

Zdeněk Š e s t á k:

Kvantitativní stanovení chlorofylu v řasách a sinicích

Ústav pro fyziologii rostlin University Karlovy

Sbírka kultur autotrofních organismů ČSAV

Množství pigmentů v řasách a sinicích je údajem pro hydrobiologii dosti významným. Pomocí něho se někteří autoři snažili určit celkové množství fytoplanktonu (2, 5, 7, 8, 9, 12, 17, 23) a tím i velikost biomasy v studovaném vodstvu, byl sledován vztah množství chlorofylu k intenzitě fotosynthesy planktonu (13 a j.), k velikosti planktonních buněk (22 a 23), k intenzitě světla, ve kterém řasy rostly (24, 25) a podobně.

Metod k stanovení pigmentů v řasách a sinicích byla již popsána celá řada (viz 20, s. 27—43); nejsou však většinou dostatečně kvantitativní. Úkolem této práce bylo je kriticky zhodnotit a pokusit se o vypracování jednodušhé přesnější metody.

Metody a diskuse

Základním předpokladem pro stanovení pigmentů v drobných vodních organismech je správný odběr vzorku vody a jeho zahuštění (viz na př. 11, 18). K analýze nesmíme užít t. zv. síťového planktonu, protože i husté sítky nezachytí všechn nannoplankton, nejdůležitější podíl fytoplanktonu (3, 5). Vzorek je také třeba odebrat vhodným sběračem.

Odebraný vzorek musíme zkoncentrovat, zbavit ho pokud možno veškeré vody. Účinnost organických rozpouštědel, kterými pigmenty z organismů extrahujeme, závisí totiž na tom, kolik obsahují vody. Tak na př. už podle pokusů Willstättera a Stolla [v (19), s. 162; v (4) s. 85] je pro extrakci suchých vzorků nejučinnější aceton, zředěný vodou na 85 %, ethanol 90 % nebo methanol takřka bezvodý; dalším zředováním se extrakce zhoršuje. Nemůžeme tedy extrahovat barviva přímo ve vzorcích vody, které obsahují jen malé množství planktonních organismů.

Podle většiny hydrobiologických metod (2, 9, 17; viz též 19, str. 185; 20, tab. 5) se vzorek vody zfiltruje kvantitativním filtračním papírem nebo skleněným sintroem, na zachycené řasy se nalije rozpouštědlo a nechá se stát 90 min. až 48 hod. Již v literatuře najdeme kritické hlasy: z některých druhů řas se pigmenty totiž extrahují lépe než z druhých, což při práci se směsí řas nutně vede k chybám (9 a j.). Podle Osipovové (15) závisí rychlost extrakce značně na typu bílkovin, na které je chlorofyl v plastidu nebo chromatoplasmě vázán (úkolem extrakce je totiž rozbít vazební komplex pigment-bílkovina denaturačí bílkoviny a převést lipofilní pigmenty do pravého roztoku). Záleží tedy nejen na druhu řasy, ale i na stáří, fyziologickém stavu buněk a do značné míry jistě i na jejich permeabilitě a osmotických vlastnostech (4).

V pokusech, které jsem dělal s čistými kulturami zelených řas a Euglen, se ukázalo, že na př. poměrně snadno se extrahují řasy rodu *Euglena* (a zřejmě bičíkovci vůbec). Pod mikroskopem zjistíme, že se působením rozpouštědla roztrhly nebo se alespoň porušila jejich blána buněčná. Jiné druhy (na př. *Ankistrodesmus falcatus* nebo *Scenedesmus obliquus*) se extrahují velmi těžko — i po delším stání s rozpouštědlem buňky zůstanou celé a jen se do určité míry odbarví; o něco lépe se extrahovala *Chlorella viridis*. Výsledek extrakce ovšem není přímo závislý na fylogenetických vztazích mezi druhy: extrahovatelnost pigmentů z blíže příbuzných druhů se často velmi liší.

Extrahujeme-li pigmenty pouhým přeléváním řas rozpouštědlem, může

značně záležet na druhu a koncentraci rozpouštědla a jeho použití. Proto jsem podle soukromého sdělení J. H r b á č k a přelával sintry s řasami malými dávkami acetonu (nejdříve bezvodým, pak několikrát 85%, nakonec opět bezvodým). Extrakce tímto způsobem není však dosti kvantitativní (viz tab. 2). Jen do jisté míry pomohlo vysušení sintrů v exsikátoru (které zase poněkud podporuje rozklad barviv) nebo zvlhčení řas po první dávce rozpouštědla. U některých vzorků nestačil ani $6 \times$ opakovaný extrakční postup. Neúspěšná byla i řada pokusů se vzorky na filtračním papíře (viz tab. 2; též 20, s. 147—149), který na rozdíl od dokonalé filtrace sintry G 4 je pro koncentrování zcela nevyhovující; i nejhustší kvantitativní papíry propouštějí mnoho řas. Jak ukázaly pokusy, prodlužováním a opakováním extrakci jen poněkud zlepšíme, zato však se zvyšuje rozklad pigmentů. Pigmenty patří totiž k nejlabilnějším rostlinným látkám. Působením kyselin, louhů, některých dalších chemických sloučenin, tepla, světla a kyslíku z nich vzniká mnoho oxydačních a redukčních produktů. Jejich roztoky mají více či méně odlišná absorpční spektra (1, 16). Přítomnost těchto rozkladných produktů značně ovlivňuje výsledky, získané při fotometrických měřeních.

Výsledky metod, při kterých se vzorek pouze nechá stát s organickým rozpouštědlem, jsou neuspokojivé, vedou ke zkreslení. Je třeba řasy rozrušit tak, aby pigmenty mohly být rozpouštědlem rychle vyluhovány.

Jedinou účinnou metodou je mechanické rozetření řas, při kterém se dokonale rozruší struktura buňky, aniž by se poškodily pigmenty. Při práci s vyššími rostlinami se listy obvykle roztírají s pískem. Zjistil jsem, že tento způsob homogenisace je výhodný i pro vzorky planktonu, vyžaduje však zvláštního způsobu koncentrace. Výhodné by bylo řasy zcentrifugovat, v našich ústavech je však jen velmi málo vyhovujících centrifug pro větší množství vody. Místo nich se nyní hojně zavádějí membránové filtry (3): pro naše účely by se však hodily jen takové, od kterých lze řasy vhodně oddělit [na př. rozpuštěním filtru v acetonu — viz (2)] — a ty nejsou u nás dosud běžně dostupné. Zkoušel jsem také koncentrovat řasy tím, že se strnou do sraženiny hydroxydu zinečnatého. Ve vzorku vody připravíme přidáním 50% roztoků zinečnaté soli a louhu voluminosní sraženinu, do které se má plankton nacytat. Pokusy ukázaly, že sraženina nezachytí řasy kvantitativně; musíme srážet dosti značným množstvím reagentů, které způsobují rozklad pigmentů (louh a kovový ion!). Abychom mohli barviva extrahovat, musíme ještě sraženinu oddělit od vody a usušit [hygroskopický $Zn(OH)_2$ schne v exsikátoru špatně]. Nerozpustná sraženina také tvoří špatně propustnou hráz pro rozpouštědlo; získané hodnoty jsou nízké a nepravidelně kolísají. Odpaření vody barviva silně naruší.

Při hledání vhodné metody koncentrování planktonu se mi nejlépe osvědčilo filtrovat řasy přes písek. K témuž závěru došli nedávno též D i e t r i c h a S t e i n e c k e (3), kteří na základě sčítání buněk porovnávali dokonalost filtrace planktonu sítkou, písčným filtrem podle S e d g w i c k - R a f t e r a a membránovým filtrem. Pro naše účely je písek zvláště vhodný, protože přímo s ním zachycené řasy rozetřeme. Navrhuji používat tohoto postupu, který jsem dostatečně prozkoušel: do Büchnerovy nálevky (užívám jsem nálevky průměru 4,5 cm) se na filtrační papír nasype 1 až 1,5 cm vrstva vhodné rozetřeného promytého sklářského písku (se zrný menšími než 100μ o průměrné velikosti 12—25 μ — vyzkoušíme pro dané vzorky planktonu. S e d g w i c k - R a f t e r ů v filtr používá písku s daleko většími zrny — od 90 do 400 μ ,

který je pro zachycení často 3 μ velkých forem nannoplanktonu asi příliš hrubozrný). Nálévka se umístí na odssávačku a za podtlaku promyje vodou. Přes písek prosajeme vzorek, písek vyklopíme do třenky a zkontrolujeme, zda se až na filtrační papír nedostaly žádné řasy. Vzorek pak s pískem roztíráme asi 3 min. Lépe se osvědčilo třít vzorek bez přidání acetonu. Při zpracování řas není zapotřebí používat $MgCO_3$ k neutralisaci kyselin, kterých je v řasách poměrně málo. Tření ukončíme tehdy, když už se v písku netvoří barevné pruhy a všechn je stejnoměrně nazelenalý. Písek přeneseme znovu na Büchnerovu nálévku na odssávače a teprve teď extrahujeme: zrušíme podtlak, na písek přidáme vždy 4 až 6 ml acetonu, necháme 0,5 až 1 min. extrahovat, odssajeme do široké zkumavky, umístěné v odssávače, na písek přilijeme další aceton a postup opakujeme. Osvědčila se extrakce do celkového objemu 20 ml, její kvantitativnost vyzkoušíme prolitím dalšího rozpouštědla a kontrolním měřením. Za nejvýhodnější považuji extrakci nejprve bezvodým acetonem, pak několikrát 85 %, poslední promytí opět bezvodým acetonem. Omezíme tak možnost tvorby koloidních roztoků, extrakce je kvantitativnější. Extrakt přefiltrujeme přes jenský sintr 1 G4, doplníme ad 20 ml (nebo jiný vhodný objem) a měříme.

Při tomto postupu pracujeme s čerstvým vzorkem. Jsou tedy vyloučeny ztráty pigmentů, které mohou nastat při sušení, úschově a pod. Řasy nemusíme bezprostředně extrahovat: můžeme je jen zachytit na písek a uschovat, třeba v Petriho misce, ve tmě po řadu hodin (vyzkoušeno 19 hod.), aniž by došlo k průkazným změnám. Shodné výsledky pro paralelní pokusy ukázaly, že rozetření s pískem plně vyhovuje. Předností metody je spojení koncentrace s extrakcí. Nepočítaje v to filtraci, zpracujeme 1 vzorek nejdéle za 15 min. Výsledky jsou srovnatelné pro různé koncentrace, jak na př. ukazuje tab. 1; k větším chybám dojde při práci s nepatrnými kvanty řas.

Nevýhodné je, že filtrace většího množství vody (1 až 2 l) trvá příliš dlouho (přes 1/2 hod.). Bylo by zapotřebí upravit nálévku tak, aby filtrace probíhala

Tabulka 1

Zhodnocení přesnosti metody „pískového filtru“ při analýze různě velkého vzorku čisté kultury *Euglena gracilis* Klebs. 10 ml acetonové extrakty měřeny na Pulfrichově fotometru ve filtru S61 při délce kyvety 5 cm, extinkce násobena 10^3 . Průměr (z 2—4 měření) je srovnáván T-testem s teoretickým průměrem, vypočteným podle extinkce největšího vzorku. Rozdíly mezi teoretickým a skutečným průměrem měření jsou neprůkazné

	10 ml vzorku	5 ml vzorku	2 ml	1 ml
1. jednotlivá měření	440 410 445 410	225 215 230 220	90 95	50 40
2. průměr měření	$428 \pm 3 \cdot 9,5$	$222 \pm 3 \cdot 3,22$	$92,5 \pm 3 \cdot 2,5$	$45 \pm 3 \cdot 5$
3. teoretický průměr	—	$214 \pm 3 \cdot 4,8$	$85,6 \pm 3 \cdot 1,9$	$42,8 \pm 3 \cdot 1$
4. testování průkaznosti rozdílu	—	$\bar{d} = 8$ $t_{(6)} = 1,38$ $P = 0,2$ neprůkazné	$\bar{d} = 6,9$ $t_{(4)} = 2,19$ $P < 0,1$ neprůkazné	$\bar{d} = 2,2$ $t_{(4)} = 0,43$ $P = 0,7$ neprůkazné

co nejrychleji a nebylo nutno vzorek přilévat. Dá se to řešit připojením válce k nálevce, spojením s nádobou se vzorkem (podobně jako u Sedgwick-Rafterova filtru), lepší konstrukcí nálevky a pod. S výhodou lze užít vzorků vody, předběžně zkoncentrované centrifugací (na př. z 2 l na 100 až 250 ml).

Přednosti doporučené metody, užívající filtrace přes písek, nejlépe vyniknou při srovnání tří různých postupů, které je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2

Srovnání účinnosti různých metod při stanovení chlorofylu v čisté kultuře *Chlorella vulgaris* var. *viridis* Chodata. 5 ml kultury (11,000 000 buněk v 1 ml) je různě zkoncentrováno a extrahováno:

1. Filtrováno přes sintr G4. 5 × (I.—V.) opakovan extrakční postup (při každém postupu se nechá protéci: 2 ml absolutního acetonu — 0,5 ml H₂O dest. — 3 × 2 ml 85% acetonu — 2 ml absolutního acetonu). Mezi jednotlivými extrakčními postupy byly sintry sušeny 1, 1, 2 a 9½ dne v exsikátoru ve tmě.

2. 3 dny na vzduchu sušené řasy na filtračním papíře extrahovány 50 hod. 85% acetone (a); zbytek na filtru rozetřen s pískem, extrakty spojeny, zahuštěny a znovu změřeno (b). Průměr ze 4 vzorků.

3. Filtrace přes pískový filtr — v textu popsán způsob.

Uvedeny hodnoty extinkce, násobené 10³, pro měření extraktu o objemu 10 ml v květech délky 5 cm na Pulfrichově fotometru s filtrem S 61.

1. Vzorky na sintrech — extrakce						2. Filtr. papír		3. Písek
I.	II.	III.	IV.	V.	Celkem I.—V.	a) 50 h.	b) 50 h. + rozetř.	
85	75	35	0	40	235	66	143	430
70	120	30	0	15	235			460

Jako rozpouštědlo se ve většině případů nejlépe osvědčil aceton, i když pro několik vzorků byly lepší výsledky při extrakci methanolem. Celkový výsledek stanovení závisí značně na čistotě rozpouštědel. V málo čistých rozpouštědlech, jako na př. v acetonu v originálním balení Spolku pro chemickou a hutní výrobu, n. p., Praha, značeném „purum“ (rok výroby asi 1954), se pigmenty velmi rychle rozkládaly, zvláště v prvních hodinách po extrakci. Nelze tedy užívat „commercial acetone of tech. grade“, jak se občas (14) doporučuje. Stačí však aceton jednou předestilovat: v takovém preparátu se po týdenní úschově ve tmě snížila extinkce roztoku pigmentů jen o asi 5 až 10 %. V literatuře často doporučené převedení barviv z polárních do nepolárních rozpouštědel, což má zabránit rozkladu pigmentů a odstranit hydrochromy, je pro běžnou práci (pokud nechceme barviva dělit nebo přesně měřit spektra) zbytečné. Manipulace s etherem je nepříjemná a převádíme-li barviva do benzínu nebo petroletheru, vznikne při seriové práci snadno emulze, jejíž extinkci nemůžeme správně odečíst. Kromě toho musíme užít pečlivě vyčištěného petroletheru, protože olefiny a další látky způsobují prudký rozklad barviv. Hydrochromy vadí při stanovení jen málokdy (nejsou rozpustné v acetonu).

Je samozřejmé, že při práci s pigmenty co nejvíce omezíme vliv světla, které je silně narušuje. Potřebujeme-li acetonové extrakty uschovat, dáme je do tmý v co nejmenších zkumavkách, opatřených parafinovanou korkovou zátkou.

Důležitou částí stanovení je jeho vyhodnocení. Stojíme před otázkou: máme stanovit všechny pigmenty nebo jen chlorofyly? Vzhledem k tomu, že podle známých výzkumů se karotenoidy a fykobiliny účastní fotosyntesy tím, že absorbují světelnou energii a předávají ji chlorofylu *a*, je otázkou diskuse, zda máme stanovit všechny pigmenty a hodnoty převést na nějaký společný jmenovatel „souboru pigmentů“ nebo stanovit pouze chlorofyly, čehož se zhusta užívá. U řas a sinic je problém komplikován tím, že různé systematické skupiny řas se značně liší kvantitativním i kvalitativním zastoupením pigmentů.

Možnost stanovit množství jednotlivých pigmentů, aniž bychom museli směs rozchromatografovat, což činí postup v hydrobiologické praxi nepoužitelným, nám dává pouze dobrý objektivní spektrofotometr (17, 19). V našich hydrobiologických ústavech jsou však pouze filtrové fotometry a kolorimetry. Há s k i n ů v pokus (10) stanovil všechny pigmenty měřením ve 4 filtrech P u l f r i c h o v a fotometru by bylo zapotřebí pečlivě vyzkoušet a odstranit některé jeho chyby. Dosud se při běžné práci stanovuje chlorofyl ($a + b$). Pro práci jsou méně výhodné fotometry s filtry, které dělí viditelné spektrum pouze na 3 oblasti. Užíval jsem výhodnějšího P u l f r i c h o v a fotometru, jehož filtry mají poměrně úzký rozsah propustnosti (do 50 $m\mu$). Měření s filtrem S 66, propouštějícím světlo vlnových délek okolo 660 $m\mu$, dává výsledky neúměrné koncentraci pigmentů a tloušťce květy. Je to asi způsobeno velkým rozdílem mezi tvarem absorpčního maxima chlorofylu *a* a propustností S 66; filtr také špatně zachycuje absorpci chlorofylu *b*. Lepší jsou filtry S 64 a S 61. S 61 má střed propustnosti 610 $m\mu$, dostaneme s ním výsledky úměrné koncentraci i při vyšším obsahu pigmentů v roztoku. Zachycuje hlavně první červené maximum chlorofylu *a* a minimum mezi 1. a 2. červeným maximem chlorofylu *b*. Při stanovení pigmentů ze sinic by mohl vadit modrý fykocyanin, jehož absorpční maximum je u 615 $m\mu$. Fykocyanin však patří mezi hydrofilní barviva, a jak ukázaly pokusy, extrahuje se organickými rozpouštědly s nízkým obsahem vody jenom ve stopách. Výhodnější než stanovit chlorofyl ($a + b$) měřením v jednom filtru by bylo odečíst extinkci extraktu v S 61 a v S 64 a z těchto hodnot vypočítat obsah chlorofylu *a* i *b*. Při přepočtech extinkce na váhová množství barviv se však setkáváme s různými nesnáze. Přepočtení je v podstatě jednoduché: nakalibrujeme užívaný měřicí přístroj podle čistých roztoků jednotlivých pigmentů, které jsme předem změřili na spektrofotometru. Podle molárních extinkčních koeficientů [viz (19), str. 147 až 149; (16)] pak vypočítáme množství barviv a sestrojíme kalibrační křivky. Obtíž je v tom, že kalibrovat musíme roztokem dokonale čistého chlorofylu. Nelze užít prodejních preparátů, což jsou vesměs směsi derivátů chlorofylu, lišící se spektrem i na př. chromatografickými vlastnostmi. Jediným zdrojem neporušených barviv mohou být extrakty z rostlin. Protože roztrpávání jednotlivých pigmentů mezi nemísitelnými rozpouštědly je nedokonalé, je k přípravě standardů třeba užít chromatografie. Jak ukázaly dosud nepublikované pokusy S. Č e r n é h o se sloupcovým dělením a naše společná práce s rozdělováním na papíře (21), je chromatografie rostlinných barviv (přes množství prací v literatuře) metodou dosud poměrně nespolehlivou, jejíž úspěšné

seriové provádění záleží na mnoha faktorech. Pro chromatografické oddělení a vyčištění standardů barviv by bylo třeba navrhnout přesně pracující normalisovanou metodu. — Přepočítávací hodnoty, platné pro jeden přístroj, nemohou platit pro jiný přístroj, mající filtry odlišných rozsahů. Nemůžeme proto užít i pečlivě vypočtených tabulek, které navrhuje G o d n e v (6, s. 141 až 146, 149 až 151). — Používání umělých barevných standardů a vizuální porovnávání roztoků ve zkumavkách je velmi nepřesné. Typické barevné křivky náhražkových roztoků, na př. H a r v e y o v a („Harvey Unit“ — 9, 23), se značně liší od průběhu extinkce roztoku pigmentů a lze jich užít nejlépe při práci s určitým druhem, případně skupinou řas. — Pro srovnávací hodnocení vzorků z různých lokalit, které hodnotíme na stejném přístroji, stačí ovšem porovnávat hodnoty extinkce roztoků pro týž filtr a stejnou délku kyvety. Nejlépe se mi osvědčilo srovnávat výsledky pro objem extraktu 10 ml v kyvetě délky 5 cm (pro běžná měření lze s výhodou užít úzkých kyvet, ve kterých můžeme měřit už 3 ml extraktu).

Stručné závěry

Sledoval jsem různé způsoby koncentrování planktonu a extrakce pigmentů. Zjistil jsem, že všechny metody, při kterých nerozrušíme buňky mechanickým způsobem, nedávají kvantitativní výsledky. Navrhl jsem metodu, ve které se řasy koncentrují filtraací přes písek, s nímž se rozetřou; extrahují se acetonem. Pigmenty je možno uchovávat a kolorimetricky měřit v 1 × destilovaném prodejném acetonu.

Závěrem děkuji svým učitelům, akademikům S. P r á t o v i a Dr I. Š e t l í k o v i, a dále doc. Dr J. H r b á č k o v i a všem dalším za cenné rady a pomoc při zpracování této práce.

Adresa autora: Z. Š e s t á k, Praha XI, Žerotínova 61. — Došlo 15. VIII. 1957.

Literatura

Uvádím pouze stručný seznam významných prací; podrobnější přehled literatury je v (20).

1. A r o n o f f, S.: The absorption spectra of chlorophyll and related compounds. *Chem. Revs.* 47: 175—195, 1950.
2. C r e i t z, G. I., R i c h a r d s, F. A.: The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. III. A note on the use of "Millipore" membrane filters in the estimation of plankton pigments. *J. marine Res.* 14: 211—216, 1955.
3. D i e t r i c h, B., S t e i n e c k e, H.: Die Bedeutung der Planktonkonzentration und deren quantitative Bestimmung in Oberflächengewässern. *Vom Wasser* 22: 72—89, 1955.
4. E y s t e r, H. C.: Permeability—a prime factor in extraction of chloroplast pigments. *Ohio J. Sci.* 50: 79—85, 1950.
5. G e s s n e r, F.: Der Chlorophyllgehalt der Seen als Ausdruck ihrer Produktivität. *Arch. f. Hydrobiol.* 40: 687—732, 1944.
6. G o d n e v, T. M.: Strojenje chlorofilla i metody jeho količestvennogo opredelenija. Minsk, 1952. 163 pp.
7. G o d n e v, T. N., K a l i š e v i č, S. V., Z a c h a r i č, G. F.: O soderžanii chlorofilla v presnovodnom planktone. *Doklady Akad. Nauk SSSR* 73: 1041—1044, 1950.
8. H a n d k e, H. H.: Hydrographische und biochemische Untersuchungen über die Plankton-Produktionskraft des Süßen Sees bei Halle. *Bot. Archiv* 42: 149—200, 1941.
9. H a r v e y, W.: Measurement of phytoplankton population. *J. Marine biol. Assoc. United Kingdom* 19: 761—773, 1934.
10. H a s k i n, H. H.: Determination of chloroplast pigments. *J. biol. Chem.* 144: 149—160, 1942.
11. K e t c h u m, B. H.: Plankton algae and their biological significance. In "Manual of phycology", edit. S m i t h. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., USA, 1951. Pp. 335—346.
12. K o Ź m i ŋ s k i, Z.: Amount and distribution of the chlorophyll in some lakes of Northeastern Wisconsin. *Trans. Wisconsin Acad. Sci., Arts and Lett.* 31: 411—438, 1938.
13. M y e r s, J., K r a t z, W. A.: Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. *J. gen. Physiol.* 39: 11—22, 1955.

14. Official methods of analysis of the Association of official agricultural chemists. Washington, 1950. 7th Edition. P. 112.
15. O s i p o v a, O.: Ob izvekaejemosti chlorofilla iz zelenych rastenij. Dokl. Akad. Nauk SSSR 57 : 799—801, 1947.
16. R a b i n o w i t c h, E.: Photosynthesis and related processes. Vol. I., II-part I. Interscience Publishers, New York, 1945, 1951.
17. R i c h a r d s, F. A., T h o m p s o n, T. G.: The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. Spectrophotometric method for estimation of plankton pigments. J. Marine Res. 11 : 156—172, 1952.
18. R u t t n e r, F.: Die Methoden der quantitativen Planktonforschung. Mikroskopie 3 : 39—51, 1948.
19. S m i t h, J. H. C., B e n i t e z, A.: Chlorophylls: Analysis in plant materials. In K. P e a c h, M. V. T r a c e y: Modern methods of plant analysis. Vol. IV, pp. 142—196. Springer, Berlin, 1955.
20. Š e s t á k, Z.: Stanovení obsahu organického uhlíku a chlorofylu ve vodách. Diplomová práce. Biologická fakulta University Karlovy, Ústav pro fyziologii rostlin. Praha, 1955.
21. Š e s t á k, Z.: K chromatografii plastidových pigmentů na papíře. Československá biologie 7 : 153—159, 1958.
22. T u c k e r, A.: The phytoplankton of the Bay of Quinte. Transactions of the Amer. microsc. Soc. 67 : 365—383, 1948.
23. T u c k e r, A.: Pigment extraction as a method of quantitative analysis of phytoplankton. Trans. Amer. microsc. Soc. 68 : 21—33, 1949.
24. U e h l i n g e r, V., C h o d a t, F.: Influence d'intensités lumineuses variées sur la croissance, le titre en chlorophylle et pouvoir photosynthétique d'une algue unicellulaire. Arch. des Sci. (Genève) 8 : 187—198, 1955.
25. W o l k e n, J. J., M e l l o n, A. D., G r e e n b l a t t, C. L.: Environmental factors affecting growth and chlorophyll synthesis in *Euglena*. I. Physical and chemical. II. The effectiveness of the spectrum for chlorophyll synthesis. J. Protozool. 2 : 89—96, 1955.

Зденек Шестак :

Количественное определение хлорофилла в водорослях

З а к л ю ч е н и е

Автор установил, что все методы определения хлорофилла в планктоне, при которых механически не разрушаются клетки водорослей, неудовлетворительны. Поэтому предлагается следующий прием: в малую воронку Бюхнера, укрепленную в колбе Бунзена (колба для фильтрации под разрежением), насыпается на фильтровальную бумагу 1—1,5 см слой растертого стекольного песка с маленькими зернами (приблизительный диаметр 12—25 μ), при пониженном давлении (водоструйный насос) песок промывается водой и пропитывается анализируемой пробой. Песок с планктоном высыпается в ступку, растирается приблизительно 3 минуты (пока он не приобретет равномерную зеленоватую окраску), пересыпается снова в воронку и экстрагируется ацетоном: прибавляют всегда от 4 до 6 мл растворителя и оставляют в течение 0,5—1 минуты экстрагировать: экстракт отсасывают в широкую пробирку, помещенную в колбе Бунзена, затем приливают следующую порцию ацетона и этот прием повторяют до тех пор, пока общий объем экстракта не достигнет 20 мл. Сначала (первая порция) для экстракции применяется ацетон безводный, затем 85%, наконец снова безводный. Экстракт фильтруется через стеклянный пористый фильтр № 4, затем дополняется до объема 20 мл и определяется его экстинкция, напр. на фотометре Пульфриха с фильтром S 61 (длина волны 590—630 μ).

Табл. 1: Оценка точности метода «песочного фильтра». Проведен анализ проб с разным количеством чистой культуры *Euglena gracilis* Klebs (1-ой столбец таблицы — проба с 10 мл культуры; 2-ой столбец — с 5 мл; 3-ий столбец — с 2 мл; 4-ой столбец — с 1 мл). Экстинкции (умноженные на 1000) ацетоновых экстрактов в объеме 10 мл определены на фотометре Пульфриха с фильтром № S 61, длина кюветы 5 см (1-ая гориз. графа таблицы). Средняя величина из 2 или 4 определений (2-ая гориз. графа) биометрически сравнивалась с теоретической средней, вычисленной по 10 мл-ой пробе (3-я гориз. графа). Различия между средними теоретическими и средними фактическими недостоверны (4-ая гориз. графа).

Табл. 2: Проверка эффективности различных методов. Определение хлорофилла в пробе с 5 мл чистой культуры водорослей *Chlorella vulgaris* var. *viridis* Chod at (11,000,000 клеток в 1 мл пробы). Выражено в экстинкциях (умноженных на 1000) 10 мл ацетонового экстракта, измеренного в кювете длиной в 5 см на фотометре Пульфриха с фильтром № S 61.

Методы:

1. Фильтрация стеклянным пористым фильтром G 4; экстракции были проведены с 5-кратной повторностью (I—V) (при каждом приеме через фильтр протекает постепенно: 2 мл безводного ацетона, затем 0,5 мл дест. воды — затем 3 раза по 2 мл 85% ацетона, наконец 2 мл безводного ацетона). Между отдельными экстракциями стеклянные фильтры сушились в эксикаторе в темноте (1, 1, 2 и 9 суток).

2. Фильтровальная бумага с пробой водорослей сушилась 3 суток на воздухе, затем экстрагировалась 50 часов 85% ацетоном (столбец таблицы — а); фильтровальная бумага с остатком водорослей растерта с песком и снова экстрагирована, экстракт соединен с экстрактом — а, смесь экстрактов сгущена до объема 10 мл и измерена (столбец — в). Средние из 4-ех проб.

3. Фильтрация через песочный фильтр — метод описан в русском заключении.

Zdeněk Š e s t á k:

Quantitative determination of chlorophyll in the algae

It has been revealed by comparative tests that the chlorophyll extraction from the algae constituting phytoplankton cannot be complete enough unless the cell walls are mechanically destroyed. To reach this aim several methods were tried and the following finally adopted: In a small Büchner funnel, of approximately 5 cm diameter, a layer of 1 to 1,5 cm. quartz sand is placed on filter paper. The diameter of the sand particles should not exceed 100 μ ; mean grain size of 12 to 25 μ was found quite convenient. Suction is then applied, the sand is washed with distilled water at first and thereafter the sample is filtered through it. The sand is put into a mortar and the material thoroughly grinded (for approximately 3 minutes). The extraction is performed on a Büchner funnel too, by adding 4—6 ml. portions of dry acetone, 1 to 3 times 85% acetone-water mixture and dry acetone successively. Each portion is allowed to penetrate the sand slowly for about 1 minute and then it is sucked off. The parts of the extract are collected in a large test tube, filtered through sintered glass filter (Schott, Jena, G 4), the volume of the filtrate adjusted to 20 ml. with dry acetone and the optical density of the final solution is measured using Zeiss' Pulfrich photometer with the filter S 61 (corresponds to wave length cca 590—630 $m\mu$).

Table 1. Proof of accuracy of the "sand-filter method". Different volumes (10 ml.—5 ml.—2 ml.—1 ml.) of a pure culture of *Euglena gracilis* Klebs were extracted with acetone. Extracts of 10 ml. volume were measured using Pulfrich photometer with the filter S 61 and a 5 cm. cuvette. The extinction data obtained have been multiplied by 1000. The average values (2nd line of the table) obtained from 2 to 4 measurements (1st line of the table) have been compared with the theoretical average (3rd line of the table), ruled out of the extinction obtained with the 10 ml. sample of the *Euglena*-culture. The t-test has been applied to show that these differences were insignificant.

Table 2. Efficiency of various methods of chlorophyll determination in a pure culture of *Chlorella vulgaris* var. *viridis* Chod at. A sample of 5 ml. volume ($11 \cdot 10^6$ cells in 1 ml.) was concentrated and extracted as follows:

1. Filtered through the sinter G 4. The extraction process (2 ml. absolute acetone, 0,5 ml. H_2O dest., 3×2 ml. 85% acetone, 2 ml. absolute acetone, were used successively) was repeated five times (I.—V.) with the same sample. After each extraction process performed the sinters were dried out in a dessicator in darkness (for 1, 1, 2 and $9\frac{1}{2}$ days).

2. The algae on a filter paper after three days air-drying were extracted for 50 hours with 85% acetone (a); the rest on the filter was grinded with sand and extracted again. Both extracts were mixed together, concentrated and measured (b). Average values of 4 samples measured are presented.

3. Filtration through the sand filter. The method has been described in the English summary.

Extinction data multiplied by 1000 are presented. Extracts of 10 ml. volume were measured using the Pulfrich photometer with the filter S 61 and a 5 cm. cuvette.