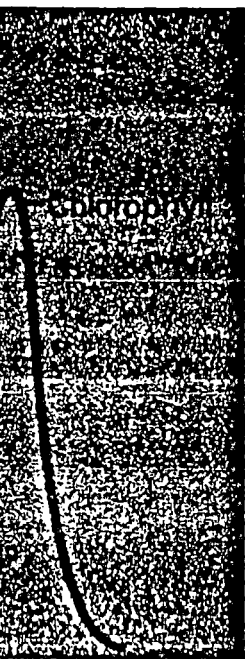
I -2 = CHO

IV-7 = CH=CHCOOH; double bond at IV-7 8

IV-7 = CH=CHCOOH; double bond at IV-7 8

II-4 = CH=CH<sub>2</sub>





-700

## Β.ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

### 1 . Γενικά για τις μεθόδους και τις χλωροφύλλες

#### Α ) Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες , όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή , αποτελούν τις βασικές φυτικές χρωστικές , οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης και άρα είναι σημαντικές για τα θαλάσσια οικοσυστήματα .

Ο προσδιορισμός των χλωροφύλλων μας δίνει πληροφορίες για τον φυτοπλαγκτονικό πληθυσμό ενός θαλάσσιου οικοσυστήματος .

Η αναλογία των χρωστικών εξαρτάται από το είδος του φυτοπλαγκτού στην περιοχή μέτρησης .

Ο προσδιορισμός των χλωροφύλλων γίνεται με την ποσοτική παραλαβή τους από τους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς , οι οποίοι συγκρατούνται μαζί με το

σωματιδιακό υλικό κατά τη διήθηση του δείγματος . Μετά χρησιμοποιούμε διάφορες τεχνικές για τον προσδιορισμό τους .

Με τις φθορισμομετρικές μεθόδους ανάλυσης προσδιορίζουμε τις χλωροφύλλες απευθείας στο θαλασσινό νερό σε συγκεντρώσεις μέχρι  $0.1\mu\text{g/lit}$  . Το κύριο πρόβλημα είναι ότι ο in situ φθορισμός εξαρτάται από παράγοντες όπως η μορφολογία και η φυσιολογία των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων , την αναλογία των ειδών , το εξωτερικό φως κ.λ.π.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η χρωματική μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί φασματοφωτόμετρο .

Φθορισμομετρικά γίνεται με χρήση ακτινοβολίας διέγερσης μήκους κύματος  $450\text{ nm}$  και μέτρηση της εκπομπής στην περιοχή των  $660\text{ nm}$  . Η φθορισμομετρική μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη από την τριχρωματική και χρησιμοποιείται για ολιγότροφες περιοχές , όπου η συγκέντρωση των χρωστικών είναι μικρή . Μειονέκτημα της φθορισμομετρικής μεθόδου είναι ότι χρειάζεται βαθμονόμηση με πρότυπα διαλύματα τα οποία είναι δύσκολα να παρασκευασθούν .

Για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των χλωροφύλλων χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές τεχνικές .

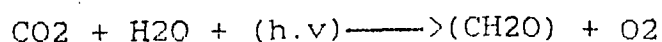
Η πιο συνηθισμένη είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδος ( T L C ) όπου οι χρωστικές διαχωρίζονται σε πλάκες Silica-gel με τη βοήθεια μίγματος οργανικών

Διαλυτών . Οι χρωστικές αναγνωρίζονται από την τιμή του Rf τους . Οι κηλίδες αποκόπτονται , οι χρωστικές εκλούονται και προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά . Η ποσότητα των χρωστικών μπορεί να μετρηθεί και πάνω στην πλάκα με χρήση φθορισμομέτρου και μετά από ψεκασμό με κατάλληλο αντιδραστήριο .

Επίσης έχουν δοκιμαστεί στην ανάλυση των χλωροφύλλων και η αέρια χρωματογραφία (G.C) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ( HPLC ) . Και οι δύο δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα αλλά απαιτούν πολύ ακριβά όργανα .

Β) Προσδιορισμός πρωτογενούς παραγωγής (Primary Production)

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε μια θαλάσσια μάζα μπορεί να προσδιοριστεί από τη μέτρηση της κατανάλωσης του περιεχόμενου σε αυτή CO<sub>2</sub> , με βάση τη γενική αντίδραση της φωτοσύνθεσης :



Για το σκοπό αυτό , μια γνωστή ποσότητα C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> προστίθεται σε ένα θαλάσσιο δείγμα που έχουμε πάρει με μια από τις δειγματοληπτικές μεθόδους .

Το δείγμα τοποθετείται σε γυάλινη διαφανή φιάλη και ξαναβυθίζεται στο σημείο δειγματοληψίας για ορισμένο χρονικό διάστημα , για να εξελιχθεί η διαδικασία της φωτοσύνθεσης σε φυσικές συνθήκες .

Μετά ανασύρεται και διηθείται . Το C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> που έχει περάσει στα φυτοπλαγκτονικά κύτταρα μετριέται σε

μετρητή Geiger . Από τη μέτρηση αυτή υπολογίζεται ο ρυθμός φωτοσύνθεσης στο δείγμα .

Μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι :

α) Ποσότητα του προσληφθέντος C14 , απελευθερώνεται πάλι στο διάλυμα με τις εκκρίσεις των οργανισμών .

β) Άλλη ποσότητα C14 ελευθερώνεται με την αναπνοή.

γ) Ο ρυθμός πρόσληψης του C14 από τους οργανισμούς είναι ελαφρά διαφορετικός από το ρυθμό πρόσληψης του C12 . Για αυτό το λόγο απαιτείται ειδική διόρθωση στις μετρήσεις .

Για τη διόρθωση των αποτελεσμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σκοτεινόχρωμες φιάλες , όπου δεν γίνεται η φωτοσύνθεση .

#### Γ) Προσδιορισμός χλωροφύλλων

Η τριχρωματική μέθοδος είναι γρήγορη και απλή για την εκτίμηση της φυτικής ζωής σε μια θαλάσσια περιοχή . Στηρίζεται στην εκχύλιση των χρωστικών με διάλυμα ακετόνης 90% και στη μέτρηση της απορρόφησης τους σε ειδικά επιλεγμένα μήκη κύματος . Οι διάφορες κατηγορίες χρωστικών προσδιορίζονται με χρήση εμπειρικών εξισώσεων .

Τα σφάλματα της μεθόδου οφείλονται στους παρακάτω παράγοντες :

α) Η ποσότητα των χρωστικών και η αναλογία των διαφόρων τύπων εξαρτάται από τα είδη του φυτοπλαγκτού και το



στάδιο ανάπτυξής του .

β) Προσδιορίζονται μαζί και χρωστικές που προέρχονται από χερσαία είδη και μεταφέρθηκαν στη θάλασσα από τον άνεμο ή τα ποτάμια .

γ) Μπορεί μια ποσότητα χρωστικών να έχει αποδομηθεί .

δ) Μπορεί να μη γίνει πλήρης εκχύλιση και παραλαβή των χρωστικών με την ακετόνη .

Η τριχρωματική μέθοδος δίνει παραπλήσια αποτελέσματα με τις χρωματογραφικές μεθόδους και χρησιμοποιείται εξαιτίας της απλότητάς της στην ωκεανογραφική έρευνα.

#### Δ. Δειγματοληψία

Για τη συλλογή του φυτοπλαγκτού απαιτείται διήθηση ποσότητας θαλασσινού νερού 0.5-5lt ανάλογα με την παραγωγικότητα της περιοχής . Στις εύτροφες περιοχές χρήσιμο είναι να γίνει πρώτη διήθηση από nylon δίχτυ για την απομάκρυνση του ζωοπλαγκτόν .

Το δείγμα μπορεί να διατηρηθεί για 8 ώρες σε σκοτεινό ή ψυχρό μέρος , αν προστεθούν 0.2ml αιωρήματος ανθρακικού μαγνησίου (  $MgCO_3$  ) , το οποίο δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για την παρεμπόδιση της αποσύνθεσης του φυτοπλαγκτού .

Το αιώρημα αποτελείται από 1gr  $MgCO_3$  σε 100ml  $H_2O$  το οποίο ανακινείται καλά πριν χρησιμοποιηθεί .

Το δείγμα δεν πρέπει να καταψυχθεί για να μη

Διαρραγούν τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτοπλαγκτονικών οργανισμών .

#### Ε. Διήθηση

Πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη συλλογή του . Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι ηθμών , κυρίως ηθμοί ινών υάλου (GF\F) (και ηθμοί χάρτου) . Κατά τη διάρκεια της διήθησης καλό είναι να προστεθεί στον ηθμό μια μικρή ποσότητα αιωρήματος  $MgCO_3$  ώστε να μικρύνουν οι πόροι και να συγκρατηθεί καλύτερα το φυτοπλαγκτόν . Καλύτερη είναι η χρήση ηθμών κελουλόζης ή άλλων πολυμερών . Πλεονέκτημά τους είναι η καλύτερη συγκράτηση του φυτοπλαγκτού και η διάλυση αυτών στην ακετόνη , διευκολύνοντας έτσι τη διαδικασία εκχύλισης .

Η διήθηση πρέπει να γίνεται σε χαμηλή πίεση , έστω και αν έτσι επιβραδύνεται η διαδικασία , για να μην σπάσουν τα τοιχώματα των φυτοπλαγκτονικών κυττάρων και καταστραφούν οι χρωστικές .

#### ΣΤ. Συντήρηση

Αν τα δείγματα του φυτοπλαγκτού πρόκειται να φυλαχθούν στους ηθμούς , τότε απαιτείται προσθήκη αιωρήματος  $MgCO_3$  στον ηθμό προς το τέλος της διήθησης , ώστε το περιβάλλον στον ηθμό να είναι αλκαλικό και να επιβραδύνουν έτσι οι διεργασίες αποσύνθεσης . Οι ηθμοί πρέπει να τοποθετηθούν στο ψυγείο

σε θερμοκρασία (T)  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  .

### Ζ.Εκχύλιση

Το δείγμα με τον ηθμό φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml διαλύματος 90% ακετόνης . Ο σωλήνας πωματίζεται ώστε να διαλυθεί ο ηθμός και να παραληφθούν οι χρωστικές . Ο ειδικός αναδευτής ( Ultrasonic Vibrator ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για καλύτερη παραλαβή των χλωροφυλλών .

Μετά το δείγμα φυγοκεντρείται για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα και είναι έτσι έτοιμο για φωτομέτρηση .

Η όλη διαδικασία πρέπει να γίνεται μακριά από το ηλιακό φως και πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή της εξάτμισης της ακετόνης , μια και η πτητικότητα της είναι μεγάλη .

### Η.Μετρήσεις

Οι μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο πρέπει να γίνονται αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση .

Το μέγεθος της κυβελίδας που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από την απορρόφηση του διαλύματος και την ακρίβεια του οργάνου . Σε ολιγότροφες περιοχές μπορεί να χρειαστεί και κυβελίδα μήκους 10cm .

Για το τυφλό προσδιορισμό , σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης , χρησιμοποιείται διάλυμα ακετόνης 90% . Οι

κυψελίδες κατά τη διάρκεια της μέτρησης πρέπει να μένουν σκεπασμένες για να μην εξατμίζεται η ακετόνη .

Τα μήκη κύματος , όπου γίνονται οι μετρήσεις είναι :  
750-665-663-645-630-510-480 nm .

## Ζ. Διορθώσεις Μετρήσεων

### α) Διόρθωση τυφλού :

1. Προσδιορίζεται η απορρόφηση του τυφλού σε όλα τα μήκη με ακετόνη 90% και στις δύο κυψελίδες
2. Προσδιορίζεται η απορρόφηση που οφείλεται στη θολερότητα του δείγματος από την απορρόφηση στα 750 nm
3. Μετρείται η απορρόφηση του δείγματος στα 750 nm , διορθώνεται ως προς το τυφλό και η τιμή που προκύπτει (ΕΒ) πολλαπλασιάζεται με ένα συντελεστή F , η τιμή του οποίου σε διάφορα μήκη κύματος είναι :

$\lambda$  : 665 , 645 , 630 , 510 , 480 nm

F : 1 , 1 , 1 , 2 , 3

Η τελική τιμή της απορρόφησης για κάθε μήκος κύματος είναι :

$$E\lambda = A\lambda - T\lambda - (F\lambda * E\beta)$$

όπου :

Aλ : Η ένδειξη του φωτομέτρου

Tλ : Η ένδειξη για το τυφλό στο αντίστοιχο μήκος κύματος .

### β) Διόρθωση μήκους κυψελίδας

Αν η μέτρηση γίνει με κυψελίδες διαφορετικού μήκους

χρειάζεται η ανάλογη διόρθωση . Αν η απορρόφηση μετρηθεί με κυψελίδα μήκους 1cm , τότε η ένδειξη πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί 10 . Γενικά η απορροφήση πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή  $10/L_{κυψ}$  όπου  $L_{κυψ}$  το μήκος της κυψελίδας που χρησιμοποιήθηκε (σε cm) .

γ) Διόρθωση όγκου εκχυλιστικού :

Αν η εκχύλιση δεν έγινε με 10ml ακετόνης τότε η απορρόφηση πολλαπλασιάζεται με ένα συντελεστή , ο οποίος δίνεται από τη σχέση :

$$V_{εκψ} / 10$$

όπου  $V_{εκψ}$  ο όγκος της ακετόνης που χρησιμοποιήθηκε .  
Π.Χ αν η εκχύλιση έγινε με 15 ml ακετόνης τότε η τιμή της απορρόφησης πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί  $15 \setminus 10 = 1.5$  .

#### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

1. Richards : Χλωροφύλλη α :  $C = 15.6E665 - 2.0E645 - 0.8E630$

Χλωροφύλλη b :  $C = 25.4E645 - 4.4E665 - 10.3E630$

Χλωροφύλλη c :  $C = 109E630 - 12.5E665 - 28.7E645$

Καροτενοειδή :  $C = 7.6 * (E480 - 1.49E510)$

2. Parsons - Strickland :

$$\text{Χλωροφύλλη } \alpha : C = 11.6E665 - 1.31E645 - 0.14E630$$

$$\text{Χλωροφύλλη } b : C = 20.7E645 - 4.34E665 - 4.42E630$$

$$\text{Χλωροφύλλη } c : C = 55E645 - 4.64E665 - 16.3E645$$

$$\text{Καροτενοειδή} : C = 10.0E480$$

3. ΟΜΑΔΑΣ Scor / Unesco

$$\text{Χλωροφύλλη } \alpha : C = 11.64E663 - 2.16E645 + 0.10E630$$

$$\text{Χλωροφύλλη } b : C = 20.97E630 - 3.94E663 - 3.66E630$$

$$\text{Χλωροφύλλη } c : C = 54.22E630 - 14.81E645 - 5.53E663$$

Η συγκέντρωση των χρωστικών στο δείγμα είναι :

$$C_{\text{δειγ.}} = C / V \text{ mgr / m}$$

όπου  $V$  ο όγκος του νερού που διηθήθηκε ( σε lt ) .

### Προσδιορισμός φαιοφυτινών

Οι φαιοφυτίνες είναι προϊόντα αποσύνθεσης των χλωροφυλλών και η παρουσία τους παρεμποδίζει περισσότερο τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης α .

Σε χαμηλό pH οι χρωστικές χάνουν το Mg που περιέχουν και μετατρέπονται στις αντίστοιχες φαιοφυτίνες. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από ελάττωση της απορρόφησης στα 665 nm , κατά 40% περίπου . Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό χλωροφυλλών - φαιοφυτινών .

Για τη μέτρηση προστίθεται στην κυβελίδα δύο σταγόνες HCL 6N , το δείγμα αναδεύεται και η απορρόφηση μετριέται στα 665 και 750 nm . Η χλωροφύλλη α και οι φαιοφυτίνες δίνονται από τις σχέσεις :

$$\text{Χλωροφύλλη } \alpha \text{ (mgr / m )} = 26.7 (E - E_v) / (V * l)$$

$$\text{Φαιοφυτίνες (mgr / m )} = 26.7 (1.7E - E_v) / (V * l)$$

όπου :

l : μήκος της κυβελίδας σε cm

v : ο όγκος της ακετόνης σε ml

V : ο όγκος του δείγματος του νερού σε lt

E : E665 - E750 πριν την οξίνιση

E : E665 - E750 μετά την οξίνιση

Οι απορροφήσεις πρέπει προηγουμένως να διωρθώνονται ως προς το τυφλό .



## Φασματοφωτομετρική ανάλυση χλωροφύλλης

Οι χρωστικές είναι υπεύθυνες για το μετασχηματισμό της ηλιακής ενέργειας σε χημική σε όλους τους φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς. Παρ' όλο ότι τα φωτοσυνθέτοντα άγλη και τα χερσαία φυτά διαθέτουν μια συμπληρωματική ομάδα διαφορετικών χρωστικών, όλα διαθέτουν μια κοινή χρωστική, τη χλωροφύλλη α. Αυτή η χλωροφύλλη είναι η μόνη χλωροφύλλη που βρέθηκε στο φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης και είναι η πραγματικά υπεύθυνη χρωστική για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό προς το φωτοσυνθετικό κέντρο. Η χλωροφύλλη α απορροφάει φως καταρχήν στο κόκκινο και μπλε μήκος κύματος της ορατής περιοχής φωτός. Αυξάνοντας την ικανότητα των φυτών να χρησιμοποιήσουν μια ευρεία περιοχή φωτός για τη φωτοσύνθεση, τα φυτά έχουν αναπτύξει και άλλες χρωστικές, ονομαζόμενες βοηθητικές χρωστικές, οι οποίες απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία σε ορατά και μη μήκη φωτός, τόσο σε κίτρινο και πορτοκαλί. Οι βοηθητικές χρωστικές περνούν την ενέργεια που απορροφούν στο κέντρο αντίδρασης της χλωροφύλλης α για χρήση για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Η κάθε ομάδα αλγών έχει το δικό του συμπλήρωμα βοηθητικών χρωστικών.

Τα φυτικά κύτταρα είναι ικανά να συνθέτουν περισσότερες ή λιγότερες χρωστικές κάθε τύπου όχι υποχρεωτικά σε σταθερή αναλογία, εξαρτώμενη αυτή από την διαθεσιμότητα σε φως και θρεπτικά συστατικά.

Με αυτό το τρόπο τα φυτά αυξάνουν στο μέγιστο την εσοδεία του φωτός << αιχμαλωτίζοντας>> αυτό σε όσο δυνατό ευρύτερη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος του φωτός .

Σε αυτό το πείραμα παίρνουμε έναν γνωστό αριθμό από φυτοπλαγκτονικά κύτταρα , και καταστρέφουμε τα κύτταρα και τις χλωροπλαστικές ελικοειδείς μεμβράνες ( όπου οι χρωστικές ουσίες είναι τοποθετημένες ) σε διαλύτη . Η ένταση του χρώματος του λαμβανόμενου εκχυλίσματος των χρωστικών θα μετρηθεί μετά με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου . Το φασματοφωτόμετρο μετράει την ποσότητα του φωτός που οι χρωστικές απορροφούν στην περιοχή των μήκων κύματος του ορατού φωτός . Κάθε χρωστική έχει χαρακτηριστικό μήκος κύματος στο οποίο ο συντελεστής απορρόφησης αυτής γίνεται μέγιστος και από τη θέση της κορυφής αναγνωρίζεται η κάθε μία . Από το ύψος της κορυφής και τη τιμή του συντελεστή απορρόφησης υπολογίζεται η ποσότητα της κάθε χρωστικής που εκχυλίστηκε από τα κύτταρα . Επειδή θα γνωρίζουμε την ποσότητα των κυττάρων θα είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε την ποσότητα της κάθε χρωστικής ανά κύτταρο . Αυτού του είδους οι μετρήσεις είναι σημαντικές για τον υπολογισμό της βιομάζας όπως και για τον προσδιορισμό των φυσιολογικών συνθηκών των κυττάρων , όπως η *adaptation* προσαρμοστικότητα αυτών σε χαμηλής ή υψηλής έντασης φωτός και τη γενική ηλικία

του πληθυσμού . Αν γίνουν αυτές οι μετρήσεις σε ένα δείγμα πεδίου θα βρεθεί ότι υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη πλακτού που παρουσιάζονται για ένα ακριβή αριθμό κυττάρων . Σε αυτή την περίπτωση φιλτράρουμε ένα γνωστό όγκο θαλασσινού νερού μέσω ενός φίλτρου και εκχυλίζουμε τις χρωστικές από το φίλτρο . Τα αποτελέσματά μας θα δοθούν με βάση τον όγκο του δείγματος παρά με βάση των αριθμό των κυττάρων .

## Διαδικασία

1 . Για καλλιέργειες , μετράμε κύτταρα και υπολογίζουμε τον αριθμό των κυττάρων ανά ml και σημειώνουμε τον αριθμό αυτό .

2 . Φυγοκεντρούμε 40 ml αραιωμένης καλλιέργειας σε φυγοκεντρικό σωλήνα όγκου 50 ml ή 10 ml πυκνής καλλιέργειας σε φυγοκεντρικό σωλήνα όγκου 15 ml . Μετά γίνεται η εξακρίβωση της πυκνότητας της καλλιέργειας . Οι επόμενες φυγοκεντρικές ταχύτητες αντιστοιχούν σε επιτραπέζιο φυγόκεντρο και θα δώσουν καλύτερα αποτελέσματα .

Dinoflagellates	ταχύτ. 5	2 λεπτά
Diatome	ταχύτ. 3	3-6 λεπτά
Green algae	ταχύτ. 3	5-10 λεπτά

Όταν τα κύτταρα κατακαθίσουν και το υπερκείμενο τελικά καθαρήσει προχωρούμε στο βήμα 3 . Αν τα κύτταρα είναι πολύ μικρά δεν θα κατακρημνιστούν εύκολα . Σε αυτή την περίπτωση θα χρειαστεί να σωθεί ένα δείγμα από τα κύτταρα που παραμένουν στο υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση . Μετράμε αυτά τα κύτταρα και αφαιρούμε τον αριθμό τους από τον αρχικό αριθμό κυττάρων για να βρούμε τον αριθμό των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση .

3 . Προσεκτικά με πιπέτα παίρνουμε το μεγαλύτερο μέρος

του υπερκείμενου να διαταράξουμε τη στερεά φάση .  
Χύνουμε το υπερκείμενο εκτός αν χρειάζεται να  
μετρήσουμε τα κύτταρα που έχουν παραμείνει όπως  
περιγράψαμε στο βήμα 2 .

4 . Χρησιμοποιώντας μια μικρού βάρους σπάτουλα ,  
πρόσθετουμε μια μικρή ποσότητα  $MgCO_3$  και 1 ml 90 % ή  
100 % ακετόνη (εξαρτάται από τον τύπο του οργανισμού  
στη στερεά φάση (Pellet) ) . Χρησιμοποιούμε μια πιπέτα  
Pasteur για να επαναιωρήσουμε τη μάζα των κυττάρων  
και  $MgCO_3$  στην ακετόνη .

5 . Χαμηλώνω τα φώτα (σχεδόν σκοτάδι ) στο εργαστήριο .  
Χρησιμοποιούμε την ίδια πιπέτα Pasteur για να  
μεταφέρουμε το παραπάνω δείγμα σε παγωμένο λεπτό  
ομογενοποιητή και τρίβω το αιώρημα χρησιμοποιώντας  
τουλάχιστον 15 χτυπήματα . Γράφουμε τον αριθμό των  
χτυπημάτων που χρησιμοποιούμε και χρησιμοποιούμε τον  
ίδιο αριθμό κάθε φορά που τρίβουμε το αιώρημα  
( εκχύλισμα ) .

Προσοχή : Οι ομογενοποιητές είναι εύθραστοι . Πολύ δύναμη  
μπορεί να τους καταστρέψει .

6 . Χρησιμοποιούμε τη πιπέτα Pasteur για να μεταφέρουμε  
το ομογενοποιημένο δείγμα σε ένα καθαρό 15 ml σωλήνα  
φυγοκέντρησης με την ετικέτα <<δουλεμένο εκχύλισμα >> .  
Αντικαθιστάται ο λεπτός ομογενοποιητής με τυλιγμένο με  
αλουμινόχαρτο γυάλινο δοχείο των 500 ml στο πάγο .  
Καλύπτουμε το γυάλινο δοχείο με καπάκι αλουμινίου .

7 . Φυγοκεντρούμε το ομογενοποιημένο μίγμα σε ταχύτητα 5 για 30 δευτερόλεπτα ή μέχρις ότου το υπερκείμενο γίνει διαυγές . Αυτό το υπερκείμενο είναι το εκχύλισμα χρωστικής ουσίας . Προσοχή : Να μην χαθεί ούτε σταγόνα !

8 . Χρησιμοποιούμε μια καθαρή πιπέτα για να μεταφέρουμε το εκχύλισμα της χρωστικής ουσίας σε τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο φυγοκεντρικό σωλήνα , που είναι μαρκαρισμένος με 0.1 ml βαθμολόγηση και σημειωμένος σαν << τελικό εκχύλισμα >> . Κρατάμε όλα τα εκχυλίσματα των χρωστικών ουσιών παγωμένα και στο σκοτάδι . Το φως λευκαίνει τις διαλυμένες , εκχυλισμένες χρωστικές .

9 . Η μάζα του  $MgCO_3$  περιέχει σπασμένα κύτταρα , συμπεριλαμβανομένων θρυματισμένων μεμβρανών χλωροπλαστών που περιέχουν ακόμη χρωστικές . Ανάλογα από την πυκνότητα και την ηλικία της καλλιέργειας τα βήματα 5 ως 8 θα επαναληφθούν 4 - 10 φορές για μια πλήρη εκχύλιση . Ακολουθώντας κάθε ομογενοποίηση και φυγοκέντρηση , προσθέτουμε το νέο καθαρισμένο υπερκείμενο στο εκχύλισμα της χρωστικής , το οποίο πρέπει πάντα να κρατιέται παγωμένο και στο σκοτάδι . Κρατάμε τον όγκο της ακετόνης όσο μικρότερο γίνεται . Όταν το υπερκείμενο διάλυμα της ακετόνης είναι άχρωμο επαναλαμβάνουμε τα βήματα 5 - 8 μία τελική φορά .

10 . Όταν έχουν εκχυλιστεί οι χρωστικές ο δοκιμαστικός σωλήνας του τεστ πρέπει να περιέχει κατά προσέγγιση 10 ml εκχυλίσματος χρωστικής . Ξετυλίγουμε το δοκιμαστικό

σωλήνα του τεστ, φυγοκεντρούμε το εκχύλισμα χρωστικών για να απομακρύνουμε κάθε υπόλειμα  $MgCO_3$ . Καταγράφουμε τον όγκο του εκχυλίσματος αφαιρώντας τον όγκο του  $MgCO_3$ . Ξανατυλίγουμε και παγώνουμε το εκχύλισμα των χρωστικών.

11. Χρησιμοποιούμε το φασματοφωτόμετρο για τον προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας του εκχυλίσματος των χρωστικών. Χρησιμοποιούμε τα μήκη κύματος των παρακάτω εξισώσεων που αντιστοιχούν στον δικό μας τύπων αλγών. Κατόπιν, χρησιμοποιούμε τους υπολογισμούς για να μετατρέψουμε τις τιμές της οπτικής πυκνότητας σε συγκεντρώσεις χλωροφύλλης.

12. Αν χρησιμοποιούμε επίσης μετρητή φθορισμού για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης, θα χρειαστεί να φυλάξουμε τουλάχιστον 6 ml εκχυλίσματος χρωστικής, έτσι ώστε να μπορούν να γίνουν μια σειρά αραιώσεων. Κρατάμε όλα τα διαλύματα στο σκοτάδι και παγωμένα.

13. Αν δουλεύουμε με ένα πληθυσμό πεδίου, θα χρειαστεί να προετοιμάσουμε διαφορετικά το δείγμα των κυττάρων. Πρώτα θα χρειαστεί να φιλτράρουμε μερικά λίτρα θαλασσινού νερού σε φίλτρο ινών υάλου. Φιλτράρουμε αρκετή ποσότητα νερού ώστε το φίλτρο να φαίνεται χρωματισμένο - όλα τα κύτταρα να έχουν συλλεγεί πάνω στο φίλτρο. Καταγράφουμε τον όγκο του φιλτραρισμένου νερού. Τοποθετούμε το φίλτρο σε ένα

## Υπολογισμοί

Υπολογίζουμε την ποσότητα της χλωροφύλλης  $a$  (  $\text{κυτ.}^{-1}$  ) και χλωροφύλλης  $b$  (  $\text{κυτ.}^{-1}$  ) χρησιμοποιώντας τους υπολογισμούς που ακολουθούν . Πρώτα υπολογίζεται σε  $\mu\text{g}$  χλωροφύλλης  $\text{mL}^{-1}$  για κάθε χλωροφύλλη στο εκχύλισμα χρησιμοποιώντας το κατάλληλο σετ εξισώσεων ( 1-4 ) . Οι τελικές εξισώσεις δίνουν τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών σε  $\mu\text{mol cell}^{-1}$  και  $\mu\text{g cell}^{-1}$  .

1. Ανώτερα φυτά και πράσινα άλγη περιέχουν χλωρ .  $a$  και  $b$  ( διαλύτης 90 % ακετόνης ) .

χλωροφύλλη  $a = 11.93 \text{ A664} - \text{A647}$



φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 ml τυλιγμένο με αλουμινόχαρτο και προσθέτουμε  $MgCO_3$  και 10 ml ακετόνης . Βεβαιωνόμαστε ότι το φίλτρο είναι τελείως βυθισμένο στην ακετόνη . Καλύπτουμε με parafilm και στροβιλίζουμε τον δοκιμαστικό σωλήνα του τεστ για να ανακατευτεί το  $MgCO_3$  . Τοποθετούμε τον δοκιμαστικό σωλήνα του τεστ στο ψυγείο ή σε καλυμένο με πάγο κουβά για τουλάχιστον μια ώρα . Μετά μια ώρα σφραγίζουμε το δοκιμαστικό σωλήνα του τεστ με τον αντίχειρα και ανατρέπουμε τον σωλήνα του τεστ για να ανακατέψουμε . Φυγοκεντρούμε το εκχύλισμα των χρωστικών και Διαβάζουμε στο φασματοφωτόμετρο όπως στα βήματα 11 και 12 . Χρησιμοποιούμε τους κατάλληλους υπολογισμούς από τους παρακάτω .

χλωροφύλλη  $b = 20.36 A647 - 5.50 A664$

2 . Διάτομα , χρυσομονάδες και καφέ άλγη περιέχουν χλωροφύλλες  $a$  ,  $c1$  και  $c2$  σε ίσες αναλογίες ( Διαλύτης 90 % ακετόνη ) .

3 . Δινομαστιγωτά και κρυπτομονάδες περιέχουν χλωροφύλλη  $a$  και  $c2$  ( Διαλύτης 100 % ακετόνη ) .

4 . Μίγματα φυτοπλακτονικών πληθυσμών περιέχουν όλα τα παραπάνω ( Διαλύτης 90 % ) .

Υπολογισμοί για  $\mu g$  χλωρ.κυτ<sup>-1</sup> του φυτοπλακτού :

$\mu g$  χλωρ. σε εκχύλισμα = ( όγκος εκχυλ.,ml ) (  $\mu g$  χλωρ.ml<sup>-1</sup> )

$$\mu mol \text{ χλωρ. σε εκχύλισμα} = \frac{\mu g \text{ χλωρ. εκχυλίσματος}}{\text{μοριακό βάρος χλωροφύλλης}}$$

Μοριακά βάρη :  $\chi\lambda\omega\rho.a = 894$

$\chi\lambda\omega\rho.b = 908$

$\chi\lambda\omega\rho.c = 610$

μmol χλωρ. εκχυλίματος

$$\mu\text{mol χλωρ. cell}^{-1} = \frac{\text{μmol χλωρ. εκχυλίματος}}{\text{συνολικά κύτταρα στο δείγμα}}$$

Αν θέλουμε να κάνουμε το πείραμα πάνω από την καμπύλη αύξησης ( growth curve ) ενός πληθυσμού , σχεδιάζουμε τα ακόλουθα : Συγκέντρωση χλωρ. α κυτ<sup>-1</sup> , χλωρ. b κυτ<sup>-1</sup> , χλωρ. c κυτ<sup>-1</sup> συναρτήσει του χρόνου και ο λόγος χλωρ. α κυτ<sup>-1</sup> σε χλωρ. b κυτ<sup>-1</sup> ή χλωρ. c κυτ<sup>-1</sup> συναρτήσει του χρόνου .

#### Φθορισμομετρική ανάλυση

Ο μετρητής φθορισμού είναι ένα άλλο όργανο για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης . Αυτή η μέθοδος εμφανίζει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων σε σχέση με τις φασματοφωτομετρικές τεχνικές , όπως η μεγαλύτερη ευαισθησία , η απαίτηση λιγότερο συμπηκνωμένων δειγμάτων, η ταχύτητα και η αμεσότητα . Ο μετρητής φθορισμού είναι μικρός , φορητός και απλός στη χρήση . Το κύριο μειονέκτημα του μετρητή φθορισμού είναι ότι μετράει μόνο τη χλωροφύλλη α και όχι τις συμπληρωματικές χρωστικές . Η φθορισμομέτρηση της χλωροφύλλης λειτουργεί σύμφωνα με την ακόλουθη αρχή : ο φθορισμομετρητής εκπέμπει φως μικρού μήκους κύματος το οποίο

απορροφάται από τα μόρια της χλωροφύλλης και ξαναεκπέμπεται σε μεγαλύτερο μήκος κύματος . Η ένταση του φθορισμού μετριέται από το φθορισμομετρητή . Από την ένδειξη του φθορισμομετρητή μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της χρωστικής . Το φως που απορροφάται από το σύνολο των κυττάρων της χλωροφύλλης χρησιμοποιείται κατά τρεις τρόπους . Κυρίως χρησιμοποιείται για την διαδικασία της φωτοσύνθεσης , μερικώς για εκπέμπεται σαν φθορισμός και το υπόλοιπο εκπέμπεται σαν θερμότητα . Το σύνολο των κυττάρων μπορεί να αναγκαστεί να επανεκπέμψει υπό μορφή φθορισμού όλη την απορροφούμενη φωτεινή ενέργεια με την προσθήκη του D.C.M.U . Το D.C.M.U είναι ένας φωτοσυνθετικός παρεμποδιστής που σπάζει τη σύνδεση μεταξύ του φωτοσυστήματος II και του φωτοσυστήματος I . Όλη η φωτεινή ενέργεια που απορροφάται από το φωτοσύστημα II επανεκπέμπεται κυρίως με το φαινόμενο του φθορισμού παρά μετατρέπεται σε χημική ενέργεια . Με το D.C.M.U μπορεί να προσδιοριστεί ένας λόγος φθορισμού από το σύνολο των κυττάρων με << ανοικτούς >> φωτοσυνθετικούς δρόμους ( F ) προς τον φθορισμό από το σύνολο των κυττάρων με φωτοσυνθετικούς δρόμους που παρεμποδίζονται από την παρουσία του D.C.M.U . Αυτός ο λόγος δείχνει την αναλογία του φωτός που απορροφάται από κανονικά κύτταρα τα όποια φθορίζουν φυσικά , μία άλλη διάγνωστική για τον προσδιορισμό της συνολικής

φυσιολογίας των κυττάρων .

Όταν οι χρωστικές της χλωροφύλλης έχουν εκχυλιστεί από τους χλωροπλάστες των ελικοειδών μεμβρανών , όλο το απορροφημένο φως φθορίζει καθώς δεν υπάρχει πλέον σε λειτουργία ένα σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων . Εκχυλισμένη χλωροφύλλη α απορροφά φως στα 663 nm και φθορίζει στα 670 nm . Χλωροφύλλη β σε σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ολόκληρα φυτικά κύτταρα απορροφούν φως κοντά στα 673 nm και 683 nm και φθορίζουν φως στα 685 nm .

Διαδικασία για εκχυλισμένη χλωροφύλλη

Διαδοχικές αραιώσεις

Επειδή ο φθορισμομετρητής είναι περισσότερο ευαίσθητος από το φασματοφωτόμετρο , τα δείγματα που προετοιμάζονται για φασματοφωτομετρία , πρέπει συχνά να αραιώνονται για μετρήσεις με φθορισμομετρία . Για αυτό το πείραμα θα πρέπει πρώτα να γίνουν διαδοχικές αραιώσεις της χλωροφύλλης που προετοιμάστηκε για φασματοφωτομετρική ανάλυση .

1 . Τυλίγουμε σε αλουμινόχαρτο και μετράμε πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml με #1 κάνοντας την αρχική αραιώση και έτσι το πιο συμπηκνωμένο δείγμα .

2 . Πάντα πρέπει να κρατάμε τα δείγματα του εκχυλίσματος της χλωροφύλλης παγωμένα και στο σκοτάδι .

Προσεκτικά μετράμε τουλάχιστον 6 ml του εκχυλίσματος μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα # 1 και καταγράφουμε τον όγκο .

3 . Παίρνουμε 10 % του όγκου από τον δοκιμαστικό σωλήνα # 1 και τον βάζουμε μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα # 2 . Προσθέτουμε αρκετό 90 % ή 100 % διάλυμα ακετόνης ( εξαρτάται από τον τύπο του άλγους ) για να έρθει ο όγκος στον αρχικό όγκο του δοκιμαστικού σωλήνα #1 . Ανακατεύουμε . Τώρα έχουμε 10 % διάλυμα .

4 . Παίρνουμε 10 % από τον όγκο του δοκιμαστικού σωλήνα # 2 και το τοποθετούμε σε δοκιμαστικό σωλήνα # 3 . Προσθέτουμε ακετόνη στο # 3 για να το φέρουμε στον αρχικό όγκο του δοκιμαστικού σωλήνα # 1 . Αυτό οδηγεί στην δημιουργία ενός διαλύματος 1 % στο δοκιμαστικό σωλήνα #3 .

5 . Συνεχίζεται αυτή η διαδικασία για να φτιαχτεί 0.1% και 0.01 % διαλύματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες # 4 και # 5 αντίστοιχα .

#### Μέτρηση φθορισμού ( Φθορισμομετρία - Fluorometry )

1 . Πρώτα από όλα πρέπει να γίνει η ρύθμιση του οργάνου για τις οπτικές ιδιότητες της γυάλινης κυψελίδας και της ακετόνης . Με ένα μαρκαδόρο σημειώνουμε μια γραμμή 5 mm μακριά από το χείλος της κυψελίδας . Κάθε φορά που βάζουμε την κυψελίδα μέσα στο μετρητή φθορισμού , πρέπει να βεβαιωνόμαστε

ότι η κυψελίδα είναι πάντοτε με τον ίδιο προσανατολισμό που χρησιμοποιείται το σημάδι της αναφοράς ( μας ) . Γεμίζουμε τη κυψελίδα με 90 % ή 100 % ακετόνη και μετράμε το φθορισμό . Σημειώνουμε τον αριθμό αυτό και τον <<door factor>> που χρησιμοποιήσαμε . Οι διαφορετικές << πόρτες >> αλλάζουν τα χαρακτηριστικά του φωτός που παράγεται από τον μετρητή φθορισμού . Ο << door factor >> είναι σημαντικός στον υπολογισμό της συγκέντρωσής της χλωροφύλλης του δείγματος μας . Ο φθορισμός της ακετόνης είναι ένας άλλος διορθωτικός παράγοντας για τους υπολογισμούς μας . Είναι πολύ σημαντικό ότι μετράμε μια νέα τιμή << ακετόνης >> κάθε φορά που αλλάζουμε τον <<door factor >> και γράφουμε και τα δύο , δηλαδή την τιμή της ακετόνης και τον <<door factor >> .

2 . Αποχύνουμε την ακετόνη και μετράμε τα εκχυλίσματα των χρωστικών ουσιών . Βάζουμε με πιπέτα περισσότερο αραιό διάλυμα χρωστικής ουσίας ( 0.01 % ) μέσα στη κυψελίδα και μετράμε το φθορισμό του . Σημειώνουμε την τιμή του φθορισμού και την αραιώση . Οι τιμές του φθορισμού πάνω από 50 είναι σημαντικές. Αν αυτή η συγκέντρωση είναι πολύ αραιωμένη ( π.χ μετρήσεις κάτω από 50 ) το χύνουμε πίσω στον δοκιμαστικό του σωλήνα και μετράμε το δείγμα το οποίο είναι 10 φορές πιο συμπηκνωμένο (0.1) . Μετράμε αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις μέχρι να πάρουμε μια σημαντική μέτρηση φθορισμού .

Διαδικασία για τη μέτρηση του φθορισμού του συνόλου των κυττάρων

1 . Αριθμίζουμε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml .  
2 . Τοποθετούμε 9 ml καλά αναμιγμένης καλλιέργειας μέσα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα . Παρατηρούμε προσεκτικά πότε η καλλιέργεια μας θα είναι αρκετά πυκνή για τα κύτταρα που χρειάζονται αραίωση . Στις πυκνές καλλιέργειες , τα κύτταρα << σκιάζουν >> το ένα το άλλο και παρεμποδίζουν την ικανότητα του φθορισμομέτρου να ανιχνεύει το φως του φθορισμού . Αν είναι αναγκαίο , αραιώνουμε τα κύτταρα με φιλτραρισμένο γλυκό νερό ή θαλασσινό νερό .

Σημειώνουμε το ποσοστό της αραίωσης .

3 . Τοποθετούμε στους 4 δοκιμαστικούς σωλήνες στο σκοτάδι για 15 λεπτά για να προσαρμοστούν τα κύτταρα στο σκοτάδι .

4 . Όσο τα κύτταρα προσαρμόζονται στο σκοτάδι βαθμολογούμε το μετρητή φθορισμού και τη κυψελίδα . Επειδή τα κύτταρα βρίσκονται σε μέσο μετράμε το φθορισμό της κυψελίδας γεμισμένη με το μέσο αντί της ακετόνης . Γράφουμε τη τιμή φθορισμού .

5 . Μετά τα 15 λεπτά προσαρμογής στο σκοτάδι , προσθέτουμε 50  $\mu$ L από D.C.M.U σε 2 από τους δοκιμαστικούς σωλήνες .

Προειδοποίηση : Το D.C.M.U είναι δηλητήριο για αυτό



πρέπει τα χέρια να πλυθούν αμέσως .

Γράφουμε τους αριθμούς των δοκιμαστικών σωλήνων που χρησιμοποιήσαμε , καλύπτουμε με parafilm , ανατρέπουμε τους σωλήνες για να αναμιχθούν και τους ξαναβάζουμε στο σκοτάδι . Το D.C.M.U απαιτεί για να δράσει , κατά προσέγγιση 5 λεπτά . Στο μεταξύ , μετράμε το φθορισμό των κυττάρων στους άλλους 2 δοκιμαστικούς σωλήνες .

6 . Θα παρατηρήσουμε το δείκτη του μετρητή φθορισμού να μετακινείται πάνω - κάτω για τα πρώτα 45 δευτερόλεπτα μετά την τοποθέτηση του δείγματος .

Αυτή η μεταβολή οφείλεται στο φθορισμό μεταβλητών χαρακτηριστικών του συνόλου των κυττάρων . Για το πρώτο δείγμα που μετράμε , σημειώνουμε το χρόνο από την στιγμή που κλείσαμε την <<πόρτα>> , μέχρι την στιγμή της σταθεροποίησης του φθορισμομετρητή και σημειώνουμε τη τιμή του φθορισμού . Πρέπει να είμαστε σταθεροί στην ποσότητα του χρόνου που περιμένουμε για να διαβάσουμε τα επόμενα δείγματα .

7 . Χρησιμοποιούμε τους παρακάτω υπολογισμούς , για να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση χλωροφύλλης , του διαλύματος εκχύλισης του συνόλου των κυττάρων και του συνόλου των κυττάρων με D.M.C.U .

#### γ . Υπολογισμοί

Οι τελικές εξισώσεις δίνουν τις συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης  $a \text{ cell}^{-1}$  και  $\mu\text{g χλωρ.}a \text{ cell}^{-1}$  ( κύτταρα = cell) .

1 . Πολλαπλασιάζουμε την τιμή του φθορισμού της χλωροφύλλης με τον αντίστοιχο συντελεστή αραίωσης που χρησιμοποιούμε .

2 .  $\mu\text{g χλωρ.α L}^{-1}$  =  
 ( Τιμή φθορισμού χρωστικής ουσίας - Τιμή φθορισμού

λευκού) \* << διορθ. fάktor >>

$$3 \text{ . } \mu\text{g χλωρ.α κυτ.}^{-1} = \frac{\mu\text{g χλωρ. α}}{\text{L}} * \frac{1 \text{ L}}{1.000 \text{ ml}} * \frac{1\text{ml αρχ.δειγ}}{\# \text{ κυτ.ml}}$$

$$4 \text{ . } \mu\text{mol χλωρ.α κυτ}^{-1} = \frac{\mu\text{g χλωρ.α κυτ}^{-1}}{\text{μοριακό βάρος της χλωρ.α } ,894}$$

## Χλωροφύλλη

Τα χαρακτηριστικά των χρωστικών ουσιών των άλγων είναι οι χλωροφύλλη, η ξανθοφύλλη και η καροτίνη. Οι τρεις χλωροφύλλες που βρίσκονται κατά κανόνα στα πλακτονικά είδη είναι οι χλωροφύλλες α, β και c. Η χλωροφύλλη α αποτελεί κατά προσέγγιση 1-2% του ξηρού βάρους του οργανικού υλικού σε όλα τα πλακτονικά άλγη και είναι ο προτιμώμενος δείκτης για τις εκτιμήσεις της βιομάζας των άλγων. Το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη των κυττάρων μεταβάλλεται από είδος σε είδος ή από ταξινομική ομάδα σε άλλη και εξαρτάται από την ηλικία των ρυθμών ανάπτυξης, το φως και τις θρεπτικές συνθήκες.

Δύο μέθοδοι για τον προσδιορισμό χλωροφύλλης α στο φυτοπλακτό είναι διαθέσιμοι: ο φασματοφωτομετρικός (τριχρωματρική μέθοδος) και ο φθορισμομετρικός. Ο δεύτερος είναι πιο ευαίσθητος, απαιτεί λιγότερο δείγμα και προσαρμόζεται για in vivo μετρήσεις.

Η φαιοφυτίνη α, ένα συνηθισμένο προϊόν διάσπασης της χλωροφύλλης α, μπορεί να παρεμποδίσει τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης α γιατί απορροφά φως και φθορίζει στην ίδια περιοχή του φάσματος όπως η χλωροφύλλη α και μπορεί να προκαλέσει σφάλματα στις τιμές της χλωροφύλλης α. Όταν γίνεται μέτρηση της χλωροφύλλης α μετράμε επίσης την συγκέντρωση της

φαιοφυτίνης  $a$  . Ο λόγος της χλωροφύλλης  $a$  προς τη φαιοφυτίνη  $a$  είναι ένας καλός δείκτης των φυσιολογικών συνθηκών του φυτοπλακτού . Ένας άλλος χρήσιμος δείκτης της ποιότητας νερού είναι ο λόγος της βιομάζας προς την χλωροφύλλη  $a$  (Αυτοτροφικός Δείκτης - Autotrophic Index ) . Σε μη ρυπασμένα νερά ο πλυθισμός του πλακτού είναι πολύ πλούσιος σε αυτότροφα χλωροφυλλικά άλγη . Καθώς τα νερά εμπλουτίζονται οργανικά , η αναλογία των ετερότροφων ( καταναλωτές ) μη χλωροφυλλων οργανισμών όπως ( filamentous ) βακτήρια και τα πρωτόζωα με στέλεχος , αυξάνεται .

Ο Αυτοτροφικός Δείκτης (Α.Ι) αποτελεί μια ένδειξη των σχετικών αλλαγών στη σύνθεση των ειδών του πλαγκτού από αλλαγές στην ποιότητα του νερού . Υπολογίζεται ως εξής :

$$A.I = \frac{\text{Βιομάζα (ελεύθερη από οργανική ύλη) σε mg/m}^3}{\text{χλωροφύλλη } a, \text{ mg / m}^3}$$

Φυσιολογικές τιμές Α.Ι από 50 μέχρι 200 .  
Μεγαλύτερες τιμές Α.Ι πάνω από 200 δηλώνει κακή ποιότητα νερού .

## 1 .Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των χλωροφυλλών a ,

b και c .

Οι χρωστικές εκχυλίζονται από το πλακτό με υδατικό διάλυμα ακετόνης και την οπτική πυκνότητα (απορροφητικότητα) του εκχυλισματός προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά . Όταν η άμεση εκχύλιση των χρωστικών δεν είναι δυνατή (όπως περιγράφουμε παρακάτω) τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν παγωμένα για 30 μέρες αν κρατηθούν στο σκοτάδι . Η ευκολία με την οποία οι χλωροφύλλες απομακρύνονται από τα κύτταρα μεταβάλλεται αντίστοιχα στα διάφορα άλγη . Για να πετύχουμε συνολική εκχύλιση των χρωστικών , είναι αναγκαίο συνήθως να διαλύσουμε τα κύτταρα μηχανικά με έναν <<tissue grinder >>

### α . Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια

- 1 . Φασματοφωτόμετρο με στενή δέσμη (0.5 μέχρι 2.0 nm) γιατί η κορυφή απορρόφησης της χλωροφύλλης είναι σχετικά στενή . Σε ένα φασματικό πλάτος δέσμης 20 nm η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a μπορεί να υποεκτιμηθεί μέχρι και περισσότερο από 40 % .
- 2 . Κυψελίδες με 1 cm , 4 cm και 10 cm μήκος διαδρομής
- 3 . Κλινική φυγόκεντρος (Clinical Centrifuge )
- 4 . Tissue Grinder . Με επιτυχία διαλύει ίνες των γυάλινων φίλτρων γιατί με το σωλήνα τριψίματος και κωνικό γουδοχέρι θα είναι δύσκολο . Προτιμάμε να χρησιμοποιούμε σωλήνα τριψίματος και γουδοχέρι (pestle )

με στρογγυλό πάτο .

5 . Σωλήνες φυγοκέντρου 15 ml, graduated ) , με βιδωτό κάλυμα .

6 . Εξοπλισμός διήθησης : φίλτρα , μεμβράνες (0.45  $\mu$ m (porosity ) , 47 mm διάμετρος ) ή γυάλινη ίνα ( G F / ή G F / A , 4.5 cm διάμετρο) κενή τρύπα .

7 . Αιώρημα ανθρακικού μαγνησιού (  $MgCO_3$  ) .

Προσθέτουμε 1.0 gr  $MgCO_3$  (σε μορφή σκόνης ) σε 100 ml απεσταγμένο νερό .

8 . Διάλυμα ( υδατικό ) ακετόνης . Ανακατεύουμε 90 μέρη ακετόνης ( βαθμός αντιδραστήριου BP 56C ) με 10 μέρη νερού ( v / v ) .

## β . Διαδικασία

1 . Συμπυκνώνουμε το δείγμα με φυγοκέντρηση ή διήθηση (μεμβράνη ή φίλτρο γυάλινης ίνας ) .

Προσθέτουμε 0.2 ml  $MgCO_3$  πριν τη φυγοκέντρηση ή κατά την περίοδο της τελικής φάσης του φιλτραρίσματος .

Φυλάμε συμπυκνωμένα ( concentrated ) δείγματα παγωμένα σε έναν αποξηραντή στο σκοτάδι αν η εκχύλιση πρόκειται να γίνει αργότερα . Χρησιμοποιούμε γυάλινα σκεύη και κυψελίδες τα οποία είναι καθαρά και ελεύθερα από οξεία .

2 . Τοποθετούμε το δείγμα σε ένα Tissue grinder καλυμένο με 2 - 3 ml 90 % υδατικού διαλύματος ακετόνης και θρυμματίζουμε . Χρησιμοποιούμε T.F.E / γυάλινο grinder για ένα φίλτρο ινών υάλου και γυάλινο / γυάλινο

grinder για φίλτρο μεμβράνης .

3 . Μεταφέρουμε το δείγμα στο φυγόκεντρο σωλήνα με το βιδωμένο κάλυμα , ξεπλένουμε τον grinder με λίγα मिलिलीτρα 98 % υδατικού διαλύματος ακετόνης και προσθέτουμε το έκχυμα στο αιώρημα της εκχύλισης . Ρυθμίζουμε τον συνολικό όγκο σε ένα σταθερό επίπεδο 5 με 10 ml με 90 % υδατικό διάλυμα ακετόνης . Χρησιμοποιούμε με οικονομία τον διαλύτη και αποφεύγουμε την υπερβολική αραίωση των χρωστικών .

Τοποθετούμε τα δείγματα κατά την διάρκεια της νύχτας σε 4 οC στο σκοτάδι .

4 . Καθαρίζω το εκχύλισμα με φυγοκέντρηση σε κλειστούς σωλήνες για 20 λεπτά στα 500 gr . Μεταφέρω το καθορισμένο εκχύλισμα μέσα σε ένα καθαρό βαθμονομημένο όγκου 15 ml σωλήνα φυγοκέντρησης με βιδωτό καπάκι και μετρώ τον ολικό όγκο του εκχυλίσματος .

5 . Μεταφέρουμε το εκχύλισμα σε κυψελίδα 1 cm και μετράμε την οπτική πυκνότητα ( O.D ) σε 750 , 663 , 645 , και 630 nm . Επιλέγουμε εκείνο το μήκος κυψελίδας , ή εκείνη την αραίωση για να εξασφαλίσουμε τιμές οπτικής πυκνότητας ( O.D ) στα 663 nm μεγαλύτερες από 0.2 και μικρότερες από 1.0 .

γ . Υπολογισμοί

Χρησιμοποιούμε τις αναγνώσεις της οπτικής πυκνότητας στα 663 , 645 και 630 nm για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης a , b και c . Οι αναγνώσεις της O.D

( οπτική πυκνότητα ) στα 750 nm εξυπηρετεί σαν διόρθωση για την θολερότητα .

Αφαιρούμε αυτή την τιμή της O.D που διαβάσαμε από κάθε τιμή O.D των άλλων μηκών κύματος των χρωστικών πριν χρησιμοποιήσουμε αυτές στις παρακάτω εξισώσεις . Επειδή η O.D του εκχυλίσματος στα 750 nm είναι πολύ ευαίσθητη σε αλλαγές της αναλογίας ακετόνης - νερού παραμένουμε αυστηρά στην αναλογία 90 μέρη ακετόνης :10 μέρη νερό ( v /v ) για την εκχύλιση χρωστικών .

Για να αποφύγουμε την χρήση της ανάγνωσης στα 750 nm καθαρίζουμε το διάλυμα των χρωστικών φυγοκεντρώντας για 20 λεπτά σε 1,000 g και χρησιμοποιούμε έναν δρόμο της φωτεινής δέσμης όχι μεγαλύτερο του 1 cm . Όταν όμως η δυνατότητα επανεώρησης του ιζήματος υπάρχει , παίρνουμε τις αναγνώσεις στα 750 nm . Αυτό είναι ένα συνήθες πρόβλημα όταν χρησιμοποιούμε φίλτρα ινών υάλου και φυγόκεντρο με κεφαλή με κλίση . Για να περιορίσουμε αυτή την δυσκολία χρησιμοποιούμε μια φυγόκεντρο με ταλαντευόμενη κεφαλή και επιπλέον ποσότητες  $MgCO_3$  που τα προσθέτουμε αμέσως πριν την φυγοκέντρηση .

1 . Υπολογισμός συγκεντρώσεων  $\chi_{\lambda\omega\rho. a}$  ,  $b$  ,  $c$  από διορθωμένες οπτικές πυκνότητες .

$$\alpha ) \text{ Chl } a, \text{mg/L} = 11.64(O.D663) - 2.16(O.D645) + 0.10(O.D630)$$

$$\beta ) \text{ Chl } b, \text{mg/L} = 20.97(O.D645) - 3.94(O.D663) - 3.66(O.D630)$$

$$\gamma ) \text{ Chl } c, \text{mg/L} = 54.22(O.D630) - 14.81(O.D645) - 5.53(O.D663)$$



όπου 0.D663 , 0.D643 και 0.D630 είναι οι διορθωμένες οπτικές πυκνότητες (με 1cm φωτεινό path ) στα αντίστοιχα μεγέθη κύματος .

2 . Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των χρωστικών στο εκχύλισμα , υπολογίζω την ποσότητα των χρωστικών ανά μονάδα όγκου όπως παρακάτω :

$$\text{Chl } a , \text{ mg / m}^3 = \frac{\text{Chl } a * (\text{ενωμένο όγκο σε L})}{\text{όγκο του δείγματος m}^3}$$

όπου chl a είναι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο εκχύλισμα προσδιορισμένη από την εξίσωση α παραπάνω

## 2 . Φθορισμομετρική μέθοδος για την χλωροφύλλη a

Η φθορισμομετρική μέθοδος για χλωροφύλλη a είναι περισσότερο ευαίσθητη από την φασματοφωτομετρική μέθοδο, απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος και δεν απαιτεί ανάλυση μήκους κύματος όπως η φασματοφωτομετρική μέθοδος . Η πιο ευνοϊκή ποσότητα ευαισθησίας για (in vitro ) μετρήσεις χλωρ. a πετυχαίνεται με τη διέγερση του μήκους κύματος σε 430 nm και σε εκπομπή μήκους κύματος σε 663 nm . Μια μέθοδος για συνεχείς μετρήσεις της χλωρ .a ( in vivo ) είναι δισθέσιμη αλλά είναι λιγότερο . Η φαιοφυτίνη a μπορεί επίσης να προσδιοριστεί φθορισμομετρικά .

## α . Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια

1 . Φθορισμομετρητής εφοδιασμένος με μεγάλης έντασης

F4T.5 μπλε λάμπα , φωτοπολλαπλασιαστή R-136 ( κόκκινης ευαισθησίας ) , ολισθητικό παράθυρο ανοίγματος 1 \* , 3 \* , 10 \* και 30 \* και φίλτρο για φωτεινή εκπομπή ( CS-2-64 ) και διεγερση με υψηλή πόρτα ευαισθησίας .

2 . Άλλα αντιδραστήρια και εξοπλισμός όπως η φασματοφωτομετρική μέθοδος .

### β . Διαδικασία

1 . Μετράμε φθορισμομετρικά μια διαλυμένη χλωροφύλλη γνωστή συγκέντρωσης όπως παρακάτω ακολουθεί :

α ) Προετοιμάζουμε το εκχύλισμα της χλωροφύλλης και αναλύουμε σπεκτροφωτομετρικά .

β ) Ετοιμάζουμε συνεχείς διαλύσεις του εκχυλίσματος για την παροχή συγκεντρώσεων που προσεγγίζουν 2 , 6 , 20 και 60 μg χλωρ. α /lt .

γ ) Διαβάζουμε για κάθε διάλυση σε κάθε ολισθητικό παράθυρο ανοίγματος 1 \* , 3 \* , 10\* και 30 \* .

δ ) Χρησιμοποιώντας τις αξίες που βρήκαμε πριν , παράγονται συντελεστές μετρήσεων μετατρέποντας τις φθορισμομετρικές ενδείξεις σε κάθε επίπεδο ευαισθησίας σε συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α , ως εξής :

$$F_s = \frac{C_a}{R_s}$$

όπου

$F_s$  είναι ο συντελεστής μετρήσεων για ευαισθησία S

$R_s$  είναι η ένδειξη από την φθορισμομέτρηση για ευαισθησία  $S$ .

$C_a$  είναι η συγκέντρωση της χλωροφύλλης  $a$  προσδιορισμένη φασματοφωτομετρικά σε  $\mu\text{g}/\text{lt}$ .

2. Μετρώντας το δείγμα φθορισμού σε καθορισμένη ευαισθησία η οποία θα δείχνει μια ενδιάμεση ένδειξη. Μετατρέπω τις ενδείξεις φθορισμού σε συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης  $a$  πολλαπλασιάζοντας τις ενδείξεις με το κατάλληλο συντελεστή βαθμολόγησης.

3. Αποφεύγουμε να χρησιμοποιούμε το 1 \* (window) εξαιτίας των απωλειών ενέργειας.

3. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης  $a$  με την παρουσία της φαιοφυτίνης  $a$ .

Η χλωροφύλλη  $a$  μπορεί να υπερεκτιμηθεί όταν συμπεριλαμβάνονται φαιοχρωστικές που απορροφούν κοντά το ίδιο μήκος κύματος όπως η χλωροφύλλη  $a$ . Η χλωροφύλλη  $a$  οξεινωμένη με αραιό διάλυμα οξέος, μετατρέπεται σε φαιοφυτίνη  $a$ , η οποία έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκη κύματος από 410 και 665 (667) nm. Επιπρόσθετη οξίνιση με πιο πυκνό διάλυμα οξέος οδηγεί σε παραπέρα διάσπαση σε ενώσεις παρόμοιες Pheophorbide. Πρόσθήκη οξέος στη χλωροφύλλη  $a$  οδηγεί σε απώλεια του ατόμου του μαγνησίου, μετατρέποντας την σε φαιοφυτίνη  $a$ . Όταν ένα διάλυμα καθαρής χλωροφύλλης  $a$  έχει μετατραπεί σε φαιοφυτίνη  $a$  με οξίνιση η κορυφή

απορρόφησης ελλοτώνεται κατά προσέγγιση σε 60 % της πραγματικής τιμής και μετατοπίζεται από τα 663 nm στα 665 nm .

Αυτό οδηγεί σε ένα λόγο κορυφής απορρόφησης πριν και μετά την οξίνιση ίσο με 1.70 [  $O.D\ 663 / O.D\ 665 = 1.70$  ] και χρησιμοποιείται στην διόρθωση της φαινόμενης συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α για φαιοφυτίνη α .

Δείγματα με ένα λόγο  $O.D\ 663$  πριν /  $O.D\ 665$  μετά την οξίνιση ίσο με 1.70 φαίνεται να περιέχουν λίγη ή καθόλου φαιοφυτίνη α και να βρίσκονται σε εξαιρετική φυσιολογική κατάσταση . Διαλύματα καθαρής φαιοφυτίνης δεν εμφανίζουν μείωση της  $O.D\ 665$  μετά την οξίνιση και έχουν λόγο  $O.D\ 663$  πριν /  $O.D\ 665$  μετά = 1.0 . Έτσι , μείγματα χλωροφύλλης α και φαιοφυτίνης α έχουν λόγους κορυφής απορρόφησης που κυμαίνονται από 1.0 έως 1.7 . Αυτοί οι λόγοι είναι βασισμένοι στη χρήση 90 % ακετόνης σαν διαλύτη . Χρησιμοποιώντας 100 % ακετόνη σαν διαλυτικό οδηγούμαστε σε ένα λόγο  $O.D\ 663$  πριν /  $O.D$  μετά με τιμή γύρω στο 2.0

α . Εξοπλισμός - αντιδραστήρια

1 ) Βλ. χλωροφύλλη

2 ) Υδροχλωρικό οξύ , HCl 1N

## β . Διαδικασία

1 . Εκχυλίζω τη χρωστική με 90 % ( v / v ) ακετόνη , καθαρίζω με φυγοκέντρηση και διαβάζουμε την O.D στα 750 nm και 663 nm .

2 . Οξινίζω το εκχύλισμα σε κυψελίδα 1 cm με δύο σταγόνες 1 N HCl . Αν χρησιμοποιείται μια μεγαλύτερη κυψελίδα προσθέτω έναν αντίστοιχα μεγαλύτερο όγκο οξέος . Ταράζω σιγά το οξινισμένο εκχύλισμα και διαβάζω την O.D στα 750 nm και στα 665 nm ; όχι νωρίτερα από 1 λεπτό ή αργότερα από 2 λεπτά μετά την οξίνιση . Κάνω το ίδιο και για τα άλλα δείγματα .

3 . Αφαιρώ το 750 nm O.D από τις αναγνώσεις πριν (O.D 663 nm ) και μετά την οξίνιση (O.D 665 nm ) .

## γ . Υπολογισμοί

Χρησιμοποιώντας τις διορθωμένες τιμές υπολογίζουμε την χλωρ.α ( C ) και τη φαιοφυτίνη α ( P ) ανά κυβικό μέτρο όπως παρακάτω :

$$1 . C , \text{ mg / m}^3 = \frac{26.73 (663b - 665a) * V1}{V2 * L}$$

$$2 . P , \text{ mg / m}^3 = \frac{26.73 ( 1.7(665a) - 663b ) * V1}{V2 * L}$$

όπου

V1 είναι ο όγκος του εκχυλίσματος (σε L )

V2 είναι ο όγκος του δείγματος (σε L)

L το μήκος του οπτικού δρόμου ή πλάτους της

κυψελλίδας (                      cm                      )                      και  
663b , 665a είναι οι οπτικές πυκνότητες της 90 %  
ακετόνης εκχυλίσματος πριν και μετά την οξίνιση ,  
αντίστοιχα .

Η τιμή 26.73 είναι η διόρθωση της απορρόφησης και  
ισοδυναμεί με το γινόμενο  $\lambda * K$  όπου  
 $\lambda$  είναι ο συντελεστής απορρόφησης για την χλωροφύλλη  $a$   
στα 663 nm =11.0 και  
 $K$  είναι ο λόγος που εκφράζει την διόρθωση για την  
οξίνιση .

## Προσδιορισμός Βιομάζας (Standing Crop )

Η βιομάζα του πλαγκτού μπορεί να εκφραστεί σαν οι αριθμοί των οργανισμών ανά μονάδα όγκου . Όμως , επειδή οι πλαγκτονικοί οργανισμοί ποικίλουν πολύ στην κατανομή του μεγέθους τους , οι αριθμοί μόνοι τους δεν δίνουν επαρκή εικόνα της δυναμικής των πληθυσμών ούτε και της ποικιλομορφίας και της δομής του οικοσυστήματος . Διαθέσιμοι μέθοδοι που παρέχουν περισσότερες και πιο ακριβείς πληροφορίες για τη βιομάζα συμπεριλαμβάνουν προσδιορισμό του ολικού άνθρακα , οξυγόνου , αζώτου , υδρογόνου , λιπιδίων , υδρογονανθράκων , φωσφόρου , πιριτίνου (διάτομα ) , χιτίνης (ζωοπλαγκτό) και χλωροφύλλη ( άλγη ) . Οι μόνοι πρακτικοί μέθοδοι για υπολογισμό της βιομάζας του ζωοπλακτού είναι οι υπολογισμοί όγκου και ξηρού βάρους . Πρόσφατα , το περιεχόμενο σε Α Τ Ρ (adenosine triphosphate ) και D Ν Α (deoxyribonucleic acid ) το πλαγκτόν έχουν εκτιμηθεί σαν υπολογισμός της βιώσιμης βιομάζας . Υπολογισμοί της βιομάζας βασισμένοι στο Α Τ Ρ φαίνεται να είναι σε άριστη συμφωνία με υπολογισμούς που βασίζονται σε μετρήσεις όπως αυτές της χλωροφύλλης α και του όγκου των κυττάρων . Ο προσδιορισμός του D Ν Α , όμως , δεν συστήνεται σαν ένας ακριβής δείκτης της βιομάζας εξαιτίας της ύπαρξης μεγάλων ποσοτήτων detrital D Ν Α στα επιφανειακά νερά , το οποίο μπορεί να προκαλέσει σφάλματα στους υπολογισμούς της βιομάζας .

## 1 . Χλωροφύλλη α

Η χλωροφύλλη α είναι ένας δείκτης της βιομάζας των αλγών . Υποθέτοντας ότι η χλωροφύλλη α αποτελεί κατά μέσο όρο , το 1.5 % του ξηρού βάρους της οργανικής ύλης των αλγών , υπολογίζουμε τη βιομάζα των αλγών με πολλαπλασιασμό του περιεχομένου σε χλωροφύλλη α επί τον παράγοντα 67 .

## 2 . Ογκος κυττάρων

Τα δεδομένα του πλαγκτού , που προκύπτουν στη βάση του όγκου προς όγκο , συχνά είναι περισσότερο χρήσιμα από αυτά που προκύπτουν σαν αριθμοί προς मिलीलीτρο .

Προσδιορίζουμε τον όγκο των κυττάρων , χρησιμοποιώντας την απλούστερη γεωμετρική διαμόρφωση που ταιριάζει καλύτερα στη μορφή των κυττάρων που θα μετρηθούν ( όπως σφαίρα , κώνος , κύλινδρος ) . Τα μεγέθη των κυττάρων ενός οργανισμού μπορεί να διαφέρουν ουσιαστικά σε διαφορετικά νερά και από τα ίδια νερά σε διαφορετικούς χρόνους κατά την διάρκεια του έτους . Συνεπώς , παίρνουμε το μέσο όρο των μετρήσεων 20 ατόμων κάθε είδους για κάθε περίοδο δειγματοληψίας .

Υπολογίζουμε τον ολικό όγκο κυττάρων για κάθε είδος πολλαπλασιάζοντας το μέσο όρο του όγκου των κυττάρων σε κυβικά μικρόμετρα με τον αριθμό αυτών ανά मिलीलीτρο .

Υπολογίζω τον συνολικό όγκο των υγρών αλγών όπως



παρακάτω :

$$V_t = \sum_{i=1}^n (N_i * V_i)$$

όπου  $V_t$  είναι ο ολικός όγκος κυττάρων του πλαγκτού ,  
 $\text{mm}^3 / \text{L}$  .

$N_i$  είναι ο αριθμός των οργανισμών των  $i$  ειδών / L .

$V_i$  είναι ο μέσος όρος του όγκου των κυττάρων των  
 $i$  ειδών ,  $\mu\text{m}^3$  .

### 3 . Έκταση της επιφάνειας των κυττάρων

Μια εκτίμηση για την έκταση της επιφάνειας των κυττάρων είναι πολύτιμη στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντος . Υπολογίζω τον μέσο όρο της έκτασης της επιφάνειας σε τετραγωνικά μικρόμετρα και πολλαπλασιάζω με τον αριθμό ανά मिलीτρο των ειδών που εξετάζουμε .

### 4 . Σταθμικοί μέθοδοι

Η βιομάζα της κοινότητας του πλαγκτού μπορεί να υπολογιστεί από σταθμικούς προσδιορισμούς , παρ'όλο που λάσπη και οργανικά τρίματα εμποδίζουν τον προσδιορισμό . Προσδιορίζουμε το ξηρό βάρος βάζοντας 100 mg υγρού συμπυκνωμένου δείγματος σε ένα καθαρό , πυρωμένο και πορσελάνινο δοχείο τήξης και ξηραίνω στους 105 οC για 24 ώρες . Εναλλακτικά , φιλτράρουμε ένα γνωστό όγκο

Δείγματος μέσω μεμβράνης 0.45-μm-διάμετρο πόρων ή σε ένα στεγνό και προζυγισμένο φίλτρο ινών υάλου .

( Σημείωση : Το μικρό δείγμα που χρησιμοποιείται σε άμεσο φιλτράρισμα μπορεί να οδηγήσει σε σφάλμα αν δεν χειριστεί κατάλληλα ) .

Ψυχραίνουμε το δείγμα σε αποξηραντή και ζυγίζουμε . Για να πάρουμε βάρος ελεύθερο από στάχτη ( ash - free weight ) πυρώνουμε το ξηρό δείγμα στους 500 οC για μία ώρα . Ψυχραίνουμε και ξαναυγραίνουμε τη στάχτη με αποσταγμένο νερό και το φέρνω σε σταθερό βάρος στους 105 οC . Η στάχτη είναι ξαναυγραμμένη για να επιστρέψει το νερό ενυδάτωσης των αργίλων ( πηλός ) και των άλλων ορυκτών . Αυτό μπορεί να ανέρχεται στο 10 % του χαμένου βάρους κατά διάρκεια της αποτέφρωσης . Το ελεύθερο από στάχτη βάρος προτιμάτε από το ξηρό βάρος συγκρινόμενο με τις ανακατεμένες συναρθώσεις . Το περιεχόμενο της στάχτης μπορεί να αποτελείται από 50 % ή περισσότερο από ξηρό βάρος σε φυτοπλαγκτό έχοντας ανόργανες δομές , όπως τα δίατομα . Σε άλλες μορφές η στάχτη αποτελεί μόνο το 5 % περίπου του ξηρού βάρους .

#### 5 . Τριφωσφορική Αδενοσίνη ( Α.Τ.Ρ )

Μέθοδοι για την μέτρηση της τριφωσφορικής αδενοσίνης ( Α.Τ.Ρ ) στο πλακτό , παρέχουν τους προσδιορισμούς της ολικής βιώσιμης βιομάζας πλαγκτού . Το Α.Τ.Ρ βρίσκεται σε όλα τα φυτά και ζώα , αλλά μόνο σε ζωντανά

κύτταρα . Δεν συσχετίζεται με νεκρά συγκεκριμένα υλικά . Ο λόγος του Α.Τ.Ρ της βιομάζας ποικίλει από είδος σε είδος , αλλά εμφανίζεται αρκετά σταθερός για να επιτρέψει αξιόπιστους υπολογισμούς της βιομάζας από τις μετρήσεις του Α.Τ.Ρ . Η μέθοδος είναι απλή και σχετικά φτηνή και τα όργανα μέτρησης είναι σταθερά και αξιόπιστα . Η μέθοδος επίσης έχει πολλές πιθανές εφαρμογές στις βιοεκτιμήσεις , ειδικά στις μελέτες θνησιμότητας πλαγκτού .

#### α . Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια

##### 1 . Γυαλικά :

καθαρά , αποστειρωμένα , στεγνά γυάλινα φιαλίδια πυριτίου δοκιμαστικοί σωλήνες μεγάλης διαμέτρου και πιπέτες .

2 . Φίλτρα : 47-mm-diam (διάμετρος) , φίλτρα πορώδους μεμβράνης 0.45-mm-diam (διάμετρος) .

3 . Εξοπλισμός διήθησης

4 . Καταψύκτης ( -20 °C )

5 . Βρασμένο νερό

6 . Ανιχνευτικά όργανα , σχεδιασμένα ειδικά για μετρήσεις Α.Τ.Ρ .

7 . Μικροσύριγγες : 10 , 25 , 50 , 100 , 250  $\mu$ L

8 . Κυψελίδες και φιαλίδια αντίδρασης

9 . Tris-ρυθμιστικό ( 0.02M , pH 7.75 ) : Διαλύουμε 7.5 gr τριουδροξυμεθυλαμινομεθάνη σε 3.000 mL με 20 % HCl .

Αυτόκλειστο 150 mL στους 115 C για 15 λεπτά .

10 . Λουσιφερίνη - Λουσιφεράση , προετοιμασία ενζύμων : Ξαναενυδατώνω τα κατεψυγμένα ( - 20 °C ) εκχυλίσματα που έχουν υποστεί λυοφιλίωση of firefly lanterns με το tris-ρυθμιστικό σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή . Το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου 2 . με 3 ώρες , μετά φυγοκεντρούμε σε 300 gr για 1 λεπτό και μεταφέρουμε το υπερκείμενο μέσα σε καθαρό , στεγνό δοκιμαστικό σωλήνα και το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα .

## β . Διαδικασία

1 . Βαθμονόμηση : Για να προσδιορίσω τον παράγοντα ( F ) βαθμονόμησης , προετοιμάζω μια σειρά από αραιώσεις του A.T.P στάνταρ , καταγράφω την εκπομπή του φωτός από διάφορα τμήματα της κάθε συγκέντρωσης των στάνταρ . Διορθώνουμε την κύρια επιφάνεια των στάνταρ με αφαίρεση των αναγνώσεων των κορυφών ή της κύριας επιφάνειας των διαφόρων << λευκών >> χρησιμοποιώντας 0.2 mL από tris-ρυθμιστικό .

Μετράμε τον παράγοντα βαθμονόμησης  $F_s$  όπως :

$$F_s = \frac{C}{A_s}$$

όπου  $F_s$  είναι ο παράγοντας βαθμονόμησης για ευαισθησία  $S$  .

$A_s$  είναι η ένδειξη κορυφής ή ο προσδιορισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη στάνταρ του A.T.P

διορθωμένες για << λευκό >> .

C είναι η συγκέντρωση του Α.Τ.Ρ σε στάνταρ διάλυση ,  
ng / ml .

## 2 . Ανάλυση Δείγματος

Συλλέγουμε 1 με 3 L δείγματος σε ένα καθαρό ,  
ασεπτερωμένο δειγματολήπτη . Το παίρνουμε από δίχτυ με  
μάτι 250 - $\mu$ m για να απομακρύνουμε μεγάλου μεγέθους  
ζωοπλαγκτό και φιλτράρουμε χρησιμοποιώντας φίλτρο με  
πόρους 47mm 0.45- $\mu$ m εφαρμόζοντας κενό περίπου στα 30  
KPa .

Σημείωση : Διακόπτουμε την αναρρόφηση πριν το  
τελευταίο στρώμα νερού περάσει μέσα από το φίλτρο .

Γρήγορα τοποθετούμε το φίλτρο σε ένα μικρό δοχείο .  
Αμέσως καλύπτουμε το φίλτρο με 3 mL βρασμένο  
tris-ρυθμιστικό χρησιμοποιώντας αυτόματη πιπέτα .  
Τοποθετούμε το δοχείο σε υδρόλουτρο για 5 λεπτά  
και μεταφέρω το εκχύλισμα σε καθαρό , στεγνό και  
βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα με μια πιπέτα Pasteur.  
Εκπλύνω το φίλτρο και το κύπελλο με 2 mL βρασμένο  
tris-ρυθμιστικό , ενώνω τα εκχυλίσματα , καταγράφουμε τον  
όγκο , φέρνουμε τον όγκο πάνω στα 5L με tris-  
ρυθμιστικό . Καλύπτουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με  
parafilm και αν τα δείγματα δεν μπορούν να αναλυθούν  
αμέσως , τα καταψύχουμε στους -25 C . Τα εκχυλίσματα  
μπορούμε να τα έχουμε για πολλούς μήνες σε

καταψύκτη . Προετοιμάζουμε τουλάχιστον τριπλά εκχυλίσματα για κάθε δείγμα .

Η αναλυτική διαδικασία εξαρτάται από τον εξοπλισμό ανίχνευσης που χρησιμοποιούμε . Αν χρησιμοποιείται μετρητής σπινθηρισμού , προπαρασκευάζουμε σε γυάλινο φιαλίδιο 0.2 mL ένζυμο . Μετράμε την εκπομπή του φωτός του προπαρασκευασμένου ενζύμου ( κενό ) για 2 με 3 λεπτά σε ευαισθησία προσδοκόμενη για το δείγμα . Προσθέτουμε 0.2 mL εκχύλισμα δείγματος στο γυάλινο φιαλίδιο , καταγράφουμε την ώρα και στροβιλίζουμε το περιεχόμενο του γυάλινου φιαλιδίου . Αρχίζουμε να καταγράφουμε την παραγωγή του φωτός 10 δευτερόλεπτα μετά την ένωση του Α.Τ.Ρ εκχυλίσματος με εκείνου του προπαρασκευασμένου ενζύμου . Καταγράφουμε την παραγωγή για 2 με 3 λεπτά χρησιμοποιώντας την ίδια περίοδο χρόνου για όλα τα δείγματα . Καθορίζουμε τον προσδιορισμό των επιφανειών κάτω από τις αποκτούμενες καμπύλες και διορθώνουμε σφαιρώντας τον προσδιορισμό των επιφανειών, κάτω από τις αποκτούμενες καμπύλες από τα << λευκά >> ( προετοιμάζουμε << λευκά >> σύμφωνα με Strickland και Parsons ) .

γ . Υπολογισμοί

Υπολογίζουμε τις συγκεντρώσεις του Α.Τ.Ρ :

$$\text{Α.Τ.Ρ} , \text{ ng / L} = \frac{A_c * V_e * F_s}{V_s}$$

όπου  $A_c$  είναι ο προσδιορισμός διορθωμένων επιφανειών

ovatoe :

onou B elvai n gmatzo an Enoo apavukhs

$$B, \text{ mg / L} = \frac{(2.4) (1,000)}{(\text{ng A.T.P. / L})}$$

H dakti tonvth gmatzo ton nlogvov elvetai ano :

En elvai o nlogvovth gmatvovth :

Vo elvai o gmatvov ton gmatvovth :

Vo elvai o gmatvov gmatvovth :

heto ano to gmatvov ton gmatvovth :

## ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

Οι χλωροφύλλες και οι καροτίνες είναι οι απαραίτητες χρωστικές ουσίες για την φωτοσύνθεση, είναι υπεύθυνες για την συλλογή ηλιακής ενέργειας επιπρόσθετα οι καροτίνες σε μερικές περιπτώσεις προστατεύουν από το έντονο φως.

Οι χλωροφύλλες και οι καροτίνες στα άλγη είναι επίσης πολύ σημαντικές σαν κριτήριο ταξινόμησης για ιδιαίτερες τάξεις και κατανομές και σαν γενεολογικός δείκτης. Η σπουδαιότητα αυτής της ανάλυσης είναι εύκολα κατανοητή όταν θυμηθούμε ότι πολλές κατανομές (δισαιρέσεις) έχουν γίνει βάσει του χρώματος (π.χ κόκκινα άλγη (ροδοφύκη), κιτρινοπράσινα άλγη (ξανθοφύκη), καφέ άλγη (φαιοφύκη), χρυσοκαφέ άλγη (πυροφύκη) κ.τ.λ.). Αναφερόμαστε σε ένα αριθμό άρθρων που αναφέρονται στην κατανομή των χρωστικών ουσιών.

Οι οπτικές παρατηρήσεις είναι ανεπαρκείς για να καθορίσουμε τους συγκεκριμένους συνδυασμούς των χλωροφυλλών και των καροτινών και αυτό οφείλεται στο ότι με γυμνό μάτι αποκρύπτονται φασματικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι διαφορετικά στο φακό, οι ποσοτικές διαφορές και το γεγονός ότι σχεδόν



όλες οι καροτίνες είναι κιτρινο-πορτοκαλί και οι χλωροφύλλες είναι πράσινες .

Απλές , αποτελεσματικές τεχνικές για τον διαχωρισμό των χρωστικών ουσιών είναι σημαντικές . Τέτοιες τεχνικές χρησιμοποιούνται για να καταδείχνουν και να διευκρινίζουν τις κυριώτερες διαφορές των χλωροφυλλών-καροτινών ανάμεσα στις τάξεις . Στο πείραμα απομονώνουμε και ξεχωρίζουμε τις πρωτεϊνικές χρωστικές τις φυκοχολινηπρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται συμπληρωματικά σε τέσσερεις ομάδες : κυανοβακτήρια , ροδόφυτα , κρυπτόφυτα και γλαυκόφυτα . Αυτές οι χρωστικές διαχωρίζονται με τεχνικές για υδατοδιαλυτά παρασκευάσματα υψηλού μοριακού βάρους . όπως στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα . Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιείται χρωματογραφία προσρόφησης με οργανικούς διαλύτες η οποία είναι μια τυπική μέθοδος που χρησιμοποιείται για παρασκευάσματα που διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες , όπως οι χλωροφύλλες και οι καροτίνες . Η συγκεκριμένη μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί είναι γρήγορη , πολύ αποτελεσματική και εύκολα επαναλαμβανόμενη .

## ΜΕΘΟΔΟΣ

Προφυλάξεις: Οι χλωροφύλλες και οι καροτίνες είναι οσταθή παρασκευάσματα. Αν δεν χειρίζονται με προσοχή θα αλλοιωθούν χημικά, γεγονός που μπορεί να κάνει τους διαχωρισμούς και τις αναγνώσεις περισσότερο δύσκολες. Είναι πολύ ευαίσθητα όταν εκτίθενται στο φως και στον αέρα, όταν υφίστανται ισομερισμό και οξειδωση αλλάζει το χρώμα και η χημική δομή τους. Οι φωτοχημικές μεταβολές επισπεύδονται όταν οι χρωστικές απορροφούνται στις χρωματογραφικές επιφάνειες. Η παρουσία ακόμα και ενός μικρού ποσού οξέος στα διαλυτικά μέσα θα μετακινήσουν το Mg από τη χλωροφύλλη και θα οδηγήσει σε παραγωγή φαιοφυτινών και θα προκαλέσει cis-trans ισομερισμό των καροτινών. Δυνατά αλκάλια θα διασπάσουν τη φυτόλη από τις χλωροφύλλες και θα αποδόσουν χλωροφυλλίδες που μπορεί να προκαλέσουν χημικές μεταβολές σε βασικές καροτίνες (π.χ. φουκοξανθίνη, περιντινίνη).

Οι χρωστικές πρέπει να χειρίζονται με προσοχή, με πολύ μικρή έκθεση στο φως και στον αέρα. Όπου είναι δυνατόν, η εργασία θα πρέπει να γίνεται σε χαμηλό φως. Διατηρώντας το διάλυμα μέσα σε γυάλινο μπουκάλι καλυμένο με μαύρο ύφασμα (ή, αν είναι δυνατόν, να τοποθετηθεί σε κόκκινο γυάλινο μπουκάλι). Τα δοχεία χρωματογραφίας θα πρέπει να καλύπτονται με μαύρα

υφάσματα . Αν τα διαλύματα ή τα εξατμισμένα δείγματα πρέπει να διατηρηθούν για χρόνο περισσότερο από μία ώρα θα πρέπει να γίνει απαέρωση αυτών με άζωτο και να φυλαχθούν στο ψυγείο ή στην κατάψυξη . Αν χρειάζεται να κρατήσετε τα δείγματα των χρωστικών πάνω από μια μέρα τοποθετούνται με ατμούς αζώτου στην κατάψυξη . Με προσοχή μπορούν να διατηρηθούν , με ασήμαντες αλλαγές για τέσσερις εβδομάδες περίπου .

Όποτε είναι δυνατόν αυτή η δουλειά θα πρέπει να γίνεται με κουκούλα στο κεφάλι . Η χρήση εκχυλισμάτων και διαλυμάτων πρέπει να γίνεται με γάντια , αν είναι δυνατόν . Επίσης να γίνεται χρήση καινούριων μπουκαλιών για διαλύματα . Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη μεθανόλη , την αιθανόλη και την ακετόνη , οι οποίες απορροφούν εύκολα υγρασία από την ατμόσφαιρα .

#### Εκχυλίσματα και χρωματογραφία

Θα πρέπει οι καλλιέργειες των μονοκυττάρων οργανισμών και τα δείγματα να είναι φρέσκα με μακροάλγη ( ή υλικά τα οποία θα έχουν πρόσφατα συλλεχθεί και έχουν διατηρηθεί σε  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ) .

1. Συλλέγουμε τους μονοκυττάρους οργανισμούς με φυγοκέντρησή και ξεπλένουμε δυο φορές τη φυγόκεντρο με απεσταγμένο νερό . Τα δείγματα με τα μακροάλγη θα πρέπει να ξεπλυθούν γρήγορα με απεσταγμένο νερό και

στυπώνεται με υδρογόνο .

2. Τρίβουμε τη μάζα των άλγων και τους μονοκύτταρους οργανισμούς από τις καλλιέργειες και εκχυλίζουμε με μεθανόλη και περίπου 5-10mg  $MgCO_3$  σε ένα χειροκίνητο ομογενοποιητή . Κοβουμε τους μακροσκοπικούς θαλλούς των αλγών ( καφέ και πράσινα ) σε μικρά κομματάκια και εκχυλίζουμε με μεθανόλη με 5-10mg  $MgCO_3$  σε ψυχρό γουδί και γουδοχέρι με άμμο ή αλεσμένο αλουμίνιο . Τα εκχυλίσματα των μακροάλγων διευκολύνει να ψυχθούν προηγουμένως και να κοπούν σε κομματάκια μέσα σε υγρό  $N_2$  ( άζωτο ) .

Η ποσότητα της μεθανόλης για κάθε εκχύλισμα θα πρέπει να είναι συνήθως περίπου 5-10 ml για τα μονό κύτταρα και 15-20 ml για τα μακροάλλα .

3. Φυγοκεντρούμε τα εκχυλίσματα σε μια κλινική φυγόκεντρο στη μέγιστη ταχύτητα για 5-10 λεπτά . Το υπερκείμενο , το οποίο πρέπει να είναι καθαρό ξαναεκχυλίζεται αν είναι έγχρωμο , όπως στο δεύτερο βήμα . Δύο ή τρία εκχυλίσματα είναι συνήθως αρκετά για να εκχυλιστεί ο όγκος των χρωστικών ουσιών .

4. Αναμιγνύουμε τα υπερκείμενα περίπου 40-60 ml από κάθε απόσταγμα και προσθέτουμε 250 ml σε ένα διαχωριστικό χονί . Προσθέτουμε περίπου 30 ml διαιθύλ-αιθέρα σε κάθε διάλυμα χρωστικών και με προσοχή αναστηκάνουμε το χονί για να πατηχθεί ένα ομογενές διάλυμα . Θα πρέπει το φως να είναι αμυδρό και , αν

είναι δυνατόν , θα πρέπει να τυλίξετε το διαχωριστικό χωνί με μαύρο ύφασμα , κατά τη διάρκεια αυτών των εργασιών .

5. Προσθέτουμε κρύο διάλυμα 5% NaCl προσεκτικά στο διαχωριστικό χωνί ρίχνοντας κάτω στη πλευρά ( προσθέτουμε περίπου δύο μέρη NaCl μαζί με το διάλυμα της μεθανόλης -διαιθυλ-αιθέρα ) . Το διάλυμα στο χωνί θα διαχωριστεί σε δύο στρώματα , ένα ανώτερο , επιφάνεια του διαιθυλ-αιθέρα που περιέχεται στις περισσότερες χρωστικές και ένα κατώτερο υπόφαση το οποίο περιέχει τη μεθανόλη-NaCl με , καμιά φορά , υπολοιματικές χρωστικές . Βγάζουμε το χωνί και με προσοχή το γέρνουμε μπροστά και πίσω αρκετές φορές . Κρατάμε το χωνί ανάποδα και ανοίγουμε το πώμα για να ελευθερωθεί η πίεση που έχει δημιουργηθεί . Θα πρέπει το στόμιο του χωνιού να είναι μακριά μας . ( -Ο διαιθυλ-αιθέρας βράζει στους 37 °C ) . Αν η υπόφαση είναι άχρωμη τη απομακρύνουμε από το διαχωριστικό χωνί και προχωράμε στο έβδομο βήμα .

6. Αν η υπόφαση είναι χρωματισμένη , πρέπει να πλυθεί . Στεγνώνουμε την υπόφαση και την επιφάνεια ξεχωριστά από το χωνί προσθέτουμε την υπόφαση πίσω στο χωνί . Προσθέτουμε άλλα 30 ml διαιθυλ-αιθέρα στο καθένα και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία ανάμιξης . Απομακρύνουμε την υπόφαση , η οποία τώρα θα πρέπει να είναι άχρωμη .

7. Συνδιάζουμε τα εκχυλίσματα του διαιθυλ-αιθέρα μέσα

στο χωνί και πλένουμε τον διαιθυλ-αιθέρα με κρύο νερό για να απομακρύνουμε το υπόλειμμα της μεθανόλης και ακολούθως απομακρύνουμε τη υδατινή υπόφαση . Επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο με κρύο νερό άλλη μια φορά .

Σημείωση : α) Ο διαιθυλ-αιθέρας είναι λίγο διαλυτός στο νερό , έτσι η ποσότητα θα μειωθεί με το πλύσιμο . Αν η ποσότητα του διαιθυλ-αιθέρα ελλειπθεί στο ελάχιστο , το οποίο θα ήταν προσιτό για τη διαδικασία , απλά προσθέτουμε διαιθυλ-αιθέρα . Για όσο χρόνο οι χρωστικές είναι μέσα σε αυτόν χρειάζεται προσοχή . Η ανατάραξη κ.λ.π συχνά προκαλούν γαλακτώματα . Αυτό μπορεί να διασπαστεί προσθέτοντας αιθανόλη , μεθανόλη ή περισσότερο χλωριούχο νάτριο .

β. Εαναπερνάμε το εκχύλισμα του διαιθυλ-αιθέρα από το χωνί και απομακρύνουμε την υγρασία του διαλύματος περνώντας το αργά από 1 cm στρώμα κοκκόδους άνυδρου θειικού νατρίου σε ένα μεσαίο φίλτρο υάλου ( μέγεθος 60 ) με πορώδη υφή . Χρησιμοποιούμε χωνί και εφαρμόζουμε μικρό κενό . Πλένουμε το θειικό νάτριο με μερικά मिलीτρα διαιθυλ-αιθέρα για να απομακρύνουμε οποιαδήποτε προσροφούσα χρωστική . Εξατμίζεται ο διαιθυλ-αιθέρας για να στεγνώσει σε ένα περιστρεφόμενο εξατμιστή σε κενό . Αν αυτό δεν είναι εφικτό , μικρά υποπολλαπλάσια ( π.χ. 15 ml ) μπορούν πολύ γρήγορα να

εξατμίστουν και να στεγνώσουν κάτω από ροή N<sub>2</sub>. Οι στεγνές χρωστικές θα σχηματίσουν μια γυαλιστερή επιφάνεια στη στρογγυλή βάση της φιάλης.

9. Χρωματογραφία : Από τη στιγμή που οι διάφορες χλωροφύλλες και καροτίνες εμφανίζουν ένα πλατύ << τόξο >> χαρακτηριστικών πολικότητας και προσρόφησης κανένα χρωματογραφικό σύστημα δεν μπορεί να διαχωρίσει όλες τις χρωστικές. Σύμφωνα με αυτά θα χρωματογραφίσουμε κάθε εκχύλισμα σε δυο συστήματα :

α) Κολοειδές gel διοξειδίου του πυριτίου με 25% ασετόν σε πετρελαιοειδές αιθέρα

β) Κελουλόζη με 25% n-προπανόλη σε πετρελαιοειδές αιθέρα, 50 λεπτά πριν τη χρήση ενισχύουμε το χρωματογραφικό χώρο με ηθμό ( Whatman #1 ) και προσθέτουμε 120 ml διαλύτη για κάθε χώρο, ρίχνοντας τους διαλύτες κάτω στην πλευρά για να υγράνει τον ηθμό. Αυτό θα εξασφαλίσει την διασπορά. Σφραγίζουμε το καπάκι του χώρου σε κενό με ένα στρώμα λίπους. Διαλύουμε το εξατμισμένο απόσταγμα των χρωστικών σε μερικά μιλιλιέτρα ασετόν για να παραχθεί ένα συμπυκνωμένο διάλυμα και εφαρμόζουμε και τα δύο σε TLC τριβλία 20 mm από το ήατο όπως 15-20 mm ταινίες ( σχ. 1 ). Πρέπει να συγκεντρώσουμε τρία ή τέσσερα διαφορετικά αποστάγματα σε κάθε διαφορετικό τριβλίο. Αν χρωματογραφιστεί μόνο ένα απόσταγμα για τα χρωματογραφικά παρασκευάσματα ( βλ. το κεφάλαιο που

σκολουθεί για τα χρωματογραφικά παρασκευάσματα ) , την ταινία να είναι 150 mm σε πλάτος .

10. Συγκεντρώνουμε τα αποστάγματα των χρωστικών με τη βοήθεια πιπέτων Pasteur ( σχ.2 ) . Αποσύρουμε περίπου 0.5 mL με την πιπέτα με ένα ελαστικό πουάρ . Η εκροή ελέγχεται καλύτερα αν κρατήμε με το ένα δάκτυλο το πάνω μέρος του φαρδιού άκρου προσοχή : Δεν ξύνουμε τη προσροφητική επιφάνεια . Το ξύσιμο ανακατεύεται με το διαχωρισμό .

11. Όταν κατάλληλα εκχυλίσματα έχουν συγκεντρωθεί , βυθίζουμε το τριβλίο σε μία ποσότητα ακετόνης ( 5mm βάθος ) σε ένα ξεχωριστό δοχείο και αφήνουμε να αναπτυχθεί για 10 mm περίπου για να σχηματιστεί μια λεπτή και έντονη ταινία . Αυτό θα μας διαβεβαιώσει ότι οι χρωστικές αναπτύχθηκαν σαν μια έντονη ταινία , όλες από την ίδια αρχική θέση και έτσι διευκολύνονται οι συγκρίσεις . Κάθε ταινία θα εξαπλωθεί όπως συγκεντρώθηκε . ( Τα συγκεντρωμένα αποστάγματα πρέπει να είναι καλυμμένα με σκοτεινή κάρτα για να προστατεύονται από το φως ) .

12. Παίρνουμε το τριβλίο από την ακετόνη και το αφήνουμε να στεγνώσει ( περίπου ένα λεπτό ) . Σημαδεύουμε το σημείο προέλευσης με ένα ξύσιμο στην άκρη της προσροφούσας επιφάνειας . Τοποθετούμε το τριβλίο στο χώρο του κατάλληλου διαλύματος και καλύπτουμε με ένα μαύρο πανί . Αφήνουμε τα τριβλία να αναπτυχθούν περίπου



25 mm από την κορυφή, παίρνουμε και σημαδεύουμε το διάλυμα στη πρόσοψη και φτιάχνουμε σε διάγραμμα τις διάφορες καρτίνες και χλωροφύλλες και τις Rf τιμές τους.

Η απόσταση που μετακινήθηκε η χρωστική από τη προέλευση της

$Rf = \frac{\text{Η απόσταση που μετακινήθηκε το διάλυμα από τη προέλευση του}}{\text{Η απόσταση που μετακινήθηκε η χρωστική από τη προέλευση της}}$

13. Αναγνώριση των χρωστικών : Αυτό μπορεί να γίνει με ένα καλό μέτρημα της σταθερότητας σημειώνοντας τις συγγενείς θέσεις των χρωματογραφικών θέσεων καταγράφοντας τα φάσματα απορρόφησης. Οι τιμές Rfz έχουν λίγη σημασία από τη στιγμή που επηρεάζονται από τόσες πειραματικές μεταβλητές.

#### Προπαρασκευαστική χρωματογραφία

1. Οι μικρές ταινίες χρωστικών περιέχουν ανεπαρκείς χρωστικές για να εξασφαλίσουμε καλά φάσματα απορρόφησης. Για να καταγράψουμε ένα σωστό φάσμα απορρόφησης προτείνεται ότι σε κάθε φύκος μια πλατιά ταινία από τα αποστάγματα μπορεί να δημιουργήσει ραβδώσεις πάνω σε τριβλίο ζελέ του πυριτίου και χρωματογραφούμε όπως περιγράφουμε παραπάνω.

2. Εύστε κάθε ξεχωριστή βασική χρωστική ζώνη ξεχωριστά με μία ξυριστική λεπίδα (προστατεύουμε τις άξυστες ζώνες από το φως) και τρίβουμε την απορροφητική

χρωστική και το ζελέ του διοξειδίου του πυριτίου σε μια σκόνη με μια σπάτουλα σε ένα μικρό γυάλινο κύπελλο .

3. Προσθέτουμε τη σκόνη σε μια πιπέτα Pasteur η οποία έχει μπλοκαριστεί με ένα glass wool . Προσθέτουμε 2-3 mL ακετόνη ( για χλωροφύλλες ) ή αιθανόλη ( για καροτίνες ) και ανακτούμε τις εκλουσμένες χρωστικές . Προσθέτουμε επαρκές διάλυμα μέχρι η σκόνη να γίνει άσπρη . Καταγράφουμε τα φάσματα απορρόφησης για τις χλωροφύλλες ( 700 nm-400 nm ) και τις καροτίνες ( 600 nm-350 nm ) .

Σημείωση : Οι χλωροφύλλες εμφανίζουν πράσινο χρώμα στα φύλλα , οι καροτίνες κίτρινο ή πορτοκαλί .

Η κατανομή των χρωστικών στα γκρουπ των άλγων.  
 ● = κύρια χρωστική του γκρουπ, ○ = χρωστική που συμπεριλαμβάνεται  
 λιγότερο από μισό από ολικό περιεχόμενο των χρωστικών.  
 ○ = παρουσιάζεται σε μικρή ποσότητα.

Pigments	Algal groups									REMARKS	
	Chlorophyceae	Siphonales <sup>3</sup>	Euglenophyceae	Xanthophyceae	Chrysophyceae	Bacillariophyceae	Phaeophyta	Dinophyceae	Rhodophyta		Cyanophyta
<i>Chlorophylls</i>											
Chlorophyll a	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	
Chlorophyll b	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Chlorophyll c	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Chlorophyll d	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Chlorophyll e	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Carotenes</i>											
α-Carotene	±○	●	●	●	●	±○	±○	●	±○	●	
β-Carotene	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
γ-Carotene	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
z-Carotene	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Flavacene	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Xanthophylls</i>											
Lutein	●	○	○	○	○	?	±○	○	±○	±○	
Zeaxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Violoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Flavoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Neoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Siphoncin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Siphonoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Fucoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Neofucoxanthin (A and B)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Diatoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Diadinoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Neodiadinoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Dinoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Neodinoxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Peridinin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Neoperidinin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Myxoxanthin (= Echinenone)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Myxoxanthophyll	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Oscilloxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Astaxanthin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Unknown xanthophyll	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
<i>Phycobilins</i>											
R-phycoerythrin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
R-phycocyanin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C-phycoerythrin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C-phycocyanin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
β-phycoerythrin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Allophycocyanin	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

\*But not in all genera

Not in higher plants  
 \*In *Navicula torquatum*

\*Taraxanthin?

Occurs as a chromo-  
 protein

Also syn. Aphanin and  
 Calorhodin

\*In *Haematococcus*, *Brachi-*  
*omonas* and *Protosiphon*

Also in *Cryptomonads*  
 Also in *Cryptomonads*,  
 but absorption peaks  
 not the same

\*In *Porphyra naiadum*  
 \*In *Porphyra naiadum*

Τα ποσοστά επί της 100 (%) της χλωροφύλλης και των καροτοειδών σε μερικά άλγη.

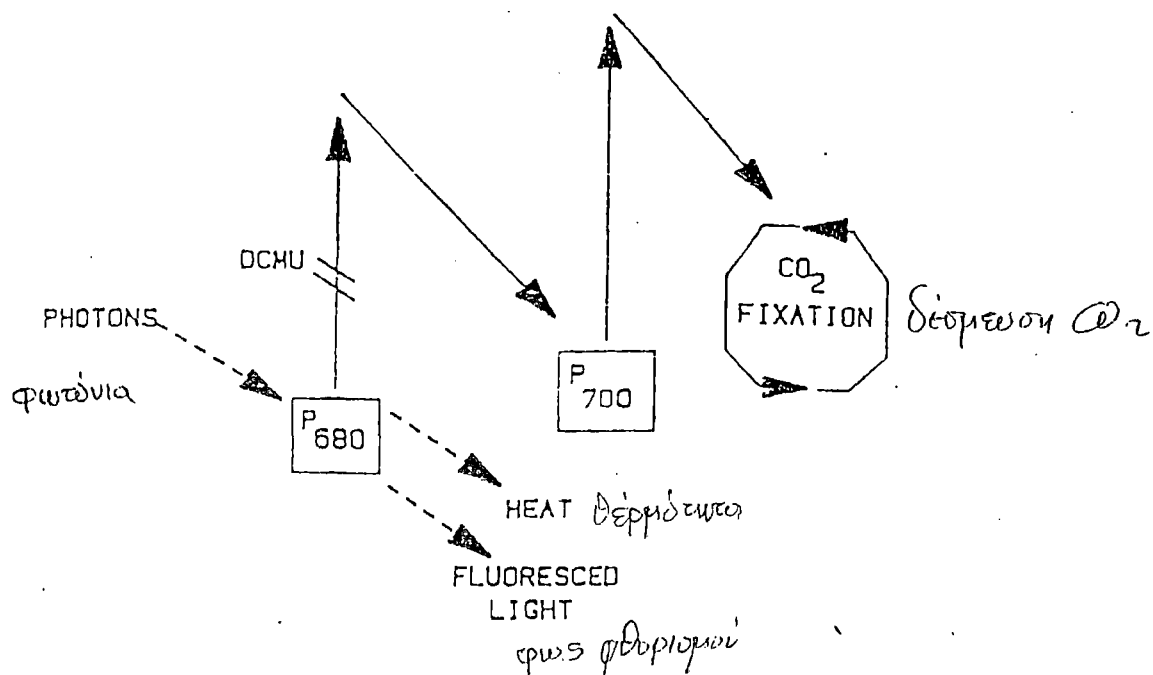
	Chlorophyll		a : b	Carotenoids		x : c	$\frac{a + b}{x + c}$
	a	b		Carotenes	Xanthophylls		
<i>Ulva lactuca</i>	0.33	0.15	2.2	0.016	0.077	3.1	2.6
<i>Chlorella pyrenodosa</i>	2.00	0.55	3.6	0.45	0.268	6.0	7.9
<i>Fucus serratus</i>	0.45	—	—	0.016	0.067	4.2	5.4
<i>Oiclyota dichotoma</i>	0.78	—	—	0.028	0.163	5.8	4.6
<i>Porphyra lacinata</i>	0.44	—	—	0.029	0.100	3.4	3.4

Χρωστικές του φυτοπλακτού.

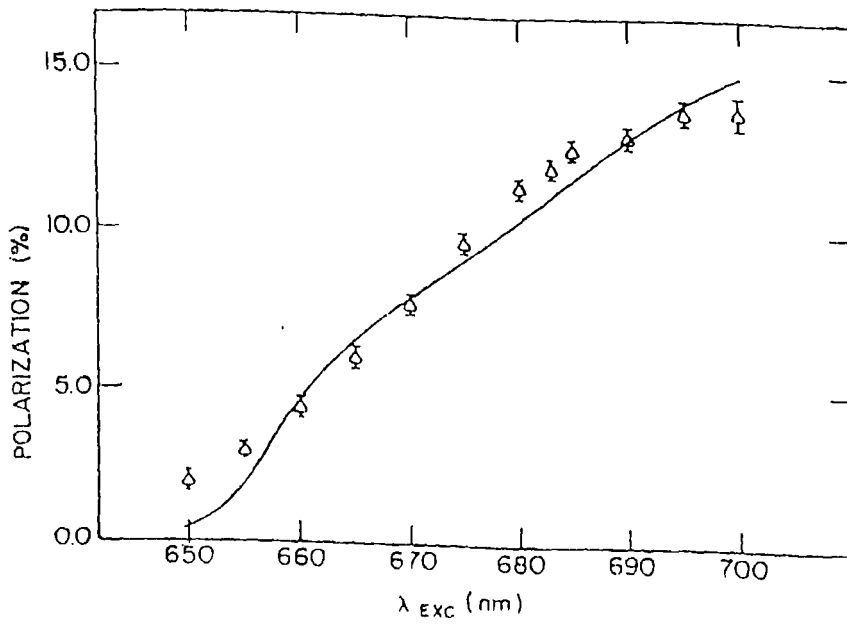
TABLE 9. PIGMENTS OF MARINE PHYTOPLANKTON

Pigment		Bacillario- phyceae	Dino- phyceae	Chryso- phyceae	Chloro- phyceae	Myxo- phyceae	Xantho- phyceae	Crypto- phyceae	Prasino- phyceae	Hapto- phyceae
Chlorophyll	<i>a</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>b</i>				++				++	
	<i>c</i>	++	++	+			(+)	++		++
Carotene	$\alpha$							+++	+	
	$\beta$	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++
	$\gamma$								+	
<i>Xanthophylls</i>										
Fucoxanthin		+++	(+)	+++			+++			+++
Neofucoxanthin		++		++						++
Diadinoxanthin		++	++	++			++			++
Diatoxanthin		+					+			+
Dinoxanthin			+							
Peridinin			+++							
Neoperidinin			+							
Lutein					+++				++	
Zeaxanthin					+				+	
Flavoxanthin					+					
Violaxanthin				+	+				++	
Neoxanthin					+					
Alloxanthin (1 + 2)								+++		
Monodoxanthin								+		
Crococanthin								++		
Myxoxanthin						++				
Myxoxanthophyll						++				
Anthraxanthin						(+)				
Siphonaxanthin					+					+
Number of unidenti- fied pigments			2		1		1	2	8	1
Phycobilins						++		++		

Σχηματική παρουσίαση, πως η ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε φωτοσυνθετική δραστηριότητα, φθορισμό και θερμότητα, όπου η 3-(3,4-διχλωροφαινύλιο)-1,1-διμεθυλοουρέα (DCMU) ενεργεί για να διαλύσει τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων μεταξύ του φωτοσυστήματος I (P680) και του φωτοσυστήματος II (P700).



Το LHCP 730 nm φάσμα διέγερσης φθορισμού πόλωσης και η καλύτερη εφαρμογή δεδομένων μεταξύ 650 και 750 nm (-) βασισμένα στο μοντέλο των τεσσάρων συνιστούσων με σχέση χλωρ. α γωνίας και της χαμηλότερης ενέργειας συνιστούσας θέσης που παίρνεται σαν ρυθμιστικός παράγοντας .



## ΒΑΣΙΚΕΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΩΤΙΝΕΣ ΤΩΝ ΑΛΓΩΝ

### ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

κλωροφύλλη a

β-καροτινίνη, ζωξαανθίνη, μυξοξανθοφυλλη.

### ΡΟΔΟΦΥΤΑ

κλωροφυλλη a

β-καροτινίνη, α-καροτινίνη, ωκρική ζωξαανθίνη

### ΕΥΓΛΕΝΟΦΥΚΗ

κλωροφυλλη a, b

β-καροτινίνη, ζωξαανθίνη, διαδινόξανθίνη, νεοξανθίνη

### ΔΙΝΟΦΥΚΗ

κλωροφυλλη a, c2

β-καροτινίνη, δινόξανθίνη, περιδινίνη, διαδινόξανθίνη,  
πυροξανθίνη.

### ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΥΚΗ

κλωροφυλλη a, c1, c2

β-καροτινίνη, διατοξανθίνη, διαδινόξανθίνη, φουκοξανθίνη

### ΧΡΥΣΟΦΥΚΗ

κλωροφυλλη a, c1, c2

β-καροτινίνη, ζωξαανθίνη, νεοξανθίνη, φουκοξανθίνη

### ΚΡΥΠΤΟΦΥΚΗ

κλωροφυλλη a, c2

α-καροτινίνη, κροκοξανθίνη, μοναδοξανθίνη, αλλοξανθίνη

### ΧΛΩΡΟΦΥΚΗ

κλωροφυλλη a, b



ποδοτήρες.

Η χλωροφύλλη α, β, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> ποσοτικοποιούνται με πολύ μικρές

μετρήσεις.

β-καροτίνη, διοξοχλωροφύλλη, διοξιοχλωροφύλλη, ετεροχλωροφύλλη,

χλωροφύλλη α, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>

ΞΑΝΘΟΦΥΚΗ

β-καροτίνη, φουκοχλωροφύλλη

χλωροφύλλη α, c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>

ΦΑΙΟΦΥΚΗ

β-καροτίνη, κροχολίνη, διοξοχλωροφύλλη, μετρήσιμη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY by Lobban , Chapman , Kremer
2. ΒΙΟΧΗΜΙΑ Ι.Γ.ΓΕΩΡΓΑΡΑΤΣΟΣ (ΤΟΜΟΣ Α)
3. ΓΕΝΙΚΗ ΒΟΤΑΝΙΚΗ Χ.ΔΙΑΠΟΥΛΗΣ
4. ΒΟΤΑΝΙΚΗ Ι.ΤΣΕΚΟΣ - Ε.ΚΟΥΚ (ΤΟΜΟΣ Α)
5. ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝ ΓΛΥΚΩΝ ΝΕΡΩΝ ΜΑΝΙΚΑ Μ. ΣΤΕΦΑΝΟΠΟΥΛΟΥ Δ.  
( ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ )

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝ
2. ΧΛΩΡΟΠΛΑΣΤΕΣ
3. ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ - ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΕΣ

### Β. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΕΣ - ΤΡΙΧΡΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ
2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ - ΜΙΑ ΑΛΛΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ
3. ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
5. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΩΝ a , b , c
6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ
7. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

### Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Δ. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ