

ZASTOSOWANIE METODY LUMINESCENCYJNEJ DO OZNACZANIA CHLOROFILU *a* W FITOPLANKTONIE

Antoni Murkowski, Zdzisław Prokowski

Zakład Fizyki, Instytut Inżynierii Rolniczej, Akademia Rolnicza
ul. Papieża Pawła VI Nr 3, 71-459 Szczecin
e-mail: fizyka@agro.ar.szczecin.pl

Streszczenie. W pracy omówiono rolę fitoplanktonu w ekosystemach wodnych oraz zagrożenia, jakie może stworzyć eutrofizacja zbiorników wodnych wykorzystywanych do celów komunalnych i rolniczych. Przedstawiono zestaw pomiarowy oraz metodę luminescencyjnego określania zawartości chlorofilu *a* w fotosyntetycznie aktywnym fitoplanktonie. Porównano metodę luminescencyjną z ogólnie stosowaną metodą spektrofotometrycznego określania zawartości chlorofilu *a*.

Słowa kluczowe: chlorofil *a*, fitoplankton, eutrofizacja, opóźniona luminescencja

Polska posiada niewielkie zasoby wodne, a 1600 m³ wody przypadających w ciągu roku na jednego mieszkańca, stawia nasz kraj na 23 miejscu w Europie. Niewielka jest także możliwość magazynowania wód odpływowych (ok. 2,5 km³) w naturalnych i sztucznych zbiornikach, co jest przyczyną wzrastającego deficytu wody pitnej [22]. Tę trudną sytuację pogarsza brak wystarczającej ilości oczyszczalni ścieków, co przyczynia się do znacznego wzrostu wód o pozaklasowym stopniu zanieczyszczenia i nieomal podwojeniu (w ubiegłej dekadzie) ilości biogenów wprowadzanych przez polskie rzeki do Bałtyku. Podobna sytuacja dotyczy stanu czystości naturalnych zbiorników wody i malejącej liczbie jezior posiadających pierwszą i drugą klasę czystości [14]. Biogenne związki, szczególnie azotu i fosforu, dopływające w dużych ilościach do tych zbiorników mogą spowodować nadmierne użyznienie wód (eutrofizację) sprzyjając bujnemu rozwojowi fitoplanktonu.

Fitoplankton tworzą liczne gatunki jednokomórkowych organizmów fotosyntetyzujących, zarówno eukarionty (zielenice, okrzemki i inne glony) jak i bez-

jądrowe cyjanobakterie nazywane sinicami. Fitoplankton jest pierwszym ogniwem łańcucha troficznego w ekosystemach wodnych i warunkuje istnienie innych żywych organizmów. W przypadku nadmiernego użyżnienia zbiorników wodnych (np. ściekami komunalnymi lub gospodarczymi, spływami nadmiaru nawozów) może nastąpić gwałtowny wzrost liczebności fitoplanktonu, nazywany zakwitem, za którym nie nadąża wzrost liczby jego głównych konsumentów, czyli zooplanktonu. Nadmiar nie skonsumowanej biomasy obumarłych organizmów ulega rozkładowi mikrobiologicznemu, co powoduje znaczne zużycie rozpuszczonego w wodzie tlenu i zanik roślinności zwierząt, a po jego zużyciu zaczynają dominować beztlenowe procesy rozkładu, w wyniku których wydzielają się bardzo toksyczny siarkowodor [13]. Szczególnie niebezpieczne są zakwity spowodowane przez sinice, co w porze letniej zdarza się coraz częściej w wodach śródlądowych i przybrzeżnych obszarach Bałtyku. Prawie wszystkie gatunki sinic zdolne są do wytwarzania toksyn, z których dla ludzi i zwierząt szczególnie niebezpieczne są neurotoksyny, które mogą doprowadzić do paraliżu mięśni oddechowych oraz hepatotoksyny niszczące komórki wątroby [7,35].

Ograniczanie populacji glonów i sinic poprzez ich niszczenie środkami chemicznymi (np. siarczanem miedzi) jest ryzykowne, bowiem może doprowadzić do uwolnienia dużych ilości toksyn oraz biogenów z martwych komórek. Bardziej celowe jest ograniczanie ilości fitoplanktonu poprzez rygorystyczną kontrolę dopływu do zbiorników biogenów (szczególnie związków fosforu) i działania biomanipulacyjne polegające na pośredniej kontroli wodnego ekosystemu, np. poprzez wprowadzanie odpowiednich gatunków ryb oraz eliminowanie innych, w celu utrzymania odpowiednio licznej populacji zooplanktonu żywiącego się fitoplanktonem [13]. W uzasadnionych przypadkach można przeciwdziałać zakwitom glonów przez rozpylenie na powierzchni zbiornika herbicydów z grupy inhibitorów fotosyntezy np. mało toksyczne dla ludzi (także dla ryb i zooplanktonu) pochodne mocznika. Preparaty te, już w koncentracji $0,1 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ hamują fotofosforylację niecykliczną uniemożliwiając wzrost organizmów fotosyntetyzujących [6].

W optymalnej temperaturze i napromieniowaniu w zakresie fotosyntetycznym (PAR), dostępności koniecznych makro- i mikroelementów (we właściwych stężeniach) oraz braku fitotoksyn w środowisku wodnym, wzrost fitoplanktonu ma charakter wykładniczy. Wzrasta wówczas zarówno jego liczebność, jak również biomasa, ilość zsyntetyzowanego chlorofilu *a*, ATP itp. [13,31]. Jeżeli, któryś z wymienionych na wstępie warunków nie jest spełniony, to wzrost populacji nabiera charakteru stacjonarnego, a nawet można zarejestrować powolne zmniejszanie się biomasy glonów. Stacjonarną fazę wzrostu charakteryzuje potencjał troficzny, czyli

maksymalna biomasa glonów i sinic, która może być wyprodukowana w optymalnych warunkach w jednostce objętości [1]. Wykładniczą fazę wzrostu określa tzw. specyficzny współczynnik wzrostu (k), który w praktyce określa się z zależności:

$$k = \ln 2/T$$

gdzie: T to czas podwojenia biomasy fitoplanktonu [31].

Nie udało się dotąd opracować w pełni zadowalających metod, które pozwalałyby z danych chemicznych dokładnie wyznaczać powyższe współczynniki oraz prognozować zmiany koncentracji fitoplanktonu, szczególnie w wodach zanieczyszczonych. W celu oceny potencjału troficznego, określoną objętość badanej wody pozbawia się naturalnego planktonu i zaszczenia standardową monokulturą glonów (np. rodzaju. *Scenedesmus*). Następnie w optymalnych warunkach temperatury i oświetlenia prowadzi się ich hodowlę, rejestrując w ustalonych odstępach czasu ilość komórek glonów lub ich biomasę oszacowaną z pomiarów zawartości chlorofilu a [1,36].

Przeciwnym problemem do wzrostu trofii są skutki wprowadzania do rzek i zbiorników wodnych zanieczyszczeń toksycznych dla fitoplanktonu i zaburzenia tym samym funkcjonowania całego łańcucha troficznego w ekosystemach wodnych. W roku 1989 Międzynarodowa Organizacja d/s Standaryzacji (ISO) opracowała test glonowy do oznaczania stopnia toksyczności zanieczyszczeń środowiska wodnego. Test ten jest zalecany przez OECD, a w państwach UE wymagane jest testowanie przy jego pomocy wszystkich nowych związków chemicznych produkowanych w ilości ponad 100 ton/rok. Organizmami wskaźnikowymi są glony należące do dwóch szczepów zielenic. Czas trwania testu wynosi 3 lub 4 doby, a pomiar liczebności komórek glonów przeprowadzany jest po upływie każdej doby. Wyznaczany jest parametr EC_{50} , określający stężenie substancji powodujące (po określonym czasie hodowli) 50% zahamowanie wzrostu populacji glonów oraz parametr toksykologiczny NOEC, wskazujący najwyższe stężenie testowanej substancji, przy którym nie następuje statystycznie istotne spowolnienie wzrostu wskaźnikowej populacji glonów [4].

Z powyższego przeglądu wynika, że pożądana jest metoda umożliwiająca ciągle monitorowanie koncentracji fitoplanktonu oraz prognozowanie eutrofizacji, zwłaszcza w zbiornikach wodnych, które dostarczają wodę pitną lub wykorzystywaną gospodarczo. Ważną rolę w ocenie jakości wód powierzchniowych i ich przydatności do celów komunalnych lub rybackich mogą spełniać testy glonowe. Szczególnie przydatne są testy pozwalające określać zawartość chlorofilu a (**Chl a**) w badanej objętości wody i na tej podstawie oszacować biomasę fitoplanktonu.

Stosowana dotąd metoda standardowa jest pracochłonna, a szczególnie kłopotliwą czynnością jest odfiltrowanie fitoplanktonu (rozmiary komórek rzędu 1-100 μm) z próbek wody o objętości od 0,5 dm³ do 3 dm³. Podobnego rzędu wielkości jak komórki, są drobne zanieczyszczenia, które skutecznie zatykają pory filtrów, na których osadzany jest fitoplankton. Filtry wraz z osadzonym fitoplanktonem należy następnie rozetrzeć, a chlorofil wyekstrahować przy użyciu acetonu i DMSO (sulfotlenku dwumetylu). Stężenie chlorofilu oznacza się spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie [11].

Ze względu na czasochłonność i zużycie znacznych ilości rozpuszczalników, wyznaczanie biomasy fitoplanktonu zgodnie z opisaną metodą nie jest wystarczająco często stosowane. Wynikła stąd potrzeba opracowanie szybkich i dokładnych metod pomiaru zawartości chlorofilu, co ułatwiłoby kontrolę jakości wód powierzchniowych oraz pozwoliło na ocenę dynamiki zmian zachodzących w ekosystemach wodnych zagrożonych eutrofizacją. Taką szansę dostrzeżono w metodach wykorzystujących fluorescencję chlorofilu [5,9]. Wadą tych metod jest uzależnienie rezultatów pomiarów od składu gatunkowego fitoplanktonu oraz warunków jego rozwoju, co wymaga częstej kalibracji aparatury i korekty uzyskiwanych wyników [23,32]. Mniej wrażliwe na wymienione okoliczności, a tym samym konkurencyjnymi względem dotychczas stosowanych, są metody wykorzystujące opóźnioną luminescencję chlorofilu [15,16,38]. Wartą omówienia jest zwłaszcza metoda luminescencyjna, w której jako nośnika informacji wykorzystano składową sekundową opóźnionej luminescencji chlorofilu, która jest wyznaczana po dodaniu inhibitora fotosyntezy oddzielającego funkcjonalnie PS II od PS I w komórkach badanego fitoplanktonu [17,18,23,24].

Zjawisko luminescencji chlorofilu *in vivo*

W procesie fotosyntezy część zaabsorbowanej energii PAR jest tracona na luminescencję, którą ze względu na mechanizmy emisji można podzielić na fluorescencję chlorofilu - **FLC** oraz opóźnioną luminescencję chlorofilu - **OLC**. Po zaprzestaniu napromieniowania organizmów fotosyntetyzujących następuje szybki (10^{-9} s) zanik FLC i znacznie wolniejszy, kilkufazowy zanik OLC, którą można rejestrować przez kilka minut [8,12]. Emisja FLC jest przejawem strat zaabsorbowanej energii fotonów PAR przez zespoły barwników fotosyntetycznych (anteny energetyczne) na wstępnym etapie fotosyntezy. Energia fotonu zaabsorbowanego przez cząsteczkę barwnika przekształca się w energię ekscytonu, który ma zdolność przemieszczania się w obrębie anteny zawierającej kilkaset cząsteczek: chlorofilu *a*

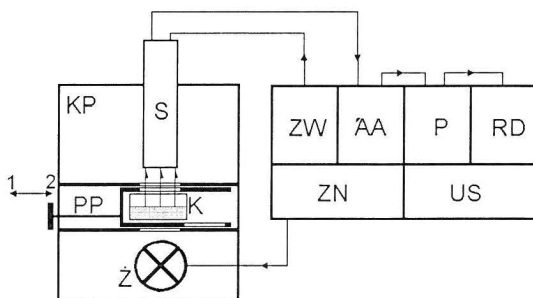
i *b* oraz barwników pomocniczych np. fikocyjaniny, fikoerytryny, karotenoidów i in. Ekscyton może zaniknąć poprzez dezaktywację promienistą, wypromieniowując foton FLC ($\lambda_{\max} = 685 \text{ nm}$), bądź też na drodze oddziaływań termicznych z cząsteczkami w antenie energetycznej. Jeżeli ekscyton migrujący w kompleksie antenowym w czasie swojego życia (kilku ns) zdąży osiągnąć centrum fotosystemu II (PS II), to nastąpi wzbudzenie P 680 i zostanie zainicjowany, fotochemiczny etap fotosyntezy [21]. Centrum stanowi cząsteczka chlorofilu P 680 o obniżonej energii wzbudzenia (absorpcja dla $\lambda_{\max} = 680 \text{ nm}$). Ilość traconej energii podczas fotosyntezy w postaci FLC nie jest duża (od 0,5% do 5%), ale posiada ważne znaczenie informacyjne. Przy sprawnym przebiegu fotosyntezy natężenie FLC jest małe, natomiast wszelkie zakłócenia tych reakcji wywołują charakterystyczny jej wzrost [2,21,34].

Zjawisko OLC związane jest z niedoskonałością procesu przetwarzania energii wzbudzonych elektronów na energię chemiczną w PS II. Źródłem emisji dwóch głównych składowych OLC, które różnią się czasami półzaniku (0,5 s dla składowej sekundowej i 12 s dla składowej dekasekundowej) są reakcje rekombinacji promienistej ($\lambda_{\max} = 685 \text{ nm}$) wzbudzonych elektronów z dodatnimi ładunkami w układzie rozkładu wody [12,33]. W pierwszym przypadku elektron znajdował się na pierwszym stabilnym akceptorze Q_A , a w drugim przypadku na wtórnym akceptorze Q_B [12,33]. W odróżnieniu od FLC, emisja OLC może nastąpić jedynie z chlorofilu funkcjonującego w PS II roślin, glonów lub sinic. W zależności od zastosowanej metody pomiarowej (np. analiza krzywej zaniku OLC, pomiar natężenia jej składowych, wyznaczanie widma wzbudzenia), można uzyskiwać szereg cennych informacji o ilości chlorofilu w antenach energetycznych, sprawności transportu elektronów w fotosystemach oraz o wpływie czynników stresowych na organizmy fotosyntetyzujące [3,10,19,20,37].

ZASTOSOWANIE POMIARU OPÓŹNIONEJ LUMINESCENCJI CHLOROFILU DO OKREŚLANIA JEGO ZAWARTOŚCI W FITOPLANKTONIE

Zawiesinę fitoplanktonu przed pomiarem OLC należy przez kilka minut inkubować w ustalonej temperaturze i przy umiarkowanym napromieniowaniu PAR. Liczba fotonów OLC, zarejestrowanych przez fotodetektor w ustalonym przedziale czasu [IOLC], będzie proporcjonalna do zawartości Chl *a* w badanej próbce [23]. Przeprowadzone badania w celu zoptymalizowania warunków pomiaru wykazały, że współczynnik korelacji pomiędzy IOLC i Chl *a* zwiększa się po dodaniu do badanej próbki wody bardzo małych (rzędu mikromola) ilości inhibitora fotosyntezy

np. diuronu lub innego herbicydu mocznikowego [24]. Inhibitory fotosyntezy przerywając transport fotowzbudzonych elektronów odłączają funkcjonalnie PS II od PS I [6,21]. W ten sposób czynniki zewnętrzne zakłócające reakcje fotosyntezy, a także różnice w składzie gatunkowym i warunkach środowiskowych, mają znacznie mniejszy wpływ na emisję OLC. Przyczyniło się to zwiększenia współczynnika korelacji ($R > 0,995$, przy $P < 0,001$) dla zależności liniowej pomiędzy IOLC i Chl *a* [17,24]. Poniżej przedstawiono prototypowy zestaw i stosowaną metodę pomiaru Chl *a* w komórkach naturalnego fitoplanktonu znajdującego się w próbkach wód powierzchniowych.



Rys. 1. Blokowy schemat zestawu do pomiaru opóźnionej luminescencji fitoplanktonu: **KP** – kamera pomiarowa, **S** – sonda pomiarowa z fotopowielaczem, **PP** – podwójna przesłona (w położeniu „2”), **K** – szklana kuweta z zawiesiną badanego fitoplanktonu, **Ż** – żarówka projekcyjna do napromieniowania fitoplanktonu (gdy **PP** jest w pozycji „1”), **ZW** – zasilacz wysokiego napięcia, **AA** – analizator amplitudy i wzmacniacz impulsowy, **P** – przelicznik, **RD** – rejestrator drukujący, **ZN** – zasilacz niskiego napięcia, **US** – sterownik pomiaru

Fig. 1. Block diagram of the set for measurements of delayed luminescence of phytoplankton: **KP** – lightproof measuring camera, **S** – probe equipped with photomultiplier, **PP** – double diaphragm (in position “2”), **K** – glass cuvette with phytoplankton suspension, **Ż** – lamp for photoexcitation of samples with phytoplankton suspension, (when **PP** is in position “1”), **ZW** – high voltage power supply, **AA** – pulse amplifier, **P** – counter, **RD** – printer, **ZN** – low voltage power supply, **US** – measurement cycle programming

Luminescencyjna metoda pomiaru zawartości Chl *a* w naturalnym fitoplanktonie

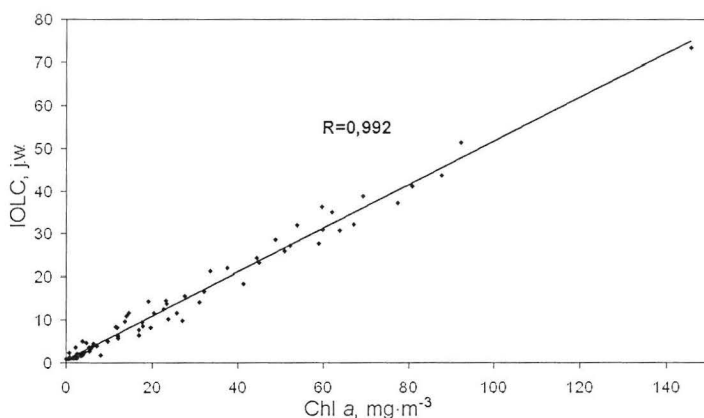
- Do szklanych krystalizatorek **[K]** nalewa się po 25 ml badanej wody z zawiesiną fitoplanktonu i dodaje po 5 ml roztworu diuronu o stężeniu $2 \cdot 10^{-5}$ M.
- K** umieszcza się na 10 min. w komorze inkubacyjnej – temperatura 25°C, światło białe o natężeniu $1 \mu\text{mol}(\text{PAR}) \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (natężenie oświetlenia ok. 50 lx).
- Po inkubacji **K** umieszcza się w kamerze pomiarowej **[KP]** - jak na rysunku 1 (podwójna przesłona **PP** w pozycji „1” zasłania sondę **S** i odsłania żarówkę **Ż**).

- D. Zostaje uruchomiony program pomiarowy z **US**: {1} – na 4 s zostaje podane napięcie z zasilacza **ZN**, na **Ż** (następuje fotowzbudzenie Chl *a* w komórkach fitoplanktonu), {2} – 1 s przerwy i przesunięcie **PP** w pozycję „2”, {3} – pomiar OLC przez 1 s, {4} – rejestracja wyniku z **P** przez **RD**.

Przed rozpoczęciem nowej serii pomiarowej należy wykonać pomiar tzw. *tła*, na które składa się prąd ciemny fotopowielacza, emisja z wnętrza kamery i od zanieczyszczeń w wodzie. W tym celu należy wykonać dodatkowy pomiar wg. powyższej procedury wlewając do krystalizatora 25 ml wody z martwym fitoplanktonem (np. zabitym termicznie po 2 min. kąpieli w łaźni wodnej).

WYNIKI I DYSKUSJA

Przy pomocy opisanej metody mierzono IOLC mikroglonów należących do różnych gatunków, które hodowano w warunkach laboratoryjnych oraz wykonywano pomiary IOLC naturalnego fitoplanktonu pobieranego z wód powierzchniowych jeziora Miedwie, będącego głównym zbiornikiem wody pitnej dla mieszkańców Szczecina. W celu weryfikacji opracowywanej metody luminescencyjnej oraz wyznaczenia współczynnika przeliczeniowego, wraz z pomiarami IOLC, wykonywano pomiary zawartości Chl *a* zgodnie z metodą standardową [11,24]. Uzyskane zależności przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Zależność natężenia opóźnionej luminescencji od zawartości chlorofilu *a* wyznaczona dla naturalnego fitoplanktonu w jeziorze Miedwie/k. Szczecina. Opis w tekście

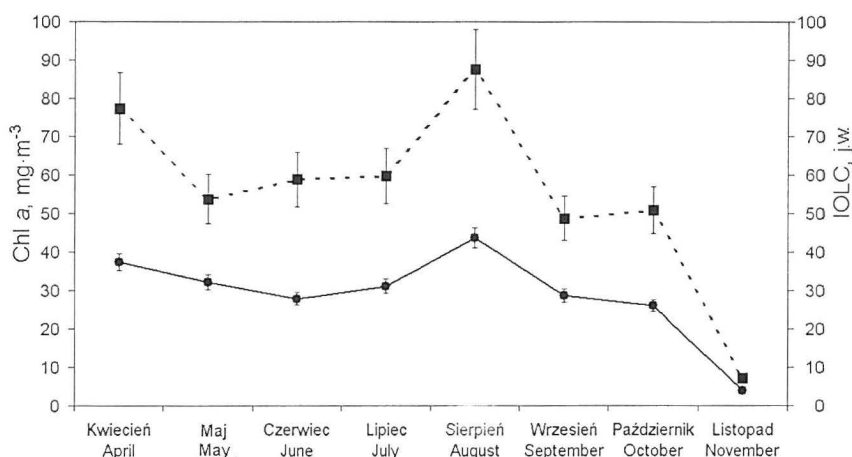
Fig. 2. Relationship between delayed luminescence intensity and chlorophyll *a* concentration in natural phytoplankton in lake Miedwie near Szczecin. Description in text

Dla IOLC, za jednostkę względną (j.w.) przyjęto 1000 zarejestrowanych impulsów. Koncentrację chlorofilu *a* w 1 m³ wody (C) można wyliczyć z zależności:

$$C = N \cdot K [\mu\text{g Chl } a \cdot \text{m}^{-3}]$$

gdzie: N – liczba impulsów (po odjęciu imp. tła) zarejestrowanych w czasie 1 s pomiaru IOLC, a współczynnik $K = 2,0 [\mu\text{g Chl } a \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{imp}^{-1}]$.

Znając zawartość Chl *a* w fotosyntetycznie aktywnych komórkach można oszacować ich biomasy [15]. Na rysunku 3 przedstawiono zmiany koncentracji Chl *a*, związane ze sezonowymi zmianami liczebności fitoplanktonu naturalnego w jeziorze Miedwie. Pomiary wykonano przy użyciu opisanej wyżej metody luminescencyjnej (linia ciągła) oraz posługując się metodą standardową ze spektrofotometrycznym oznaczeniem Chl *a* wg metody Jeffrey i Humphrey (linia przerywana) [11]. Wszystkie pomiary wykonywano w 5 powtórzeniach i obliczono średnie błędy kwadratowe. Średnie arytmetyczne wyników pomiarów oraz błędy zaznaczono na wykresach.



Rys. 3. Sezonowy przebieg zmian chlorofilu *a* w zawiesinie naturalnego fitoplanktonu jeziora Miedwie k/Szczecina. Linia przerywana – metoda standardowa; linia ciągła – metoda luminescencyjna. Szczegóły w tekście

Fig. 3. Seasonal changes in chlorophyll *a* content in suspension of natural phytoplankton of lake Miedwie near Szczecin. Dotted line – standard method; solid line – luminescence method. Description in text

Ze względu na swoje zalety i specyficzne wymagania związane z badaniami fitoplanktonu metody wykorzystujące OLC mogą także znaleźć szerokie zastosowanie w hydrobiologii do określania składu taksonomicznego populacji glonów oraz przy szacowaniu produktywności pierwotnej ekosystemów wodnych [15,16,24,26,38].

Testy glonowe, w których wykorzystywane jest zjawisko luminescencji chlorofilu (FLC lub OLC) mogą być bardzo przydatne w badaniach ekofizjologicznych, przy ocenie jakości wód śródlądowych i morskich oraz w monitoringu ekologicznym [5,15,16,18,24,27,28]. Dalszym rozwinięciem przedstawionej metody luminescencyjnej jest metoda, w której wykorzystano ciągłą rejestrację IOLC do badania fitoplanktonu zarówno w wodach śródlądowych jak i morskich. Założenia metodyczne oraz rozwiązania techniczne znajdują się w pracach Prokowskiego [25,29,30]. Ciągła rejestracja IOLC i zautomatyzowana ocena zmian biomasy fitoplanktonu może w znacznym stopniu ułatwić badania hydrobiologiczne *in situ*, usprawnić kontrolę jakości wód powierzchniowych oraz prognozowanie ich eutrofizacji.

Tabela 1. Porównanie dwóch metod oceny zawartości chlorofilu *a*

Table 1. Comparison of two methods of chlorophyll *a* estimation

Cechy metod Parameters of methods	Metoda oceny zawartości chlorofilu <i>a</i> Method of chlorophyll <i>a</i> estimation	
	standardowa standard	luminescencyjna luminescence
Objętość próbki – Sample volume	500-2000 ml	10-25 ml
Czułość metody – Method sensitivity	5 mg Chl <i>a</i> · m ⁻³	0,2 mg Chl <i>a</i> · m ⁻³
Czas oznaczenia Chl <i>a</i> w 30 próbkach Time of Chl <i>a</i> analysis in 30 samples	6 godzin	20 minut
Zużycie odczynników dla 30 próbek Amount of reagents used in 30 samples	300 ml acetonu i 15 ml DMSO	0,6 mg diuronu
Niezbędna aparatura Required apparatus	spektrofotometr spectrophotometer	luminometr luminometer

PODSUMOWANIE

1. Stwierdzono wysoce istotną korelację pomiędzy natężeniem opóźnionej luminescencji chlorofilu *a* (pomiar składowej sekundowej) i koncentracją chlorofilu *a* określoną spektrofotometrycznie, przy użyciu metody standardowej.

2. Przedstawiona luminescencyjna metoda określania zawartości chlorofilu *a* w aktywnym fotosyntetycznie fitoplanktonie posiada szereg istotnych zalet i jest konkurencyjna, zarówno w stosunku do metody standardowej jak i do innych metod wykorzystujących fluorescencję chlorofilu.

3. Wielomiesięczne pomiary (metodą standardową i luminescencyjną) zawartości chlorofilu *a* w zawiesinie fitoplanktonu znajdującego się w próbkach wody jeziornej wykazały zbieżne zmiany jego koncentracji spowodowane sezonowymi zmianami w liczebności naturalnych populacji glonów.

4. Opracowana luminescencyjna metoda określania zawartości chlorofilu *a* w wodach zawierających fitoplankton, w porównaniu z metodą standardową (tab.1):

- a) wymaga ok. 50 – krotnie mniejszych próbek badanej wody,
- b) jest ok. 25 – krotnie czulsza,
- c) jest ok. 18 – krotnie mniej czasochłonna,
- d) nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych, a koszt stosowanego inhibitora fotosyntezy (np. diuronu) jest pomijalnie mały.

PIŚMIENNICTWO

1. **Bednarz T.:** Oznaczanie potencjału troficznego wód metodą testów glonowych. Wiad. Bot. 28, 201-210, 1984.
2. **Bolh r-Nordenkamp H. R.,  quist G.:** Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual. (Eds. Hall D. O. et al.) Chapman & Hall, London, (12), 193-206, 1993.
3. **Brzostowicz A.:** Luminescencja w procesie fotosyntezy. Acta Agrophysica, 45, 31-42, 2001.
4. **Burkiewicz K.:** Algal growth inhibition test for aquatic toxicity assessment. W: Ekofizjologiczne aspekty reakcji ro lin na dzia anie abiotycznych czynnik w stresowych. Praca zbiorowa pod red. S. Grzesiaka i in., Zak . Fizjol. Ro lin, PAN, Krak w, 126-127, 1998.
5. **Demers S., Therriault J. C., Legendre L. Neveux J.:** An *in vivo* fluorescence method for the continuous *in situ* estimation of phytoplankton photosynthetic characteristics. Mar. Ecol. Prog., Ser. 27, 21-27, 1985.
6. **Devine M., Duke S. O., Fedtke C.:** Physiology of herbicide action. PTR Prentice Hall Englewood Cliffs, New Jersey, 1993.
7. **Dolowy K.:** Zagro enia dla zdrowia ludzi i zwierz t powodowane przez cyjanobakterie. W: Agrofizyka na pocz tku XXI wieku. Praca zbiorowa pod red. B. Dobrza skiego jr., S. Nawrockiego, S. Grundasa, Wyd.Nauk. FRNA, 3, 85-86, 2001.
8. **Govindjee, Satoh K.:** Fluorescence properties of chlorophyll b- and chlorophyll c- containing algae. In: Light emission by plants and bacteria Ed.: Govindjee, J. Ames, D.C. Fork. Academic Press, Orlando, 497-537, 1986.
9. **Heaney S. I.:** Some observations on use of the *in vivo* fluorescence to determine chlorophyll-*a* in natural populations and cultures of freshwater phytoplankton. Freshwater Biol., 8, 115-126, 1978.
10. **Hideg E., Demeter S.:** Effect of pH on the slow phase components of delayed luminescence in chloroplasts. Z. Naturforsch., 42c, 1121-1125, 1987.
11. **Jeffrey S.W., Humphrey G.F.:** New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 191-194, 1975.
12. **Jursinic P.A.:** Delayed fluorescence: current concepts and status. In: Light emission by plants and bacteria. Ed.: Govindjee, J. Ames, D.C. Fork. Academic Press, Orlando, 291-328, 1986.
13. **Kajak Z.:** Eutrofizacja. W: Hydrobiologia-limnologia. PWN, Warszawa, 237-274, 1998.

14. **Kozłowski S.:** Zanieczyszczenie wód. W: Ekorozwój – wyzwanie XXI wieku. PWN, Warszawa, 27-30, 2002.
15. **Krause H., Helml M., Gerhardt V., Gerhardt W.:** *In vivo* measurements of photosynthetically active pigment systems in fresh waters using delayed luminescence. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 16, 47-54, 1982.
16. **Krause H., Gerhardt V.:** Application of delayed luminescence in limnology and oceanography. J. Lumines., 31/32, 888-891, 1984.
17. **Murkowski A., Prokowski Z.:** Opis patentowy, nr 132607, PL. Zgłosz. P. 239757 z 23.12.1982. Opubl. 31.10.1987. Sposób pomiaru koncentracji biomasy fitoplanktonu, Akademia Rolnicza, Szczecin, PL, 1987.
18. **Murkowski A., Prokowski Z.:** Ocena biomasy fitoplanktonu przy użyciu metody luminescencyjnej. Jeziora lobeliowe. Charakterystyka, funkcjonowanie i ochrona. Idee Ekol. T.6., ser. Szkice 4, cz. I, 167-172, 1994.
19. **Murkowski A.:** Luminescence assay for determination of triazine resistance of rape plants. Proc. 2nd Inter. Weed Control Congress, 2, 541-545, 1996.
20. **Murkowski A., Skórska E.:** Chlorophyll *a* luminescence an index of photoinhibition damages. Curr. Top. Biophys., 21(1), 72-78, 1997.
21. **Murkowski A.:** Biofizyczne aspekty procesu fotosyntezy i luminescencja chlorofilu. W: Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych. Acta Agrophysica, 61, 9-23, 2002.
22. **Nowicki M.:** Ochrona wód. W: Strategia ekorozwoju Polski. ARW, Warszawa, 117-127, 1993.
23. **Prokowski Z., Brzóstowicz A., Grabikowski E., Murkowski A.:** Wykorzystanie detekcji luminescencji aparatu fotosyntetycznego do określania zawartości chlorofilu *a* w fitoplanktonie. Studia i Mater. Oceanol., 49 (Fizyka Morza 4), 77-90, 1985.
24. **Prokowski Z.:** Wykorzystanie opóźnionej luminescencji w zakresie sekundowym do określania wybranych parametrów fitoplanktonu. Praca doktorska, AR, Szczecin, 1986.
25. **Prokowski Z.:** The use of the delayed luminescence for the continuous estimation of chlorophyll *a* concentration in phytoplankton. 4th International Conference Physical Properties of Agricultural Materials and their Influence on Technological-Processes. NRD, Rostock, 4-8.09.1989, 627-631, 1989.
26. **Prokowski Z.:** Effect of DCMU on induction kinetics of long-lived delayed luminescence in green algae. Photosynthetica, 25, 223-226, 1991.
27. **Prokowski Z.:** Effect of HgCl₂ on long-lived delayed luminescence in *Scenedesmus quadricauda*. Photosynthetica, 28, 563-566, 1993.
28. **Prokowski Z.:** Zastosowanie metod luminescencyjnych w badaniach fitoplanktonu. Jeziora lobeliowe. Charakterystyka, funkcjonowanie i ochrona. Idee Ekol. T.6., ser. Szkice 4, cz. I, 173-177, 1994.
29. **Prokowski Z.:** Luminescence of chlorophyll *a* in green alga *Scenedesmus quadricauda*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 469, 643-650, 1999.
30. **Prokowski Z.:** Nowe sposoby pomiaru parametrów luminescencyjnych glonów jako wskaźników zmian w środowisku. Rozprawa hab., nr 205, AR, Szczecin, 2002.
31. **Redalje D.G., Laws E.A.:** A method for estimating phytoplankton growth rates and carbon biomass. Mar. Biol., 62, 73-79, 1981.
32. **Renger G., Schreiber U.:** Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plant research. In: Light emission by plants and bacteria. Ed.: Govindjee, J. Ames, D.C. Fork. Academic Press, Orlando, 587-619, 1986.
33. **Rutherford A.W., Inoue Y.:** Oscillation of the light luminescence from PSII: recombination of S₂Q_B⁻ and S₃Q_B⁻. FEBS Lett., Vol. 165 (2), 165-170, 1984.

34. **Schreiber U.:** Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion. Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany, 1997.
35. **Tarczyńska M., Zalewski M.:** Toksyczność zakwitów sinicowych jako wynik eutrofizacji zbiorników wodnych. *Gospodarka wodna*, 4(556), 83-87, 1995.
36. **Tukaj Z.:** The toxicity of three dispersed diesel fuel oils and dispersants towards some *Scenedesmus* (Chlorococcales) species. *Oceanologia*, 36(2), 175-186, 1994.
37. **Veselovsky V.A., Veselova T.V.:** Luminescence of plants (in Russian). Publishing House "Science", Moscow, 1990.
38. **Wiltshire K.H., Harsdorf S., Smidt B., Blöcker G., Reuter R., Schroeder F.:** The determination of algal biomass (as chlorophyll) in suspended matter from the Elbe estuary and the German Bight: A comparison of high-performance liquid chromatography, delayed fluorescence and prompt fluorescence and prompt fluorescence methods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 222, 113-131, 1998.

APPLICATION OF LUMINESCENCE METHODS FOR PHYTOPLANKTON CHLOROPHYLL *a* ESTIMATION

Antoni Murkowski, Zdzisław Prokowski

Department of Physics, Institute of Agricultural Engineering, University of Agriculture
ul. Papieża Pawła VI No 3, 71-459 Szczecin
e-mail: fizyka@agro.ar.szczecin.pl

Abstract. The study describes the role of phytoplankton in aquatic ecosystems and the threats that are posed by eutrophication of the bodies of water used for municipal or agricultural purposes. A measuring set and the luminescence method of measuring chlorophyll *a* content in active phytoplankton have been presented. The luminescence method was compared with the commonly used method of spectrophotometric determination of chlorophyll *a* concentration.

Key words: chlorophyll *a*, phytoplankton, eutrophication, delayed luminescence