Joanna Cieślewicz

BARWNIKI ROŚLINNE W OSADACH DENNYCH EKOSYSTEMÓW WODNYCH

Wydawnictwa Uczelniane
Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego
w Bydgoszczy

OPINIODAWCA
prof. dr hab. Sławomir S. Gonet

REDAKTOR DZIAŁOWY
dr hab. inż. Katarzyna Borowska, prof. nadzw. UTP

Opracowanie redakcyjne i techniczne
mgr Aleksandra Górska, mgr Patrycja Fereni-Morzyńska

Projekt okładki
mgr inż. Daniel Morzyński

Zdjęcie na okładce
Prof. dr hab. inż. Janusz Hermann

© Copyright
Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego
Bydgoszcz 2015

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany
ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych,
kopiujących, nagrywających i innych bez pisemnej zgody
posiadacza praw autorskich.

ISBN 978-83-64235-62-7

Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego
Redaktor Naczelny
prof. dr hab. inż. Józef Flizikowski
ul. ks. A. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz, tel. 52 3749482, 52 3749426
e-mail: wydawucz@utp.edu.pl http://www.wu.utp.edu.pl

Wyd. I. Ark. aut. 7,2. Ark. druk. 8,0.
Zakład Małej Poligrafii UTP Bydgoszcz, ul. ks. A. Kordeckiego 20

Spis treści

WSTĘP 5

1. ŹRÓDŁA BARWNIKÓW DEPONOWANYCH W OSADACH DENNYCH 8
   1.1. Makrofity 8
   1.2. Bakterie i sinice 10
   1.3. Glony 16

2. CHARAKTERYSTYKA BARWNIKÓW 21
   2.1. Chlorofile 21
   2.2. Karotenoidy 27
   2.3. Fikobiliny 34

3. PROCESY DEGRADACJI BARWNIKÓW 38
   3.1. Starzenie się komórek 38
   3.2. Degradacja w słupie wody i osadach dennych 41

4. ANALIZA BARWNIKÓW I PRODUKTÓW ICH DEGRADACJI 56
   4.1. Ekstrakcja barwników 56
   4.2. Rozdział barwników 67
   4.3. Badania ilościowe 76
      4.3.1. Względne jednostki barwnikowe 76
      4.3.2. Równania do równoczesnego obliczania zawartości barwników 77
   4.4. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w analizie barwników roślinnych 81
   4.5. Wskaźniki stosowane w badaniach barwników roślinnych 93

5. PODSUMOWANIE 96

Wykaz terminów stosowanych w monografii 98

Nazwy zwyczajowe i systematyczne przykładowych karotenoidów 100

Literatura 101

Summary 129

WSTĘP

Obiekty wodne na swym pierwotnym dnie zbudowanym z różnych utworów skalnych mają zdeponowaną pewną ilość autochtonicznego i allochtonicznego materiału mineralno-organicznego. Autochtoniczne składniki osadów stanowią opadające na dno szczątki organizmów roślinnych i zwierzęcych zasiedlających określone środowisko wodne, resztki niestrawionych pokarmów i odchody większych zwierząt, wytrącające się z wody rozpuszczone i koloidalne związki chemiczne oraz materiały pochodzące z abrazji brzegów. Materiał allochtoniczny składa się głównie z produktów erozji podłoża zlewni [379].

Materia organiczna zawarta w osadach dennych jest mieszaniną lipidów, węglowodanów, protein i innych związków pochodzących ze szczątków organizmów żyjących wcześniej w jeziorze i jego zlewni. Z tej mieszaniny w procesie przemian diagenetycznych formowane są substancje humusowe, stanowiące od 60 do 70% materii organicznej w osadach młodych i ponad 90% w starszych. Resuspensja i spływ w głąb misy jeziornej przenoszą materiał z płytkiego litoralu do głębszych partii zbiornika. Przemiany mikrobiologiczne zachodzące w wodzie i osadach powodują zmniejszanie się udziału materiału wyjściowego i zastępowanie go związkami syntetyzowanymi przez mikroorganizmy [283]. Pula materii organicznej deponowana w osadach dennych zasilana jest przez detrytus, którego źródłem są jednokomórkowe glony żyjące w strefie fotycznej. Jednak w wielu przypadkach znaczący może być także udział detrytusu pochodzącego z roślin lądowych. Na względne udziały materii z tych dwóch głównych źródeł wpływają produkcja zachodząca w jeziorze, produkcja roślin lądowych oraz procesy transportu [280]. Zakumulowana w osadach materia organiczna odzwierciedla oba typy i ilości materiałów ze źródeł pierwotnych oraz stopień przemian i degradacji materiału wyjściowego [24, 281, 284].

Materia organiczna podlega różnym procesom, które mogą zmieniać jej skład we względnie krótkim czasie pomiędzy jej syntezą a długoterminowym zdeponowaniem na dnie zbiornika. Mniej reaktywne formy materii organicznej zaczynają dominować, podczas gdy bardziej reaktywne i rozpuszczalne w wodzie są wykorzystywane jako pokarm przez mikroorganizmy oraz odżywiające się osadami zwierzęta.

Wczesne fazy diagenezy występujące przed sedymentacją mogą istotnie modyfikować właściwości materii organicznej. Eadie i współ. [104] w badaniach prowadzonych na jeziorze Michigan stwierdzili, że 85% węgla organicznego, który był wiązany w procesie fotosyntezy w strefie fotycznej, było mineralizowane przed opuszczeniem epilimnionu, czyli części słupa wody powyżej termokliny. Około 94% wodnej produkcji pierwotnej tego jeziora było ponownie włączane do obiegu przed wzbogaceniem powierzchni osadu znajdującej się na głębokości 100 m. W jeziorach płytszych materia organiczna opada w krótszym czasie i dlatego jest krócej wystawiona na procesy utleniania w słupie wody. Ze względu na zachodzące procesy pozostałości syntetyzowanej przez mikroorganizmy materii organicznej są dołączane do mieszaniny, niektóre są modyfikowane lub niszczone, lecz inne są zachowywane. Ostatecznie materia organiczna osadów jest tylko niewielką frakcją początkowego materiału [282, 291].

Zaraz po wzbogaceniu osadów materia organiczna jest przedmiotem dodatkowych procesów prowadzących do rozkładu i przemian spowodowanych utlenianiem. Wydłużenie czasu wystawienia materii organicznej na utlenianie powodują także procesy resuspensji i mieszania biologicznego. Organizmy bentosowe powodują dalszą degradację poprzez wykorzystanie materii organicznej jako pokarmu. Tylko niewielka część materii organicznej wyprodukowanej w ekosystemach wodnych zostaje ostatecznie pogrzebana w osadach. W wyniku zachodzących procesów zanikają labilne produkty biosyntezy i formowane są substancje bardziej odporne na procesy diagenezy [48, 282].

Pomimo całkowitego rozkładu struktur morfologicznych w osadach dennych zostają zachowane zsyntetyzowane przez glony, fototroficzne bakterie i rośliny wyższe barwniki roślinne oraz ich pochodne [57, 245]. Chlorofile, karotenoidy oraz ich pochodne zostały wyizolowane i zidentyfikowane już w latach czterdziestych ubiegłego stulecia [120]. Niezmodyfikowane karotenoidy pochodzenia glonowego odnajdywane były w osadach morskich liczących 56 tysięcy lat [416], podczas gdy perhydrokaroten (całkowicie nasycona pochodna karotenoidów) został wyizolowany z łupków ilastych zdeponowanych w płytkich jeziorach ponad 50 milionów lat temu [292]. Ilość zdeponowanych w osadach jeziornych barwników pochodzących z epilimnionu i hypolimnionu zależy przede wszystkim od składu gatunkowego i biomasy fitoplanktonu oraz bakterii fototroficznych [182, 297, 308, 353], makrofitów [30], jak również dopływu ze źródeł lądowych. Podstawowa produktywność jezior jest bardzo zmienna, co jest konsekwencją indywidualnych cech zbiorników, typu zlewni, zmian w uwarstwieniu wód oraz szeregu czynników naturalnych oraz powodowanych przez człowieka, wpływających na poziom wody i retencję, obecność drobnoustrojów, procesy zachodzące w słupie wody; produktywność zależy także od klimatu [88, 115, 315, 352].

Początkowo barwniki roślinne w badaniach paleolimnologicznych wykorzystywano jedynie jako wskaźniki obecności określonych populacji organizmów fototroficznych czy zmian w produkcji biologicznej jezior [20, 118, 183, 402]. Z czasem jednak zakres zastosowań barwników i ich pochodnych jako wskaźników w badaniach ekologicznych i paleolimnologicznych znacznie rozszerzono. Badania jakościowych i ilościowych stosunków różnych grup barwników wykorzystywane są do oceny biologicznego stanu wód zarówno płynących, jak i stojących. Pomimo że niektóre barwniki takie jak chlorofil *a* i β-karoten są bardzo powszechne, obecność takich barwników jak alloksantyna, luteina, fukoksantyna i zeaksantyna, które są markerami określonych grup glonów, pozwala określić ich liczebność [47, 107, 195, 336, 398] lub dynamikę zmian ilościowych [232, 396]. Szczególne znaczenie dla zrozumienia procesów zachodzących w samych jeziorach mają badania dotyczące zbiorników, do których nie dopływa materia allochtoniczna, a także wolnych od oddziaływań człowieka [412]. Na podstawie zachowanych w osadach dennych barwników i produktów ich rozkładu można określić historyczną obecność i obfitość poszczególnych grup glonów [92, 114, 156, 233, 245, 331, 347, 372, 373, 400, 413, 415], zmiany klimatyczne [6, 148, 168, 377] oraz zmiany trofii [13, 45, 93, 100, 146, 147, 153, 339, 450-452]. Barwniki obecne w osadach stanowią także zapis warunków tlenowych panujących w hypolimnionie jezior [78, 146, 454] i oddziaływania roślinożerców [13, 300]. Badania barwników mogą stanowić cenne uzupełnienie badań palinologicznych [342, 345, 423]. Gdy uwzględni się fakt, że relacje między barwnikami fotosyntetycznymi pochodzącymi z osadów dennych są zwykle odmienne od stosunków panujących w słupie wody, co jest spowodowane zróżnicowaniem tempa ich rozkładu i stopniem zachowywania [263, 436], okazuje się, że barwniki mogą być użyteczne, stanowiąc biomarkery do śledzenia diagenetycznych przemian detrytusu glonowego [437]. Analiza zawartych w rdzeniach barwników pozwala na wydzielenie w historii jezior okresów dominacji glonów, sinic czy makrofitów [414] bądź postępującego zakwaszenia [143, 425]. Han i współ. [157] na podstawie przeprowadzonych analiz osadów dennych (zawartości węgla organicznego, węglanów, barwników, wartości $\delta^{13}C$) określili zmiany klimatyczne i zmiany poziomu wody w jeziorze w ciągu analizowanych 700 lat. W okresach suchych i ciepłych wzrastała zawartość sinic, co odzwierciedlało się w zwiększonym zachowywaniu oscillaksantyny i miksoksantofilu, natomiast zachowywaniu chlorofilu sprzyjały okresy zimniejsze i bardziej mokre (tab. 1).

W pracy przedstawiono występowanie i właściwości poszczególnych grup barwników, procesy ich degradacji oraz podstawowe metody ich oznaczania.

Tabela 1. Podsumowanie zmian klimatycznych i warunków środowiskowych w jeziorze Qinghai [157]

	Zmiany klimatu	Zmiany poziomu wody	Zmiany zawartości		
			oscillaksantyna	miksoksantofil	chlorofil
700 lat	sucho i ciepło	poziom wody opada, wzrasta zasolenie	stopniowy wzrost	stopniowy wzrost	niska, prawie stała
	zimniej i bardziej mokro	poziom wody wzrasta	stopniowy spadek	stopniowy spadek	bardzo wysoka
	sucho i ciepło	niski poziom wody	wysoka	wysoka	niska, prawie stała
	zimniej i bardziej mokro	poziom wody wzrasta	nieregularny spadek	stopniowy spadek	nieregularny wzrost
	bardziej sucho i cieplej	poziom wody opada	zmienna	stopniowy wzrost	nieregularny spadek
	zimno i mokro	wysoki poziom wody	nieregularny spadek	stopniowy spadek	nieregularny wzrost
	sucho i ciepło	niski poziom wody	zmienna	wysoka	niska, prawie stała
	zimno i mokro	wysoki poziom wody	niska	niska	wysoka

1. ŹRÓDŁA BARWNIKÓW DEPONOWANYCH W OSADACH DENNYCH

Do głównych źródeł barwników w ekosystemach wodnych zaliczyć należy makrofity, populacje fototroficznych bakterii, sinice oraz zespoły glonów planktonowych i bentosowych [68, 141, 188, 209, 245, 272, 297, 376, 417]. W wodach mogą występować również barwniki związane z materiałem detrytusowym donoszonym z lądu lub resuspendowanym z osadów [69, 240, 427].

1.1. MAKROFITY

Makrofity w wodach stojących reprezentowane są przez liczne gatunki roślin, począwszy od ziemnowodnych amfifitów, a skończywszy na pleustonie (tab. 2). Strefowe rozmieszczenie roślin naczyniowych występuje w różnych zbiornikach śródlądowych, jednak tylko w jeziorach osiąga pełne zróżnicowanie przy dużym bogactwie form roślinnych. W wodach wyróżnia się następujące zbiorowiska roślinne (fitocenozy):

- **amfifity** (Schröder, 1902) – rośliny ziemnowodne, rozwijające się na granicy wody i lądu, przystosowane do życia zarówno w płytkiej wodzie, jak i na lądzie. Strefa ich występowania leży na pobrzeżach okresowo znajdujących się pod wodą;
- **helofity** (Warming, Raunkiaer) – rośliny zakorzenione w dnie i wznoszące się ponad wodę pędami wegetatywnymi i owocującymi. Wyróżnia się wśród nich dwie podgrupy – szuwary i oczerety:
  - szuwary (Starmach, 1954) – rośliny występujące w płytkiej wodzie, na terenach zabagnionych i przejściowo znajdujących się pod wodą. Są to rośliny błotne, przystosowane do okresowego zalewania przez wodę,
  - oczerety (Starmach, 1954) – rośliny rozwijające się na płyciznach przybrzeżnych, a czasami śródjeziornych. Na ławicy przybrzeżnej wystawionej na falowanie oczerety rosną w pewnej odległości od brzegu, noszą wtedy nazwę oczeretów wielkojeziornych. W miejscach osłoniętych dochodzą do samego brzegu, a na terenach podmokłych często rosną na lądzie;
- **nimfeidy** (Du Rietz, 1921) – rośliny rozwijające się na dnie, o liściach pływających na powierzchni wody. Ogonki liściowe tych roślin są długie, elastyczne i sięgają do powierzchni wody. Ich masywne i silnie rozwinięte kłącza tkwią głęboko w osadach dennych, zabezpieczając rośliny przed wyrwaniem. Występują przeważnie po zewnętrznej stronie oczeretów w zatokach i osłoniętych miejscach jezior, a czasami i wśród mniej zwartych oczeretów. Jedynie w małych, zacisznych i często zamkniętych jeziorach mogą zajmować znaczne przestrzenie, wypierając inne gatunki roślin. Wszystkie rośliny o liściach pływających źle znoszą większe ruchy wody (falowanie, prąd) oraz gwałtowne zmiany poziomu wody;
- **elodeidy** (Du Rietz, 1921) – rośliny całkowicie zanurzone w wodzie, ich łodygi asymilacyjne i owocujące wznoszą się nad dno, ale nigdy nie wyrastają ponad wodę i nie tworzą liści pływających, jedynie kwiaty mogą wystawać z wody. Rośliny należące do tego zbiorowiska często tworzą rozległe łąki podwodne, stanowiące dolne piętro litoralu;

Tabela 2. Przykładowe gatunki roślin naczyniowych występujących w zbiornikach wodnych [25]

Amfifity	Helofity	
	szuwary	oczerety
czermień błotna (*Calla palustris*) wywłócznik okółkowy (*Myriophyllum verticillatum*) rdest ziemnowodny (*Polygonum amphibium*) babka wodna (*Alisma plantago-aquatica*) jaskier leżący (*Ranunculus reptans*) niezapominajka błotna (*Myosotis palustris*) turzyce (*Carex*) mchy z rodzajów: *Bryum*, *Sphagnum, Calliergon*	turzyca sztywna (*Carex stricta*) turzyca zaostrzona (*Carex gracilis*) turzyca nitkowata (*Carex lasiocarpa*) turzyca dzióbkowata (*Carex rostrata*) sit ściśniony (*Juncus compressus*) sit członowaty (*Juncus articulatus*) ponikło błotne (*Heleocharis acicular*) czermień błotna (*Calla palustris*) tatarak zwyczajny (*Acorus calamus*)	oczeret jeziorny (*Schoenoplectus lacustris*) oczeret Tabernemontana (*Schoenoplectus Tabernaemontani*) trzcina pospolita (*Phragmites australis*) pałka wąskolistna (*Typha angustifolia*) pałka szerokolistna (*Typha latifolia*) skrzyp bagienny (*Equisetum limosum*)

Nimfeidy	Elodeidy	Isoetidy	Pleuston
grążel żółty (*Nuphar luteum*) grzybień biały (*Nymphaea alba*) rdestnica pływająca (*Potamogeton natans*) grzybieńczyk wodny (*Nymphoides peltata*) rdest ziemnowodny (*Polygonum amphibium*) grążel drobny (*Nuphar pumilum*)	rdestnica przeszyta (*Potamogeton perfoliatus*) rdestnica połyskująca (*Potamogeton lucens*) rdestnica grzebieniasta (*Potamogeton pectinatus*) rdestnica kędzierzawa (*Potamogeton crispus*) włosiennicznik krążkolistny (*Batrachium circinatum*) rogatek sztywny (*Ceratophyllum demersum*) wywłócznik kłosowy (*Myriophyllum spicatum*)	ponikło igłowate (*Heleocharis aciculars*) poryblin jeziorny (*Isoëtes lacustris*) brzeżyca jednokwiatowa (*Litorella uniflora*) jezierza (*Najas*)	salwinia pływająca (*Salvinia natans*) aldrowanda pęcherzykowata (*Aldrovanda vesiculosa*) wgłębik pływający (*Riciocarpus natans*) żabiściek pływający (*Hydrocharis morsus-ranae*) glony z rodzajów: *Hydrodictyon, Zygnema, Spirogyra* przedstawiciele rodziny rzęsowatych (*Lamnaceae*)

- **isoetidy** (Du Rietz, 1921) – rośliny rozwijające się przy samym dnie, które nigdy nie dorastają do powierzchni wody. Zwykle tworzą podwodne darnie na niewielkich głębokościach. Zbiorowisko to tylko w niektórych jeziorach zajmuje większe przestrzenie. Przeważnie są to stosunkowo małe płaty roślinności na ławicy przybrzeżnej rozległych jezior – zazwyczaj na płyciznach między brzegiem a oczeretami wielkojeziornymi lub na płyciznach śródjeziornych na tak zwanych górkach podwodnych. Niektóre rośliny wchodzące w skład tego zbiorowiska (poryblin, jezierza) mogą występować także w miejscach głębszych;
- **pleuston** (Schröder, 1902) – rośliny makroskopowe, niezakorzenione, lecz wolno unoszące się na powierzchni wody lub w wodzie. Nie tworzą stałych zbiorowisk, często rozwijają się pod osłoną roślin zakorzenionych [25].

Makrofity cechuje specyficzny (tab. 3), odmienny od glonów skład chemiczny (tab. 9) i w porównaniu z nimi charakteryzują się niewielką liczbą barwników, bowiem obecne są u nich jedynie chlorofile *a* i *b* oraz β-karoten, α-karoten, luteina, zeaksantyna, neoksantyna i wiolaksantyna [245, 249, 317, 374]. Badając rozkład materiału organicznego pochodzącego z roślin zanurzonych, Bianchi i Findlay [29] stwierdzili obecność fukoksantyny u *Potamogeton sp*. i *Vallisneria americana*. Szersze omówienie budowy oraz właściwości chlorofili i karotenoidów występujących u roślin wyższych przedstawiono w części poświęconej barwnikom obecnym u glonów.

1.2. BAKTERIE I SINICE

W środowisku wodnym znaczącą rolę w produkcji materii organicznej odgrywają bakterie autotroficzne, natomiast bakterie heterotroficzne biorą udział w mineralizacji detrytusu, stanowiąc ważne ogniwo w procesach obiegu materii i przepływu energii [87, 312].

Tabela 3. Skład chemiczny trzech głównych typów roślin [423]

Typ ekologiczny roślin	Białka	Węglowodany	Ekstrakt eterowy	Celuloza
	% materii organicznej			
Wynurzone	13 (3,5-26,7)	50 (23-69)	2,1 (0,4-6,1)	32 (17,6-45,4)
O liściach pływających	26,5 (18-44)	42 (31-64)	4,0 (2,8-5,7)	27 (14-38)
Zanurzone	22 (7,5-34,7)	51 (20-70)	2,2 (4,4-5,1)	27 (14,0-61,6)
Średnia dla grup	19	50	2,4	29

W tabeli 4 zaprezentowano częstotliwość występowania przedstawicieli niektórych rodzin bakterii w wodach stojących. Biomasa i liczba bakterii są największe w epilimnionie, głębiej zmniejszają się, a minimum osiągają w matalimnionie i górnej części hypolimnionu, aby ponownie wzrosnąć w dolnej jego części, szczególnie, gdy panują tam warunki beztlenowe [423]. Najwięcej bakterii nieprzetrwalnikujących występuje w wodach eutroficznych, natomiast w wodach mezotroficznych i dystroficznych przeważają bakterie, które wytwarzają przetrwalniki [312]. W tabeli 5 przedstawiono zróżnicowanie liczby bakterii, ich objętości i biomasy w wodach jezior o różnej produktywności. Liczba bakterii na ogół zwiększa się wraz ze wzrostem trofii, ale należy pa-

miętać, że zależy to od jeziora, sezonu czy roku [423]. Bakterie zarówno fotosyntetyzujące, jak i niefotosyntetyzujące są bogate w karotenoidy, które mogą stanowić nawet 3% ich suchej masy (np. u *Streptomyces mediolani*). Najczęściej u bakterii występują fitoen, fitofluen, neurosporen, likopen oraz β-, γ- i ϕ-karoteny (rys. 1), natomiast u bakterii żyjących w warunkach beztlenowych dosyć powszechne są karotenoidy metoksylowane (tab. 6), których brak u glonów, podczas gdy nie występują karotenoidy epoksydowe. Sporadycznie obecne są karotenoidy o charakterze kwaśnym. Karotenoidy aromatyczne takie jak chlorobakten, izorenieraten czy okenon występują tylko u niektórych rodzajów bakterii [188, 268]. Ogólnie u bakterii stwierdzono obecność około 100 karotenoidów, z czego 24 to karoteny. Karotenoidy występujące u bakterii zawierają w cząsteczce najczęściej 40 atomów węgla, rzadziej trzydzieści, czterdzieści pięć czy pięćdziesiąt.

Tabela 4. Częstotliwość występowania przedstawicieli niektórych rodzin bakterii w wodach stojących [312]

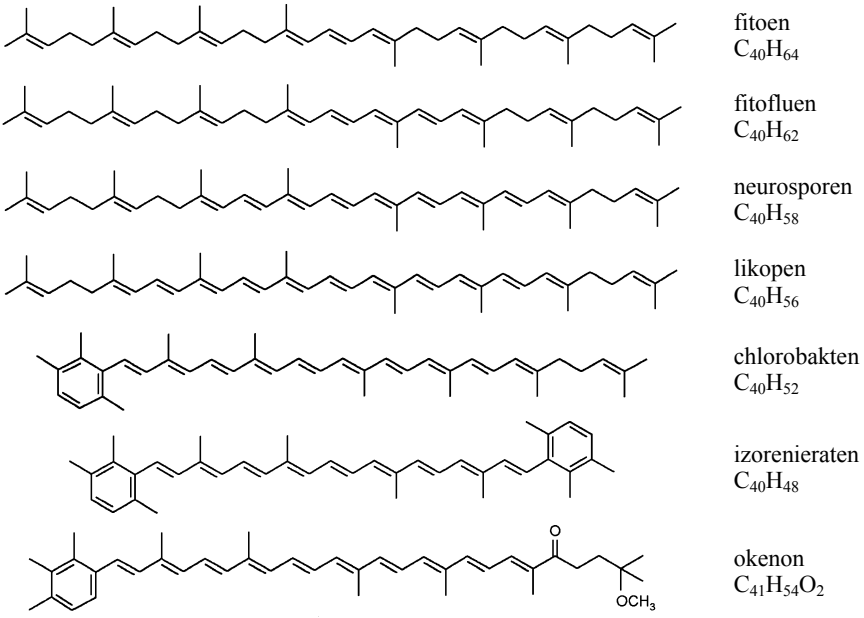
Grupa fizjologiczna	Takson	Częstotliwość występowania
Amonifikatory	*Bacillceae*	+++
	Bacteriaceae	++
	Pseudomonadaceae	++
	Micrococcaceae	+++
	Mycobacteriaceae	+++
	Micromonoaporaceae	++
	Actinomycetaceae	+
	Chromobacteriaceae	++
	Caulobacteriaceae	++
	Chlamydobacteriaceae	+
Denitryfikatory	*Pseudomonadaceae*	++
Nitryfikatory	*Nitrobacteriaceae*	+
Bakterie wiążące azot atmosferyczny	*Azotobacteriaceae*	+
	Clostridium	++
Bakterie siarkowe	*Chromathiaceae*	++
	Achromathiaceae	+
	Thiobacillaceae	++
Redukujące siarczany	*Desulfovibrio desulfuricans*	++
Bakterie wodorowe	*Hydrogenomonas*	+
Bakterie żelaziste	*Chlamydobacteriaceae*	+
	Gallionella	+
	Siderocapsaceae	++
	Hyphpomicrobiaceae	++
Rozkładające związki organiczne typu węglowodanów	*Spirochaetaceae*	++
	Bacillaceae	+
	Mycobacteriaceae	+
	Actinomycetaceae	+
Rozkładające węglowodory	*Bacteriaceae*	+
	Pseudomonadaceae	+
	Mycobacteriaceae	++

+ mało, ++ średnio, +++ dużo

Tabela 5. Liczba, objętość oraz biomasa bakterii w jeziorach o zróżnicowanej produktywności [423] (pisownia nazw jezior zgodna z oryginałem)

Typ i jeziora	Liczba $10^6 \cdot ml^{-1}$	Objętość μm^3	Biomasa $g \cdot m^{-3}$
Oligotroficzne			
Zelenetskoye	0,175	0,265	0,06
Baikal	0,20	–	–
Krivoye	0,67	0,43	0,21
Onezhskoe	0,29	–	–
Ladozhskoe	0,35	–	–
Pert	0,13	–	–
Mezotroficzne			
Krasnoye	0,70	0,43	0,30
Naroch	0,64	0,50	0,32
Dal′nee	1,50	0,67	1,00
Sevan	0,39	112	0,43
Glubokoe	1,20	–	0,97
Eutroficzne			
Drivyaty	1,84	0,76	1,40
Myastro	2,20	0,50	1,10
Batorin	6,40	0,50	3,20
Beloe	2,23	–	–
Chernoe	4,00	–	–
B. Krivoe (słone)	12,3	–	–
4 słone jeziora afrykańskie	3,7-360	–	–
Zbiorniki			
Rybinsk	1,70	0,60	1,00
Bratsk	0,85	0,90	0,77
Kiev	4,10	0,84	3,35
Kremenchung	3,50	0,60	2,10
Kakhov	4,00	0,47	1,90
Dneprodzerzhin	3,40	0,65	2,20
Kashkorenskoe	7,8-57,9	–	–
Rybovodnye (staw)	1,0-40,0	–	–
Kramet–Niyaz (staw)			
bez nawożenia	2,0-6,0	–	2,0-6,0
z nawożeniem	5,0-20,0	–	5,0-25,0
Dystroficzne			
Chaernoe	1,07	–	–
Piyarochnoe	0,43	–	–
Serpovidnoe	0,1-0,5	–	–
Wartości średnie			
Oligotroficzne	0,50	0,2-0,4	0,15
Mezotroficzne	1,00	0,4-1,2	0,70
Eutroficzne	3,70	0,5-0,9	2,30

Pod względem budowy i struktury chemicznej większe zróżnicowanie jakościowe występuje u bakterii niefotosyntetyzujących, natomiast największe zróżnicowanie w strukturze chemicznej wśród bakterii fotosyntetyzujących wykazują bakterie siarkowe oraz z rodzaju *Rhodopseudomonas* i *Chromatium*. U bakterii beztlenowych tworzą się głównie karoteny oraz ubogie w tlen ksantofile hydroksylowane lub metoksylowane przy węglu w pozycji 1.



Rys. 1. Wzory przykładowych karotenoidów występujących u bakterii [53]

Tabela 6. Charakterystyka struktury głównych grup karotenoidów u bakterii [87]

Bakterie	Rodzaje karotenoidów				
	alifatyczne	monocykliczne	bicykliczne	aromatyczne	metoksylowane
fotosyntetyzujące	+	+	–	+	+
niefotosyntetyzujące	+	+	+	+	+

Bakterie	Rodzaje karotenoidów			
	hydroksylowane przy węglu (C_2)	(C_1)	karbonylowe	karboksylowe
fotosyntetyzujące	–	+	+	–
niefotosyntetyzujące	+	+	+	(+)

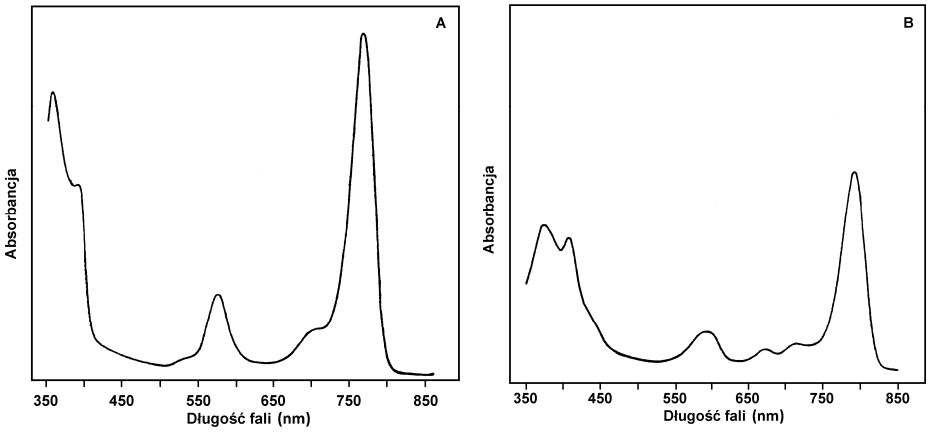
(+) występowanie niepewne lub limitowane

U bakterii tlenowych nad karotenami ilościowo dominują ksantofile bogate w grupy hydroksylowe, ketonowe, aldehydowe, metoksylowe i karboksylowe [87]. Oprócz organizmów, które prowadzą oksygeniczny typ fotosyntezy (z wydzieleniem tlenu), istnieją grupy bakterii, dla których źródłem elektronów nie jest woda, lecz związki siarki lub proste związki organiczne, i ten typ fotosyntezy przebiega bez wydzielenia tlenu (anoksygeniczny typ fotosyntezy). W przeciwieństwie do organizmów prowadzących oksygeniczny typ fotosyntezy bakterie charakteryzują się występowaniem tylko jednego fotoukładu. Optimum spektralne bakterii leży w zakresach w znikomy sposób wykorzystywanych przez fitoplankton: 700-760 nm dla zielonych bakterii siarkowych i > 800 nm dla bakterii purpurowych [234].

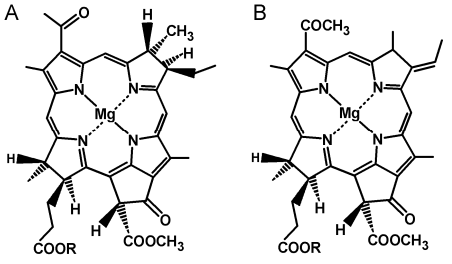
W komórkach bakterii występują nie tylko karotenoidy, obecne są również bakteriochlorofile, których podstawowe właściwości spektrometryczne zestawiono w tabeli 7. Zróżnicowany przebieg widm absorpcyjnych bakterichlorofili *a* i *b* przedstawiono na rysunku 2, natomiast na rysunku 3 zamieszczono ich wzory strukturalne. Do najczęściej występujących należy bakteriochlorofil *a*. U większości bakterii purpurowych obecny jest on zarówno w antenach, jak i w centrum reakcji.

Tabela 7. Główne maksima absorpcji bakteriochlorofili w rozpuszczalnikach organicznych [172]

Związek	Wzór i masa cząsteczkowa	Rozpuszczalnik	Maksima absorpcji, nm		
			Soret	Q_x	Q_y
BChl *a*	$C_{55}H_{74}N_4O_6Mg$ 910	eter dietylowy	358	577	773
		metanol	365	605-608	772
BChl *b*	$C_{55}H_{72}N_4O_6Mg$ 908	aceton	372	592	791
		eter dietylowy	368	578	794
BChl *c*		eter dietylowy	429	–	659
		aceton	428	–	660
BChl *d*		eter dietylowy	423	–	651
		aceton	424	–	654
Bchl *e*		aceton	458	–	647
Bchl *g*	$C_{55}H_{74}N_4O_6Mg$ 886	eter dietylowy	364, 404	565	767
		aceton	365, 405	566	762



Rys. 2. Przebieg widm bakteriochlorofili *a* (A) i *b* (B) [350]



Rys. 3. Wzory strukturalne bakteriochlorofili *a* (A) i *b* (B) [350]

Bakteriochlorofil *a* występuje także w antenach i centrach reakcji u zielonych bakterii siarkowych. Głównymi barwnikami antenowymi są bakteriochlorofile *c*, *d* i *e* (tab. 8). Strukturalnie i spektrometrycznie te bakteriochlorofile przypominają bardziej chlorofile *a* i *b* roślin niż bakteryjne chlorofile *a*, *b* i *g*. Bakteriochlorofil *g* jest natomiast głównym barwnikiem u heliobakterii. Bakteriochlorofilu *f* nie odnaleziono dotychczas w naturze.

Obecnie do królestwa *Bacteria* zalicza się także sinice, które jednak w przeciwieństwie do bakterii zawierają chlorofil *a* i karotenoidy, takie jak miksoksantofil czy echinenon, ale również rozpuszczalne w wodzie biliproteiny [17, 207, 219, 225].

Tabela 8. Główne grupy bakterii wykorzystujących energię świetlną w procesach życiowych (chl – chlorofil, bchl – bakteriochlorofil, P – maksimum absorpcji λ w nm) [219]

Grupa systematyczna	Rodzaj barwników chlorofilowych	Forma chlorofilu w centrum reakcji	Źródło elektronów	Wymagania życiowe	Typowe gatunki
Sinice (***Cyanobacteria***)	chl *a*	PSI–chl *a* (P-700) PSII–chl *a* (P-680)	H_2O	autotrofy, aeroby	*Anabena azollae* *Synechococcus elongatus* *Nostoc flagelliformae*
Bakterie zielone nitkowate (*Chloroflexaceae*)	bchl *a*, bchl *c*, bchl *d*	bchl *a* (P-865)	proste związki organiczne, H_2, H_2S	fakultatywne aeroby	*Chloroflexus aurantiacus*
Bakterie zielone siarkowe (*Chlorobiaceae*)	bchl *a*, bchl *c*, bchl *d*, bchl *e*	bchl *a* (P-840)	H_2, H_2S, S^0, $Na_2S_2O_3$, SO_4^{2-}	autotrofy, anaeroby	*Chlorobium limicola*
Bakterie purpurowe siarkowe (*Chromatiaceae* i *Ectothiorhodaceae*)	bchl *a*, bchl *b*	bchl *a* (P-870) lub bchl *b* (P-890)	H_2, H_2S, S^0, $Na_2S_2O_3$, SO_3^{2-}	autotrofy i heterotrofy na świetle, ścisłe anaeroby	*Chromatium vinosum* *Thiocapsa roseopersicina*
Bakterie purpurowe niesiarkowe (*Rhodospirillaceae*)	bchl *a*, bchl *b*	bchl *a* (P-870) lub bchl *b* (P-960)	proste związki organiczne, H_2, czasem H_2S lub $Na_2S_2O_3$	autotrofy i heterotrofy na świetle, heterotrofy w ciemności, fakultatywne aeroby	*Rhodopseudomonas viridis* *Rhodobacter sphaeroides* *Rhodospirillum rubrum*
Heliobakterie (*Heliobacteriaceae*)	bchl *g*	bchl *g* (P-798)	proste związki organiczne	fotoheterotrofy, ścisłe anaeroby	*Heliobacterium chlorum*
Heliobakterie (*Heliobacteriaceae*)	brak (chromoforem jest retinal)	brak	brak fotosyntezy	chemoheterotrofy, fototrofy, aeroby	*Heliobacterium halobium*

1.3. GLONY

Glony to fotosyntetyzujące rośliny żyjące głównie w wodach słodkich i słonych, rzadziej w miejscach wilgotnych. Charakteryzują się wysoką produktywnością, wytwarzają bowiem około 70% ogólnej materii organicznej i tlenu na kuli ziemskiej. W tabeli 9 przedstawiono skład chemiczny wybranych gatunków glonów, należy jednak mieć na uwadze, że w dużej mierze jest on zależny od warunków środowiskowych [19, 311]. Nie ulega jednak wątpliwości, że glony w porównaniu z makrofitami charakteryzują się wyższą zawartością bogatych w azot białek. Stosunkowo niskie wartości stosunku C/N stwierdzane dla glonów powodują, że materia organiczna pochodzenia glonowego bardzo szybko ulega procesom degradacji [283].

Tabela 9. Skład chemiczny glonów [19]

Gatunek	Białka	Węglowodany	Lipidy
	% suchej masy		
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22
Chlorella pyrenoidoisa	57	26	2
Euglena gracilis	39-61	14-18	14-20
Scenedesmus obliquus	50-56	10-17	12-14
fitoplankton średnio*	13	41,5	1,3

* na podstawie [311]

W tabeli 10 przedstawiono zróżnicowanie wybranych gromad glonów słono- oraz słodkowodnych.

Tabela 10. Zróżnicowanie organizmów występujących w fitoplanktonie morskim i słodkowodnym [195]

Gromada/Klasa	Rodzaje	Przybliżona liczba żyjących gatunków
Linia glonów złotobrązowych (chlorofile *a* i *c*)		
Bacillariophyta	210	nieznana (5500-10000?)
Dinophyta	550	4000
Chrysophyta		
Chrysophyceae	120	1000
Raphidophyceae	4	9
Haptophyta		
Prymnesiophyceae	50	500
Xanthophyta	90	600
Cryptophyta	8	> 50
Eustigmatophyta	6	12
Linia glonów zielonych (chlorofile *a* i *b*)		
Chlorophyta		
Chlorophyceae	350	2500
Prasinophyceae	13	120
Euglenophyta	43	650-800 (?)
Linia glonów czerwonych (chlorofil *a* i biliproteiny)		
Rhodophyta	3	10 (?)
Zielononiebieskie ***Procaryota*** (chlorofil *a* i biliproteiny)		
Cyanobacteria	w trakcie oceny	(> 10000 spp.?)
Prochlorophyta	3	3

Na podstawie tych danych można stwierdzić, że glony są bardzo liczną i nie do końca poznaną grupą organizmów różniących się pod względem rozmiarów i budowy (tab. 11, 12). W zależności trofii wód zmienia się zarówno skład fitoplanktonu, jak i jego produkcja pierwotna oraz zwiększa się jednocześnie zawartość chlorofilu *a*. Należy jednak pamiętać, że w jeziorach o niskiej trofii produkcja biologiczna zachodzi z małą intensywnością, ale może odbywać na większych głębokościach dzięki głębokiemu przenikaniu światła (tab. 13, 14).

Fitoplankton zawiera trzy typy barwników związanych ze zbieraniem światła i fotoprotekcją: chlorofile, karotenoidy i biliproteiny. Ich struktury chemiczne i właściwości przedstawiono szerzej w pracach Keely'ego [211], Rowana [334] i Scheera [350].

Tabela 11. Zakres wielkości fitoplanktonu [364]

Kategoria	Średnica komórki lub kolonii μm	Objętość μm^3	Organizmy jednokomórkowe	Organizmy kolonijne
Pikoplankton	0,2-2	$4{,}2 \cdot 10^{-3}$-4,2	bakterie fotosyntetyzujące sinice *Synechococcus* *Synechocystis*	–
Nanoplankton	2-20	4,2-$4{,}2 \cdot 10^{3}$	sinice kryptomonady *Cryptomonas* *Rhodomonas*	–
Mikroplankton	20-200	$4{,}2 \cdot 10^{3}$-$4{,}2 \cdot 10^{6}$	bruzdnice *Ceratium* *Peridinium*	okrzemki *Asterionella*
Makroplankton	> 200	> $4{,}2 \cdot 10^{6}$	–	sinice *Anabena* *Microcystis*

Wartości objętości zostały oparte na kuli (objętość = $4/3\pi r^3$)

Tabela 12. Główne gromady glonów słodkowodnych [364]

Gromady glonów	Typowy kolor	Typowa morfologia gatunków słodkowodnych	Przykłady
Zielenice ***Chlorophyta***	trawiasty	mikroskopijne lub widoczne – jednokomórkowe lub nitkowate, kolonijne	*Chlamydomonas* *Cladophora*
Eugleniny ***Euglenophyta***	różne kolory	mikroskopijne – jednokomórkowe	*Euglena* *Colacium*
Różnowiciowce ***Xanthophyta***	żółtozielony	mikroskopijne – jednokomórkowe lub nitkowate	*Ophiocytium* *Vaucheria*
Bruzdnice ***Dinophyta***	czerwonobrązowy	mikroskopijne – jednokomórkowe	*Ceratium* *Peridinium*
Kryptomonady ***Cryptophyta***	różne kolory	mikroskopijne – jednokomórkowe	*Rhodomonas* *Cryptomonas*
Chryzofity ***Chrysophyta***	złoty brąz	mikroskopijne – jednokomórkowe lub kolonijne	*Mallomonas* *Dinobryon*
Okrzemki ***Bacillariophyta***	złoty brąz	mikroskopijne – jednokomórkowe lub nitkowate, kolonijne	*Stephanodiscus* *Aulacoseira*
Krasnorosty ***Rhodophyta***	czerwony	mikroskopijne lub widoczne – jednokomórkowe lub kolonijne	*Batrachospermum* *Bangia*
Brunatnice ***Phaeophyta***	brązowy	widoczne – wielokomórkowe plechy	*Pleurocladia* *Heribaudiella*

Tabela 13. Charakterystyka fitoplanktonu występującego w wodach o zróżnicowanej trofii [423]

Trofia jeziora	Charakterystyka wód	Dominujące organizmy	Inne zwykle występujące glony i sinice
Oligotrofia	lekko kwaśne; bardzo niskie zasolenie	desmidia *Staurodesmus*, *Staurastrum*	*Sphaerocystis, Gloecystis, Rhizolenia, Tabellaria*
Oligotrofia	obojętne do lekko zasadowych; ubogie w nutrienty	okrzemki, szczególnie *Cyclotella* i *Tabellaria*	niektóre *Asterionalla* spp., niektóre *Melosira* spp.
Oligotrofia	obojętne do lekko zasadowych; ubogie w nutrienty, czyli bardziej produktywne z okresową redukcją zawartości nutrientów	glony złociste, w szczególności *Dinobryon*, niektóre *Mallomonas*	inne chryzofity, np. *Synura*, *Uroglena*; okrzemka *Tabellaria*
Oligotrofia	obojętne do lekko zasadowych; ubogie w nutrienty	chlorokokowate *Oocystis* lub chryzofitowe *Botrycococcus*	okrzemki oligotroficzne
Oligotrofia	obojętne do lekko zasadowych; generalnie ubogie w nutrienty; powszechne wśród płytkich jezior arktycznych	bruzdnice, szczególnie niektóre *Peridinium* i *Ceratium* spp.	małe chryzofity, kryptofity i okrzemki
Mezotrofia lub eutrofia	obojętne do lekko zasadowych; panuje cały rok lub w niektórych okresach w jeziorach eutroficznych	bruzdnice, niektóre *Peridinium* i *Ceratium* spp.	*Glenodinium* i wiele innych glonów
Eutrofia	zwykle alkaliczne; jeziora wzbogacone w nutrienty	okrzemki, szczególnie *Asterionella* spp., *Fragilaria crotonensis*, *Synedra*, *Stephanodiscus* i *Melosira granutata*	liczne inne glony, szczególnie zielenice, sinice podczas ciepłych okresów roku; desmidia, jeżeli zawartość rozpuszczonej materii organicznej jest wystarczająco wysoka
Eutrofia	zwykle alkaliczne; wzbogacone w nutrienty; powszechne w cieplejszych okresach jezior strefy umiarkowanej lub trwale we wzbogaconych jeziorach tropikalnych	sinice, szczególnie *Anacystis* (= *Microcystis*), *Aphanizomenon*, *Anabena*	inne sinice; eugleniny, jeżeli występuje wzbogacenie w materię organiczną lub zanieczyszczenie

Tabela 14. Zakresy produkcji pierwotnej fitoplanktonu jezior o zróżnicowanej trofii [208, 423]

Typ troficzny	Średnia produkcja pierwotna	Biomasa fitoplanktonu	Chlorofil *a*	Dominujący fitoplankton
	mg $C \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$	$mg \cdot m^{-3}$	$mg \cdot m^{-3}$	
Ultraoligotrofia	< 50	< 50	0,01-0,5	*Chrysophyceae*
Oligotrofia	50-300	20-100	0,3-3	*Cryptophyceae*
Mezotrofia	250-1000	100-300	2-15	*Dinophyceae, Bacillariophyceae*
Eutrofia	> 1000	> 300	10-500	*Bacillariophyceae, Cyanobacteria*
Hipertrofia	>> 1000	> 300	> 500	*Chlorophyceae, Euglenophyceae*
Dystrofia	< 50-500	< 50-200	0,1-100	*Conjugatophyceae*

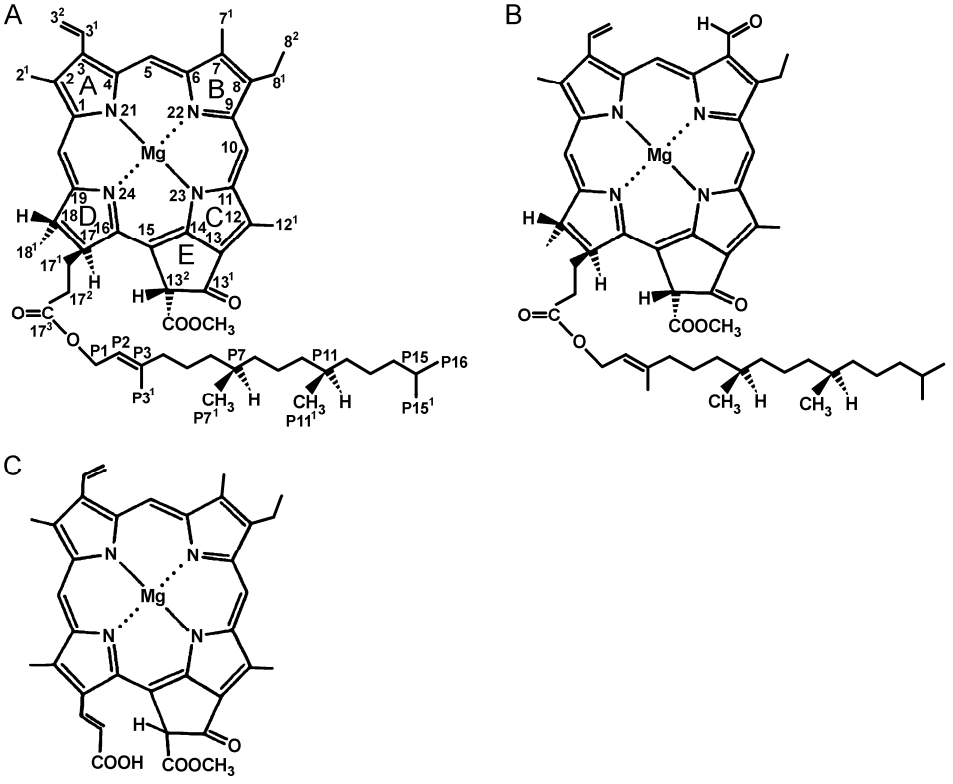
2. CHARAKTERYSTYKA BARWNKÓW

2.1. CHLOROFILE

Wszystkie fotosyntetyzujące glony, sinice i rośliny wyższe zawierają w chloroplastach jeden lub więcej typów chlorofilu jako część kompleksów zbierających światło. Na rysunku 4A przedstawiono strukturę oraz system numeracji dla chlorofilu *a* (Chl *a*) z czterema pierścieniami (A-D) makropierścienia tetrapirolowego, z cyklopentanonowym pierścieniem (E) połączonym z pierścieniem C i z bocznym łańcuchem w postaci kwasu propanowego przy C-17, zestryfikowanego fitolem (alkoholem C_{20}). Centralny atom magnezu jest związany z atomami azotu pierścieni pirolowych [350, 366].

Różne rodzaje chlorofili różnią się od siebie stopniem utlenienia makropierścienia, typem łańcuchów bocznych i, jeżeli jest obecny, typem estryfikującego alkoholu. Makropierścień może być porfiryną z pierścieniami A-D całkowicie nienasyconymi – rodzina chlorofili *c*, *a* chloryną (17,18-dihydoporfiryną) ze zredukowanym pierścieniem D – chlorofile *a*, *b* i *d* lub bakteriochloryną *a* (7,8,17,18-tertahydoporfiryną) ze zredukowanymi pierścieniami B i C – bakteriochlorofile *a*, *b* i *g* [350]. Chlorofil *b* (rys. 4B) w odróżnieniu od chlorofilu *a* w pozycji C-7 pierścienia B zamiast grupy metylowej ma grupę aldehydową. Wpływa to na jego właściwości spektrometryczne, zwiększa także jego polarność i stabilność. W formach diwinylowych chlorofili *a* i *b* grupa etylowa przy C-8 jest zastąpiona drugą grupą winylową (w formach monowinylowych grupa winylowa występuje przy węglu C-3). W fitoplanktonie zidentyfikowano dziewięć rodzajów chlorofilu *c*, występujących głównie w gromadzie ***Haptophyta*** [446]. Podstawową cechą odróżniającą chlorofile *c* (rys. 4C) od chlorofilu *a* jest obecność kwasu akrylowego, a nie propanowego przy węglu 17. w pierścieniu D, z wyjątkiem chlorofilu $c_{CS\text{-}170}$, w którym pozostał kwas propanowy. W chlorofilach *a* i *b* grupa karboksylowa jest zestryfikowana fitolem, natomiast w grupie chlorofili *c* pozostaje zwykle niezestryfikowana [366]. W tabeli 15 przedstawiono właściwości głównych typów chlorofilu [194].

Liczne pochodne chlorofilu znajdowane są zarówno naturalnie, jak i jako artefakty powstałe podczas ekstrakcji poprzez modyfikację cząsteczki chlorofilu. Należą do nich: feofityny (-Mg), chlorofilidy (-fityl), feoforbidy (-Mg-fityl), piropochodne (-grupa $COOCH_3$ przy C-13^2) (rys. 5), epimery (reorganizacja przy C-13^2) i allomery (utlenianie) [184, 313, 350].

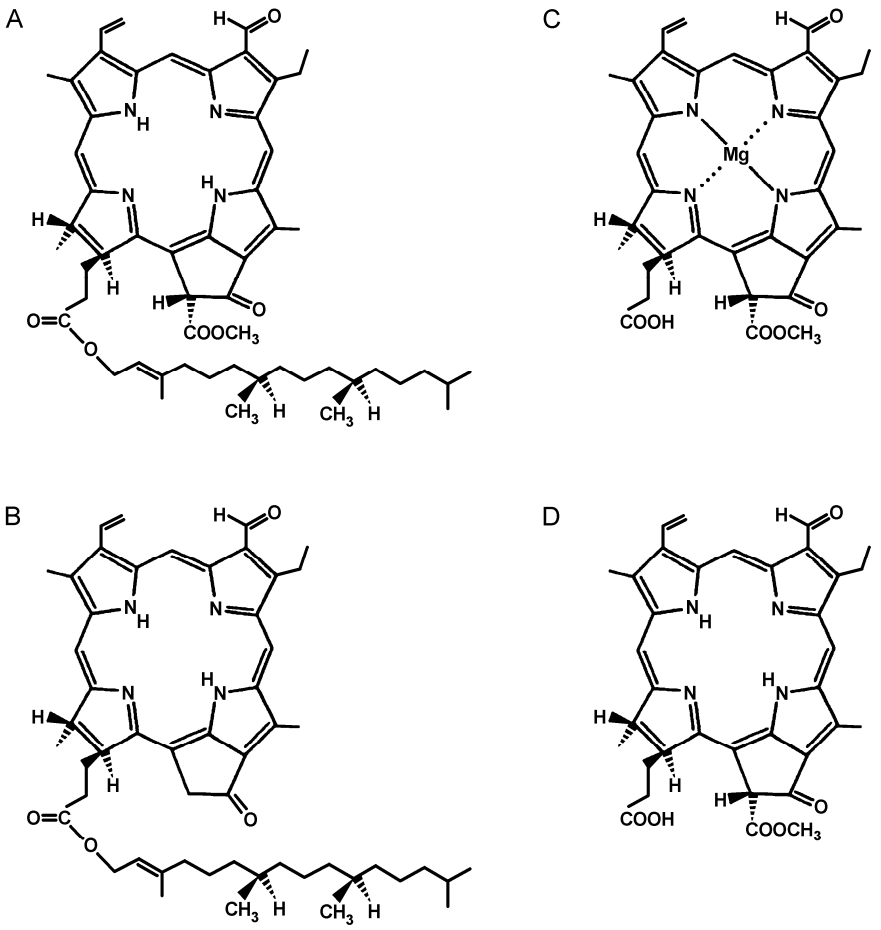


Rys. 4. Wzory strukturalne chlorofilu *a* (A), *b* (B) i c_1 (C) [193]

Tabela 15. Zestawienie właściwości podstawowych rodzajów chlorofilu [194]

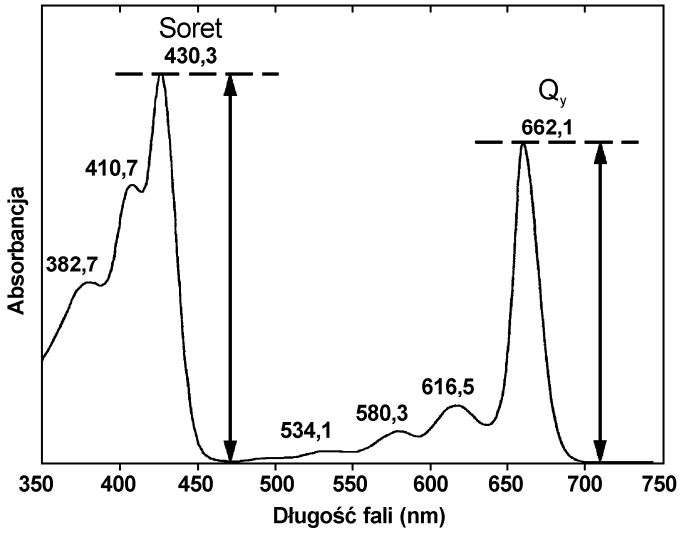
Nazwa	Skrót według SCOR*	Wzór chemiczny	Masa cząsteczkowa	Główne maksima absorpcji**
Chlorofil *a*	Chl *a*	$C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$	893,50	430,3; 662,1
Chlorofil *b*	Chl *b*	$C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$	907,49	456,9; 645,5
Chlorofil c_1	Chl c_1	$C_{35}H_{30}N_4O_5Mg$	610,95	446,1; 629,1
Chlorofil c_2	Chl c_2	$C_{35}H_{28}N_4O_5Mg$	608,94	444,6; 629,6
Chlorofil c_3	Chl c_3	$C_{36}H_{28}N_4O_7Mg$	652,95	452,1; 626,3
Chlorofil *d****	–	$C_{54}H_{70}N_4O_6Mg$	895,48	445,0; 693,0

* SCOR – Scientific Committee on Oceanic Research
** w 100% acetonie
*** Jensen i Aasmundrud 1963 [200]



Rys. 5. Wzory pochodnych chlorofilu *a* – feofityna *a* (A), pirofeofityna *a* (B), chlorofilid *a* (C), feoforbid *a* (D) [193]

Chlorofile charakteryzują się występowaniem w widmach absorpcyjnych dwóch głównych pasm (rys. 6): w zakresie światła niebieskiego (pasmo Soret – N) oraz światła czerwonego (Q_y – C). Wartość stosunku intensywności tych pasm (N/C) jest charakterystyczna dla danego związku i uzależniona od stosowanego rozpuszczalnika; dla chlorofilu *a* wartości te wahają się od 0,96 w metanolu do 1,30 w eterze dietylowym [193, 197]. W tabeli 16 przedstawiono wartości stosunku N/C dla chlorofilu i jego pochodnych [334]. Chlorofile i ich pochodne wykazują także właściwości fluorescencyjne. Pochłaniając światło w zakresie światła niebieskiego, emitują światło czerwone. W tabeli 17 przedstawiono maksima fluorescencji dla chlorofili i ich pochodnych. Zjawisko to jest wykorzystywane w analizie chromatograficznej barwników z zastosowaniem detektora fluorescencyjnego.



Rys. 6. Przebieg widma chlorofilu *a* [371]

Tabela 16. Maksima absorpcji oraz wartość stosunku absorbancji dla pasm niebieskiego i czerwonego (N/C) [334]

Barwnik	Rozpuszczalnik	Maksima absorpcji, nm		Wartość N/C
		niebieskie (N)	czerwone (C)	
1	2	3	4	5
Chlorofil *a*	eter dietylowy	427,5	660	1,32
		430	660	1,21
		430	662	1,30
		428,9	662	1,34
	aceton (100%)	430	660	1,26
		–	–	1,59
		–	662	–
		–	663	–
		430,2	662,0	–
	aceton (90%)	–	663	–
		–	665	–
		–	665	–
		432	664	–
		430	662	–
	aceton (80%)	430	663	1,11
		–	664	–
		433	665	1,21
	metanol (100%)	432,5	665	1,21
Chlorofil *b*	eter dietylowy	452,5	642,5	2,82
		455	642,5	2,74
		455	644	2,82
		453	642	2,92
		453	642,5	2,77
	aceton (100%)	455	645	2,84

cd. tabeli 16

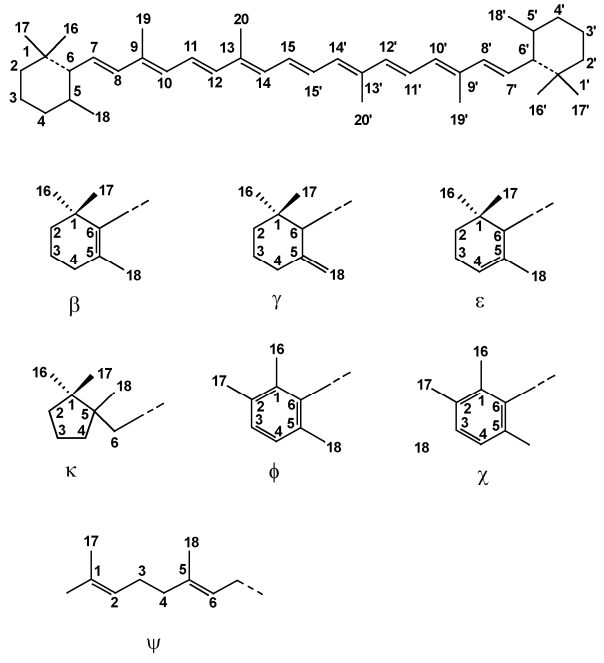
1	2	3	4	5
Chlorofil *b*	aceton (90%)	–	646	–
		–	648	3,05
	aceton (80%)	460	645	2,66
		460	648,5	3,05
	metanol (100%)	475	650	2,81
Chlorofil c_1	eter dietylowy	444,5-445,8	627,8-628,2	9,93-10,21
		438	625	8,7
	aceton (100%)	442,2-443,5	629,8-630,5	6,71
		–	629,1	8,89
	aceton (90%)	–	630,6	7,11
		442	629	7,3
Chlorofil c_2	eter dietylowy	448,2-449,4	628,2-629,4	13,4-15,2
		451,5	624,5	11,25
		445	628	9,3
	aceton (100%)	444,2-444,7	630,1-630,6	9,64
		–	629,6	8,69
	aceton (90%)	–	630,9	9,25
		450	629	8,8
	metanol (100%)	451,1-453,3	634,8-635,0	9,32-9,99
		451	633	9,4
	tetrahydrofuran	457,2	634,8	14,70
	pirydyna	466,0	641,6	14,45
	dioksan	454,2	631,4	14,37
Chlorofil c_3	eter dietylowy	451,3	625,9	32,1
		451,3-451,5	623,9-624,5	–
	aceton (100%)	451,7	626,7	30,77
Chlorofil *d*	eter dietylowy	447	688	0,89
		445	686	0,88
	aceton (100%)	445	693	1,01
Feofityna *a*	eter dietylowy	410	665	2,14
		408,5	667	2,07
		408	669	2,03
	aceton (80%)	410	663	2,62
		409	666,5	2,30
Feoforbid *a*	eter dietylowy	408,5	667	2,01
Feofityna *b*	eter dietylowy	433	653	5,35
		434	655	5,08
	aceton (100%)	433	657	5,88
	aceton (80%)	436	655	5,07
Feoforbid *b*	eter dietylowy	432	654	4,79
Feofityna c_1	eter dietylowy	421	568	11,3
Feofityna c_2	eter dietylowy	432	572	12,3
	aceton (90%)	431	574/596	13,0

Tabela 17. Maksima emisji fluorescencyjnej chlorofili i ich pochodnych [334]

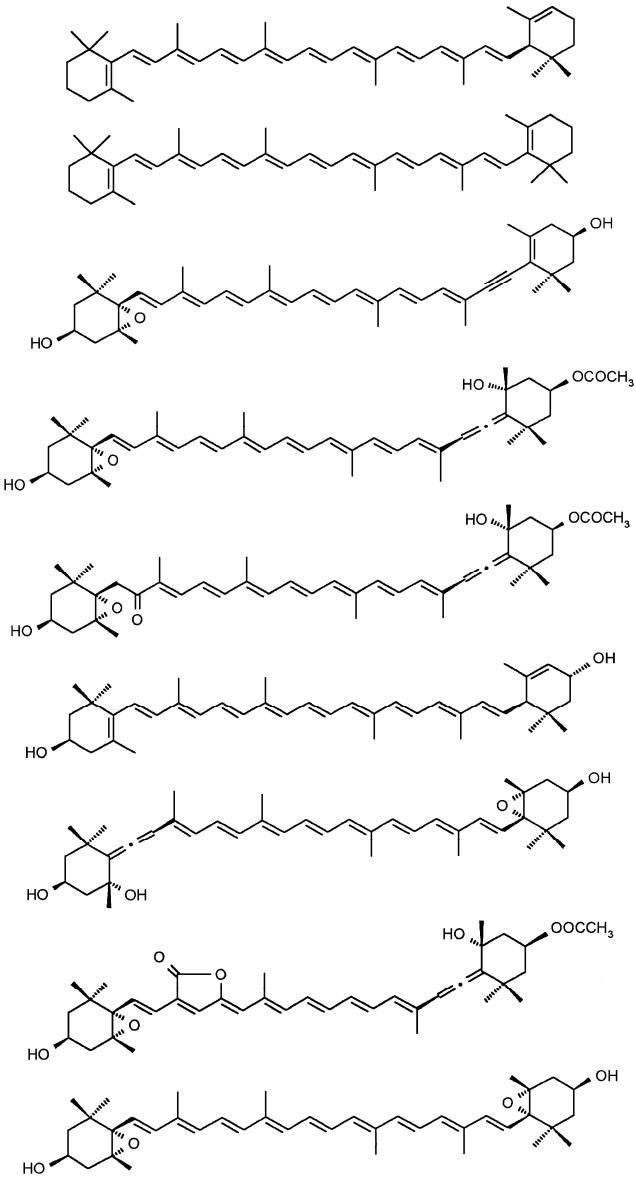
Barwnik	Rozpuszczalnik	Wzbudzenie, nm	Emisja, nm
Chlorofil *a*	aceton (100%)	430	668
	aceton (90%)	435	667
		437	676
	aceton (80%)	432	674
	eter dietylowy	430	668
		420	669
	metanol	–	674
Chlorofil *b*	aceton (100%)	459	652
	aceton (90%)	470	651
		467	659
	aceton (80%)	466	659
	eter dietylowy	453	648
		454	649
Chlorofil c_1	aceton (100%)	450	633
	eter dietylowy	443	632
Chlorofil c_2	aceton (100%)	453	635
	eter dietylowy	446	632
	etanol	450	638
	eter dietylowy	445	693
		447	696
		447	695
	aceton (100%)	–	700
	aceton (80%)	–	704
	metanol (100%)	–	714
	etanol (100%)	–	715
	etanol (80%)	–	713
	benzyna lakowa	–	688
	pirydyna	–	708
	dioksan	–	693
Feofityna *a*	aceton (90%)	–	673
		390	667
		420	672
	aceton (80%)	398	676
	eter dietylowy	409	673
		400	673
Feofityna *b*	aceton (90%)	435	657
		442	666
	aceton (80%)	398	676
	eter dietylowy	434	661
		–	661
		416	661
Feofityna *d*	eter dietylowy	–	701

2.2. KAROTENOIDY

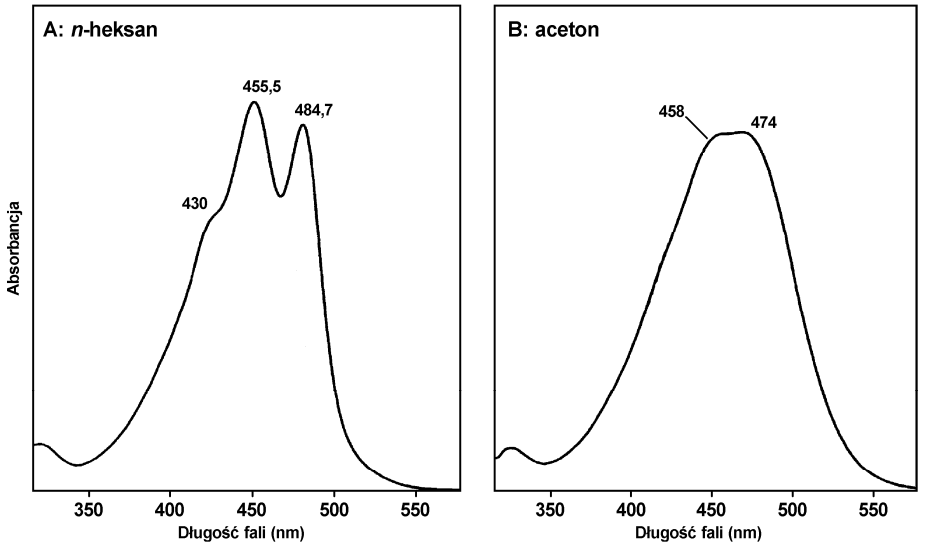
Obok chlorofili w komórkach organizmów fotosyntetyzujących występują także barwniki określane jako pomocnicze. Pierwszą ich grupę stanowią karotenoidy. Są to pochodne izoprenu i można wśród nich wyróżnić pomarańczowoczerwone węglowodorowe karoteny i żółtopomarańczowe zawierające tlen ksantofile. W większości tych związków znajdują się dwa pierścienie jononowe połączone łańcuchem węglowodorowym, w którym występują na przemian wiązania podwójne i pojedyncze, tworząc układ wiązań sprzężonych. System numeracji oraz typy grup końcowych karotenoidów przedstawiono na rysunku 7, natomiast wzory przykładowych karotenoidów – na rysunku 8. Do charakterystyki karotenoidów stosuje się określenia epifazowe i hipofazowe. Wynika to z podziału wyekstrahowanych karotenoidów między eter naftowy a 90% metanol. Karotenoidy zawierające dwie lub więcej grup hydroksylowych podczas podziału przechodzą do metanolu i są nazywane hipofazowymi, natomiast karotenoidy pozbawione grup hydroksylowych rozpuszczają się w eterze naftowym i są określane epifazowymi. Związki z jedną grupą hydroksylową wykazują właściwości pośrednie [118]. Widma absorpcyjne karotenoidów charakteryzują się występowaniem zróżnicowanej ilości pików. Przebieg widm oraz długości fal, przy których występują charakterystyczne maksima absorpcji (rys. 9, 10), uzależnione są od zastosowanego rozpuszczalnika. Parametrem opisującym ich przebieg jest wartość stosunku intensywności pików III i II wyrażona jako %III:II (rys. 11) [210] (tab. 18). Utlenianie, niska bądź wysoka wartość pH, światło i ciepło lub kombinacja tych czynników mogą powodować zmiany we właściwościach karotenoidów podczas ekstrakcji, zatem wartość parametru %III:II może posłużyć do określenia stopnia ich degradacji [52, 254, 255].



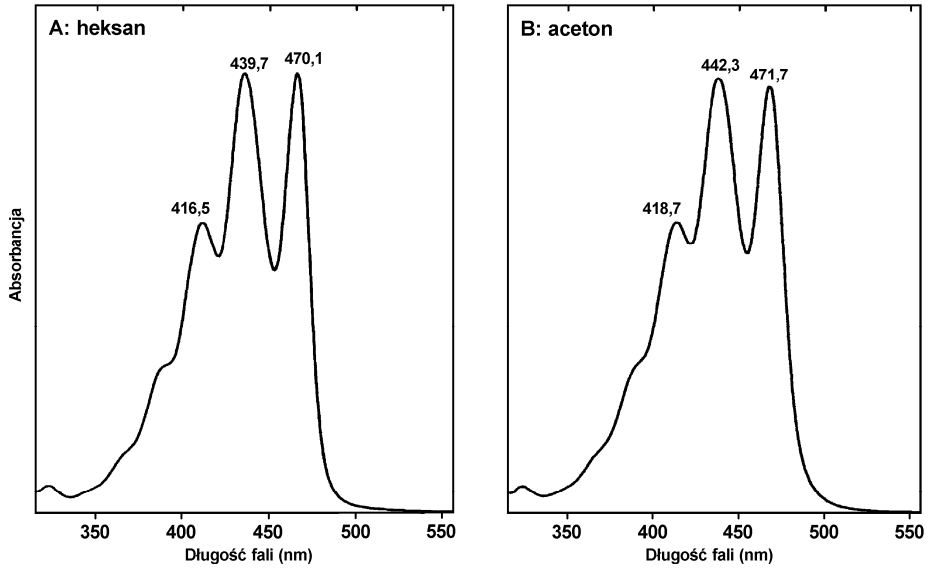
Rys. 7. Schemat numeracji i grupy końcowe karotenoidów [53]



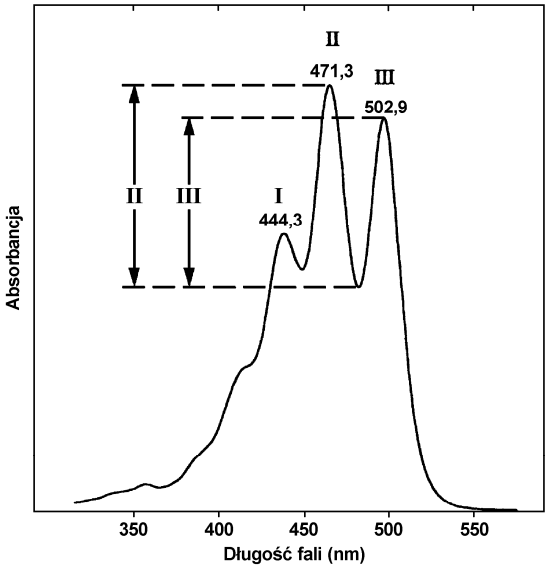
Rys. 8. Wzory strukturalne wybranych karotenoidów [53]



Rys. 9. Przebieg widma peridininy [193]



Rys. 10. Przebieg widma wiolaksantyny [193]



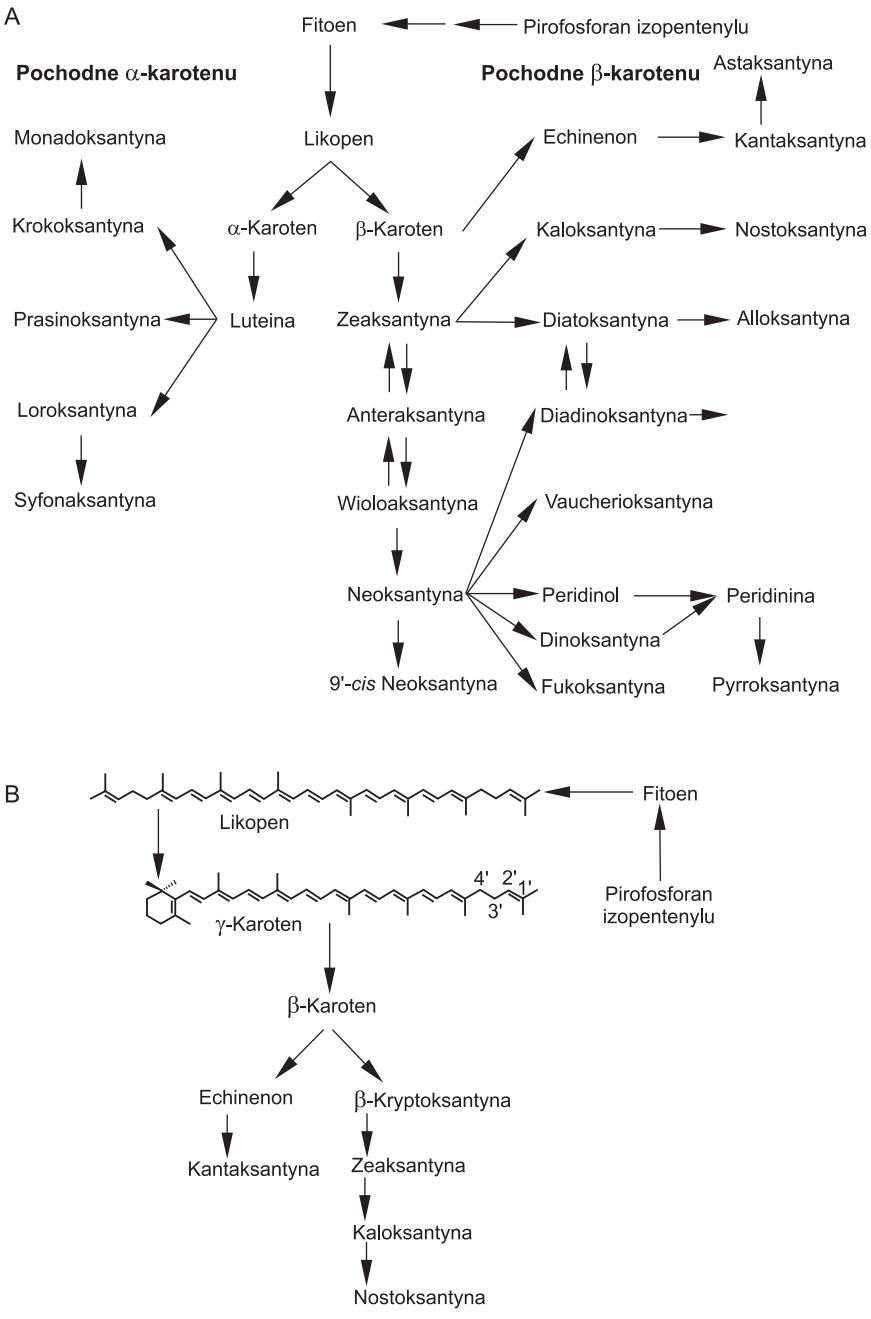
Rys. 11. Przebieg widma likopenu [210]

Tabela 18. Zestawienie wartości %III:II dla różnych rozpuszczalników [193]

Barwnik	Rozpuszczalnik			
	aceton	heksan	metanol	etanol
α-karoten	53	62	–	–
β-karoten	21	36	–	–
Diadinoksantyna	61-63	57	54	67
Diatoksantyna	35-42	31	–	–
Fukoksantyna	3-4	–	–	0
Luteina	67	76	–	62
Neoksantyna	83-90	94-97	–	–
Peridinina	0	75-85	–	0
Wiolaksantyna	76-95	100	–	93-96

W 1979 roku odnotowano około 450 naturalnie występujących karotenoidów, a obecnie zidentyfikowano już ponad 750 karotenoidów u roślin lądowych, bakterii, sinic, grzybów i zwierząt [53, 374, 401]. Organizmy te (z wyjątkiem zwierząt) mogą syntetyzować wiele rodzajów karotenoidów w procesie zróżnicowanej karotenogenezy. Karotenoidy i drogi karotenogenezy mogą być wykorzystywane jako markery chemotaksonomiczne [43, 195, 252, 253, 267, 334]. Na rysunku 12 przedstawiono drogi biosyntezy karotenoidów u tlenowych fototrofów i sinic [395].

Karotenoidy wchodzą w skład systemów zbierających światło, absorbując światło niebieskie i zielone (420-550 nm) (diadinoksantyna i diatoksantyna u ***Chromophyta*** oraz wiolaksantyna, anteraksantyna i zeaksanyna u ***Chlorophyta***). Glony są bardzo zasobne w karotenoidy i według danych literaturowych ich zawartość w suchej masie może wynosić u euglenin – 0,44%, okrzemek – 0,58%, zielenic – 0,64% i złotowiciowców – 1,67% [86]. Podział karotenoidów oraz ich występowanie u glonów i sinic przedstawiono w tabeli 19 [417].



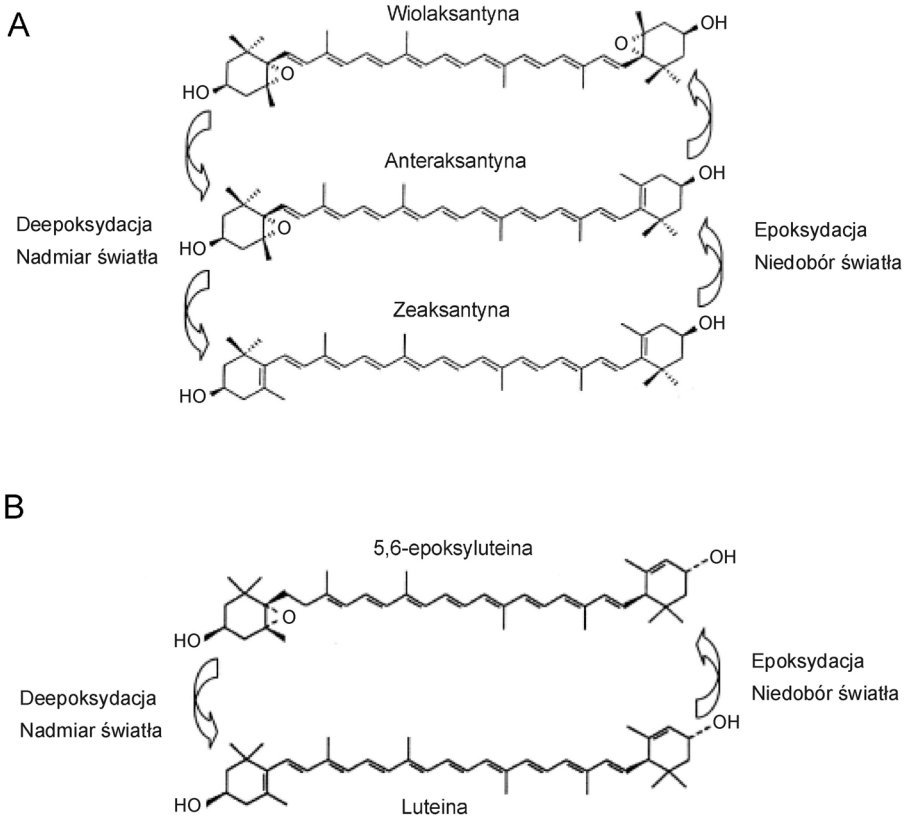
Rys. 12. Drogi karotenogenezy u fototrofów (A) i sinic (B) [395]

Tabela 19. Podział karotenoidów pod względem chemicznym i ich występowanie u glonów i sinic [417]

Typ karotenoidu	Przykładowe karotenoidy	Występowanie
Glikozydowe	miksoksantofil	***Cyanobacteria***
Acykliczne	fitoen fitofluen	*Dinophyceae*
	likopen	*Chlorophyceae*
Monocykliczne	γ-karoten	***Cyanobacteria***, *Dinophyceae, Chlorophyceae*
Bicykliczne	α-karoten	*Chrysophyceae, Chlorophyceae, Cryptophyceae*
	β-karoten	***Cyanobacteria***, *Chrysophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae, Phaeophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae, Rhodophyceae, Chlorophyceae, Conjugatophyceae, Charophyceae, Chloromonadophyceae*
	ε-karoten	*Euglenophyceae*
Acetylenowe	diatoksantyna diadinoksantyna	*Xanthophyceae, Bacillariophyceae, Phaeophyceae, Euglenophyceae*
	alloksantyna	*Cryptophyceae*
Epoksydowe	anteraksantyna	*Xanthophyceae, Rhodophyceae, Chlorophyceae, Conjugatophyceae, Charophyceae*
	wiolaksantyna	*Xanthophyceae, Phaeophyceae, Rhodophyceae, Chlorophyceae, Conjugatophyceae, Charophyceae*
Ketonowe	β-karoten	*Chlorophyceae*
	echinenon	***Cyanobacteria***, *Chlorophyceae*
	kantaksantyna	***Cyanobacteria***, *Chlorophyceae*
Allenowe	neoksantyna	***Cyanobacteria***, *Xanthophyceae, Chlorophyceae, Conjugatophyceae, Charophyceae, Euglenophyceae*
	fukoksantyna	*Chrysophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae, Phaeophyceae, Dinophyceae, Rhodophyceae*
	peridinina	*Dinophyceae*
Hydroksy	zeaksanyna	*Rhodophyceae, Chlorophyceae, Conjugatophyceae, Charophyceae, Euglenophyceae*
	luteina	*Chlorophyceae, Conjugatophyceae, Charophyceae*

Niektóre z tych barwników pełnią funkcję ochronną przed procesami fotooksydacji. Jeżeli wzbudzony stan singletowy cząsteczki chlorofilu nie zostanie wykorzystany do przeprowadzenia reakcji fotochemicznej, to ulega przemianie do stosunkowo długo żyjącego stanu typletowego, który może generować powstawanie bardzo reaktywnej formy tlenu – tlenu singletowego. Ochronna rola karotenoidów polega na przejmowaniu energii stanu trypletowego chlorofilu i jego dezaktywacji termicznej, co zapobiega powstawaniu tlenu singletowego. Szczególne znaczenie w ochronie aparatu fotosyntetycznego przed nadmiarem energii ma zeaksantyna, tworząca się w silnym świetle z wiolaksantyny w wyniku reakcji cyklu ksantofilowego. Polega on na odwracalnej przemianie wiolaksantyny przez anteraksantynę w zeaksantynę [17, 219, 366].

Sapozhnikov i współ. [346] jako pierwsi stwierdzili znaczne zmniejszenie się zawartości wiolaksantyny w liściach różnych roślin pod wpływem intensywnego światła. Yamamoto i współ. [441] powiązali ten spadek zawartości wiolaksantyny ze wzrostem zawartości anteraksantyny i zeaksantyny. Następnie Hager [149] oraz Yamamoto i współ. [440] dowiedli, że pula wiolaksantyny zostaje odtworzona z zeaksantyny w ciemności lub przy niskiej intensywności światła, co potwierdza wewnętrzne przemiany barwników w cyklu nazywanym ksantofilowym (rys. 13A, tab. 20).



Rys. 13. Przebieg zależnych od światła cykli: ksantofilowego (A) i 5,6-epoksyluteiny (B) [310]

Tabela 20. Występowanie różnych typów cyklu ksantofilowego u organizmów fotoautotroficznych [61, 123, 362, 384]

Cykl wiolaksantyny	Cykl diadinoksantyny	Cykl epoksyluteiny	Cykl ksantofilowy nie występuje
Rośliny wyższe	*Bacillariophyceae*	*Cuscuta reflexa*	***Cyanobacteria***
Paprocie	*Chrysophyceae*	*Amyema miquelli*	Bakterie fotosyntetyzujące
Mchy	*Xanthophyceae*	*Quercus sp.*	Większość ***Rhodophyta***
Phaeophyta	***Rhaphidophyta***	*Inga sp.*	***Cryptophyta***
Chlorophyta	***Dinophyceaa***	– –	– –
Niektóre ***Rhodophyta***	***Euglenophyta***	– –	– –

Cykl ten występuje nie tylko u roślin wyższych, paproci, mchów czy porostów [97], ale także u glonów [150, 362], u których obserwowano różne efekty w zależności od występujących barwników. Zarówno u ***Chlorophyta*** (zielenic), jak i u ***Phaeophyta*** (brunatnic) zachodzi cykl podobny do występującego u roślin wyższych. U niektórych ***Rhodophyta*** (krasnorostów), które są pozbawione wiolaksantyny, występuje częściowy cykl ograniczony do przemiany anteraksantyna – zeaksantyna. Czasami zeaksantyna jest jedynym obecnym barwnikiem cyklu i przemiana barwników nie następuje, np. sinice takie jak *Spirulina* są bogate w zeaksantynę, która stanowi ponad 40% zawartych w ich składzie karotenoidów, ale nie stwierdzono u nich występowania żadnej formy cyklu ksantofilowego, natomiast u *Cryptomonas rufesnes* nie ma żadenego z barwników cyklu ksantofilowego [328, 329, 366]. U niektórych glonów może zachodzić cykl diadinoksantyny, w którym w 1-stopniowej reakcji diadinoksantyna jest przekształcana w diatoksantynę [384]. Wariantem cyklu ksantofilowego jest cykl, w którym deepoksydacji ulega 5,6-epoksyluteina (rys. 13B) [61, 123, 191].

2.3. FIKOBILINY

Drugą grupę barwników pomocniczych stanowią występujące u sinic, kryptofitów i krasnorostów fikobiliny (tab. 21). Zbudowane są z 4 pierścieni pirolowych połączonych w układ liniowy i nie zawierają magnezu oraz fitolu (rys. 14). W odróżnieniu od chlorofili i karotenoidów są rozpuszczalne w wodzie. W połączeniu z białkami tworzą struktury antenowe zwane fikobilisomami, dostarczające energię wzbudzenia do chlorofili fotoukładu II. Znaczna większość wszystkich fikobiliprotein składa się z dwóch podjednostek polipeptydowych, z których jedna jest nieco mniejsza i oznaczana jako podjednostka α, natomiast druga – większa i określana jako β. U niektórych organizmów podjednostki α i β mogą mieć taką samą wielkość [83, 84].

Na podstawie właściwości absorpcyjnych można wyróżnić trzy typy fikobiliprotein – fikoerytryny, które absorbują światło przy 495 nm i 540-570 nm, fikocyjaniny z maksimum absorpcji przy 610-620 nm oraz allofikocyjaniny absorbujące światło w zakresie 650-655 nm. Ze względu na rozpuszczalność w wodzie i bardzo szybki rozkład po obumarciu komórek barwniki te nie występują w materiale detrytusowym [236, 334, 381].

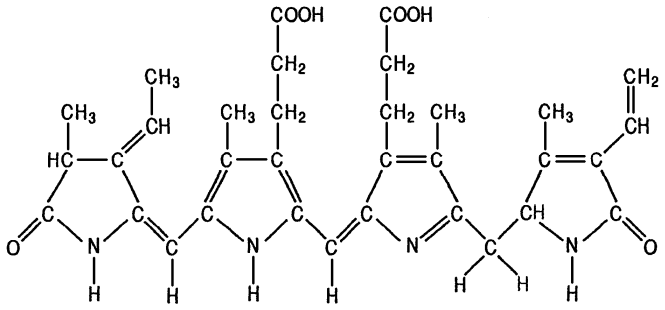
W tabeli 22 przedstawiono występowanie podstawowych barwników fotosyntetycznych u glonów [423].

Tabela 21. Maksima absorpcji najpospolitszych barwników fikobiliproteinowych i ich występowanie u glonów [83]

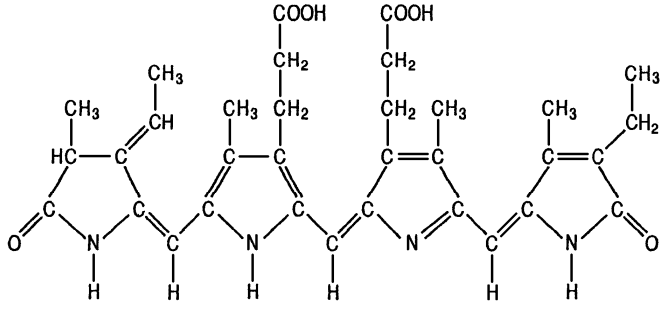
Rodzaj fikobiliproteiny	Maksima absorpcji wyciągów wodnych, nm	Występowanie
C-fikocyjanina	620	wszystkie gatunki sinic, niektóre gatunki krasnorostów
R-fikocyjanina	552, 617	szereg gatunków krasnorostów
Allofikocyjanina	652	wszystkie gatunki sinic i krasnorostów
Allofikocyjanina-B	671	sinice *Anabaena variabilis* i *Anacystis nidulans*
B-fikoerytryna	546, 565	krasnorosty z rodzaju *Bangiales* i *Rhodocorton*
b-fikoerytryna	546, 565	krasnorost *Porphyridium cruentum*
C-fikoerytryna	565	szereg gatunków sinic
R-fikoerytryna	497, 540, 565	krasnorosty z rodzaju *Porhyra* i inne gatunki
Fikoerytrocyjanina	568	sinice *Anabaena variabilis* i *A. sp.* 6411
Fikocyjanina-615	588, 615	kryptomonada *Hemiselmis virescens*
Fikocyjanina-630	588, 630	szereg gatunków kryptomonad
Fikocyjanina-645	583, 645	odmiany kryptomonady *H. virescens* (droop, millport)
Fikoerytryna-545	545	kryptomonady z rodzaju *Cryptomonas*, *Rhodomonas* i *Plagioselmis*
Fikoerytryna-555	555	kryptymonady z rodzaju *Hemiselmis*, *Chroomonas* i *Cryptochrysis*
Fikoerytryna-566	566	kryptymonady z rodzaju *Cryptomonas*

Tabela 22. Występowanie barwników fotosyntetycznych u glonów [423]

Barwniki		***Chloro-phyta***	*Xantho-phyceae*	*Chryso-phyceae*	*Bacillario-phyceae*	*Crypto-phyceae*	*Dino-phyceae*	*Euglено-phyceae*	*Phaeo-phyceae*	*Rodo-phyceae*
Chlorofile	chlorofil *a*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	chlorofil *b*	+	–	–	–	–	–	+	–	–
	chlorofil *c*	–	+	+	+	+	+	–	+	
	chlorofil *d*	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Karoteny	α-karoten	+	–	–	–	+	–	–	–	+
	β-karoten	+	+	+	+	–	+	+	+	+
	γ-karoten	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	ε-karoten	–	–	–	+	+	–	–	–	–
Ksantofile	luteina	+	–	+	–	–	–	–	+	+
	wiolaksantyna	+	+	–	–	–	–	–	+	+
	fukoksantyna	–	–	+	+	–	–	–	+	
	neoksantyna	+	+	–	–	–	–	+	–	–
	astaksantyna	+	–	–	–	–	–	+	–	–
	diatoksantyna	–	–	+	+	–	–	–	+	–
	diadinoksantyna	–	–	+	+	–	+	–	–	–
	peridinina	–	–	–	–	–	+	–	–	–
	dinoksantyna	–	–	–	–	–	+	–	–	–
	teraksantyna	–	–	–	–	–	–	–	–	+
	anteraksantyna	–	–	–	–	–	–	+	–	–
	echinenon	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Biliproteiny	fikocyjanina	–	–	–	–	+	–	–	–	+
	fikoerytryna	–	–	–	–	+	–	–	–	+



fikoerytryna

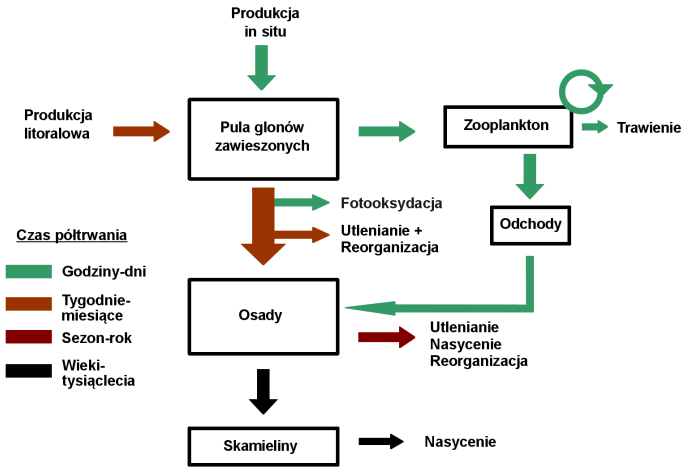


fikocyjanina

Rys. 14. Wzory strukturalne fikobilin [219]

3. PROCESY DEGRADACJI BARWNIKÓW

Ze względu na swoją budowę barwniki łatwo podlegają procesom degradacji. Procesy, na które składają się utlenienie chemiczne, degradacja powodowana przez bakterie i wyżeranie przez bezkręgowce oraz zmiany związane ze starzeniem się komórek, mogą przebiegać już w słupie wody, jak i po zdeponowaniu barwników w osadach. Miejscami szczególnie wrażliwymi na działanie mikroorganizmów są grupy funkcyjne i wiązania podwójne [68, 129, 175, 214, 238, 271, 274, 278, 419]. Zmiany zachodzące w barwnikach mogą trwać od kilku godzin do wieków. Szybkość procesów degradacyjnych zależy od wielu czynników, takich jak zakwaszenie, pochodzenie barwników, ilość światła, stężenie tlenu, głębokość wody czy intensywność wyjadania przez zooplankton, ale też od stabilności samych barwników (rys. 15) [16, 31, 56, 57, 68, 81, 89, 137, 143, 160, 215, 222, 226, 227, 231, 237, 239, 245, 289, 290, 344, 394].



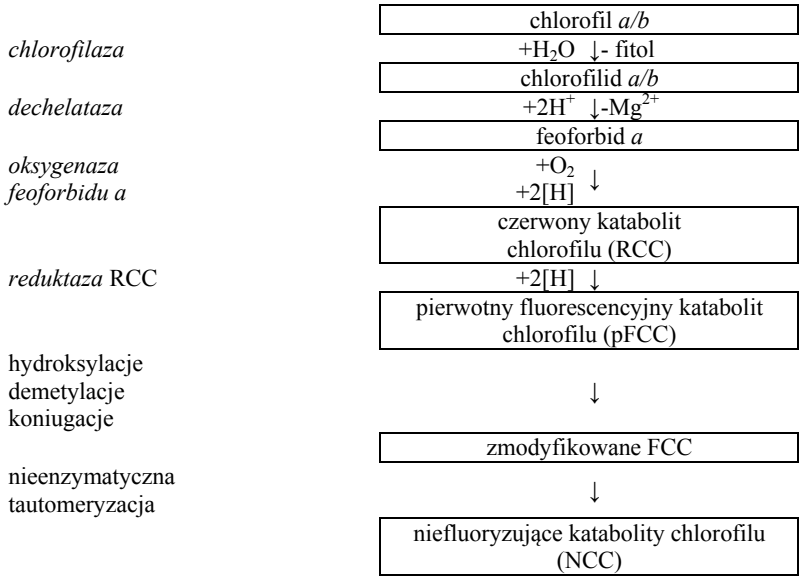
Rys. 15. Przepływ autochtonicznych karotenoidów i chlorofili pochodzenia glonowego w jeziorach słodkowodnych [238]

3.1. STARZENIE SIĘ KOMÓREK

Naturalnym procesem, podczas którego dochodzi do degradacji barwników, jest starzenie się i obumieranie komórek. Mechanizm degradacji karotenoidów w starzejących się komórkach roślin wyższych czy glonów nie został dokładnie ustalony. Zechmeister [448] stwierdził, że izomeryzacja *cis* barwników *trans* może zmniejszać ich stabilność w rozpuszczalnikach organicznych. *Cis*-izomery syntetyzowane są w rozkładających się lub przechowywanych tkankach roślinnych [367]. Powstawanie tych izomerów może wynikać z suszenia tkanek, nadmiaru ciepła, światła czy zakwaszenia. Obecność *cis*-karotenoidów stwierdzono również w osadach jeziornych. Biorąc pod uwagę łatwość detekcji związaną z ich wysokimi stężeniami, można je uznać za pierwszy etap w procesie degradacji karotenoidów. Ostatecznie degradacja do związków bezbarwnych (λ_{max} < 380 nm) wymaga zniszczenia systemu wiązań w taki sposób, aby

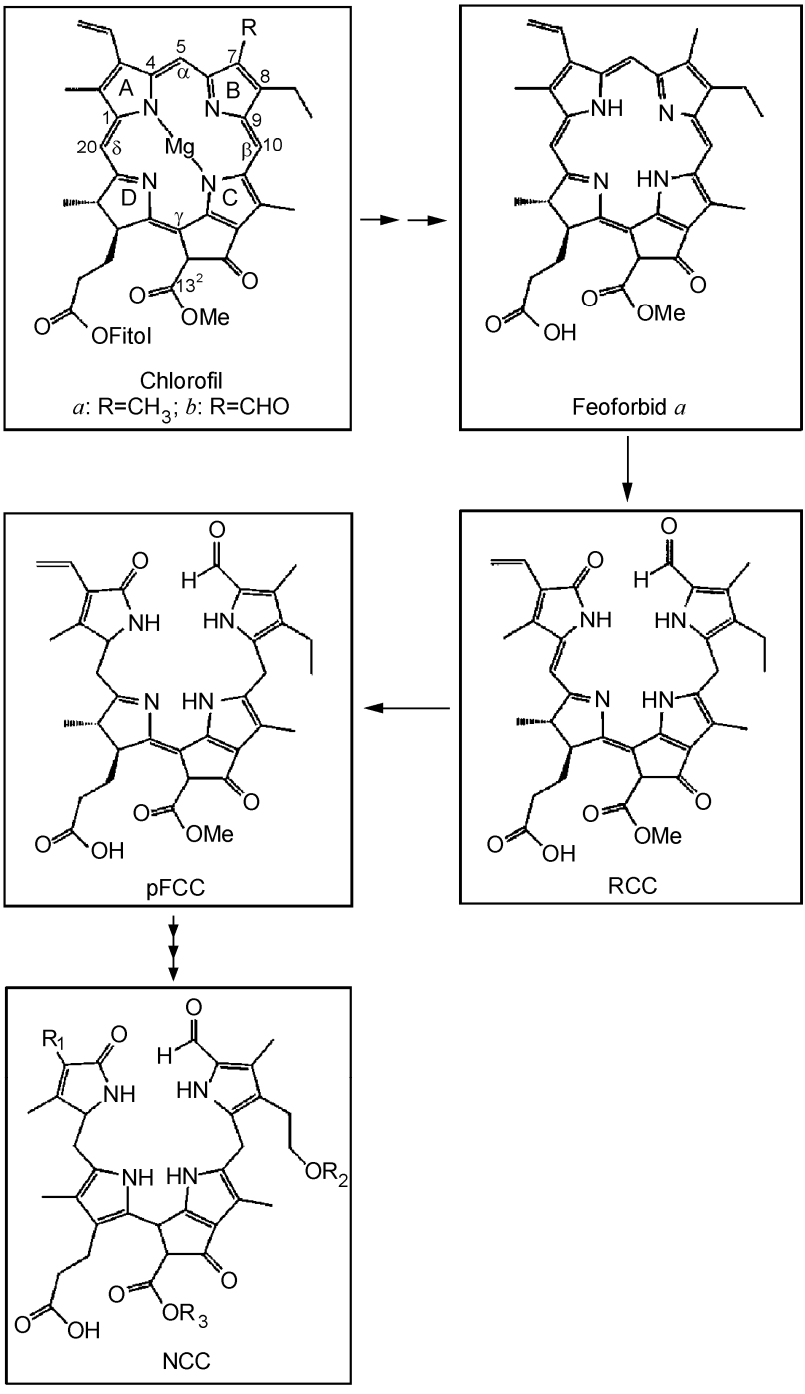
pozostało mniej niż siedem sprzężonych wiązań podwójnych [96]. Podczas starzenia się komórek roślin wyższych zawartość barwników zmniejsza się bardzo szybko. Liście roślin lądowych są w różny sposób wnoszone do ekosystemów wodnych. Przeprowadzone badania dowiodły, że barwniki w nich zawarte nawet w małych jeziorach ulegają degradacji przede wszystkim przed depozycją w osadach dennych [137, 138, 392].

Procesy rozkładu chlorofilu podczas starzenia się roślin wyższych zostały obszernie przedstawione w pracach Hörtensteinera [175] oraz Matilego i współ. [274]. Katabolizm chlorofilu, obejmujący przynajmniej sześć reakcji, badany był w starzejących się liściach i dojrzewających owocach bardzo wielu gatunków roślin [139, 169, 176-178, 351] (rys. 16). Pierwsze cztery reakcje odpowiedzialne są za przemianę chlorofilu w pierwotny fluorescencyjny katabolit (pFCC). Początkowo dzięki działaniu chlorofilazy odłączany jest fitol zarówno od chlorofilu *a*, jak i chlorofilu *b*. Powstający w tej reakcji chlorofilid *b* jest następnie redukowany w reakcjach z NADPH i ferredoksyną do chlorofilidu *a*, który zasila pulę chlorofilidu *a* pochodzącego od chlorofilu *a*. Potem przy udziale dechelatazy usuwany jest centralny atom magnezu z chlorofilidu; produkt tej reakcji – feoforbid *a* – jest ostatnim barwnym (zielonym) pośrednim katabolitem. W kolejnej, dwustopniowej reakcji makropierścień jest otwierany i przejściowo powstaje czerwony katabolit chlorofilu (RCC); końcowy produkt tej reakcji pFCC to fluorescencyjny liniowy tetrapirol. Dalsze reakcje obejmujące hydroksylację w pozycji C(8^2) związku pFCC oraz nieenzymatyczną tautomeryzację w pierścieniu D prowadzą do powstania różniących się budową niefluorescencyjnych katabolitów chlorofilu (NCC).



Rys. 16. Degradacja chlorofilu w starzejących się liściach [175]

Na rysunku 17 przedstawiono podstawowe produkty reakcji rozkładu chlorofilu. Czas półtrwania chlorofili w starzejących się liściach drzew liściastych wynosi od 7 do 15 dni. 90-98% wszystkich chlorofili jest już zdegradowanych, gdy liście opadają [56], natomiast barwniki obecne w makrofitach mogą być częściowo zachowywane w osadach jeziornych.



Rys. 17. Struktura pośrednich i końcowych katabolitów chlorofilu; podstawniki R_1, R_2, R_3 – zależnie od gatunku rośliny (R_1 – winyl, dihydroksyetyl, R_2 – wodór, malonyl, glukozyl, R_3 – wodór, metyl) [274]

Proces degradacji chlorofilu u glonów jest poznany znacznie słabiej niż u roślin wyższych. Podczas starzenia się glonów degradacja chlorofilu może zachodzić poprzez utratę atomów magnezu z makropierścienia (typ I degradacji [56]). Stwierdzono, że rozkład glonów prowadzi do szybkiej przemiany chlorofilu *a* ($+Mg^{2+}$) do feofityny *a* ($-Mg^{2+}$), jednak liza komórek nie jest wystarczającym czynnikiem do tego, aby zaszła konwersja chlorofilu *a* do feoforbidu *a* [89, 90]. Ustalono również, że degradacja chlorofilu *a* u obumierających okrzemek zachodzi głównie przez chlorofilid *a* do feoforbidu *a*. Degradacja chlorofilu do barwnych pochodnych w rozkładających się glonach wydaje się być katalizowana przez chlorofilazę i prawdopodobnie enzym umożliwiający usunięcie Mg^{2+} [298]. Mniej poznany jest mechanizm przekształcania chlorofili lub feobarwników do bezbarwnych związków w ciemności (II typ degradacji), który inaczej niż zniszczenie pierścienia porfirynowego wymaga przypuszczalnie tlenu cząsteczkowego [56, 163].

3.2. DEGRADACJA BARWNIKÓW W SŁUPIE WODY I OSADACH DENNYCH

Degradację barwników u glonów, głównego źródła barwników w środowiskach wodnych, cechuje trójetapowy przebieg. Najszybciej degradacja zachodzi podczas obumierania komórek oraz podczas opadania detrytusu, w tym czasie około 99% karotenoidów i chlorofili może zostać zdegradowanych [180]. Kolejny, wolniejszy już etap degradacji następuje po depozycji materiału na powierzchni osadu, a szybkość procesów zależy przede wszystkim od stopnia degradacji barwników w słupie wody, warunków chemicznych i występującej fauny [182, 321]. Trzeci etap degradacji zachodzi bardzo wolno i obejmuje procesy trwające nawet tysiąclecia, które powodują postępujące zmniejszanie się zawartości pochodnych karotenoidów i chlorofili [318, 416].

W latach czterdziestych ubiegłego stulecia w badaniach laboratoryjnych ustalono, że czynnikiem, który w decydujący sposób wpływa na degradację barwników, jest tlen. Fox i współ. [120] stwierdzili, że β-karoten obecny w wodorostach morskich nie podlegał degradacji podczas 180 dni inkubacji w wodzie morskiej pozbawionej tlenu, podczas gdy zmniejszała się zawartość materii cząsteczkowej. Cranwell [81] natomiast stwierdził, że β-karoten oraz echinenon ulegały degradacji o połowę wolniej w materii organicznej pochodzącej z sinic w warunkach beztlenowych, tymczasem w obecności tlenu tempo degradacji wzrastało dwukrotnie. Także Leavitt [237] zanotował niewielki ubytek karotenoidów obecnych u sinic po 37 tygodniach inkubacji w warunkach beztlenowych, podczas gdy w warunkach tlenowych zniszczeniu uległo do 62% karotenoidów. Jednak w przytoczonych badaniach Cranwella [81] oraz Leavitta [237] nie stwierdzono, że ubytek ksantofili znacznie przekraczał rozkład karotenów. Chociaż mechanizm działania tlenu nie został szczegółowo określony, to wykazano, że tlen może powodować straty karotenoidów zarówno przez bezpośrednie utlenianie sprzężonego chromoforu [367], jak i poprzez pobudzanie aktywności mikroorganizmów i roślinożerców [237, 388].

W zdrowych komórkach chlorofil zwykle jest dobrze chroniony przed negatywnym wpływem światła, niestety ochrona ta zanika już we wczesnej fazie starzenia się komórek. Zarówno chlorofile, jak i karotenoidy są szybko odbarwiane przez światło w obecności tlenu [226, 227]. Absorpcja światła przez chlorofile może skutkować wysoko reaktywnym, metastabilnym, wzbudzonym trypletowym stanem cząsteczki.

Trypletowo wzbudzony chlorofil może przechodzić reakcje redoks, które prowadzą do tworzenia rodników (np. anionorodnika ponadtlenkowego, reakcje 1-3 [17]), katalizujących niszczenie komórki, w tym utlenianie barwników. Alternatywnie wzbudzony chlorofil może oddziaływać z tlenem i tworzyć chlorofil w stanie podstawowym oraz tlen singletowy, który szybko reaguje z większością związków, zawierających wiązania podwójne (reakcje 4, 5 [17]).

$$U \rightarrow U^* \qquad \text{(reakcja 1)}$$

fotosensybilizator wzbudzony fotosensybilizator

$$U^* + SH \rightarrow HU^{\bullet} + S^{\bullet} \qquad \text{(reakcja 2)}$$

$$HU^{\bullet} + O_2 \rightarrow U + O^{\bullet}_2 + H^+ \qquad \text{(reakcja 3)}$$

$$^1U \rightarrow {}^3U^* \qquad \text{(reakcja 4)}$$

$$^3U^* + {}^3O_2 \rightarrow {}^1U + {}^1O_2 \qquad \text{(reakcja 5)}$$

$O^{\bullet}_2$ – anionorodnik ponadtlenkowy
$^1O_2$ – tlen singletowy

Karotenoidy są szybko odbarwiane przez dołączenie tlenu do łańcucha polienowego [17, 228], następnie odbarwiane są chlorofile. Fotoutlenianie barwników jest zależne od temperatury, a współczynnik temperaturowy (Q_{10}) tej reakcji waha się od 1,26 do 1,8 [198, 375]. Charakterystyka zabarwionych na czerwono produktów pośrednich wskazuje, że degradacja chlorofilu rozpoczyna się od rozszczepienia mostków metinowych w cząsteczce hemu, podczas gdy atom Mg^{2+} i fitol zostają zachowane [199], jednak szczegółowe mechanizmy degradacji chlorofilu nie zostały jeszcze dokładnie poznane [163].

Ogólnie wydaje się, że fotooksydacja jest najważniejszym procesem degradacji barwników w sedymentującym materiale detrytusowym. Według SooHoo i Kiefera [374] niskie zawartości feobarwników w powierzchniowych wodach morskich wynikają z fotooksydacji barwników w małych, wolno opadających cząstkach. Oczywiście szybkość procesu fotooksydacji zależy od składu gatunkowego planktonu, obecności kwasów huminowych i innych związków absorbujących światło. W wielu przypadkach czas wymagany do odbarwienia jest krótszy niż czas potrzebny do opadnięcia związanych z detrytusem barwników do strefy pozbawionej światła. Dlatego osadowe barwniki mogą pochodzić głównie z szybko tonącego materiału lub z położonej głębiej części strefy fotycznej [68, 242, 419]. Przeprowadzone przez Carpentera i współ. [68] badania nad tempem fotooksydacji dowiodły, że degradacja chlorofili *a* i *a′* (epimer) związanych z detrytusem zachodzi znacznie szybciej w porównaniu z feobarwnikami (feofityną *a* i feoforbidem *a*) (tab. 23).

Uzyskane wartości średnie wynosiły k = 0,0665 dla chlorofili *a* i *a′* i k = 0,0235 dla feobarwników. Szybkość fotodegradacji można określić w procentach na dzień oraz czasach półtrwania barwników w dniach. Średnia dzienna fotodegradacja dla chlorofilu *a′* wynosiła 75±3% i 40±2% dla feobarwników, natomiast średnie czasy półtrwania wynosiły odpowiednio 0,52±0,05 dla chlorofilu *a′* i 1,5±0,1 dnia dla feobarwników. Nie ulega wątpliwości, że barwniki związane z detrytusem zawieszonym w epilimnionie dłużej niż kilka dni będą silniej zdegradowane i ich udział w puli barwników zawartych w osadach będzie niewielki.

Tabela 23. Wartości stałych fotodegradacji barwników [68]

Barwnik	Stałe fotodegradacji
	$m^2 \cdot Einst^{-1}$
Chlorofil *a*	0,0307; 0,0959 jeziora Peter i Paul, odpowiednio
Chlorofil *a′*	0,0572; 0,0716 jeziora Peter i Paul, odpowiednio
Feofityna *a*	0,0107; 0,0250 jeziora Peter i Tuesday, odpowiednio
Feoforbid *a*	0,0120; 0,0392 jeziora Peter i Paul, odpowiednio

W tabeli 24 przedstawiono zestawienie danych dotyczących dopływu i odpływu barwników ze słupa wody dla jezior Paul, Peter i Tuesday [68]. Otrzymany budżet chlorofilu *a* i jego pochodnych wskazuje, że zarówno produkcję, jak i dopływ z nanoplanktonu, fotodegradację oraz sedymentację należy uważać za procesy istotne w przepływie barwników, a różnice w dopływie i odpływie odzwierciedlają akumulację barwników w słupie wody podczas trwania badań [68].

Tabela 24. Średnie dopływy i odpływy barwników ze słupa wody badanych jezior [68]

Źródło	Wartości
	$\mu mol \cdot m^{-2}$
Dopływ	
produkcja chlorofilu	72; 229 jeziora Paul i Peter, odpowiednio
dopływy nanoplanktonowe	216; 606 jeziora Tuesdey i Paul, odpowiednio
całkowity dopływ	358; 835 jeziora Tuesdey i Paul, odpowiednio
Odpływ	
fotodegradacja	212; 367 jeziora Peter i Paul, odpowiednio
sedymentacja	
chlorofil *a*	10; 33 jeziora Tuesday i Peter, odpowiednio
chlorofil *a′*	4; 15 jeziora Tuesday i Peter, odpowiednio
feofityna *a*	9; 29 jeziora Tuesday i Peter, odpowiednio
feoforbid *a*	26; 352 jeziora Tuesday i Paul, odpowiednio
suma	49; 389 jeziora Tuesday i Paul, odpowiednio
całkowity odpływ	317; 756 jeziora Tuesday i Paul, odpowiednio

Fotooksydacja jest też najbardziej istotnym procesem degradacji barwników, które zostały już zdeponowane w osadach. Szybkość przebiegu tego procesu zależy od składu planktonu, obecności kwasów huminowych i innych absorbujących światło związków występujących w słupie wody ponad osadem, a także od temperatury [68, 238, 242,

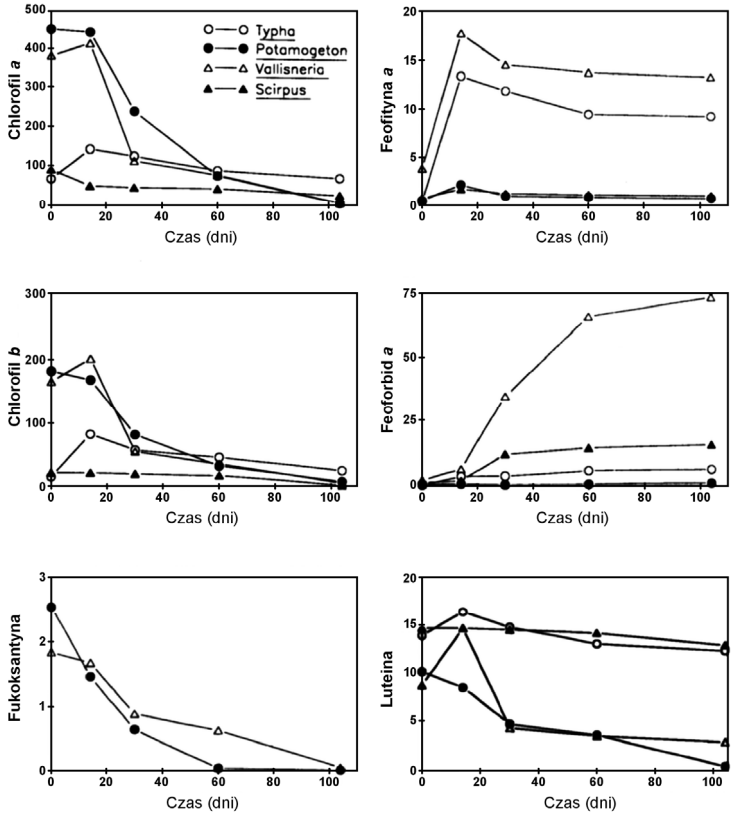
419, 420]. Istotnymi czynnikami mogą być zarówno aktywność bezkręgowców w osadach płytkich jezior [31, 241], jak i warunki fizykochemiczne i biologiczne panujące w słupie wody [181, 241].

Do dna w jeziorach głębokich zwykle przenika mniej światła niż w jeziorach płytkich, a często osady są go całkowicie pozbawione; występują też niedobory tlenu. Dlatego degradacja barwników zachodząca w procesie fotooksydacji i powodowana przez mikroorganizmy jest mniejsza niż w jeziorach płytkich i barwniki mogą być zachowywane w większym stopniu w porównaniu z osadami jezior płytkich [343-345, 392]. Cranwell [81] na podstawie badań stwierdził, że tempo rozkładu β-karotenu oraz echinenonu było mniejsze w warunkach beświetlnych. W jeziorach głębokich barwniki dłużej pozostają w słupie wody, co może równoważyć korzystne zachowywanie w środowisku osadów. W warunkach naturalnych, gdy światło jest intensywne, a tlen występuje w wysokim stężeniu (np. w nieproduktywnych jeziorach holomiktycznych), karotenoidy i chlorofile są szybko transformowane do związków bezbarwnych, natomiast w jeziorach meromiktycznych barwniki zachowywane są w dużo większym stopniu [226, 227, 237]. Glony ze względu na skład chemiczny (wysoką zawartość białka) charakteryzują się niskimi wartościami stosunku węgla do azotu i bardzo łatwo ulegają procesom degradacji, natomiast rośliny naczyniowe zawierające celulozę cechują się zdecydowanie wyższymi wartościami tego stosunku i procesy ich rozkładu zachodzą znacznie wolniej. Badania dekompozycji materiału organicznego pochodzącego z roślin naczyniowych poświęcane są w głównej mierze procesom rozkładu materii dopływającej do strumieni z lądu, a także rozkładowi występujących w rzekach makrofitów [18, 116, 378]. Badania tego typu koncentrują się głównie na tempie zachodzących zmian (tempo dekompozycji zwykle analizuje się, umieszczając w badanym cieku lub zbiorniku woreczki z uprzednio zważonymi liśćmi) i oddziaływaniu różnych grup organizmów na postępujące procesy rozkładu [22, 73, 117, 326, 393].

Badania dotyczące wód stojących są prowadzone rzadziej i obejmują głównie procesy rozkładu materiału organicznego zachodzące w strefie litoralu [21, 305-307]. Niestety szersze badania nad rozkładem materii organicznej pochodzącej z makrofitów z uwzględnieniem procesów związanych z degradacją barwników są stosunkowo rzadkie [29, 31, 74, 360]. Bianchi i Findlay [29] określili stałe rozkładu materiału roślinnego oraz barwników zawartych w tym materiale dla wynurzonych roślin wodnych (*Typha angustifolia* i *Scirpus fluviatilis*) oraz roślin zanurzonych (*Potamogeton sp*. i *Vallisneria americana*). Analizowane rośliny charakteryzowały się znacznymi różnicami wartości molowego stosunku C/N. W czasie doświadczenia trwającego 104 dni stwierdzono, że najszybciej ulegały dekompozycji próbki nurzańca amerykańskiego (*Vallisneria americana*), natomiast najwolniej rozkładała się pałka wąskolistna (*Typha angustifolia*) (tab. 25). Rozkład chlorofili *a* i *b* następował szybciej w materiale roślinnym pochodzącym z roślin zanurzonych (*Potamogeton sp*. i *Vallisneria americana*). W niektórych przypadkach stwierdzono nawet wzrost zawartości chlorofilu (rys. 18), co było spowodowane szybszym rozkładem materiału, który nie zawierał barwników.

Tabela 25. Stałe rozkładu (dzień$^{-1}$) oraz wartości molowego stosunku C/N dla 4 analizowanych makrofitów [29]

Materiał roślinny	Stała rozkładu (k)	C/N
Typha angustifolia	-0,0024±0,0007	37,73±1,37
Scirpus fluviatilis	-0,0087±0,0012	51,15±1,15
Potamogeton sp.	-0,0133±0,0012	12,17±0,48
Vallisneria americana	-0,0334±0,0032	11,72±0,10



Rys. 18. Stężenie barwników (nmol·g_{sm}^{-1}) w rozkładających się makrofitach [29]

Obserwowano również początkowy wzrost, a w dalszym etapie doświadczenia spadek zawartości pochodnej chlorofilu *a* – feofityny *a*; stopniowo zwiększała się natomiast zawartość feoforbidu *a*. Na podstawie przeprowadzonej analizy karotenoidów stwierdzono, że najwolniej zachodził rozkład luteiny, podczas gdy oznaczona tylko w roślinach zanurzonych fukoksantyna ulegała rozkładowi najszybciej (rys. 18).

W osadach dennych zostają zachowane karotenoidy, chlorofile, związki pełniące rolę fotoprotekcyjną oraz inne rozpuszczalne w lipidach związki syntetyzowane przez organizmy fototroficzne w ekosystemach wodnych i ich zlewniach. Analizując proces zachowywania barwników w osadach, należy mieć na uwadze, że po pierwsze barwniki pochodzące ze zlewni zwykle nie docierają do jeziora w pierwotnej formie i że barwniki pochodzenia autochtonicznego podlegają intensywnej degradacji, jeżeli nie zostaną szybko włączone do osadów. W strefie fotycznej całkowita fotodegradacja pochodnych chlorofilu może zajść w ciągu trzech dni [68, 136, 392]. Po drugie cząsteczkowa charakterystyka procesów degradacji chlorofili różni się od degradacji karotenoidów. Te drugie są przekształcane początkowo w *cis*-karotenoidy, a dalsza degradacja prowadzi do powstania związków bezbarwnych bez zniszczenia systemu sprzężonych wiązań podwójnych, natomiast chlorofile ulegają degradacji do feofityn przez utratę atomu magnezu z pierścienia tetrapirolowego, feoforbidów po odłączeniu łańcucha fitolowego i różnych grup funkcyjnych [238, 301].

W tabeli 26 przedstawiono dane dotyczące względnej stabilności wybranych barwników i ich pochodnych. Powszechnie występujące β-karoten, zeaksantyna oraz luteina są najbardziej stabilnymi karotenoidami i mogą pozostać nienaruszone nawet w warunkach tlenowych [35], natomiast do najbardziej nietrwałych należą peridinina i fukoksantyna. Niskie stężenia fukoksantyny stwierdzane w osadach mogą wynikać zarówno ze stosunkowo niskiej odporności tego karotenoidu na degradację, jak również z konsumpcji przez zooplankton [29, 31, 180, 181, 238, 241, 242, 321, 322].

Tabela 26. Względna stabilność barwników (od 1 – najbardziej stabilne do 4 – najmniej stabilne, – stabilność nie została określona) [245]

Barwnik	Stabilność	Barwnik	Stabilność
Karotenoidy		Karotenoidy	
β-karoten	1	oscillaksantyna	2
α-karoten	2	afanizofil	2
β-izorenieraten	1	luteina	1
izorenieraten	1	neoksantyna	4
alloksantyna	1	wiolaksantyna	4
fukoksantyna	2	okenon	1
diatoksantyna	2	astaksantyna	4
diadinoksantyna	3	Chlorofile i ich pochodne	
dinoksantyna	–	chlorofil *a*	3
peridinina	4	chlorofil *b*	2
echinenon	1	feofityna *a*	1
zeaksantyna	1	feofityna *b*	2
kantaksantyna	1	feoforbid *a*	3
miksoksantofil	2	piro-feo(barwniki)	2
scytonemina	–	chlorofil *c*	4

Degradacja chlorofilu *a* jest zwykle silniejsza niż karotenoidów, ale może ulegać zmianie w zależności od struktury łańcucha pokarmowego w zbiorniku wodnym. Niezdegradowane chlorofile są obecne tylko wtedy, gdy pozostałości glonów zostaną szybko pogrzebane w zimnym i pozbawionym tlenu środowisku [68, 69, 106, 238, 242, 419, 420]. Szacuje się, że rocznie na lądach i w oceanach degradacji ulega około 10^9 ton chlorofilu. Jest to jednak wielkość przybliżona, bowiem podawane w literaturze wartości wahają się od 10^8 do 10^{12} ton. W tabeli 27 przedstawiono wielkość degradacji chlorofilu zachodzącej w ciągu roku oraz tempo jego obiegu w ekosystemach wodnych i lądowych. Na podstawie tych danych można stwierdzić, że o ile ekosystemy lądowe charakteryzują się znacznie wyższą produkcją netto materii organicznej, to jednak ekosystemy wodne cechuje wyższa produkcja chlorofilu i szybsze tempo jego wymiany [163, 164].

Tabela 27. Całkowita roczna degradacja oraz tempo obiegu chlorofilu w ekosystemach wodnych i lądowych [163]

Wartości	Środowisko		Ogólnie
	wodne	lądowe	
Produkcja netto suchej materii organicznej – tony·10^{10} na rok	5,55	11,47	–
Udział tkanek fosyntetycznych w organizmach	0,90	0,30	–
Produkcja netto tkanek fotosyntetycznych – tony·10^{10} na rok	4,99	3,44	–
Stężenie chlorofilu – tony·10^{-3}·tona^{-1} s.m.	17,3	8,5	–
Roczna produkcja netto chlorofilu – tony·10^8 (P)	8,63	2,92	11,55
Biomasa chlorofilu – tony·10^8 (B)	0,19	2,25	2,44
Tempo wymiany w ciągu roku (P/B)-1	44,4	0,3	3,73

Karotenoidy znajdujące się w słupie wody podlegają szybciej procesom rozkładu w porównaniu z chlorofilami, natomiast po zasileniu osadów są od nich bardziej stabilne. Brak istotnych dowodów na znaczący rozkład karotenoidów po pogrzebaniu w osadach; jeżeli następuje, to jest podobny do rozkładu materii organicznej jako całości. Jednak w osadach mogą zachodzić procesy reorganizacji wewnątrz cząsteczek, które w przypadku diadinoksantyny prowadzą do powstania stabilnej diatoksantyny [337]. Odporność na dalszy rozkład feofityn, feoforbidów i chlorofilidów (pochodnych chlorofilu) jest zbliżona i występują one w wyższych stężeniach niż niezdegradowany chlorofil, który w znacznych ilościach obecny jest tylko w świeżo odłożonych osadach [342, 392]. Szybkość rozkładu w osadach pozbawionych tlenu jest zwykle o połowę mniejsza niż w interfazie woda – osad w środowiskach dobrze natlenionych z powodu braku możliwości bezpośredniego utleniania i zmniejszonej aktywności organizmów bentosowych [28, 31, 181, 387, 397, 435]. Rozpatrując procesy degradacji barwników, należy mieć na uwadze, że wszystkie te przemiany mogą zachodzić w tym samym czasie i trudno je przedstawiać i analizować jednostkowo.

Reakcje diagenetyczne karotenoidów obejmują między innymi tworzenie „perhydro" pochodnych poprzez uwodornienie łańcucha polienowego zachowanych karotenoidów, takich jak β-karoten, γ-karoten, likopen, β-izorenieraten i innych [7, 213, 292]. Obecność tego typu związków odnotowano w ropie naftowej. W przypadku β-karotenu i izorenieratenu stwierdzono również powstawanie innych diagenetycznych produktów zawierających od jednego do czterech dodatkowych pierścieni aromatycznych [180, 243, 319-322, 410, 450]. Także różne osadowe związki organiczne siarki mają szkielet węglowy izorenieratenu i β-karotenu. W procesie dalszych przemian związki pochodzenia barwnikowego włączane są do kerogenu (makromolekularnej materii organicznej, nierozpuszczalnej w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych). Szersze omówienie procesów zachodzących podczas diagenezy karotenoidów przedstawili Sinninghe Damsté i Koopmans [369].

Barwniki rzadko ulegają całkowitej degradacji, bowiem zmiany diagenetyczne zachodzące w tych związkach, takie jak transformacja chlorofili do porfiryn i wprowadzenie do cząsteczki niklu lub wanadu czy uwodornienie wiązań podwójnych węgiel – węgiel karotenoidów (formowanie alkanów izoprenowych), mogą je stabilizować [282, 334, 350]. Obecność nienaruszonych karotenoidów, izorenieratenu [212] i nieokreślonego diaromatycznego karotenoidu [65] stwierdzono w utworach pochodzących z miocenu. Na ogół jednak stężenia niezdegradowanych karotenoidów istotnie zmniejszają się wraz z głębokością, przy czym szybciej degradacji ulegają karotenoidy zawierające tlen (hydroksy-, okso-, epoksy-) [49, 120, 416]. Karotenoidy mogą być łatwo utleniane i dlatego niskie stężenie tlenu zarówno w słupie wody, jak i w osadzie jest ważnym czynnikiem warunkującym zachowywanie karotenoidów w osadach [342]. Pomimo szybkich diagenetycznych reakcji transformacji, jakim mogą podlegać karotenoidy zarówno w słupie wody, jak i w osadach dennych, kopalne karotenoidy można wykorzystywać do badań zmian w środowisku, w którym zachodzi depozycja, przede wszystkim w pozbawionych tlenu partiach jezior i mórz [108, 233, 243, 320, 385, 410, 450]. W wodzie pobranej z Morza Czarnego z głębokości 80 m stwierdzono występowanie diaromatycznego karotenoidu izorenieratenu, który jest syntetyzowany przez zielone bakterie siarkowe (*Chlorobiaceae*). Ze względu na to, że *Chlorobiaceae* są organizmami fotoautotroficznymi, ściśle beztlenowymi i wymagającymi siarkowodoru, obecność tego karotenoidu wskazuje na nakładanie się stref fotycznej i beztlenowej. Zapis zawartości izorenieratenu w osadach Morza Czarnego wykorzystano do oceny

tych warunków w przeszłości, co pozwoliło na odtworzenie zmian w głębokości chemokliny [320]. Pomimo zachodzących procesów diagenezy niezmienione karotenoidy były odnajdywane w osadach morskich i słodkowodnych zdeponowanych 20 000 lat temu [404, 416].

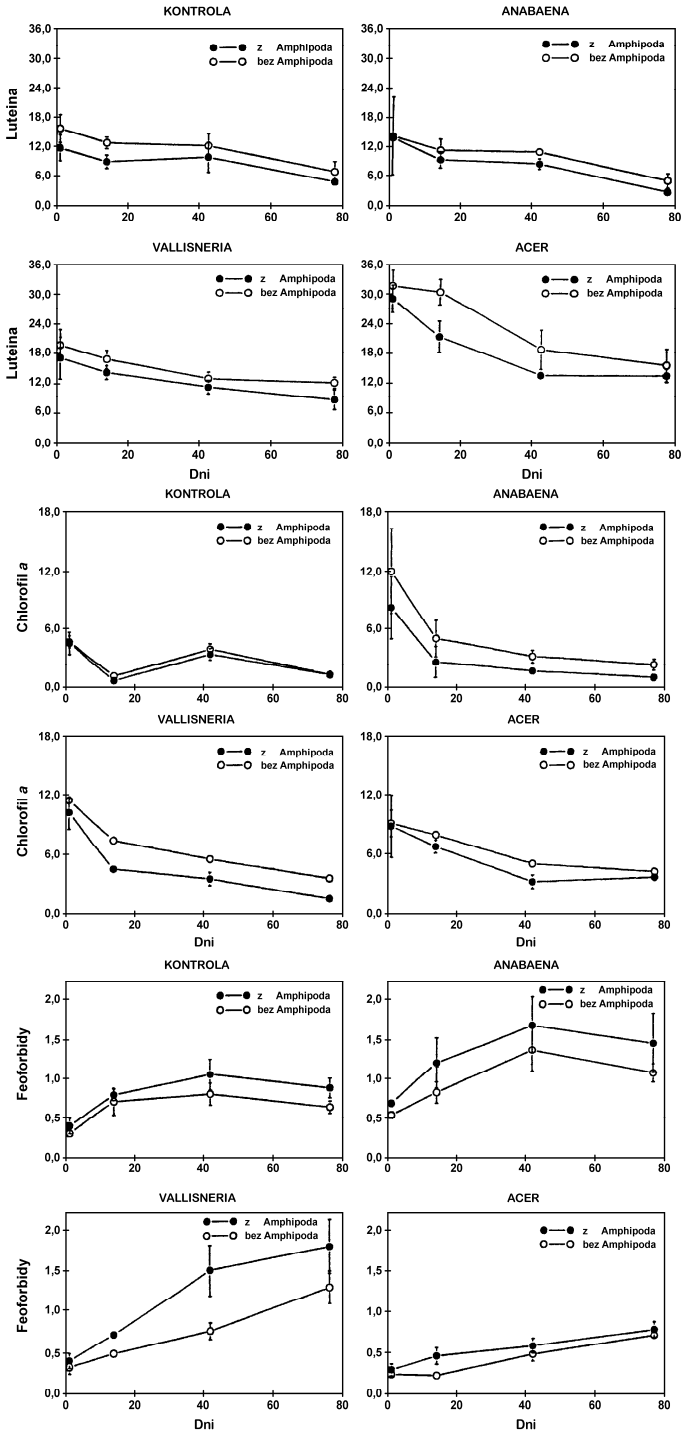
Czynnikiem wpływającym w sposób znaczący na zachowywanie barwników jest wyżeranie przez roślinożerców. W tabeli 28 przedstawiono szybkość filtracji wody przez różne gatunki zooplanktonu. Można stwierdzić, że szybkość filtracji zależy w dużej mierze od wielkości zwierzęcia, ale także temperatury i rozmiaru fitoplanktonu [423]. Podczas przechodzenia przez przewód pokarmowy zwierząt chlorofil *a* zostaje przekształcony w feofitynę i feoforbid, w związku z czym może zaniknąć nawet 70% chlorofilu i jego pochodnych [32, 79, 89, 90].

Tabela 28. Tempo filtracji u różnych gatunków zooplanktonu [423]

Gatunki	Zakres wielkości zwierząt długość w mm	Średnie tempo filtracji ml·zwierzę$^{-1}$·dzień$^{-1}$
Daphnia rosea	1,3-1,6	3,6-5,5
Daphnia galeata	1,5-1,7	3,7-6,4
Daphnia parvula	0,7-1,2	3,8
Daphnia longispina	–	2,3
Ceriodaphnia quadrangula	0,7-0,9	4,6
Diaphanosoma brachyurum	0,9-1,4	1,6
Bosmina longirostris	0,4-0,6	0,44
Chydorus sphaericus	0,1-0,2	0,18

Podobne wyniki uzyskali Head i Harris [160] oraz Mayzaud i Razouls [275]. W prowadzonych przez nich badaniach wyżeranie przez widłonogi powodowało degradację chlorofili do związków bezbarwnych. W badaniach nad degradacją materii organicznej pochodzącej z różnych źródeł (planktonu, roślinności litoralowej i lądowej) Bianchi i współ. [31] odnotowali istotnie wyższe tempo transformacji chlorofilu *a* w feoforbid *a* w obecności roślinożerców z rodzaju *Gammarus* (rys. 19), natomiast formowanie feofityny czy 5,6-epoksydu luteiny nie było istotnie skorelowane z ich obecnością.

Degradacja karotenoidów występuje głównie podczas przechodzenia barwników przez przewód pokarmowy roślinożerców i może sięgać 80% [239]. Porównując degradacyjne możliwości słodkowodnych wioślarek i wrotków, Carpenter i Bergquist [67] sugerowali, że wyżeranie powoduje znaczącą, lecz nieselektywną degradację barwników, i że zawartość barwników na jednostkę materii organicznej może wzrastać po przejściu przez jelito roślinożerców. Head i Harris [160] na podstawie badań nad morskimi widłonogami stwierdzili, że stopień degradacji barwników zależy zarówno od gatunku glonów, jak i gatunku roślinożerców. Nelson [294] odnotował degradację karotenoidów po ich zjedzeniu przez makrozooplankton o dużych rozmiarach (np. osłonice), natomiast nie potwierdził degradacji po trawieniu przez makrozooplankton o małych rozmiarach (np. widłonogi). Leavitt i współ. [243] sugerowali, że wydalanie przez duży zooplankton może istotnie wpływać na zwiększone zachowywanie barwników i ich pochodnych w osadach jeziornych.



Rys. 19. Stężenia barwników w osadach (nmol·$g_{sm\ osadu}^{-1}$) [31]

W badaniach prowadzonych przez Pasternak i Dritsa [304] analizowano przebieg zmian zawartości chlorofilu i jego pochodnych w przewodzie pokarmowym oraz odchodach morskich widłonogów *Calanus pacificus*. Jako źródło pokarmu i zarazem chlorofilu posłużyły okrzemki *Phaeodactylum tricornutum*. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zawartość chlorofilu i jego pochodnych szybko zmniejszała się podczas przechodzenia przez przewód pokarmowy przy jednoczesnym wzroście ich zawartości w odchodach, tymczasem sumaryczna zawartość analizowanych związków ($S+S^f$) nie zmniejszała się istotnie (tab. 29). Odmienne wyniki otrzymali Conover i współ. [77], którzy zaobserwowali degradację 99% barwników.

Tabela 29. Średnia zawartość chlorofilu i jego pochodnych (chl + feo) w przewodzie pokarmowym (S) i odchodach (So) Calanus pacificus (ng·ml-1 ekstraktu) [304]

Czas min	Stężenie chlorofilu podczas eksperymentu					
	4,8 ng·ml^{-1}			1,8 ng·ml^{-1}		
	$S_{(chl + feo)}$	$S^o_{(chl + feo)}$	$S + S^o$	$S_{(chl + feo)}$	$S^o_{(chl + feo)}$	$S + S^o$
0	1,17±0,15	–	–	0,23±0,04	–	–
30	0,77±0,17	0,13	0,90	0,07±0,04	0,21	0,28
60	0,21±0,16	0,53	0,74	0,04±0,03	0,24	0,28
120	0,04±0,02	0,67	0,71	0,01	0,25	0,26

Straty karotenoidów mogą wynikać także z absorpcji przez roślinożerców. Herring [165, 166] stwierdził, że czyste barwniki, którymi karmiono rozwielitki, były włączone do tkanek zwierzęcych jako karotenoproteiny, ulegały degradacji do związków bezbarwnych lub przechodziły przez jelito nienaruszone. Inne doświadczenia potwierdziły, że wiele skorupiaków jeziornych może wchłaniać i metabolizować proste karotenoidy (np. β-karoten czy echinenon) do złożonych, specyficznych dla zwierząt barwników, takich jak astaksantyna lub kantaksantyna [134, 217]. Przyswojone karotenoidy mogą być przechowywane w ciałach lipidowych i jajach jako karotenoproteiny [72]. Badania sugerują również, że karotenoidy pozostają metabolicznie aktywne po asymilacji. Ilość wchłanianych karotenoidów, a więc i stężenie w organizmach uzależnione jest od przezroczystości wody [167], dostępności pożywienia [77, 155, 218, 278] oraz obecności innych absorbujących światło barwników w tkankach roślinożerców [167, 238]. W przeciwieństwie do karotenoidów barwniki chlorofilowe prawdopodobnie nie są asymilowane przez bezkręgowce wodne.

Interesujące wyniki badań otrzymali McLeroy-Etheridge i McManus [278], którzy analizowali degradację barwników (chlorofili i karotenoidów) powodowaną przez widłonoga *Acartia tonsa* (dorosłe żeńskie osobniki) w zależności od gatunku pożywienia i jego dostępności. Niezależnie od gatunku fitoplanktonu destrukcja barwników była większa w przypadku ograniczonego dostępu do pokarmu (tab. 30, 31). Otrzymane wyniki potwierdziły także stosunkowo małą odporność na degradację fukoksantyny i wysoką stabilność luteiny.

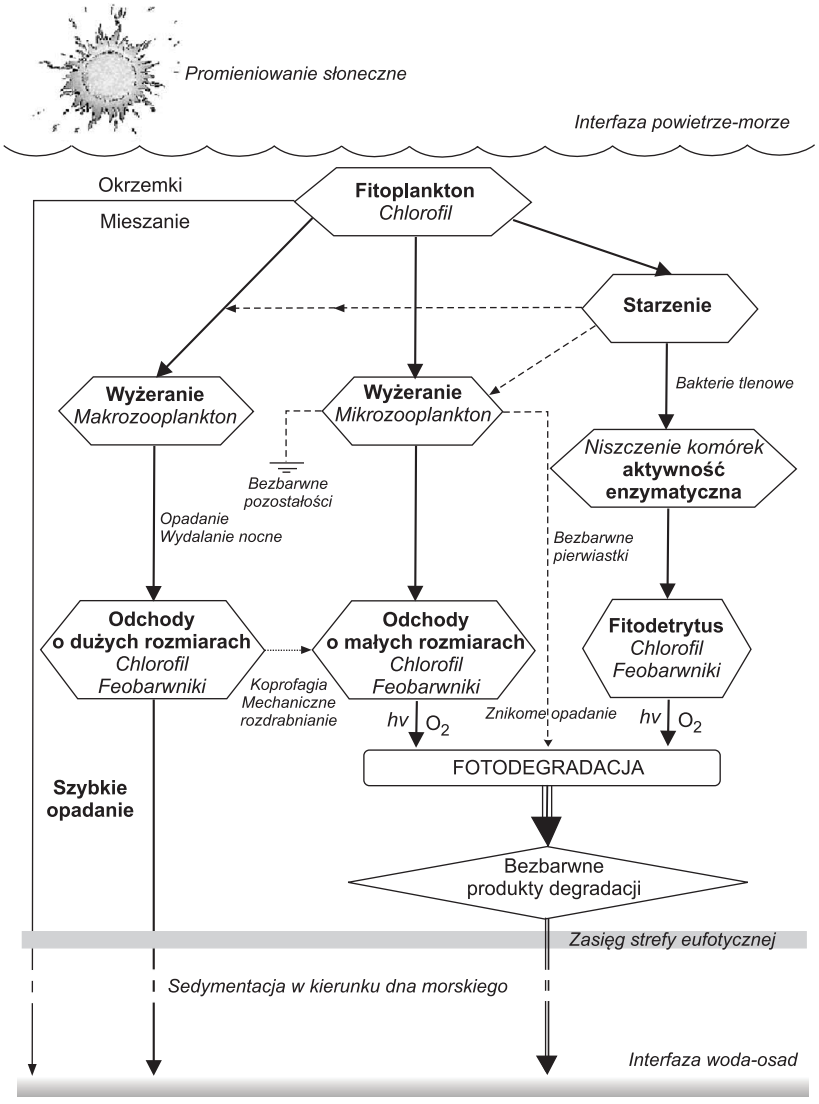
Tabela 30. Degradacja (do feobarwników) i destrukcja (do produktów bezbarwnych) przy odżywianiu widłonogów w sposób ograniczony i nieograniczony [278]

Fitoplankton	Odżywianie nieograniczone		Odżywianie ograniczone	
	% degradacji	% destrukcji	% degradacji	% destrukcji
Chlorofil *a*				
Thalassiosira weissflogii	7	73	2	93
Rhodomonas lens	9	60	16	70
Chroomonas salina	14	57	22	64
Tetraselmis sp.	3	0	19	52
Tetraselmis PLY 429	6	13	21	71
Dunaliella tetriolecta	11	53	29	70
Chlorofil *b*				
Tetraselmis sp.	< 1	3	< 1	20
Tetraselmis PLY 429	< 1	43	3	78
Dunaliella tetriolecta	4	40	7	87

Tabela 31. Destrukcja karotenoidów (%D) i szybkość odżywiania I (liczba komórek połkniętych przez widłonoga w trakcie godziny) [278]

Fitoplankton	Barwnik	Odżywianie nieograniczone		Odżywianie ograniczone	
		%D	I	%D	I
Thalassiosira weissflogii	fukoksantyna	63	4275	99,9	933
Rhodomonas lens	alloksantyna	56	5062	65	2905
Chroomonas salina	alloksantyna	37	8049	52	2092
Tetraselmis sp.	luteina	0	9707	31	3002
Tetraselmis PLY 429	luteina	2	7229	80	4307
Dunaliella tetriolecta	luteina	35	6080	80	3496

Pomimo że wyżeranie przez zooplankton może prowadzić według niektórych autorów do znaczącej degradacji barwników, to jednak wyżeranie komórek glonów powoduje, że barwniki nie ulegają degradacji fotochemicznej, a wydalane z ekskrementami szybko sedymentują bez przechodzenia poważniejszych zmian [71, 89, 90, 238, 242]. Główne drogi degradacji chlorofilu w ekosystemach morskich z uwzględnieniem wpływu procesów konsumpcji oraz starzenia się komórek przedstawiono na rysunku 20 [82].



Rys. 20. Główne drogi degradacji chlorofilu w strefie eufotycznej [82]

Wszystkie wymienione czynniki w różny, często bardzo istotny sposób wpływają na zawartość i właściwości zachowywanych w osadach barwników i ich pochodnych. W tabeli 32 przedstawiono przegląd barwników roślinnych najczęściej odzyskiwanych z osadów dennych jezior. W badaniach bardziej szczegółowych, ukierunkowanych np. na produkty przemian chlorofili czy karotenoidów liczba oznaczanych barwników jest oczywiście znacznie większa.

Tabela 32. Przegląd występowania barwników roślinnych i ich pochodnych w osadach jeziornych

Barwnik																									Źródło
β-karoten	α-karoten	β-izorenieraten	alloksantyna	fukoksantyna	diatoksantyna	diadinoksantyna	dinoksantyna	peridinina	echinenon	zeaksantyna	kantaksantyna	miksoksantofil	oscillaksantyna	luteina	neoksantyna	wiolaksantyna	okenon	astaksantyna	chlorofil *a*	chlorofil *b*	feofityna *a*	feofityna *b*	feoforbid *a*	chlorofil *c*	
+	+			+	+	+					+			+		+									[338]
			+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+							[450]
+	+									+				+			+								[297]
+		+	+		+									+					+				+		[171]
+			+	+	+					+		+		+					+	+	+	+			[102]
+		+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+	+		+	+	[209]
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[245]
		+								+	+			+			+								[355]
			+	+				+		+	+	+	+												[394]
+	+		+	+	+					+				+					+	+	+	+	+		[188]
+	+		+		+					+				+			+		+	+	+	+	+		[187]
+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+			+	+	[272]
+										+				+			+								[268]
+				+						+				+			+	+							[142]
+		+	+	+				+	+			+					+								[148]
+	+			+		+				+	+			+					+	+					[45]
+			+		+				+	+		+		+					+		+	+			[285]
+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+		+		[58]
									+	+								+	+	+					[247]
+			+	+	+				+	+		+	+	+			+		+	+	+	+			[277]

W tabeli 33 przedstawiono zakresy zawartości barwników i ich pochodnych notowane w osadach dennych jezior. Porównywanie dostępnych w literaturze wyników utrudniają: po pierwsze – zróżnicowane metody ekstrakcji barwników i analizy chromatograficznej, po drugie – jednostki, w jakich przedstawiane są otrzymane wyniki. Głębokości (pomiary dokonywane od powierzchni osadu), na których stwierdzana jest obecność poszczególnych barwników, zależą od rodzaju środowiska wodnego, jego głębokości i produktywności. Zróżnicowanie głębokości występowania barwników w osadach dennych jezior, estuariów i mórz zaprezentowano w tabeli 34.

Tabela 33. Zawartość barwników roślinnych w powierzchniowej warstwie osadów dennych jezior

Barwnik	Zawartość $nmol \cdot g_{mo}^{-1}$	Źródło
β-karoten	0,008-2000	[102, 142, 144, 148, 171, 246, 260, 272, 324, 413]
β-izorenieraten	30-60	[47, 209, 260]
Alloksantyna	0,062-400	[102, 148, 171, 245, 272, 324, 413, 415]
Fukoksantyna	2,8-1145,4	[102, 142, 148, 209, 260, 272, 324, 413]
Diatoksantyna	0,049-1200	[102, 171, 245, 324, 413, 415]
Diadinoksantyna	33-550	[209, 260, 272, 324]
Dinoksantyna	13-50	[209, 272]
Peridinina	100-300	[148, 209]
Echinenon	0,5-300	[142, 148, 209, 247, 260, 272, 324]
Zeaksantyna	50-1000	[209, 247, 272]
Luteina + zeaksantyna	0,4-900	[102, 142, 324, 413]
Kantaksantyna	3-100	[209, 247, 272, 413, 415]
Miksoksantofil	5,9-180	[102, 209, 272, 324, 413]
Oscillaksantyna	80-300	[209, 272]
Luteina	0,088-3000	[148, 171, 209, 245, 272]
Okenon	5-2000	[142, 148, 260]
Astaksantyna	48-100	[142, 209]
Scytonemina	0,5-10	[142, 412, 415]
Chlorofil *a*	0,028-700	[102, 171, 247, 272, 324, 413, 415]
Chlorofil *b*	8-140	[102, 247, 272, 324, 413]
Feofityna *a*	42-831,4	[102, 324, 412, 415]
Feofityna *b*	0,4-40	[102, 245, 324, 413]
Feofityny	500	[272]
Feoforbid *a*	0,20-3,5	[171, 245]
Feoforbidy	400	[272]
Chlorofil *c*	600	[272]

Tabela 34. Zróżnicowanie głębokości występowania barwników w osadach dennych jezior, estuariów i mórz (cm)

Barwnik																						Źródło
β-karoten	β-izorenieraten	alloksantyna	fukoksantyna	diatoksantyna	diadinoksantyna	peridinina	echinenon	zeaksantyna	kantaksantyna	miksoksantofil	oscillaksantyna	luteina	lut. + zeaksantyna	okenon	astaksantyna	chlorofil *a*	chlorofil *b*	feofityna *a*	feofityna *b*	feoforbid *a*	chlorofile *c*	
Jeziora																						
										> 50	> 50											[202]
70		70	70	70						70			70				70					[154]
	370							370	370			370										[355]
> 41		> 41		> 41					> 41			> 41										[372]
> 15		> 15	> 15	> 15	> 15		> 15	> 15	> 15	> 15		> 15			> 15	> 15	> 15	> 15	> 15	> 15	> 15	[58]
> 32	> 32	> 32	4		> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32		32		> 32	> 32	> 32		> 32	> 32	[209]
> 35	> 35	> 35			> 35		> 35					> 35		25								[260]
	> 30			> 30				> 30				> 30		> 30								[188]
> 15		> 15		> 15								> 15				> 15		> 15	> 15			[246]
> 65		> 65		> 65						> 65			> 65			> 65	> 65	> 65	> 65			[102]
> 66			> 66				> 66						> 66	> 66	> 66							[142]
32	30	30	10			17	30					30		30								[148]
1283		1283					617			617	599	1283		1283								[451]
																240	240	240	2			[55]
Estuaria																						
																> 10	> 10					[27]
			4									4				4	4					[223]
Morza																						
																> 5						[66]
462																462	462	462			462	[224]

4. ANALIZA BARWNIKÓW I PRODUKTÓW ICH DEGRADACJI

Barwniki roślinne występujące w organizmach roślinnych i osadach dennych stanowią grupę związków o zróżnicowanych właściwościach, takich jak rozpuszczalność, podatność na degradację czy stopień rozkładu. Powoduje to, że w badaniach prowadzonych nad barwnikami wykorzystuje się różnorodne procedury analityczne, począwszy od przygotowania próbek do ekstrakcji poprzez wybór rozpuszczalnika aż do układu eluentów i rodzaju kolumny używanych w chromatografii cieczowej. Utrudnia to zarówno wybór procedury, jak i porównywanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi.

4.1. EKSTRAKCJA BARWNIKÓW

Pierwszym etapem badań laboratoryjnych jest przygotowanie próbek do ekstrakcji. W przypadku próbek wód jest to ich przesączenie, natomiast podczas analizowania osadów dennych może to być liofilizacja lub suszenie w temperaturze pokojowej. Jednak Leavitt i Hodgson w pracy [245] wskazują, że barwniki zawarte w osadach wysuszonych są bardziej podatne na degradację podczas oczekiwania na ekstrakcję. Kolejnym etapem jest ekstrakcja barwników, podczas której należy zapewnić takie warunki, aby zastosowana metoda ekstrakcji była możliwie wydajna, barwniki w ekstrakcie – stabilne, a otrzymana mieszanina dawała się dobrze rozdzielić [45, 58, 66, 158, 268, 277, 285, 339, 344, 409]. Dalsze komplikacje procedur powodowane są temperaturą, w jakiej powinna być prowadzona ekstrakcja, czasem jej trwania oraz stosowaniem sonikacji.

W przypadku próbek takich jak glony można zastosować następujące techniki ekstrakcji: moczenie próbek w rozpuszczalniku, rozcieranie i sonikacja. Ekstrakcja przez moczenie jest łatwą i odpowiednią metodą, gdy należy przygotować dużą liczbę próbek do badań spektrometrycznych. Metoda ta wymaga zróżnicowanego czasu ekstrakcji w zależności od przyjętych warunków i rodzaju rozpuszczalnika – od 10 minut w temperaturze 65°C przy zastosowaniu dimetylosulfotlenku (DMSO) [63], przez noc, gdy użyty jest 90% aceton [358], do 40 godzin w temperaturze 4°C z wykorzystaniem innych rozpuszczalników [380]. Jedną z wcześniejszych metod jest rozcieranie z zastosowaniem homogenizatorów. Zniszczenie komórek glonów co prawda ułatwia ekstrakcję barwników, jednak stosowanie szklanych homogenizatorów może być niebezpieczne dla osób obsługujących. Czasami dochodzi również do przegrzania próbek. W przypadku osadów dennych zawierających ziarna piasku niewskazane jest używanie szklanych homogenizatorów, jednak można je rozetrzeć ręcznie w moździerzu.

Obecnie coraz szerzej stosowaną metodą ekstrakcji jest sonikacja, podczas której na skutek działania ultradźwięków komórki ulegają rozerwaniu [3, 431]. Wpływ sonikacji na efektywność ekstrakcji badali Dere i współ. [98]. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzili, że 5-minutowa sonikacja nie spowodowała istotnego wzrostu wydajności ekstrakcji (tab. 35). Mogło to jednak wynikać z faktu, że ekstrakcji poddawano próbki uprzednio zhomogenizowane.

Tabela 35. Wpływ sonikacji na wydajność ekstrakcji chlorofilu a ($\mu g \cdot gśm^{-1}$) [98]

Gatunek	Metanol		Eter dietylowy		Aceton	
	C_h	C_{hs}	C_h	C_{hs}	C_h	C_{hs}
Cladophora glomerata	60,7	61,4	53,8	53,7	56,2	57,0
Ulva rigita	54,6	54,7	48,6	49,0	48,9	49,3
Codium tomentosum	49,0	50,9	46,2	48,2	47,4	49,9
Cladostephus verticillatus	51,3	53,1	47,9	50,8	48,2	51,8

C_h – próbki homogenizowane
C_{hs} – próbki homogenizowane i poddane sonikacji

Kolejną kwestią sporną jest stosowany ekstrahent. Do najczęściej wykorzystywanych należy aceton o różnych stężeniach [58, 66, 75, 103, 142, 162, 187, 188, 202, 302, 331], rzadziej metanol [45, 258], ale też wykorzystywane są mieszaniny acetonu z metanolem (1:1 v/v [442], 7:2 v/v [268], 80:20 v/v [247]), acetonu, metanolu i wody (80:15:5 v/v/v [245, 277]).

Mieszaniny zawierające wodę przeznaczone są do osadów wysuszonych, przy czym zaleca się liofilizowanie osadów, a nie suszenie z dostępem powietrza, podczas którego następuje utlenianie barwników. Leavitt i Hodgson [245] podkreślają, że dodatek metanolu zwiększa wydajność ekstrakcji w przypadku próbek tak złożonych jak osady denne. Zalecane jest również odgazowanie czystych rozpuszczalników w celu usunięcia rozpuszczonego tlenu, a nie przygotowanej z nich mieszaniny. Szerszy przegląd rozpuszczalników stosowanych do ekstrakcji barwników przedstawił Rowan [334].

W tabeli 36 zamieszczono dane charakteryzujące ekstrahenty zwykle używane do ekstrakcji barwników.

Tabela 36. Przegląd rozpuszczalników stosowanych w ekstrakcji barwników roślinnych z materiału roślinnego i osadów dennych

Ekstrahent	Stężenie, %	Temperatura*, °C	Czas ekstrakcji	Sonikacja	Osady**	Źródło
1	2	3	4	5	6	7
Aceton	100				+	[23, 32-34, 324]
			24 h			[29]
			24 h		+	[11, 29]
		4	24 h		+	[204]
		4	24 h	+	+	[249]
		5	15-20 h		+	[158]
		-20	3 h	+	+	[449]
		-20	12-20 h			[308]
		-20	48 h		+	[288]
			30 s	+		[60]
	95					[1]
				+	+	[10]
	94					[40]
	90					[36, 70, 206, 261, 265, 431]
				+		[107, 389, 432]
					+	[143, 147, 392]
				+	+	[58, 230]
		0	24 h	+		[248]
		2	12 h			[293]
		4	2 h	+		[382]
		4	18-24 h		+	[128]
		4	24 h		+	[66, 132, 216, 330, 368, 422]
		4	24 h	+		[407]
		-10	24 h			[406]
		-10	48 h			[174]

* temperatura podczas ekstrakcji;
** metoda stosowana do ekstrakcji barwników z osadów

cd. tabeli 36

1	2	3	4	5	6	7
Aceton	90	-20	4 h	+		[390]
		-20	24 h			[133]
		-20	24-48 h			[38]
	85					[103]
	80					[176]
		40	30-69 min			[99]
				+		[376]
		0		+	+	[187, 189]
		20	10-120 min		+	[303]
Aceton – trzykrotna ekstrakcja	100:80:80					[103]
Aceton – trzykrotna ekstrakcja	85:100:100					[103]
Metanol		21	15-20 h		+	[158]
	100			+	+	[62]
	100	-18	48 h		+	[434]
	96					[103]
	95		5 min	+		[447]
	95			+		[11]
	90			+		[151]
				+	+	[412]
				+		[432]
						[269]
Metanol (CH_3COONH_4)***		5	15 min			[45, 54]
						[266]
		-20	24 h			[60]
Metanol/CH_3COONH_4 (98:2)						[336]
Etanol/eter dietylowy						[370]

*** metanol zbuforowany CH_3COONH_4

cd. tabeli 36

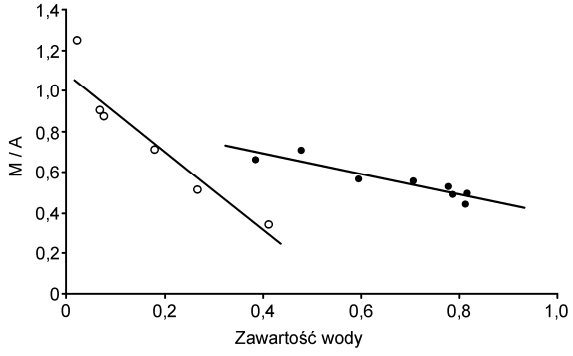
1	2	3	4	5	6	7
Dimetyloformamid (DMF)		4	3 h		+	[114]
DMSO	99,5	40-67	38-51 min			[99]
DMSO						[359]
Eter naftowy					+	[1]
Tetrahydrofuran	100				+	[261]
Aceton/metanol					+	[170]
Aceton/metanol (7:2)						[268]
Aceton/metanol (80:20)			12-24 h		+	[288]
		-20	24 h	+	+	[121]
Aceton/metanol/woda (80:15:5)					+	[92, 245]
		temp. pokoj.	24 h	+	+	[277]
		-20	16-24 h		+	[415]
		-20	24 h			[397]
Aceton/metanol/woda (45:45:10)		2-3		+		[151]
Metanol/aceton/DMF/woda (30:30:30:10)			2 h			[151]
Aceton/eter naftowy (1:1)						[317]

Wpływ rodzaju ekstrahenta i zawartości wody w próbkach osadów dennych na wydajność ekstrakcji przedstawił Hansson [158]. Badaniami objęto 14 jezior, których osady charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością wody i materii organicznej. Otrzymane wyniki dowiodły, że najwyższą średnią wydajność ekstrakcji wykazywał etanol. Biorąc pod uwagę znacznie wyższą wydajność ekstrakcji stwierdzoną w omawianych badaniach dla liofilizowanych próbek osadów oraz możliwość bezpośredniego porównywania otrzymywanych zawartości barwników, wydaje się uzasadnione stosowanie procesu liofilizacji jako metody przygotowania próbek do ekstrakcji (tab. 37).

Tabela 37. Średnie zawartości chlorofilu a w ekstraktach z osadów świeżych i liofilizowanych o zróżnicowanej zwartości materii organicznej [158]

Ekstrahent	Osad świeży	Osad zliofilizowany
	$\mu g \cdot cm^{-3}$	
Wysoka zawartość materii organicznej		
Aceton (90%)	–	31,54
Aceton (100%)	5,58	29,52
Metanol	2,86	21,41
Etanol	6,09	27,23
Niska zawartość materii organicznej		
Aceton (90%)	–	28,54
Aceton (100%)	8,47	28,39
Metanol	3,06	30,72
Etanol	6,01	30,24

Jako wskaźnik zróżnicowania wydajności ekstrakcji z wykorzystaniem metanolu i acetonu zastosowano wartość stosunku zawartości chlorofilu *a* w obu ekstraktach (M/A). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że wartości tego stosunku były ujemnie skorelowane z zawartością wody w analizowanych próbkach, zależały również od zawartości materii organicznej w osadach dennych (rys. 21).

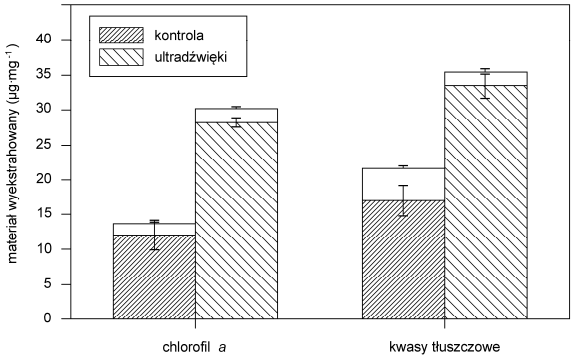


Rys. 21. Stosunek zawartości chlorofilu *a* wyekstrahowanego metanolem i acetonem (M/A) z osadów o niskiej (symbole otwarte) i wysokiej (symbole zamknięte) zawartości materii organicznej przy różnej zawartości wody ($ml \cdot cm^{-3}$) [158]

Problem stosowanych metod ekstrakcji często bywa badany w aspekcie analizy ilościowej i jakościowej barwników w materiale roślinnym. W pracy [426] Wiltshire i współ. rozpatrywali wpływ sposobu ekstrakcji na jej wydajność w odniesieniu do barwników i kwasów tłuszczowych. Zastosowano dwie metody: tradycyjną, podczas której liofilizowane glony traktowano rozpuszczalnikiem, a następnie wytrząsano ręcznie przez minutę i pozostawiano na pewien czas. Potem próbki wirowano i usuwano

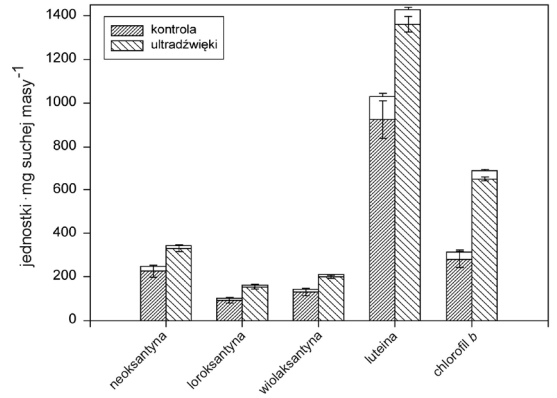
supernatant, po czym w celu zwiększenia wydajności ekstrakcji poddawano je ponownej ekstrakcji z użyciem kolejnej porcji czystego rozpuszczalnika.

W drugim wariancie (ekstrakcji maksymalnej) do probówki z materiałem liofilizowanym oprócz rozpuszczalnika dodawano również kwarc (rozmiar cząstek – 10-30 μm). Następnie próbki umieszczano w myjce ultradźwiękowej (35 kHz, 80 W) w temperaturze -4°C (stosowano wodę morską) i poddawano działaniu ultradźwięków przez 90 min. Podobnie jak w wariancie kontrolnym próbki ekstrahowano dwukrotnie. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 22.



Rys. 22. Porównanie wydajności ekstrakcji chlorofilu *a* i kwasów tłuszczowych ze *Scenedesmus obliquus*; I ekstrakcja – słupki zakreskowane, II ekstrakcja – słupki otwarte [426]

Nie ulega wątpliwości, że stosowanie metody ultradźwiękowej zwiększa wydajność ekstrakcji w przypadku zarówno chlorofilu *a*, jak i kwasów tłuszczowych. Zwraca też uwagę fakt stosunkowo niskiej zawartości badanych związków w roztworach uzyskanych podczas drugiej ekstrakcji. Analogiczne wyniki otrzymano, analizując zawartości poszczególnych barwników (rys. 23). Dunn i współ. w pracy [103] porównywali wydajność jednokrotnej i wielokrotnej ekstrakcji barwników z liści *Eucalyptus longifolia*. W tabeli 38 przedstawiono zróżnicowanie zawartości barwników w ekstraktach w zależności od wykorzystanej techniki ekstrakcji. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zastosowanie ekstrakcji wielokrotnej spowodowało wzrost jej wydajności nawet o ponad 18% w przypadku β-karotenu.



Rys. 23. Porównanie wydajności ekstrakcji barwników ze *Scenedesmus obliquus*; I ekstrakcja – słupki zakreskowane, II ekstrakcja – słupki otwarte [426]

Tabela 38. Stężenia chlorofili i karotenoidów wyekstrahowanych z Eucalyptus longifolia [103]

Barwnik	Stężenie barwnika, $Au \cdot g_{śm}^{-1}$		
	1-krotna ekstrakcja (100% aceton)	3-krotna ekstrakcja (100:80:80% aceton)	3-krotna ekstrakcja (80:80:100% aceton)
Neoksantyna	2,117	2,281	2,367
Chlorofil *b*	5,212	5,331	5,574
Luteina	6,736	7,344	7,447
Chlorofil *a*	17,724	18,608	19,353
β-karoten	3,599	3,518	4,267

Wpływ sposobu przygotowania próbek i stosowanego rozpuszczalnika na ekstrakcję barwników z peryfitonu analizowali w pracy [151] także Hagerthey i współ. Otrzymane wyniki wykazały, że w przypadku chlorofilu *b*, β-karotenu, miksoksantofilu i echinenonu liofilizacja znacznie zwiększała wydajność ekstrakcji, a kolejnymi procesami, które dały taki sam efekt, były: rozcieranie próbek zliofilizowanych, poddawanie ich działaniu ultradźwięków oraz zastosowanie do ekstrakcji mieszaniny złożonej z acetonu, metanolu, dimetyloformamidu i wody (MAD). Zastosowanie MAD znacznie zwiększyło wydajność, co było szczególnie zauważalne w przypadku β-karotenu i echinenonu (tab. 39).

Tabela 39. Wydajność (średnia) barwników wyekstrahowanych za pomocą różnych rozpuszczalników i metod fizycznych (długość fali detekcji 440 nm) [151]

Metoda	Chl *b*	Lut	β-kar	Fuko	Miks	Zea	Echin
	$\mu g \cdot g_{sm}^{-1}$						
Mrożenie, moczenie i sonikacja							
Aceton	45	43	0	430	409	67	22±18
MAD	0	7	0	209	80	6	0±0
Metanol	0	1	0	30	10	1	0±0
Metanol/aceton	12	12	2	154	132±64	14	4±4
Mrożenie, rozcieranie, moczenie i sonikacja							
Aceton	39	51	0	464	532	77	38±27
MAD	0	3	0	110	49	3	0±0
Metanol	0	0	0	24	0	0	0±0
Metanol/aceton	7	11	439	132	123	13	3±3
Liofilizacja, moczenie i sonikacja							
Aceton	64	29	137	249	223	34	47
MAD	90	51	250	385	454	69	119
Metanol	50	21	35	266	299	40	32
Metanol/aceton	40	24	105	173	209	29	41
Liofilizacja, rozcieranie i sonikacja							
Aceton	161	64	376	435	590	76	181
MAD	191	83	400	559	432	106	206
Metanol	73	42	44	357	420	53	60
Metanol/aceton	63	37	142	252	208	41	69

Chl *b* – chlorofil *b* Lut – luteina β-kar – β-karoten
Fuko – fukoksantyna Miks – miksoksantyna Zea – zeaksantyna
Echin – echinenon MAD – metanol/aceton/DMF/woda

Interesujące wyniki przedstawili w pracy [406] van Leeuwe i współ. Badając acetonowe i metanolowe ekstrakty barwników z glonów, stwierdzili, że liofilizacja w znaczący sposób podnosiła wydajność ekstrakcji, bowiem stężenia barwników w próbkach nieliofilizowanych w porównaniu z próbkami liofilizowanymi były o 20-50% niższe (tab. 40).

Tabela 40. Wydajność ekstrakcji w różnych wariantach jako procent ekstrakcji acetonem przez 48 h w temperaturze 4°C po liofilizacji [406]

Glony	Barwnik	Ac/4*	Ac/-L*	Ac/-20*	MeOH*
Pyramimonas sp.	luteina	100	77	94	129
	chlorofil *b*	100	79	96	111
	chlorofil *a*	100	80	96	110
	β-karoten	100	83	96	73
Phaeocystis antarctica	fukoksantyna	100	46	110	123
	diadinoksantyna	100	42	119	130
	chlorofil *a*	100	64	115	107
	chlorofil $c_{1,2}$	100	54	107	105
Phaeocystis globosa	fukoksantyna	100	82	89	150
	diadinoksantyna	100	73	90	152
	chlorofil *a*	100	89	93	151
	chlorofil $c_{1,2}$	100	85	91	154
Thalassiosira weisflogii	fukoksantyna	100	85	98	81
	diadinoksantyna	100	84	101	73
	chlorofil *a*	100	84	100	80
	chlorofil $c_{1,2}$	100	82	94	81

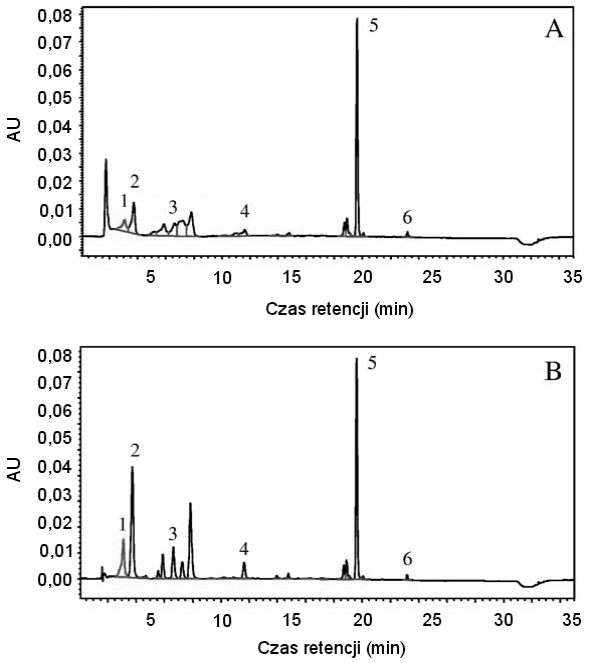
*Ac/4 – ekstrakcja acetonem w temperaturze 4°C po liofilizacji; Ac/-L – ekstrakcja acetonem bez uprzedniej liofilizacji; Ac/-20 – ekstrakcja acetonem w temperaturze -20°C po liofilizacji; MeOH – ekstrakcja metanolem bez uprzedniej liofilizacji

Drugim badanym zagadnieniem była ocena stabilności barwników w ekstraktach. Wykonanie analizy chromatograficznej wymaga umieszczenia fiolek z ekstraktami barwników w autosamplerze. Ze względu na to, że jedna analiza trwa około 2 godzin (przy założeniu, że analizę wykonuje się w 3 powtórzeniach po 35 minut każde), czas oczekiwania ostatniej próbki z serii może być dosyć długi. W tabeli 41 przedstawiono dane o efektach degradacji barwników, które znajdowały się autosamplerze przez 18 godzin. Można stwierdzić, że ekstrakty barwników w 90% acetonie były bardziej stabilne niż w metanolu. Stosunkowo niską stabilnością charakteryzował się jedynie ekstrakt acetonowy z *Emiliania huxleyi*, jednak i w tym przypadku ekstrakty metanolowe były mniej stabilne niż acetonowe. W pracy [406] autorzy przedstawili także interesującą technikę nazywaną *water-paking*. Podczas analizy chromatograficznej przed właściwą próbką wykonuje się nastrzyk wody (20 µl wody Mili-Q), następnie nastrzykuje się analizowany ekstrakt (60 µl) i ponownie wodę (20 µl wody Mili-Q). Zastosowanie tej metody w przypadku ekstraktów acetonowych poprawia rozdział pików (rys. 24), natomiast ekstrakty metanolowe nie wymagają jej użycia [406, 445]. Badania nad stabilnością acetonowych ekstraktów barwników (chlorofili *a*, *b* i *c*, pochodnych chlorofilu *a*, β-karotenu) prowadziły także Kowalewska i Szymczak [222]. Stwierdziły, że ekstrakty barwników były czułe przede wszystkim na działanie światła i tlenu, natomiast temperatura do 25°C nie wywierała na nie istotnego wpływu. Interesujący wydaje się fakt, że chlorofil *a* był mniej stabilny niż jego pochodne, ale bardziej stabilny w porównaniuz β-karotenem.

Tabela 41. Degradacja barwników w ekstraktach acetonowych i metanolowych [406]

Glony	Barwnik	90% aceton			Metanol		
		spadek, %·ml^{-1}·h^{-1}	r^2	p	spadek, %·ml^{-1}·h^{-1}	r^2	p
Pyramimonas sp.	luteina	0,08	0,13	ni	-0,53	0,48	< 0,001
	chlorofil *b*	0,04	0,05	ni	-1,20	0,94	< 0,05
	chlorofil *a*	0,05	0,18	ni	-1,08	0,91	< 0,05
	β-karoten	0,00	0,28	ni	-0,70	0,61	< 0,001
Phaeocystis antarctica	fukoksantyna	0,00	0,00	ni	-0,37	0,43	< 0,05
	diadinoksantyna	0,16	0,26	ni	-0,15	0,04	ni
	chlorofil *a*	-0,03	0,24	ni	-0,79	0,72	< 0,001
	chlorofil $c_{1,2}$	-0,23	0,34	ni	-0,40	0,39	< 0,05
Phaeocystis globosa	fukoksantyna	0,06	0,57	< 0,05	0,00	0,00	ni
	diadinoksantyna	0,07	0,23	ni	-0,22	0,75	< 0,05
	chlorofil *a*	-0,04	0,04	ni	-0,54	0,93	< 0,001
	chlorofil $c_{1,2}$	-0,03	0,02	ni	-0,09	0,67	< 0,05
Thalassiosira weisflogii	fukoksantyna	-0,04	0,01	ni	0,004	0,0003	ni
	diadinoksantyna	-0,07	0,06	ni	-0,31	0,83	< 0,001
	chlorofil *a*	-0,07	0,20	ni	-1,50	0,91	< 0,001
	chlorofil $c_{1,2}$	-0,06	0,40	ni	-2,30	0,98	< 0,001
Emiliania huxleyi	fukoksantyna	-0,24	0,85	< 0,05	-0,54	0,50	< 0,05
	diadinoksantyna	-0,54	0,96	< 0,001	-0,59	0,66	< 0,001
	chlorofil *a*	-0,15	0,87	< 0,05	-2,53	0,95	< 0,001
	chlorofil $c_{1,2}$	-0,54	0,92	< 0,001	-1,49	0,73	< 0,001

r^2 – współczynnik determinacji
p – graniczny poziom istotności



Rys. 24. Chromatogramy barwników otrzymane dla *Phaeocystis antarctica*: (A) z zastosowaniem metody *water-packing*, (B) bez zastosowania metody *water-packing*; (1) chlorofil c_3, (2) chlorofile c_1, c_2, (3) fukoksantyna, (4) diadinoksantyna, (5) chlorofil *a*, (6) β-karoten [406]

W pracy [99] Devesa i współ. przedstawili natomiast wpływ rodzaju rozpuszczalnika, temperatury oraz stosunku osadu do ekstrahenta na wydajność ekstrakcji barwników z osadów rzecznych. Do oznaczenia zawartości barwników w próbkach wykorzystano wzory zaproponowane przez Wellburna [418] (tab. 56). W celu określenia optymalnych warunków ekstrakcji utworzono model matematyczny, a otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 42.

Tabela 42. Optymalne warunki przewidywane zgodnie z modelem, określone w celu otrzymania maksymalnego stężenia barwników przy ekstrakcji dimetylosulfotlenkiem (DMSO), metanolem i acetonem (RO – stosunek roztworu do osadu) [99]

Rozpuszczalniki i barwniki		Zmienne niezależne			Zmienne zależne
		RO $ml \cdot g^{-1}$	czas ekstrakcji min	T °C	μg barwników na g osadu
DMSO	chlorofil *a*	3,6	38	40	53,4
	chlorofil *b*	3,6	50	67	34,4
	całkowite karotenoidy	3,7	51	64	11,4
Metanol	chlorofil *a*	5,0	30	40	36,2
	chlorofil *b*	4,9	30	40	25,6
	całkowite karotenoidy	5,0	30	48	5,1
Aceton	chlorofil *a*	4,8	30	40	25,0
	chlorofil *b*	4,9	30	40	24,0
	całkowite karotenoidy	4,3	69	40	4,7

Zgodnie z uzyskanymi wynikami podczas ekstrakcji należałoby dostosować objętość rozpuszczalnika do masy osadu, a czas jej trwania i temperaturę do określonego rozpuszczalnika. Według zaproponowanego modelu najwyższą wydajność procesu ekstrakcji zapewnia użycie DMSO. Wykonane analizy potwierdziły skuteczność tego ekstrahenta, a wyniki uzyskane w warunkach optymalnych różniły się jedynie o 15% od założonych w modelu (tab. 43). W przedstawionym eksperymencie zwraca uwagę fakt stosunkowo krótkiego czasu ekstrakcji, ale przede wszystkim wysokiej temperatury stosowanej podczas ekstrakcji tak specyficznego związku, jakim jest chlorofil. Biorąc pod uwagę, że w badaniach tych nie przeprowadzono analizy za pomocą metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a ograniczono się jedynie do oznaczenia właściwości spektrometrycznych, trudno ocenić wpływ tego parametru na właściwości otrzymanych ekstraktów.

Tabela 43. Stężenia barwników przewidywane zgodnie z modelem po ekstrakcji barwników z użyciem DMSO w optymalnych warunkach i eksperymentalne wyniki otrzymane w tych samych warunkach [99]

Barwniki	RO $ml \cdot g^{-1}$	Czas ekstrakcji min	T °C	Przewidywane µg barwników na g osadu	Eksperymentalne µg barwników na g osadu
Chlorofil *a*	3,6	38	40	53,4	48,1
Chlorofil *b*	3,6	50	67	34,4	31,0
Całkowite karotenoidy	3,7	51	64	11,4	9,0

4.2. ROZDZIAŁ BARWNIKÓW

Otrzymywane w latach 50. ubiegłego stulecia ekstrakty acetonowe z roślin czy osadów dennych zawierały mieszaniny różnego rodzaju chlorofili, karotenoidów i ich pochodnych. Z mieszaniny wydzielano karotenoidy dzięki reakcji saponifikacji (ekstrakt acetonowy poddawano zmydleniu równoważną objętością 20% metanolowego roztworu wodorotlenku potasu przez 2 h w temperaturze pokojowej). Reakcja ta prowadzi do utworzenia soli potasowych kwasów organicznych włącznie z chlorofilem *a* i chlorofilem *b*, które przez ten zabieg stają się rozpuszczalne w wodzie. Następnie karotenoidy przenosi się do eteru naftowego dodawanego razem z wodą. W kolejnym etapie dodanie 90% metanolu powoduje rozdział karotenoidów na epifazowe i hipofazowe [118].

Rozwój technik laboratoryjnych umożliwił dalszy rozdział mieszanin barwników za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC) jednowymiarowej lub dwuwymiarowej [44, 184, 225, 340, 344, 345, 363, 399, 409]. W chromatografii cienkowarstwowej wykorzystywane są płytki pokryte różnego rodzaju sorbentami. Do najczęściej stosowanych należą płytki pokryte żelem krzemionkowym, tlenkiem glinu, ziemią okrzemkową, poliamidem i celulozą. Rzadziej używa się płytek pokrytych sacharozą, żelami dekstranowymi czy akrylowymi [46]. Do rozwijania chromatogramów wykorzystywane są rozpuszczalniki o różnej stałej dielektrycznej. Wyższa wartość tego parametru świadczy o większej polarności związku (tab. 44) [76]. W tabeli 45 przedstawiono sugerowane przez Touchstone′a i Dobbinsa [399] mieszaniny rozpuszczalników i płytki do rozdziału barwników chloroplastowych.

Podstawowym parametrem oznaczanym w chromatografii cienkowarstwowej jest wartość R_F:

$$R_F = \frac{\text{odległość od źródła do środka plamy}}{\text{odległość od źródła do czoła rozpuszczalnika}}$$

Tabela 44. Rozpuszczalniki zwykle używane w chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej [76]

Rozpuszczalnik	Stała dielektryczna	Rozpuszczalnik	Stała dielektryczna
heksan	1,9	chloroform	4,8
eter naftowy	2,0	octan etylu	6,0
cykloheksan	2,0	alkohol izopropylowy	18,3
tetrachlorek węgla	2,2	aceton	20,7
benzen	2,3	etanol	24,3
toluen	2,4	metanol	32,6
eter dietylowy	3,4	woda	78,5

Tabela 45. Mieszaniny do rozdziału barwników chloroplastowych [399]

Mieszanina	Pokrycie płytki
Izooktan (2,2,4-trimetylopentan):aceton:eter (3:1:1)	żel krzemionkowy lub poliamid
Eter naftowy:benzen:chloroform: aceton:izopropanol (50:35:10:5:0,17)	celuloza
Eter naftowy:n-propanol (99,2:0,8) następnie 20% chloroform w eterze naftowym (ch. dwuwym.)	sacharoza
Eter naftowy:aceton (4:6)	tlenek glinu
Eter naftowy:n-propanol (199:1)	skrobia

Bardzo szczegółowe opracowanie dotyczące chromatograficznego rozdziału karotenoidów przedstawił Foppen w *Tables for identification of carotenoid pigments* [119]. Zaprezentowane dane obejmują zastosowaną metodę, użyte rozpuszczalniki, wartości R_F, maksima absorpcji w zakresie światła widzialnego oraz bogatą literaturę. Tabela 46 obrazuje sposób przedstawienia danych w omawianej publikacji. Zwraca uwagę fakt znacznego zróżnicowania wartości R_F w zależności od składu zastosowanej fazy rozwijającej, np. w zależności od stosunku benzyny ekstrakcyjnej do benzenu wartość R_F dla β-karotenu waha się 0,11 do 0,74.

Metodę jednokierunkowej (jednowymiarowej) chromatografii cienkowarstwowej zastosowali Czeczuga i Czerpak [85] w badaniach, które obejmowały wyekstrahowane acetonem barwniki z osadów dennych jezior Wiżajny i Wądołek. Do rozwijania chromatogramów użyto dwóch mieszanin złożonych z:

– benzenu, eteru etylowego i metanolu zmieszanych w stosunku 17:2:1,
– benzenu, eteru naftowego i acetonu zmieszanych w stosunku 20:5:4.

Tabela 46. Dane dotyczące β-karotenu* [119]

(A) Chromatographic behaviour			*Reference*
Method	*Solvent system*	R_F	
TLC, Silica Gel G	Light petroleum–benzene–ethanol (10:2:1)	0.95	87
TLC, Silica Gel G	Hexane–ethyl acetate (2:1)	0.91	91
TLC, Silica Gel G	Hexane–ethyl acetate (9:1)	0.85	91
TLC, Silica Gel G	Hexane–ether (1:1)	0.87	68
TLC, Silica Gel G	Hexane–benzene (4:1)	0.71	91
TLC, Silica Gel G	Light petroleum–benzene–ethanol (25:25:2)	0.76	92
TLC, Silica Gel G	Undecane–methylene chloride (4:1)	0.73	63
TLC, Silica Gel G	Light petroleum	0.01	63
TLC, Silica Gel G	Light petroleum–ether (19:1)	0.55	63
TLC, Silica Gel G	Hexane–acetone (19:1)	0.80	83
TLC, Silica Gel G impregnated with paraffin	Methanol–acetone (5:2)	0.08	63
TLC, MgO	Light petroleum–benzene (1:9)	0.74	82
TLC, MgO	Light petroleum–benzene (1:1)	0.49	82
TLC, MgO	Light petroleum–benzene (9:1)	0.11	82
TLC, Silica Gel G–$Ca(OH)_2$ (6:1)	Light petroleum–benzene (49:1)	0.84	81
PC, S & S No 287	Light petroleum	0.95	93
PC, S & S No 287	Light petroleum–acetone (49:1)	0.98	93
PC, S & S No 288	Light petroleum	0.46	19
PC, S & S No 288	Light petroleum–acetone (99:9)	0.98	19
PC, S & S No 667	Light petroleum	0.38	84
PC, S & S No 667	Light petroleum–benzene (4:1)	0.62	84
PC, S & S No 287	Light petroleum–isopropanol (200:3)	0.96	84
CC, cellulose	Hexane		94
CC, alumina	Light petroleum–ether (99:1)		28
CC, Alumina II	Light petroleum–ether (9:1)		93
CC, MgO–Celite (1:1)	Hexane		95
GLC, Ucon column, 40°, 500 atm.			86
(B) Visible light absorption			
Solvent	*Maxima (nm)*		
Hexane	425, 450, 476		68
Light petroleum	421, 451, 478		89
Carbon disulphide	450, 475, 505		63
Chloroform	465, 493		95
Acetone	427, 454, 480		83
Ethanol	425, 450, 478		83
$E^{1\%}_{1cm}$ = 2592 (in hexane)			89
(C) Infrared light absorption			
Method	*Maxima (cm^{-1})*		
CCl_4	Represented figure		89
KBr	Represented figure		96

cd. tabeli 46

(D) Nuclear magnetic resonance spectrum			
Solvent	*τ-values*		
$CDCl_3$	8.03, 8.26, 8.45, 8.95		96
$CDCl_3$	Represented figure		89
(E) Mass spectrometry (m/e)			
536, 444, 430			89
(F) Melting points (°C)	*Crystallised from*		
179.80	Light petroleum		90
(G) Partition coefficient			
Solvent system	*Value*		
95% Methanol in hexane	100:0		94

* źródło: Table 26 [119], numeracja cytowanej literatury zgodna z oryginałem

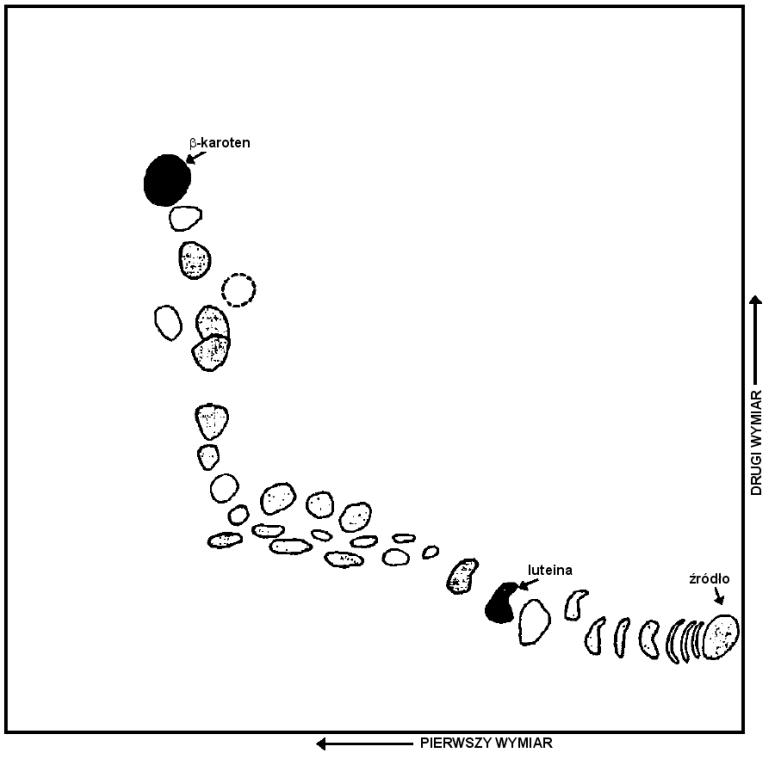
W tabeli 47 przedstawiono liczbę plam widocznych na chromatogramach zarówno w świetle widzialnym, jak i w ultrafiolecie. Liczba uzyskanych plam jest niewielka w porównaniu z wynikami otrzymanymi przez Sangera i Gorhama [344], którzy analizując osady jeziorne, stwierdzili występowanie od 24 do 47 różnych barwników (rys. 25). Jednak badacze ci wykorzystali technikę dwukierunkowej (dwuwymiarowej) chromatografii cienkowarstwowej (*two-dimensional thin layer chromatography*).

Tabela 47. Wyniki analizy chromatograficznej ekstraktów acetonowych z osadów jezior Wiżajny i Wądołek (w nawiasach podano liczbę plam widocznych w świetle widzialnym) [85]

Jezioro	Mieszanina 1	Mieszanina 2
Wiżajny	7 (3)	6 (4)
Wądołek	11 (4)	11 (4)

W zastosowanej przez nich metodzie ekstrakcję barwników prowadzi się 90% roztworem acetonu. Następnie w rozdzielaczu barwniki z acetonu ekstrahowane są eterem dietylowym. W celu usunięcia pozostałości acetonu ekstrakt przemywa się wodą i pozostawia się pod wyciągiem, a następnie osusza nad bezwodnym siarczanem(VI) sodu.

W omawianej metodzie stosowane są dwie mieszaniny rozpuszczalników:
– mieszanina I – 25 cm^3 acetonu i 75 cm^3 benzenu,
– mieszanina II – 100 cm^3 heksanu, 2 cm^3 acetonu, 4 cm^3 propanolu i 0,5 cm^3 metanolu.



Rys. 25. Chromatogram barwników wyekstrahowanych z profundalowych osadów jeziora Itasca [344]

Chromatogramy rozwija się w komorze chromatograficznej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym w ciemności, początkowo z użyciem mieszaniny I. Po osiągnięciu przez czoło rozpuszczalnika 4/5 wysokości płytki przenosi się ją do komory zawierającej mieszaninę II, pamiętając o obróceniu płytki. Chromatogramy należy analizować natychmiast po wyjęciu z II mieszaniny rozwijającej i zaznaczyć miejsca, w których znajdują się plamy barwników. Dalsza analiza polega na przeniesieniu materiału z płytki do probówki z rozpuszczalnikiem, np. z acetonem. Po odwirowaniu i zdekantowaniu próbki można poddać dalszej analizie spektrometrycznej lub w razie potrzeby przenieść do innego rozpuszczalnika (np. heksanu). Sanger i Gorham [344] przedstawili również charakterystykę chromatograficzną materiału organicznego pochodzenia lądowego (tab. 48). W porównaniu z liczbą plam świadczących o obecności barwników uzyskanych dla organizmów wodnych wyniki otrzymane dla materiału pochodzenia lądowego były bardzo skromne, co potwierdza niewielkie zróżnicowanie barwników występujących u roślin lądowych (tab. 49).

Metodę dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej zastosował także Rybak [338], prowadząc badania osadów dennych jeziora Mutek. Wykazał obecność 20 barwników, a spośród 12 zidentyfikowanych większość stanowił β-karoten i jego pochodne. W badanych osadach jeziora Długie w Olsztynie stwierdzono natomiast obecność od 11 do 32 barwników w zależności od warstwy osadu, z których dzięki zastosowaniu metod spektrometrycznych zidentyfikowano 23 [339].

Tabela 48. Zróżnicowanie barwników w materii organicznej pochodzenia lądowego [344]

Materiał	Liczba plam na chromatogramie		
	całkowita	epifazowe	hipofazowe
Materiał żywy			
zielone liście dębu	7	1	3
mieszana flora górska	8		
Materiał rozkładający się			
mieszana flora górska w czasie jesiennej zmiany barwy	10	1	3
jesienne liście dębu	10		
świeżo opadłe liście dębu	10		
suche, jesienne liście	3		
mieszane, świeżo opadłe liście	11		
warstwa próchnicy z lasu dębowego	7	1	1
Liście dębu pogrzebane w osadach jeziornych			
zielone liście dębu pogrzebane przez 24 dni	10		
zielone liście dębu pogrzebane przez 1 rok	8		
fragment liścia dębu znaleziony na głębokości 20 cm	3	1	1

Tabela 49. Zróżnicowanie barwników w materii organicznej pochodzenia lądowego [344]

Materiał	Liczba plam na chromatogramie		
	całkowita	epifazowe	hipofazowe
Żywy materiał			
Glony			
Sinice (różne)	16-21	5-7	6-10
Anabena i *Microcystis*	15		
Staurastrum i *Melosira*	10		
Staurastru	10		
Aphanizomenon	15		
Chara	19		
Makrofity			
Ceratophyllum	12		
Potamogeton (różne)	12		
Potamogeton richardsonii	15		
Rdestnice (różne)	15		
Fotosyntetyczne bakterie			
Rhodospirillum rubrum	11		
Rhodopseudomonas palustris i *R. capsulata*	11		
Rozkładający się materiał			
Glony			
Chara (żółta)	27		
Sinice	21-27	10-13	11-12
Materiał z pułapek osadowych	36-39		
Mieszanina glonów i makrofitów	30-32		
Makrofity rozkładające się w interfazie woda – osad			
Potamogeton (różne)	26		
Ceratophyllum	13		

Także w późniejszych latach technika chromatografii cienkowarstwowej była często stosowana i doskonalona, bowiem umożliwia wyizolowanie czystych barwników do badań spektrometrycznych. W latach 90. ubiegłego stulecia chromatografię cienkowarstwową nadal wykorzystywano do rozdziału mieszanin barwników karotenoidowych i tetrapirolowych [185, 357, 409], przy czym często modyfikowano zarówno skład ekstrahentów, jak i fazy rozwijającej, np. Andersen i współ. w pracy z 1998 roku [9] przedstawili rozdział barwników ekstrahowanych z glonów z zastosowaniem acetonu, metanolu, mieszaniny acetonu i metanolu (1:1) oraz DMSO.

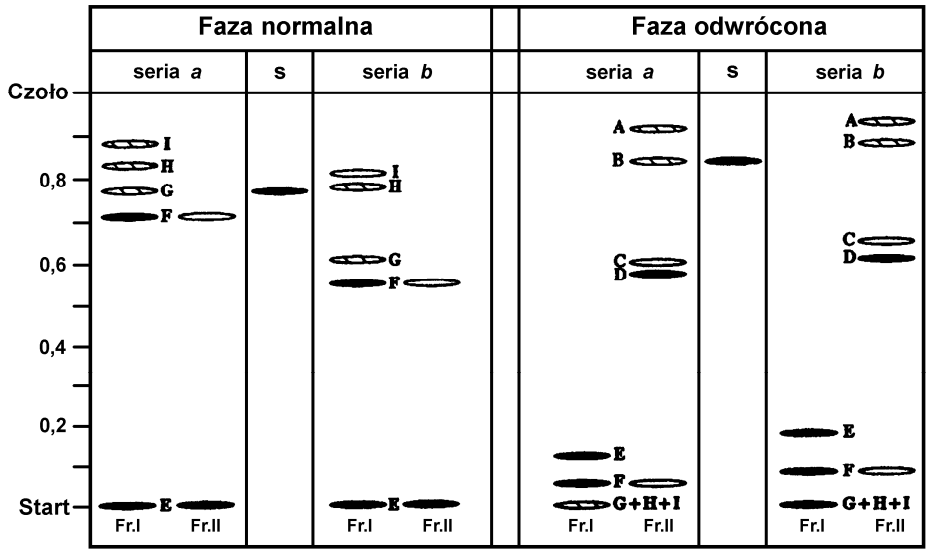
Chromatogramy rozwijano z zastosowaniem różnych mieszanin (eter naftowy:octan etylu:dietyloamina (58:30:12); aceton:eter naftowy (30:70); aceton:*n*-heksan (20:80); aceton:*n*-heksan (40:60)), co stanowiło uzupełnienie analizy prowadzonej za pomocą metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Dalsze modyfikacje stosowanych metod obejmowały użycie płytek i układu rozpuszczalników umożliwiających prowadzenie chromatografii w odwróconym układzie faz. Technikę tę wykorzystał Leavitt [237] w badaniach nad degradacją karotenoidów. Porównanie płytek chromatograficznych zwykłych (TLC) i wysokosprawnych (HPTLC) przedstawiono w tabeli 50 [428]. Zastosowanie płytek HPTLC pozwala na uzyskanie lepszego rozdziału analizowanych mieszanin przy krótszej drodze rozdziału.

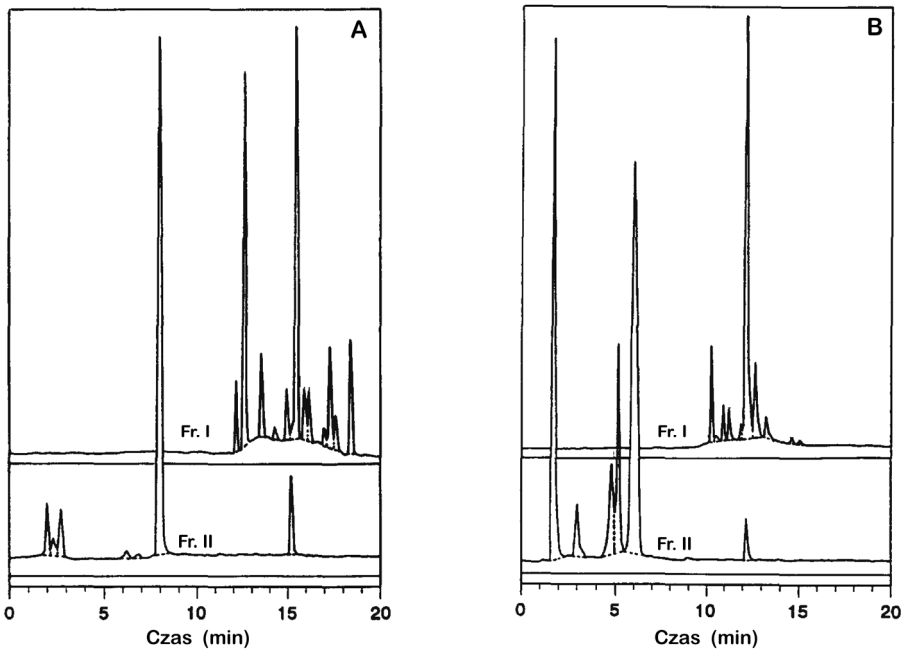
Tabela 50. Porównanie płytek chromatograficznych [428]

Parametr	Płytki zwykłe (TLC)	Płytki wysokosprawne (HPTLC)
Grubość warstwy sorbentu, mm	0,25	0,20
Rozmiar cząstek sorbentu, μm	ok. 0,12	ok. 0,7
Frakcja sitowa sorbentu	szeroka	wąska
Droga rozwijania chromatogramu, %	100, np. 10 cm	ok. 50, np. 3-5 cm
Rozdzielenie składników mieszaniny	dobre	lepsze
Właściwości optyczne warstwy sorbentu	dobre	lepsze
Wykrywalność analizowanych substancji	dobra	lepsza
Wielkość chromatografowanej próbki, %	100	ok. 10-20
Zużycie eluentu	małe	mniejsze

Porównanie rozdziału mieszanin barwników (chlorofili *a* i *b* traktowanych alkaliami) prowadzonego z wykorzystaniem metody chromatografii w normalnym i odwróconym układzie faz przedstawiły Minguez-Mosquera i Gandul-Rojas [287]. Użyły do rozwijania chromatogramów w fazie normalnej mieszaniny benzyny ekstrakcyjnej, acetonu i dietyloaminy (10:4:1) oraz w fazie odwróconej metanolu, acetonu i wody (20:4:3). Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej w normalnym układzie faz umożliwiło zdecydowanie lepszy (w porównaniu z frakcją II) rozdział pochodnych chlorofili z frakcji I (frakcji barwników przeniesionej do eteru dietylowego przez dodanie roztworu chlorku sodu), natomiast wykorzystanie chromatografii o odwróconym układzie faz pozwoliło na rozdział barwników frakcji II (frakcji barwników przeniesionej do fazy eteru dietylowego przez dodanie 18% (v/v) roztworu kwasu chlorowodorowego) (rys. 26, 27, tab. 51). Użycie wysokosprawnej chromatografii cieczowej pozwala na bardziej szczegółowy rozdział otrzymanych pochodnych chlorofilu niż chromatografia cienkowarstwowa. Jednak zwraca uwagę fakt dużego zróżnicowania wyników uzyskanych z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej w normalnym i odwróconym układzie faz.



Rys. 26. Rozdział chromatograficzny taktowanych alkaliami chlorofili *a* i *b* [287]



Rys. 27. Przykładowe chromatogramy powstałych po traktowaniu chlorofilu *a* (A) i chlorofilu *b* (B) alkaliami (detekcja przy 430 nm) – frakcja I (Fr. I), frakcja II (Fr. II) [287]

Tabela 51. Chromatograficzna charakterystyka produktów powstałych pod wpływem działania alkaliów na chlorofile a i b, wyizolowanych za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej oraz lokalizacja odpowiadających im pików na chromatogramach HPLC [287]

Położenie związku			Charakterystyka chromatograficzna (TLC)			
pasmo TLC		nr piku HPLC	R_F		kolor na płytce	
frakcja I[a]	frakcja II		faza odwrócona	faza normalna	światło dzienne	UV – 366 nm
Pochodne chlorofilu *a*						
	A	3	0,91	0,00	niebieskozielony	bf[b]
	B	1,2	0,84	0,00	szarozielony	cf
	C	4, 4′	0,60	0,00	szary	cf
	D	5	0,57	0,00	szarobrązowy	bf
E		6, 6′	0,18	0,00	brązowoniebieskoszary	irf
F	F	9	0,05	0,71	niebieskozielony	bf
G, H, I[c]		4, 7, 8, 8′, 8″, 10, 10′, 11, 11′	0,00	0,77, 0,83, 0,88	niebieskozielony	cf
Pochodne chlorofilu *b*						
	A	2	0,93	0,00	żółtozielony	bf
	B	1	0,88	0,00	brązowozielony	cf
	C	3, 3′	0,65	0,00	brązowozielony	cf
	D	4	0,61	0,00	brązowozielony	bf
E		5, 5′	0,22	0,00	brązowożółtozielony	irf
F	F	8	0,08	0,55	żółtozielony	bf
G, H, I[c]		6, 6′, 7, 9, 9′, 10, 10′	0,00	0,61, 0,78, 0,81	żółtozielony	cf

[a] frakcja barwników przeniesiona do fazy eteru dietylowego przez dodanie wody nasyconej NaCl (frakcja I) lub dodanie 18% (v/v) roztworu HCl (frakcja II)
[b] bf – brak fluorescencji; cf – czerwona fluorescencja; irf – intensywna różowa fluorescencja
[c] pasma G, H i I zostały otrzymane razem

Suzuki i współ. [391] przedstawili zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej o odwróconym układzie faz do oceny właściwości chlorofili *a* i *b* oraz ich pochodnych. W tabeli 52 zestawiono uzyskane wartości R_F. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że ruchliwość analizowanych barwników wzrasta w porządku: feofityna < chlorofil < feoforbid. Wysoka ruchliwość feoforbidu jest powodowana obecnością polarnej grupy karboksylowej w cząsteczce (rys. 5D, pozycja 17). Pozostałe barwiki mają w tej pozycji mniej polarną grupę, estrowo związany fitol.

Tabela 52. Wartości RF analizowanych chlorofili, feofityn oraz feoforbidów [391]

Rozpuszczalnik	Związek					
	I-*a*	I-*b*	II-*a*	II-*b*	III-*a*	III-*b*
Metanol	0,13	0,18	0,014	0,023	0,34	0,44
Etanol	0,66	0,74	0,34	0,41	0,76	0,82
1-propanol	0,81	0,90	0,63	0,67	0,88	0,96
2-propanol	0,74	0,84	0,48	0,57	0,83	0,92
1-butanol	0,94	0,99	0,78	0,85	0,99	1,00
2-butanol	1,00	1,00	0,87	0,92	1,00	1,00
Tert-butanol	0,93	1,00	0,82	0,88	0,96	1,00
1-pentanol	1,00	1,00	0,95	0,98	1,00	1,00
Acetonitryl	0,07	0,09	0,01	0,02	0,31	0,37
Aceton	0,90	0,82	0,76	0,80	1,00	1,00

I-*a* – chlorofil *a* II-*a* – feofityna *a* III-*a* – feoforbid *a*
I-*b* – chlorofil *b* II-*b* – feofityna *b* III-*b* – feoforbid *b*

Pomimo rozwoju techniki i coraz szerszego stosowania do analizy barwników wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) chromatografia cienkowarstwowa bywa nadal używana do badań mieszanin tych związków. Metoda ta może być szczególnie użyteczna przy badaniach wstępnych z racji dostępności, stosunkowo niskiego kosztu oraz możliwości wyodrębnienia barwników do badań spektrometrycznych. Technikę tę stosuje się nadal w farmacji, biochemii, medycynie, analizie zanieczyszczeń środowiska czy analizie żywności [428]. Szersze informacje na temat używanych płytek, faz mobilnych, procesów wizualizacji można znaleźć w *Practice of thin layer chromatography* [399] oraz *CRS handbook of plant chromatography* [225].

4.3. BADANIA ILOŚCIOWE

4.3.1. Względne jednostki barwnikowe

Metoda przestawiona przez Vallentynego [403] oraz zalecana przez Wetzla i Likensa [424] zakłada przeprowadzenie trwającej 24 godziny ekstrakcji barwników z osadów wilgotnych. Do wykonania obliczeń niezbędne jest oznaczenie wilgotności aktualnej oraz zawartości materii organicznej. Krótki opis tej metody przedstawiono poniżej.

Do dużej probówki (można użyć plastikowych probówek typu Falcon) należy odważyć 1-2 g osadu i dodać około 30 cm^3 90% wodnego, alkalicznego roztworu acetonu (do przygotowanego 90% roztworu acetonu dodać 2 krople stężonego roztworu NH_4OH). Probówkę należy zamknąć i zamieszać zawartość, następnie przechowywać w ciemności w temperaturze 4°C przez 24 h, okresowo mieszając. Po upływie czasu

ekstrakcji roztwór przesączyć przez sączek papierowy do szklanej, zamykanej na szlif kolbki miarowej o objętości 100 cm^3. Do probówki z osadem dodać kolejną porcję rozpuszczalnika, przemyć osad i przesączyć do kolbki miarowej następną porcję ekstraktu. Osad przemywać wielokrotnie niewielkimi porcjami rozpuszczalnika do uzyskania przesączu o objętości 100 cm^3.

Właściwości optyczne ekstraktów oznaczyć spektrometrem w zakresie światła widzialnego z zastosowaniem 1-centymetrowej kuwety. Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji przy długości fali 750 nm (A_{750} – absorbancja linii bazowej) oraz maksimum absorpcji w chlorofilowej części widma – A_{662} (maksimum absorpcji może być zlokalizowane między 657 a 666 nm) obliczyć zawartość produktów degradacji barwników roślinnych wyrażoną w SPDU w przeliczeniu na 1 g suchej masy osadu oraz w przeliczeniu na 1 g materii organicznej osadu (SPDU – *Sedimentary Degradation Pigment Unit*). Wartość ta jest definiowana jako absorbancja 1-centymetrowej warstwy roztworu przy długości fali maksimum absorpcji w czerwonej części widma z absorbancją linii bazowej przy 750 nm w warunkach ekstrakcji i rozcieńczenia, jakie opisano powyżej.

Obliczenia:
$SPDU/g_{sm} = (A_{662} - A_{750}) \cdot$ [1/masa naważki suchego osadu (w gramach)]
$SPDU/g_{mo} = (A_{662} - A_{750}) \cdot$ [1/zawartość materii organicznej w naważce suchego osadu (w gramach)]

Zastosowanie SPDU do oceny zawartości barwników można znaleźć nie tylko w starszych publikacjach [1, 51, 91, 140], lecz także w pracach wydanych w XXI wieku [110, 220]. Przy bardziej szczegółowych badaniach wymagany jest jednak rozdział pochodnych chlorofilowych od karotenoidów oraz oddzielenie karotenoidów epifazowych i hipofazowych [424].

4.3.2. Równania do równoczesnego obliczania zawartości barwników

Wykorzystując właściwości spektrometryczne roztworów barwników do oznaczania zawartości barwników, często używa się również równań, które są dostosowane do rodzaju rozpuszczalnika.

W publikacji dotyczącej standardowch metod badań wód i ścieków [5] przedstawiono równania przeznaczone dla roztworów barwników ekstrahowanych 90% acetonem:

$$\text{chlorofil } a = 11{,}85 \cdot A_{664} - 1{,}54 \cdot A_{647} - 0{,}08 \cdot A_{630}$$
$$\text{chlorofil } b = 21{,}03 \cdot A_{647} - 5{,}43 \cdot A_{664} - 2{,}66 \cdot A_{630}$$
$$\text{chlorofil } c = 24{,}52 \cdot A_{630} - 7{,}60 \cdot A_{647} - 1{,}67 \cdot A_{664}$$

Marković i współ. [273] wykorzystali natomiast wzory zaproponowane w pracach Holma [173] i Wettsteina [421]:

$$\text{chlorofil } a = 9{,}784 \cdot A_{662} - 0{,}990 \cdot A_{644}$$
$$\text{chlorofil } b = 21{,}426 \cdot A_{644} - 4{,}650 \cdot A_{662}$$
$$\text{karotenoidy} = 4{,}695 \cdot A_{440} - 0{,}268 \cdot (a + b)$$

Bardzo szeroki przegląd stosowanych równań przedstawili Jeffrey i Welschmeyer w pracy [196] (tab. 53-55). Zaproponowane wzory dostosowane są do pomiarów wyko-

nywanych w 1-centymentrowej kuwecie. Także Wellburn w pracy z 1994 roku [418] zamieścił przegląd równań stosowanych w metodach spektrometrycznych dostosowanych do różnych rozpuszczalników (tab. 56).

Tabela 53. Równania do równoczesnego obliczania zawartości chlorofili a i c [179, 192, 196]

Jeffrey i Humphrey 1975, **Humphrey 1979** rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla ***Chromophyta*** chlorofil *a* = $11,47 \cdot E_{664} - 0,40 \cdot E_{630}$ chlorofil c_1+c_2 = $24,36 \cdot E_{630} - 3,73 \cdot E_{663}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *c*
rozpuszczalnik 100% aceton; jednostki $\mu g \cdot dm^{-3}$; przeznaczone dla bruzdnic i kryptomonad chlorofil *a* = $11,43 \cdot E_{663} - 0,64 \cdot E_{630}$ chlorofil c_1+c_2 = $27,09 \cdot E_{630} - 3,63 \cdot E_{663}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *c*
rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki $\mu g \cdot dm^{-3}$; przeznaczone dla bruzdnic i kryptomonad chlorofil = $11,43 \cdot E_{664} - 0,40 \cdot E_{630}$ chlorofil c_1+c_2 = $24,88 \cdot E_{630} - 3,38 \cdot E_{664}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *c*

Tabela 54. Równania do równoczesnego obliczania zawartości chlorofili a, b i c [192, 196, 302, 327, 358]

Richards i Thompson 1952 rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki dla równań dla chlorofili *a* i *b* $mg \cdot dm^{-3}$, dla chlorofilu *c* $MSPU \cdot dm^{-3}$: *Mili-Specified Pigments Units* chlorofil *a* = $15,6 \cdot E_{665} - 2,0 \cdot E_{645} - 0,8 \cdot E_{630}$ chlorofil *b* = $25,4 \cdot E_{645} - 4,4 \cdot E_{665} - 10,3 \cdot E_{630}$ chlorofil *c* = $109 \cdot E_{630} - 12,5 \cdot E_{665} - 28,7 \cdot E_{645}$ nierekomendowane
Parsons i Strickland 1963 rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki $mg \cdot dm^{-3}$ chlorofil *a* = $11,6 \cdot E_{665} - 0,14 \cdot E_{630} - 1,31 \cdot E_{645}$ chlorofil *b* = $20,7 \cdot E_{645} - 4,34 \cdot E_{665} - 4,42 \cdot E_{630}$ chlorofil *c* = $55 \cdot E_{630} - 16,3 \cdot E_{645} - 4,64 \cdot E_{665}$ rekomendowane tylko dla chlorofilu *a*
SCOR-UNESCO 1966 rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$ chlorofil *a* = $11,64 \cdot E_{663} - 2,16 \cdot E_{645} + 0,10 \cdot E_{630}$ chlorofil *b* = $-3,94 \cdot E_{663} + 20,97 \cdot E_{645} - 3,66 \cdot E_{630}$ chlorofil *c* = $-5,53 \cdot E_{633} - 14,81 \cdot E_{645} + 54,22 \cdot E_{630}$ rekomendowane tylko dla chlorofilu *a*
Jeffrey i Humphrey 1975 rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla planktonu mieszanego chlorofil *a* = $11,85 \cdot E_{664} - 1,54 \cdot E_{647} - 0,08 \cdot E_{630}$ chlorofil *b* = $-5,43 \cdot E_{664} + 21,03 \cdot E_{647} - 2,66 \cdot E_{630}$ chlorofil c_1+c_2 = $-1,67 \cdot E_{634} - 7,60 \cdot E_{647} + 24,52 \cdot E_{630}$ rekomendowane dla chlorofili *a*, *b* i *c*

Tabela 55. Równania do równoczesnego obliczania zawartości chlorofili a i b [15, 192, 196, 314]

Arnon 1949 rozpuszczalnik 80% aceton; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla zielenic i barwników liści chlorofil *a* = $12,7 \cdot E_{663} - 2,69 \cdot E_{645}$ chlorofil *b* = $22,9 \cdot E_{645} - 4,68 \cdot E_{663}$ nierekomendowane
Jeffrey i Humphrey 1975 rozpuszczalnik 90% aceton; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla zielenic i barwników liści chlorofil *a* = $11,93 \cdot E_{664} - 1,93 \cdot E_{647}$ chlorofil *b* = $20,36 \cdot E_{647} - 5,50 \cdot E_{664}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *b*
Porra i współ. 1989 rozpuszczalnik zbuforowany 80% aceton; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla zielenic i barwników liści chlorofil *a* = $12,25 \cdot E_{663,6} - 2,55 \cdot E_{646,6}$ chlorofil *b* = $20,31 \cdot E_{646,6} - 4,91 \cdot E_{663,6}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *b*
rozpuszczalnik metanol; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla zielenic i barwników liści chlorofil *a* = $16,29 \cdot E_{665,2} - 8,54 \cdot E_{652}$ chlorofil *b* = $30,66 \cdot E_{652} - 13,58 \cdot E_{665,2}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *b*
rozpuszczalnik dimetyloformamid; jednostki $\mu g \cdot cm^{-3}$; przeznaczone dla zielenic i barwników liści chlorofil *a* = $12,00 \cdot E_{663,8} - 3,11 \cdot E_{646,8}$ chlorofil *b* = $20,78 \cdot E_{646,8} - 4,88 \cdot E_{663,8}$ rekomendowane dla chlorofili *a* i *b*

Interesujące porównanie zawartości barwników oznaczonych spektrometrycznie przedstawili Dere i współ. w pracy [98]. Do badań wykorzystano słodkowodną *Cladophora glomerata* oraz słonowodne *Codium tomentosum*, *Ulva rigita* oraz *Cladostephus verticillatus*. Do ekstrakcji użyto 95% eteru dietylowego, 96% metanolu i 100% acetonu, a do obliczeń wykorzystano wzory zamieszczone w tabeli 57 [256]. Według autorów przedstawione w tabeli 58 dane wskazują, że najbardziej efektywnym ekstrahentem jest metanol. Nie stwierdzono istotnej różnicy w efektywności ekstrakcji w przypadku eteru dietylowego i acetonu. Jednak przy tego typu badaniach wnioskować należy bardzo ostrożnie. Jak wskazują równania przedstawione w tabelach 56 i 57, wraz z postępem nauki zmianie ulegają formuły równań, w związku z tym stosowanie wzorów do obliczeń zawartości barwników można rekomendować do porównywania efektywności ekstrakcji ze zróżnicowanego materiału organicznego w przypadku stosowania tego samego rozpuszczalnika niż porównywania efektywności różnych rozpuszczalników.

Tabela 56. Równania do obliczania zawartości chlorofili *a* i *b* oraz karotenoidów (µg·cm^{-3}) [418]

Rozpuszczalnik	Równanie
80% aceton	chlorofil *a* (C_a) = 12,21·A_{663} - 2,81·A_{646} chlorofil *b* (C_b) = 20,13·A_{646} - 5,03·A_{663} karotenoidy = (1000·A_{470} - 3,27·C_a - 104·C_b)/198
Chloroform	chlorofil *a* (C_a) = 10,91·A_{666} - 1,2·A_{648} chlorofil *b* (C_b) = 16,38·A_{648} - 4,57·A_{666} karotenoidy = (1000·A_{480} - 1,42·C_a - 46,09·C_b)/202
Eter dietylowy	chlorofil *a* (C_a) = 10,05·A_{662} - 0,77·A_{644} chlorofil *b* (C_b) = 16,37·A_{644} - 3,14·A_{662} karotenoidy = (1000·A_{470} - 1,28·C_a - 56,7·C_b)/205
Dimetyloformamid	chlorofil *a* (C_a) = 11,65·A_{664} - 2,69·A_{647} chlorofil *b* (C_b) = 20,81·A_{647} - 4,53·A_{664} karotenoidy = (1000·A_{480} - 0,89·C_a - 52,02·C_b)/245
DMSO	chlorofil *a* (C_a) = 12,19·A_{665} - 3,45·A_{649} chlorofil *b* (C_b) = 21,99·A_{649} - 5,32·A_{665} karotenoidy = (1000·A_{480} - 2,14·C_a - 70,16·C_b)/220
Metanol	chlorofil *a* (C_a) = 15,65·A_{666} - 7,34·A_{653} chlorofil *b* (C_b) = 27,05·A_{653} - 11,21·A_{666} karotenoidy = (1000·A_{470} - 2,86·C_a - 129,2·C_b)/221

Tabela 57. Równania do obliczania zawartości chlorofili *a* i *b* oraz karotenoidów (µg·cm^{-3}) [256]

Rozpuszczalnik	Równanie
100% aceton	chlorofil *a* (C_a) = 11,75·A_{662} - 2,35·A_{645} chlorofil *b* (C_b) = 18,61·A_{645} - 5,3,96·A_{662} karotenoidy = (1000·A_{470} - 2,27·C_a - 81,4·C_b)/227
Eter dietylowy	chlorofil *a* (C_a) = 10,05·A_{662} - 0,77·A_{644} chlorofil *b* (C_b) = 16,37·A_{644} - 3,14·A_{662} karotenoidy = (1000·A_{470} - 1,28·C_a - 56,7·C_b)/230
Metanol	chlorofil *a* (C_a) = 15,65·A_{666} - 7,34·A_{653} chlorofil *b* (C_b) = 27,05·A_{653} - 11,21·A_{666} karotenoidy (C_{k+k}) = (1000·A_{470} - 2,86·C_a - 129,2·C_b)/245

Tabela 58. Zawartość barwników w ekstraktach [98]

Gatunek	Barwnik	Metanol	Eter dietylowy	Aceton
		µg·$g_{św}^{-1}$		
Cladophora glomerata	C_a	60,7	53,8	56,2
	C_b	23,0	20,1	20,3
	C_{k+k}	19,2	18,8	20,1
Ulva rigita	C_a	54,6	48,6	48,9
	C_b	24,1	21,2	23,3
	C_{k+k}	20,8	21,6	20,6
Codium tomentosum	C_a	49,0	46,2	47,4
	C_b	21,8	20,1	20,2
	C_{k+k}	24,7	20,5	22,4
Cladostephus verticillatus	C_a	51,3	47,9	48,2
	C_b	–	–	–
	C_{k+k}	33,8	28,7	29,5

4.4. ZASTOSOWANIE WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W ANALIZIE BARWNIKÓW ROŚLINNYCH

Postęp techniczny umożliwił również rozwój technik stosowanych w badaniach nad barwnikami oraz ich pochodnymi izolowanymi z tkanek roślinnych i różnego typu osadów dennych. Od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) wykorzystuje się do separacji, identyfikacji oraz oznaczania ilościowego chlorofili i karotenoidów [109, 111, 152, 186, 271, 361, 432, 447].

Wysokosprawną chromatografię cieczową można stosować w normalnym układzie faz (NP), gdy adsorbent jest polarny (hydrofilowy), a rozpuszczalnik – mniej polarny, a także w układzie odwróconym (RP), gdy faza stacjonarna jest słabo polarna lub niepolarna, a rozpuszczalnik – polarny. Według niektórych autorów zaletą chromatografii w normalnym układzie faz są stosunkowo krótkie czasy retencji [325]. Do eluentów używanych podczas analiz w normalnym układzie faz zaliczyć można: heksan, izooktan, chloroform i chlorek metylenu. Sporządzając mieszaniny rozpuszczalników, należy korzystać z diagramu mieszalności rozpuszczalników [428].

Do optymalnego rozdziału analizowanych barwników nie wystarczają już pojedyncze rozpuszczalniki, lecz stosuje się ich mieszaniny. Skład mieszaniny może być przez cały czas trwania analizy jednakowy i wówczas jest to tak zwana elucja izokratyczna. W przypadku próbek bardziej złożonych stosuje się natomiast elucję gradientową. W czasie rozdzielania składników jednej próbki skład eluentu zmienia się i zwiększa się jego siła eluowania. Zmiana składu mieszaniny może być liniowa lub przebiegać skokowo [295, 335, 428].

Analiza chromatograficzna barwników sprawia duże trudności z jednej strony ze względu na duże zróżnicowanie polarności analizowanych związków, z drugiej – ponieważ związki te często mają bardzo podobną strukturę, przy czym niektóre różnią się jedynie położeniem wiązania podwójnego. W badaniach tego typu zwykle wykorzystuje się kolumny C_8-C_{30} i elucję gradientową. Zawartość chlorofili i karotenoidów jest najczęściej oznaczana za pomocą metody RP-HPLC głównie z zastosowaniem kolumn C_{18} [37, 38, 50, 58, 80, 95, 125, 126, 133, 161, 162, 171, 174, 180, 229, 251, 268, 323, 356, 408, 426, 433, 443], rzadziej C_8 [82, 204, 264, 279, 407]. Faza ruchoma składa się natomiast z dwóch lub trzech rozpuszczalników mieszanych sukcesywnie w celu otrzymania gradientu polarności roztworu, dzięki czemu bardziej polarne barwniki są wymywane wcześniej niż mniej polarne [40, 41, 54, 75, 194, 201, 211, 225, 245, 251, 276, 279, 354, 382, 428, 432].

W badaniach porównawczych analizowano wpływ rodzaju kolumny na rozdział barwników wyekstrahowanych z osadów dennych zdeponowanych w estuarium oraz z fitoplanktonu [279]. Wyniki otrzymane przez Mendesa i współ. wskazują, że zarówno wybór kolumny, jak i układu rozpuszczalników (tab. 59) istotnie wpływa na detekcję barwników i czas ich retencji (rys. 28, tab. 60). Czasy retencji otrzymane dla poszczególnych barwników są wyższe i sama analiza trwa dłużej w przypadku zastosowania kolumny C_8.

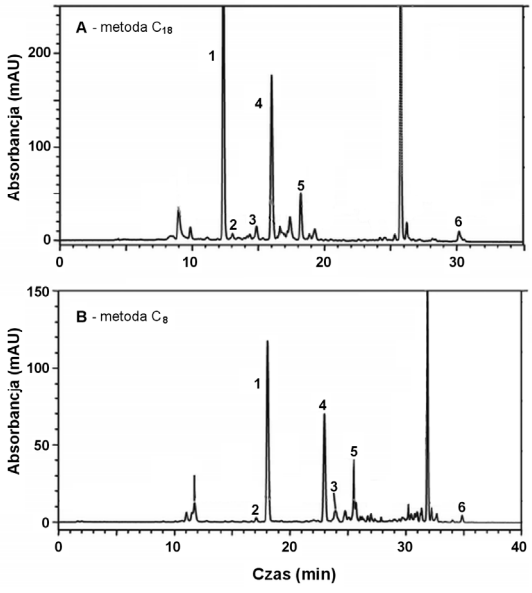
Tabela 59. Skład faz mobilnych wykorzystanych w metodach C_{18} i C_8 [279]

		Rozpuszczalnik		
Metoda C_{18}	Czas min	A	B	C
		metanol:woda* (85:15 v/v)	acetonitryl:woda (90:10 v/v)	octan etylu
		%	%	%
	0	60	40	0
	2	0	100	0
	7	0	80	20
	17	0	50	50
	21	0	30	70
	28,5	0	30	70
	29,5	0	100	0
	30,5	60	40	0
	35	60	40	0

		Rozpuszczalnik	
Metoda C_8	Czas min	A	B
		metanol:acetonitryl:pirydyna** (50:25:25 v/v/v)	metanol:actonitryl:aceton (20:60:20 v/v/v)
		%	%
	0	100	0
	20	60	40
	26	5	95
	38	5	95
	40	100	0

* mieszanina zbuforowana 0,5 M octanem amonu

** wodny roztwór pirydyny (0,25 M) doprowadzony do pH = 5 kwasem octowym



Rys. 28. Przykładowe chromatogramy barwników wyekstrahowanych z próbek osadów dennych; (1) fukoksantyna, (2) pochodna fukoksantyny, (3) neofukoksantyna, (4) diadinoksantyna, (5) diatoksantyna, (6) β,β-karoten [279]

Tabela 60. Wykaz barwników, ich czasów retencji i maksimów absorpcji otrzymanych dla kolumn C_{18} i C_8 [279]

Barwnik	Czas retencji, min		λ_{maks}, nm	
	C_{18}	C_8	C_{18}	C_8
Chlorofil c_3	7,58	7,30	454, 586	458, 591
Chlorofilid *a*	7,51	9,88	431, 665	429, 664
Chlorofil c_2	8,69	10,68	445, 581, 630	452, 584, 633
Chlorofil c_1	–	11,70	–	447, 581, 632
Peridinina	10,88	13,77	475	475
Fukoksantyna	12,38	18,18	448, 465	450, 464
Neoksantyna	12,91	19,10	414, 438, 466	414, 437, 466
Prasinoksantyna	13,51	19,67	454	455
Wiolaksantyna	13,81	20,54	417, 441, 471	417, 440, 470
Diadinoksantyna	15,45	23,06	424, 448, 477	424, 446, 476
Anteraksantyna	16,60	24,13	424, 448, 476	423, 446, 475
Alloksantyna	16,84	24,85	429, 454, 483	429, 453, 482
Diatoksantyna	17,77	25,51	430, 454, 482	428, 453, 481
Luteina	18,24	26,21	425, 447, 475	425, 447, 475
Zeaksantyna	18,71	26,04	430, 454, 481	428, 453, 479
Chlorofil *b*	22,97	30,20	457, 596, 646	462, 599, 648
Chlorofil *a* allomer	25,30	31,36	428, 613, 662	428, 619, 663
Chlorofil *a*	25,82	31,72	430, 617, 663	431, 617, 663
Chlorofil *a* epimer	26,61	32,21	430, 615, 663	429, 617, 663
α-karoten	29,71	35,46	426, 449, 476	427, 447, 475
β-karoten	30,00	35,77	430, 454, 481	429, 454, 480

W monografii poświęconej barwnikom fitoplanktonu [194] rekomendowana jest metoda przedstawiona przez Wrighta i współ. [432]. Analizę przeprowadza się w odwróconym układzie faz z użyciem kolumny C_{18}, co pozwala na rozdział 40 karotenoidów oraz 12 chlorofili i ich pochodnych. W tabeli 61 przedstawiono program HPLC, natomiast w tabeli 62 – uzyskane za pomocą tej metody czasy retencji. Nie jest to jednak metoda doskonała, bowiem nie pozwala na rozdział niektórych par barwników, np. form mono- i diwinylowych w przypadku chlorofili *a* i *b* oraz chlorofilu c_3. Wykorzystuje się też dwie inne metody z zastosowaniem kolumn C_8, w których octan amonu zastąpiono pirydyną bądź octanem tetrabutyloamonu (TBAA). Zapata i współ. [446] zaproponowali użycie odmiennych mieszanin eluentów oraz gradientów stężeń (tab. 63). Wykorzystując tę metodę, Zapata i współ. uzyskali rozdział 7 polarnych pochodnych chlorofilu *c*, rozdział mono- i diwinylowego chlorofilu *a* oraz częściowy rozdział mono- i diwinylowego chlorofilu *b*.

Tabela 61. Programy rozpuszczalników [432]

Czas, min	Przepływ, $cm^3 \cdot min^{-1}$	%A	%B	%C	Warunki
A. protokół analizy					
0,0	1,0	100	0	0	nastrzyk
2,0	1,0	0	100	0	gradient liniowy
2,6	1,0	0	90	10	gradient liniowy
13,6	1,0	0	65	35	gradient liniowy
18,0	1,0	0	31	69	gradient liniowy
23,0	1,0	0	31	69	zatrzymanie
B. protokół zamknięcia					
25,0	1,0	0	100	0	gradient liniowy
26,0	1,0	100	0	0	gradient liniowy
34,0	1,0	100	0	0	zatrzymanie
0,0	1,0	100	0	0	analiza zakończona
3,0	1,0	0	100	0	gradient liniowy
6,0	1,0	0	0	100	gradient liniowy
16,0	1,0	0	0	100	przemywanie
17,0	1,0	0	0	100	zamknięcie

A – mieszanina: metanol/0,5M octan amonu (80:20);
B – mieszanina: acetonitryl/woda (90:10);
C – octan etylu; kolumna Spherisorb ODS2

Tabela 62. Czasy retencji barwników uzyskane przy zastosowaniu programu rozpuszczalników przedstawionego w tabeli 61 [193]

Barwnik	Czas retencji, min	Skład rozpuszczalnika		
		%A	%B	%C
Czoło rozpuszczalnika	2,56			
Chlorofilid *b*	4,48	29,0	71,0	0,0
Chlorofilid *a*	5,01	2,5	97,5	0,0
Chlorofil c_3	5,38	0,0	94,7	5,3
Chlorofil c_1 i c_2	6,40	0,0	88,3	11,7
Peridinina	7,42	0,0	86,0	14,0
Syfonoksantyna	8,11	0,0	84,4	15,6
Fukoksantyna	8,70	0,0	83,1	16,9
trans-neoksantyna	9,11	0,0	82,2	17,8
cis-neoksantyna	9,31	0,0	81,7	18,3
cis-fukoksantyna	9,68	0,0	80,9	19,1
Feoforbid *a*	10,39	0,0	79,3	20,7
Wiolaksantyna	10,59	0,0	78,8	21,2
Dinoksantyna	10,76	0,0	78,4	21,6
Diadinoksantyna	11,61	0,0	76,5	23,5
Anteraksantyna	12,24	0,0	75,0	25,0
Alloksantyna	12,51	0,0	74,4	25,6
Monadoksantyna	12,78	0,0	73,8	26,2
Diatoksantyna	13,08	0,0	73,1	26,9
Luteina	13,36	0,0	72,5	27,5
Zeaksantyna	13,59	0,0	72,0	28,0
Kantaksantyna	14,00	0,0	71,0	29,0
Syfoneina	14,36	0,0	70,2	29,8
Chlorofil *b*	15,15	0,0	68,4	31,6

cd. tabeli 62

Chlorofil *a* allomer	15,87	0,0	66,8	33,2
Chlorofil *a*	16,15	0,0	66,2	33,8
Chlorofil *a* epimer	16,53	0,0	65,3	34,7
Echinenon	16,74	0,0	64,6	35,4
Likopen	17,59	0,0	60,1	39,9
Feofityna *b*	17,58	0,0	59,6	40,4
γ-karoten	18,26	0,0	56,5	43,5
ε-karoten	18,40	0,0	55,8	44,2
Feofityna *a*	18,56	0,0	54,9	45,1
α-karoten	18,64	0,0	54,5	45,5
β-karoten	18,76	0,0	53,8	46,2

Tabela 63. Profil gradientu i skład fazy mobilnej [447]

Czas min	A: metanol:acetonitryl:wodny roztwór pirydyny (50:25:25 v/v/v) %A	B1: metanol:acetonitryl:aceton (20:60:20 v/v/v) %B
0	100	0
22	60	40
28	5	95
38	5	95
40	100	0
Czas min	A: metanol:acetonitryl:wodny roztwór pirydyny (50:25:25 v/v/v) %A	B2: acetonitryl:aceton (80:20 v/v) %B
0	100	0
18	60	40
22	0	100
38	0	100
40	100	0

Van Heukelem i Thomas [405] przedstawili ewaluację różnych typów kolumn. Podobnie jak w przypadku metod wykorzystywanych przez Zapatę i współ. [447] zastosowanie kolumn C_8 polepszyło rozdział barwników należących do rodziny chlorofili *c*. Warunki, w jakich przeprowadzono rozdziały, przedstawiono w tabeli 64. Rozdział mono- i diwinylowych par barwników uzyskali Garrido i Zapata [127] przy zastosowaniu kolumny C_{18}. Jako rozpuszczalników użyto mieszanin wodnego roztworu metanolu i acetonitrylu oraz acetonu z pirydyną. Zastosowanie tego rozwiązania pozwoliło na rozdział par mono- i diwinylowych, nie umożliwiło jednak prawidłowego rozdziału karotenoidów.

Kolumnę C_8 wykorzystali w badaniach Josefson i Hansen [204], analizując zawartość fukoksantyny i chlorofilu *a* w osadach morskich. Zastosowanie tej kolumny i rozpuszczalników w układzie 75:25 – aceton:woda (A) i 80:20 – aceton:metanol z detekcją przy 449 nm (dla fukoksantyny) i 662 nm (dla chlorofilu *a*) pozwoliło na szybki (poniżej 20 minut) i dokładny rozdział analizowanych barwników. Szerszy przegląd używanych w analizach chromatograficznych mieszanin eluentów przedstawiono w tabeli 65.

Tabela 64. Warunki analiz chromatograficznych* [405]

Kolumna	Wymiary kolumny mm	Temperatury kolumny °C	Czasy gradientów min	Początkowy %A	Początkowy %B	Przepływ $ml \cdot min^{-1}$
Kolumny C_8						
Hypersil mos-2	100 x 4,6	40, 60	15, 45	95	5	1,0
Luna C8(2)	100 x 4,6	40, 60	15, 45	95	5	0,8
Eclipse XDD	150 x 4,6	45, 60	20, 60	100	0	1,0
Kolumny C_{18}						
Supelcosil LC 318	250 x 4,6	45, 60	20, 60	95	5	1,0
Supelcosil LC PAH	100 x 4,6	45, 60	15, 45	95	5	1,0
Vydac 201TP	250 x 3,2	45, 60	20, 60	100	0	0,6
YMC ODS-AL	150 x 4,6	40, 60	20, 60	95	5	1,0
Zorbax Bonus-RP C_{14}	250 x 4,6	45, 60	20, 60	100	0	1,2
YMC C_{30}	250 x 4,6	40, 60	20, 60	80	20	1,0

* barwniki analizowano dla każdej kolumny w dwóch wartościach temperatury i czasów gradientów. Wszystkie gradienty były liniowe od określonego początkowego % rozpuszczalnika B do 100% B. Rozpuszczalnik A – 70:30 metanol, 28 mM octan tetrabutyloamonu (TBAA), pH = 6,5; rozpuszczalnik B – metanol, z wyjątkiem kolumny YMC C_{30}, w przypadku której zastosowano etanol

Tabela 65. Skład mieszanin rozpuszczalników stosowanych w analizie HPLC

A	B	C	Źródło
1	2	3	4
51:49 – tetrahydrofuran:woda	–	–	[205]
51:49 – metanol:dichlorometan	–	–	[105]
83:17 – aceton:woda	–	–	[221]
44:49,5:6,5 – octan etylu:metanol:woda	–	–	[365]
60:20:20 – acetonitryl:metanol:octan etylu	–	–	[286, 453]
85:10:5 – acetonitryl:metanol:izopropanol	–	–	[297]
75:20:5 – acetonitryl:2-propanol:woda	–	–	[442]
63:7:30 – acetonitryl:0,5% roztwór trietyloaminy:metanol	octan etylu	–	[187, 372]
80:20 – metanol:0,5M octan amonu	90:10 – acetonitryl:woda	–	[26, 75]
70:30 – metanol:0,5 M octan amonu	metanol	–	[64, 75]
70:30 – metanol:1M octan amonu	metanol	–	[75, 258]
70:30 – metanol:octan amonu	metanol		[101]
70:30 – metanol:28mM TBAA*	metanol	–	[405]
80:10:10 – metanol:IPR**:woda	metanol	–	[37]
80:10:10 – metanol:IPR**:woda	60:40 – metanol:aceton	–	[54]
51:36:13 – metanol:acetonitryl:woda	70:30 – octan etylu:acetonitryl	–	[59]
50:30:20 – metanol:actonitryl:1M octan amonu	50:50 – acetonitryl:octan etylu	–	[125]
90:10 – metanol:IPR*	63:27 – metanol:aceton	–	[241, 244]
80:20 – metanol:0,005M fosforan tetrabutyloamonu (PIC A)	80:20 – metanol:aceton	–	[180]
45:45:10 – metanol:acetonitryl:IPR*	45:55 – acetonitryl:aceton	–	[114]
80:20 – metanol:1M octan amonu	80:20 – metanol:aceton	–	[247]
70:30 metanol:woda	80:20 – metanol:octan etylu	–	[130]
70:30 – metanol:1M octan amonu	70:30 – metanol:octan etylu	–	[439]
80:20 – metanol:1M octan amonu	60:40 – metanol:aceton	–	[4, 383]
80:20 – metanol:0,5M octan amonu	80:20 – metanol:aceton	–	[121, 203]

cd. tabeli 65

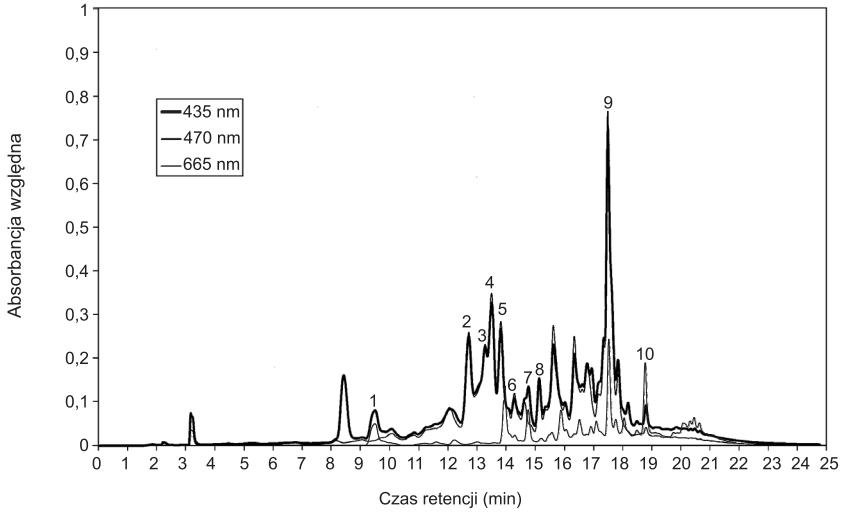
1	2	3	4
80:20 – metanol:0,5M octan amonu	70:30 – metanol:aceton	–	[122]
80:20 – metanol:0,5M octan amonu	50:50 – metanol:aceton	–	[411]
50:25:25 – metanol:acetonitryl:0,25M wodny roztwór pirydyny	80:20 – acetonitryl:aceton	–	[446]
45:35:25 – metanol:acetonitryl:0,25M wodny roztwór pirydyny	60:40 – acetonitryl:aceton	–	[127]
50:25:25 – metanol:acetonitryl:0,25M wodny roztwór pirydyny	20:60:20 – metanol:acetonitryl:aceton	–	[444, 447]
0,3M octan amonu w 51:36:13 – metanol:acetonitryl:woda	70:30 – octan etylu:acetonitryl	–	[59]
acetonitryl	80:20–woda destylowa:TBAA*	10:5 – aceton:acetonitryl	[348]
80:20 – metanol:1M octan amonu	80:20 – metanol:aceton	aceton	[270]
metanol	0,025M wodny roztwór pirydyny	aceton	[124]
80:20 – metanol:0,5M octan amonu	90:10 – acetonitryl:woda	octan etylu	[32, 94, 201, 251, 277, 303, 429, 432]
70:30 – metanol:28mM octan tetrabutyloamonu	metanol	octan etylu	[75]
80:10:10 – metanol:woda:octan amonu	90:10 – metanol:aceton	10:7,7 – metanol:propanol	[426]

* TBAA – octan tetrabutyloamonu

** IPR (*Ion Pairing Reagent*) – 1,5 g octanu tetrabutyloamonu i 7,7 g octanu amonu rozpuszczone w 100 ml wody

W celu przeprowadzenia poprawnych interpretacji i integracji pików dla próbek zawierających zróżnicowane barwniki ważne jest prawidłowe określenie długości fali, przy której powinna być prowadzona detekcja. Zwykle stosuje się następujące długości fal:

– 435 nm – rejestrowane są piki związane z obecnością większości barwników z wyjątkiem feofityny *a*, feoforbidu *a* i ich pochodnych,
– 470 nm – rejestrowane są piki odpowiadające karotenoidom, chlorofilom *b* i *c*, nie występują interferencje związane z pochodnymi chlorofilu *a*,
– 665 nm – detekcja chlorofilu *a*, feofityny *a*, feoforbidu *a* i ich pochodnych. Przykładowy chromatogram z zastosowaniem detekcji przy omawianych długościach fal przedstawiono na rysunku 29 [171].



Rys. 29. Chromatogramy barwników wyekstrahowanych z osadów jeziora Fidler; (1) feoforbid *a*, (2) alloksantyna, (3) diatoksantyna, (4) luteina, (5) bakteriofeofityna *c* fr. 1, (6) bakteriofeofityna *c* fr. 2, (7) chlorofil *a*, (8) izorenieraten, (9) β,β-karoten, (10) pirofeofityna *a* [171]

Jak wskazują dane przedstawione tabeli 68, długości fal, przy których prowadzona jest detekcja w analizie chromatograficznej barwników z zastosowaniem detektora z matrycą diodową (*Diode Array Detector* – DAD), są bardzo zróżnicowane.

W analizie chromatograficznej oprócz detektora diodowego możliwe jest stosowanie detektora fluorescencyjnego. Detekcja fluorescencyjna polega na pomiarze intensywności światła o określonej długości fali, emitowanego przez wykrywany związek w wyniku jego wzbudzenia. Pobudzenie następuje na skutek działania światła o energii większej niż światła emitowanego. W analizie tej stosowane są również różne długości fal wzbudzenia i emisji (tab. 66). Wynika to z właściwości chlorofilu i jego pochodnych. Barwniki te ulegają wzbudzeniu przy bardzo różnych długościach fal – 390 nm (feofityna *a*) czy 470 nm (chlorofil *b*) – i mogą emitować promieniowanie w zakresie od 632 do 715 nm (tab. 17).

Piki odpowiadające poszczególnym barwnikom można identyfikować przez porównanie ze standardowymi roztworami barwników (DHI Water and Environment, Denmark). Dostępne są zarówno roztwory poszczególnych barwników, jak i ich mieszaniny. Do porównań można także wykorzystać dane literaturowe dostępne np. w pracy Jeffreya i współ. [194]. Należy jednak pamiętać o zmianach zachodzących w czasach retencji i kolejności eluowanych barwników w zależności od zastosowanej metody, o czym świadczą dane zamieszczone w tabeli 67.

Tabela 66. Długości fal, które są stosowane podczas analiz z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Detektor diodowy		Detektor fluorescencyjny		
Długość fali, nm	Źródło	Wzbudzenie, nm	Emisja, nm	Źródło
1	2	3	4	5
377	[386]	405	> 580	[386]
380	[186]	406	660	[32]
394	[159]	410	665	[101]
400	[105]	410±40	600-800	[235]
405	[433]	410	667	[114]
410	[221, 277, 341]	410	680	[408]
420	[10, 112, 229, 443]	412	674	[300]
428	[332]	420	> 650	[180]
430	[125, 161, 162, 229, 241, 286, 453]	420	672	[2]
431	[251]	425	660	[429]
435	[8, 171, 277, 285, 303]	430	> 580	[309]
436	[36, 39, 42, 45, 130, 131, 201, 224, 225, 248, 429, 433, 434, 439]	430	650	[124]
438	[26, 32, 323]	430	660	[223, 383]
440	[2, 12, 42, 50, 58, 59, 64, 66, 101, 109, 114, 180, 203, 230, 249, 258, 259, 262, 308, 341, 348, 349, 382, 383]	430	663	[5, 66]
445	[80, 296]	430	670	[45, 54, 279]
449	[204, 251]	431	660	[382]
450	[8, 10, 19, 54, 94, 96, 125, 205, 221, 235, 248, 277, 317, 341, 405, 430, 445]	431	667	[366]
454	[251]	434	670	[37]
457	[332]	436	660	[130, 131]
458	[251]	440	500-800	[439]
470	[171]	440	500-700	[216]
476	[296]	440	630	[223, 224]

cd. tabeli 66

1	2	3	4	5
640	[438]	440	650	[447]
650	[225, 443]	440	660	[4, 126, 323, 445]
654	[361]	440	> 600	[26, 29]
660	[204]	400-460	> 600	[36, 39]
662	[204]	400-550	580	[316]
665	[171, 405, 430]	400-620	630	[316]
669	[270]	400-660	680	[316]

Tabela 67. Porównanie czasów retencji barwników przy zastosowaniu różnych metod chromatograficznych [366]

Barwnik	Czas retencji, min			
	[432]	[447]	[405]	[127]
Czoło rozpuszczalnika	2,56	1,93		
Chlorofilid *b*	4,48	5,43		
Karotenoid P-468	4,50			
Chlorofilid *a*	5,01			
Karotenoid P-457	5,11			
Chlorofil c_3	5,38	7,94	3,88	13,85
Chlorofil c_2	6,40	11,44	5,7	14,94
Chlorofil c_1	6,40	12,14	6,05	13,04
Peridinina	7,42	14,20	9,32	7,88
Syfonoksantyna	8,11	14,76		
Fukoksantyna	8,70	18,87	12,63	9,23
trans-neoksantyna	9,11			
cis-fukoksantyna	9,68			
Feoforbid *a*	10,39			
Wiolaksantyna	10,59	21,32	13,99	14,12
Dinoksantyna	10,76	25,22	15,49	14,67
Diadinoksantyna	11,61	24,11	15,23	
Anteraksantyna	12,24	25,38	15,99	17,93
Alloksantyna	12,51	26,25	16,53	19,83
Monadosantyna	12,78	27,07	17,22	25,53
Diatoksantyna	13,08	26,90	17,12	
Luteina	13,36	27,65	17,98	20,37
Zeaksantyna	13,59	27,49	17,79	21,46
Kantaksantyna	14,00		19,07	
Syfoneina	14,36	29,37		
Chlorofil *b* (allomer)	14,85	31,28		
Diwinylowy chlorofil *b*	15,15	31,58	21,92	
Chlorofil *b*	15,15	31,62	22,03	23,9
Diwinylowy chlorofil *b* (epimer)			22,29	
Chlorofil *b* (epimer)		31,87	22,50	
Krokoksantyna	15,87	31,11	22,42	
Chlorofil *a* (allomer)	15,87	32,63	23,30	
Np-chl c_2			23,53	
Diwinylowy chlorofil *a*	16,15	32,83	23,76	
Chlorofil *a*	16,15	33,15	23,96	27,16
Diwinylowy chlorofil *a* (epimer)	16,53		24,13	
Chlorofil *a* (epimer)	16,53	33,48	34,33	28,47
Echinenon	16,74			
Likopen	17,59			
Feofityna *b*	17,58			
cis-likopen	17,84			
γ-karoten	18,26	34,25		
ε-karoten	18,40	35,52		
Feofityna *a*	18,56	35,41		
α-karoten	18,64	35,74	26,65	32,59
β-karoten	18,76	35,95	26,71	32,86
cis-α-karoten	18,83			
cis-β-karoten	18,94	36,26		

W tabeli 68 zaprezentowano barwniki fotosyntetyczne, które w analizach chromatograficznych uważa się za markery diagnostyczne charakterystyczne dla poszczególnych grup glonów.

Tabela 68. Barwniki fotosyntetyczne stosowane jako markery diagnostyczne w analizach z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Gromada	Markery diagnostyczne	
	fitoplankton morski [8]	fitoplankton słodkowodny [364]
Prochlorophyta	diwinylowe chlorofile *a* i *b*	–
Cyanobacteria	–	zeaksantyna
Bacillariophyta	fukoksantyna + diadinoksantyna	fukoksantyna
Prymnesiophyta	19′-butanoilooksofukoksantyna	–
Pelagophyta	19′-heksanoilooksofukoksantyna	–
Chrysophyta	fukoksantyna + wiolaksantyna	–
Cryptophyta	alloksantyna	alloksantyna
Dinophyta	peridinina	peridinina
Prasinophyta	prasinoksantyna	–
Chlorophyta	luteina	wiolaksantyna

4.5. WSKAŹNIKI STOSOWANE W BADANIACH BARWNIKÓW ROŚLINNYCH

Do oceny warunków zachowywania barwników w osadach dennych, stopnia zachowania poszczególnych grup barwników i ich względnej obfitości stosowane są różne wskaźniki, do których zaliczyć można wartości stosunków $A_{480/665}$, $A_{430/410}$, $A_{410/665}$ oraz CD/TC.

Stosunek wartości absorbancji ekstraktów barwników mierzonych przy długościach fal 480 i 665 nm ($A_{480/665}$) – jego wartość wykorzystuje się jako wskaźnik względnej obfitości karotenoidów [302].

Stosunek wartości absorbancji ekstraktów barwników mierzonych przy długościach fal 430 i 410 nm ($A_{430/410}$) – podczas zakwaszania każda cząsteczka chlorofilu *a* traci atom magnezu. W 90% roztworze acetonu wiąże się to z przesunięciem maksimum absorpcji z 430 nm charakterystycznych dla chlorofilu *a* do 410 nm typowych dla feofityny *a*. Używając tej właściwości jako wskaźnika zakwaszenia jezior, wykorzystuje się wartość stosunku 430 nm:410 nm ($A_{430/410}$), który może być także stosowany do określania warunków zachowywania barwników w przypadku jezior niezakwaszonych. Dla niezdegradowanej mieszaniny barwników wartości tego stosunku wahają się w zakresie od 1,2 do 1,8 [290, badania własne – dane niepublikowane]. Jeżeli wartość tego stosunku wynosi około 1, można stwierdzić, że w osadach występuje naturalna mieszanina niezdegradowanych barwników i warunki sprzyjają ich zachowywaniu [113, 143, 145, 209, 231].

Stosunek wartości absorbancji ekstraktów barwników mierzonych przy długościach fal 410 i 665 nm ($A_{410/665}$) – jego wartości używa się jako wskaźnika zachowania chlorofilu *a*. Produkty degradacji chlorofilu *a* (związki typu porfiryn) wykazują maksimum absorpcji przy 410 nm, natomiast pik przy 665 nm jest efektem obecności chlorofilu *a* i jego pochodnych (związków typu chloryn). Wykazano, że dla bogatych w chloryny osadów wartość stosunku $A_{410/665}$ (porfinyny/chloryny) wynosi od 1 do 5,

natomiast osady zasobne w porfiryny charakteryzują się wartościami stosunku w zakresie od 5 a 10 [247, 333, 334].

Stosunek zawartości pochodnych chlorofilu i całkowitej zawartości karotenoidów (CD/TC) – oprócz wartości stosunków $A_{430/410}$ i $A_{410/665}$ jego wartość proponowana jest jako wskaźnik rozkładu i stanu troficznego [20, 118, 135, 202, 345]. Niska wartość stosunku CD/TC wskazuje na optymalne warunki do zachowywania tych barwników w osadach z powodu wysokich stężeń karotenoidów, bowiem karotenoidy ulegają degradacji trochę szybciej niż pochodne chlorofilu [343]. Wskaźnik ten wykorzystali w badaniach Mikomägi i Punning [285], którzy porównywali zawartości barwników roślinnych w powierzchniowych (0-3 cm) osadach dennych jezior estońskich. Wyższe wartości stosunku CD/TC otrzymali dla barwników zdeponowanych w osadach jeziora oligotroficznego o niskiej produkcji pierwotnej, w którym ze względu na dużą przezroczystość wody oraz wysoką zawartość tlenu warunki do zachowywania były niekorzystne. Swain [392] sugerował jednak, że wyższe wartości tego stosunku uzyskiwane dla jezior oligotroficznych w porównaniu z eutroficznymi wynikają z różnic w produkcji tych dwóch typów barwników; zaprezentował także wpływ czynników związanych z eutrofizacją, które z różną intensywnością oddziałują na stężenie barwników profundalowych (tab. 69). Według niektórych autorów [250, 257, 342] indeks CD/TC może być wykorzystywany w przedstawianiu historii jeziora jako miara ładunku allochtonicznej materii organicznej w stosunku do udziału materii autochtonicznej. W rozkładających się jesienią liściach i organicznych poziomach gleby pochodne chlorofilu są lepiej zachowywane niż karotenoidy, toteż wartość stosunku wynosi 1 bądź więcej. Wyższe wartości tego stosunku świadczą o większym dopływie detrytusu allochtonicznego. Podczas rozkładu glonów zauważalna jest tendencja do zachowywania karotenoidów i wartości tego stosunku są niższe [14, 140, 145, 345]. Z powodu sprzecznych rezultatów związanych prawdopodobnie ze specyficzną charakterystyką określonych zbiorników i z wpływem czynników fizykochemicznych, biologicznych oraz morfometrycznych [238] ważność tego stosunku jako wskaźnika degradacji barwników jest dyskusyjna.

Bianchi i współ. [30] proponowali również wykorzystanie wartości stosunku zawartości chlorofilu *b* do luteiny jako wskaźnika źródeł materii organicznej.

Tabela 69. Wpływ czynników związanych ze wzrostem eutrofii na stężenie barwników w profundalu wyrażone w przeliczeniu na gram materii organicznej przy założeniu, że w warunkach umożliwiających utlenianie karotenoidy ulegają degradacji szybciej niż chlorofile [392]

Czynnik	Względny wpływ na			Uwagi
	stężenie CD	stężenie TC	wartość stosunku CD/TC	
Spadek zawartości tlenu w wodach profundalu	duży	większy	mały	stężenie tlenu w profundalu zmniejsza się przy wzrastającej trofii jeziora, ale brak istotnej korelacji w przypadku jezior niestratyfikowanych i meromiktycznych
Wzrost tempa akumulacji osadu	duży	większy	mały	pogrzebanie barwników w odtlenionych osadach następuje szybciej w jeziorach eutroficznych
Wzrost produkcji pierwotnej	duży	większy	mały	wzrost autochtonicznej produkcji barwników zmniejsza rozcieńczenie przez ubogą w barwniki materię allochtoniczną
Spadek wartości stosunku N/P				
stres azotowy	mniejszy	mały	mały	istnieją dowody wpływu na fitoplankton
dominacja sinic	duży	większy	mały	sinice zawierają względnie dużo karotenoidów pomocniczych
Spadek intensywności światła				
akomodacja do samozacienienia	większy	?	?	nie stwierdzono, że karotenoidy i chlorofile są syntetyzowane w wyższych stężeniach w odpowiedzi na samozacienienie
zmniejszenie wybielania	duży	duży	?	
zmniejszenie znaczenia bentosowej produkcji pierwotnej	duży	większy	mały?	glony bentosowe mogą być w mniejszym stopniu degradowane przed pogrzebaniem w osadach dennych
zmniejszenie produkcji makrofitów	?	?	?	zwiększenie ilości fitoplanktonu może ograniczyć rozwój makrofitów

CD – pochodne chlorofilu;
TC – całkowite karotenoidy

5. PODSUMOWANIE

Zdeponowane osady denne stanowią cenny i unikalny zapis zjawisk zachodzących w samych zbiornikach wodnych, jak i ich zlewniach. Szczególnie ważnym ich składnikiem jest materia organiczna, której głównym źródłem są glony żyjące w strefie fotycznej; pulę tę wzbogacają również mikroorganizmy i makrofity. W wielu przypadkach znaczący może być także udział detrytusu pochodzącego z roślin lądowych. Materia organiczna podlega różnym procesom, które mogą zmieniać jej skład we względnie krótkim czasie pomiędzy jej syntezą a długoterminowym zdeponowaniem na dnie zbiornika. Mniej reaktywne formy materii organicznej zaczynają dominować, podczas gdy bardziej reaktywne i rozpuszczalne w wodzie są wykorzystywane jako pokarm przez mikroorganizmy oraz odżywiające się osadami zwierzęta. Pomimo całkowitego rozkładu struktur morfologicznych w osadach dennych zostają zachowane zsyntetyzowane przez glony, fototroficzne bakterie i rośliny wyższe barwniki roślinne oraz ich pochodne.

W pracy przedstawiono charakterystykę i źródła barwników roślinnych deponowanych w osadach dennych. Omówiono procesy powodujące ich degradację z uwzględnieniem starzenia się komórek, wpływu roślinożerców oraz czynników fizykochemicznych występujących w słupie wody i osadach dennych, a oddziałujących na zachowywanie barwników roślinnych. Wszystkie te procesy i czynniki decydują, że zdeponowane osady denne stanowią tak unikalny, charakterystyczny dla danego zbiornika zapis jego historii.

Zaprezentowano możliwości wykorzystania analiz barwników jako elementu badań ekologicznych (tab. 70) i paleolimnologicznych oraz przegląd wskaźników stosowanych w tych badaniach. Przedstawiono również metody wykorzystywane w analizie barwników, poczynając od metod ekstrakcji i używanych rozpuszczalników, poprzez technikę rozdziału za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej, aż po zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Nie ulega wątpliwości, że badania barwników roślinnych nie są proste. Na końcowe wyniki badań wpływa bardzo wiele parametów, m.in. sposób i miejsce pobrania próbek, ich przechowywanie i przygotowanie do ekstrakcji, zastosowany ekstrahent, kolumna chromatograficzna czy zestaw eluentów. Ze względu na zróżnicowanie właściwości materiału, z którego można wyekstrahować barwniki (glony, makrofity, osady denne o różnorodnej zawartości materii organicznej i różnym stopniu uwodnienia), bardzo trudno polecić jedną skuteczną metodę odpowiednią do stosowania zawsze i do wszystkiego.

W przypadku silnie uwodnionych osadów dennych dobrym sposobem przygotowania próbek jest liofilizacja, która zapobiega rozcieńczaniu ekstrahentów. Niestety barwniki zawarte w osadach wysuszonych są bardziej podatne na degradację podczas oczekiwania na ekstrakcję, dlatego należy ją przeprowadzić tak szybko, jak to tylko możliwe. Na podstawie przedstawionych wyników badań jako ekstrahent polecić można aceton między innymi ze względu na większą w porównaniu z pozostałymi stabilność ekstraktów. Wybór kolumny chromatograficznej, rodzaju i układu eluentów oraz długości fal, przy których będzie prowadzona detekcja, zależy od rodzaju materiału poddanego ekstrakcji oraz spodziewanych wyników.

Praca może stanowić cenne źródło informacji dla studentów kierunków związanych z nauką o szeroko pojętym środowisku.

Tabela 70. Podsumowanie głównych, najbardziej stabilnych i dostarczających najwięcej informacji barwników: źródła i ich wykorzystanie jako pośrednie zapisy paleolimnologii [141]

Barwniki	Taksony	Źródło	Pośredni zapis
Barwniki kopalne	wszystkie rośliny	planktonowe, litoralowe	zmian w łańcuchu pokarmowym i ogólnego składu taksonomicznego
β-karoten, feofityny i całkowite karotenoidy	rośliny, niektóre bakterie	planktonowe, litoralowe, lądowe (przede wszystkim feofityna *a*)	produkcji pierwotnej i całkowitej obfitości fototrofów
β-karoten:chlofil *a*	wszystkie rośliny	planktonowe, litoralowe	obfitych zakwitów glonów (niska wartość stosunku)
Feoforbidy	pochodne chlorofilu	planktonowe	konsumpcji przez zooplankton
Astaksantyna, astacen	zooplankton, niektóre glony	planktonowe	obfitości zooplanktonu
Alkilowe porfiryny wanadylu	produkty diagenezy chlorofilu	lądowe	dawnych, bogatych w materię organiczną osadów i warunków beztlenowych
Węglowodory arylowo-izoprenowe	diagenetyczne produkt karotenoidów	lądowe	dawnych, bogatych w materię organiczną osadów i warunków beztlenowych
Alloksantyna	***Cryptophyta***	wyłącznie planktonowe	poziomu wody (?)
Dwa rozpuszczalne w tłuszczach barwniki podobne do scytoneminy	niektóre bentosowe sinice	jeziora alpejskie	minionego promieniowania UV w środowisku wodnym
Echinenon	całkowite sinice	planktonowe, litoralowe	eutrofizacji fosforanowej
Miksokantofil, oscillaksantyna	nitkowate sinice	planktonowe	eutrofizacji fosforanowej
Afanizofil	sinice wiążące N_2	planktonowe	eutrofizacji
Okenon, izorenieraten	*Chromatiaceae* (*Chromatium okenii*) *Chlorobiaceae* (fotosyntetyzujące purpurowe i zielone bakterie siarkowe, odpowiednio)	planktonowe	warunków beztlenowych i dawnej przezroczystości mierzonej krążkiem Secchiego
Sferoiden, sferoidenon	*Rhodopseudomonas sphaeroides*	planktonowe	warunków meromiktycznych /holomiktycznych
Wskaźnik 430 nm:410 nm	wszystkie glony	planktonowe, litoralowe, lądowe	zakwaszenia, zachowania barwników
Chlorofil *a*: feofityna *a*; chlorofil *a*: β-karoten	wszystkie glony	planktonowe, litoralowe, lądowe	zachowania barwników

WYKAZ TERMINÓW STOSOWANYCH W MONOGRAFII [17, 208, 299, 405]

1. **Allochtoniczny** – „obcy", pochodzący z zewnątrz ekosystemu, w którym aktualnie występuje.
2. **Amonifikatory** – organizmy biorące udział w procesie rozkładu azotowych substancji organicznych, powodujące wydzielanie się z nich amoniaku.
3. **Autochtoniczny** – „tutejszy", pochodzący z tego samego ekosystemu, w którym się obecnie znajduje.
4. **Bentos** – zbiorowisko właściwych organizmów dennych, zamieszkujących mniej lub bardziej drobnoziarniste osady denne. Stanowią go rośliny (fitobentos) i zwierzęta (zoobentos), które żyją zarówno na powierzchni dna, jak i w głębi osadów dennych.
5. **Biocenoza** – zespół organizmów roślinnych i zwierzęcych powiązanych wzajemnymi zależnościami, głównie pokarmowymi, żyjących w określonym środowisku – biotopie.
6. **Chemoklina, warstwa skoku chemicznego** – warstwa oddzielająca w zbiorniku wodnym różne pod względem stężenia określonych substancji chemicznych warstwy wody, np. ubogie w sole odżywcze wody powierzchniowe od zasobnych w nie wód głębinowych.
7. **Denitryfikatory** – mikroorganizmy biorące udział w procesie denitryfikacji, czyli redukcji azotanów(V) poprzez azotany(III) do amoniaku (denitryfikacja częściowa) lub azotu (denitryfikacja całkowita).
8. **Detrytus** – mniej lub bardziej rozłożona materia organiczna zarówno unosząca się w toni wodnej, jak i zalegająca na dnie lub brzegu akwenu.
9. **Diageneza** – w ujęciu geologicznym to szereg procesów fizycznych i chemicznych prowadzących do przemiany luźnego osadu w zwięzłą skałę, np. piasku w piaskowiec. W przypadku materii organicznej to szereg procesów obejmujących jej degradację i syntezę nowych związków o składzie odmiennym niż mieszanina wyjściowa.
10. **Dystrofizm** – stan wyjątkowo niskiej żyzności wód wynikający z niedoboru biogenów i nadmiaru substancji organicznych w zbiorniku wodnym, związany ze znacznym dopływem jałowych allochtonicznych substancji o odczynie kwaśnym.
11. **Epilimnion** – warstwa nadskokowa; górna, nagrzana warstwa wody w jeziorze, pojawiająca się w okresie występowania stratyfikacji termicznej.
12. **Eutrofizm** – stan wysokiej żyzności wód wynikający z dużej ilości nutrientów (biogenów).
13. **Fotosensybilizator (światłouczulacz)** – związek absorbujący światło.
14. **Fotyczna strefa** – górna warstwa wody w zbiorniku wodnym, do której docierają promienie słoneczne. Z uwagi na różne natężenie promieniowania świetlnego wyróżnić można strefę prześwietloną, czyli eufotyczną, oraz mroczną – dysfotyczną.
15. **Hipertrofizm** – stan skrajnego przeżyźnienia wód.
16. **Hypolimnion, hipolimnion** – dolna, stagnująca warstwa wody w jeziorze, występująca w czasie istnienia prostej stratyfikacji termicznej.
17. **Makrofity, makroflora** – zbiorowisko dużych roślin w określonym środowisku; zalicza się do nich naczyniowe i większe zarodnikowe, np. szereg brunatnic, krasnorostów, zielenic i mchów.

18. **Meiofauna, meiobentos** – niewielkie organizmy denne; do meiofauny zalicza się skorupiaki, robaki (brzuchorzęski, nicienie), niektóre pierwotniaki oraz inne organizmy.
19. **Mezotrofia** – stan umiarkowanej żyzności wód wynikający z niezbyt dużej ilości nutrientów i substancji organicznych.
20. **Nitryfikatory** – organizmy biorące udział w procesie utleniania amoniaku i soli amonowych poprzez azotany(III) do azotanów(V).
21. **Nutrienty, biogeny** – wszelkie sole nieorganiczne potrzebne do rozwoju żywych organizmów; w hydrobiologii są to związki azotu i fosforu.
22. **Oligotrofizm** – stan niskiej żyzności wód wynikający z niedoboru nutrientów.
23. **Palinologia** – dział botaniki; nauka zajmująca się badaniem ziaren pyłu i zarodników roślin (także kopalnych).
24. **Produktywność biologiczna** – proces wytwarzania materii organicznej przez określoną biocenozę lub jej część w konkretnych warunkach środowiskowych.
25. **Resuspensja** – przemieszczanie się cząstek osadów na skutek ruchów wody lub rycia w osadzie przez zwierzęta bentosowe lub żywiące się bentosem.
26. **Sonikacja** – działanie ultradźwiękami.
27. **Stratyfikacja termiczna** – termiczne uwarstwienie wody w morzu lub jeziorze, spowodowane pionowym zróżnicowaniem temperatury wody. Wyróżnia się: st. prostą, gdy powierzchniowa warstwa mniej lub bardziej nagrzanej wody o temperaturze nieco wzrastającej w kierunku powierzchni zalega ponad dolną głębinową warstwą wody o niemal jednakowej temperaturze, a na ich pograniczu znajduje się cienka warstwa wody charakteryzująca się nagłą zmianą temperatury, zwana warstwą skoku termicznego (termoklina), oraz st. odwróconą, gdy górna warstwa wody jest zimniejsza od dolnej. W głębokich zbiornikach słodkowodnych temperatura dolnej warstwy jest zazwyczaj zbliżona do +4°C.
28. **Termoklina, warstwa skoku termicznego** – warstwa gwałtownej zmiany temperatury, zwana w wodach słodkich metalimnionem.
29. **Trofizm** – termin określający produktywność biologiczną zbiorników wodnych oraz zespół czynników środowiskowych decydujących o niej.
30. **Zlewnia** – teren, z którego wody spływają do określonego zbiornika.

NAZWY ZWYCZAJOWE I SYSTEMATYCZNE PRZYKŁADOWYCH KAROTENOIDÓW [53, 190]

Nazwa zwyczajowa		Nazwa systematyczna
Karoteny	α-karoten	(6′*R*)-β,ε-karoten
	β-karoten	β,β-karoten
	γ-karoten	β,ψ-karoten
	ε-karoten	(6*S*,6*S*′)-ε,ε-karoten
	likopen	ψ,ψ-karoten
	izorenieraten	ϕ,ϕ-karoten
	β-izorenieraten	β,ϕ-karoten
Ksantofile	alloksantyna	(3*R*,3′*R*)-7,8,7′,8′-tetrahydro-β,β-karoteno-3,3′-diol
	anteraksantyna	(3*S*,5*R*,6*S*,3′*R*)-5,6-epoksy-5,6-didehydro-β,β-karoteno-3,3′diol
	astaksantyna	(3*S*,3′*S*)-3,3′-dihydroksy-β,β-karoteno-4,4′-dion
	diadinoksantyna	(3*S*,5*R*,6*S*,3′*R*)-5,6-epoksy-7′,8′-didehydro-5,6-dihydro-β,β-karoteno-3,3′-diol
	diatoksantyna	(3*R*,3′*R*)-7,8-didehdro-β,β-karoteno-3,3′-diol
	echinenon	β,β-karoteno-4-on
	fitoen	7,8,11,12,7′,8′,11′,12′-oktahydro-ψ,ψ-karoten
	fitofluen	7,8,11,12,7′,8′-oktahydro-ψ,ψ-karoten
	kantaksantyna	β,β-karoteno-4,4′-dion
	luteina	(3*R*,3′*R*,6′*R*)-β,ε-karoteno-3,3′-diol
	neoksantyna	(9′-cis)(3*S*,5*R*,6*R*,3′*S*,5′*R*,6′*S*)-5′,6′-epoksy-6,7-didehydro-5,6,5′,6′-tetrahydro-β,β-karoteno-3,5,3′-triol
	neurosporen	7,8-dihydro-ψ,ψ-karoten
	okenon	1′-metoksy-1′,2′-dihydroksy-χ,ψ-karoteno-4′-on
	wiolaksantyna	(3*S*,5*R*,6*S*,3′*S*,5′*R*,6′*S*)- 5,6:5′,6′-diepoksy-5,6,5′,6′-tetrahydro-β,β-karoteno-3,3′-diol
	zeaksantyna	(3*R*,3′*R*)-β,β-karoteno-3,3′-diol

LITERATURA

[1] Adams M.S., Prentki R.T., 1986. Sedimentary pigments as an index of the trophic status of Lake Mead. Hydrobiologia 143, 71-77.

[2] Ahel M., Terzić S., 1998. Pigment signatures of phytoplankton dynamics in the northern Adriatic. Croat. Chem. Acta 71(2), 199-215.

[3] Alliger H., 1975. Ultrasonic disruption. Am. Lab. 10, 75-85.

[4] Almela L., Fernández-López J.A., Roca M.J., 2000. High performance liquid chromatographic screening of chlorophyll derivatives produced during fruit storage. J. Chrom. 870, 483-489.

[5] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater.

[6] Ammann B., 1989. Periods of rapid environmental change around 12500 and 10000 years B.P., as recorded in Swiss lake deposits. J. Paleolimnol. 1, 269-277.

[7] Anders D.E., Robinson W.E., 1971. Cycloalkane constituents of the bitumen from Green River Shale. Geochim. Cosmochim. Acta 35(7), 661-678.

[8] Andersen R.A., Bidigare R.R., Keller M.D., Latasa M., 1996. A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. Deep Sea Res. II 43(2-3), 517-537.

[9] Andersen R.A., Potter D., Bidigare R.R., Latasa M., Rowan K., O'Kelly Ch.J., 1998. Characterization and phylogenetic position of the enigmatic golden alga *Phaeothamnion confervicola*: ultrastructure, pigment composition and partial SSU rDNA sequence. J. Phycol. 34, 286-298.

[10] Aneeshkumar N., Sujatha C.H., 2012. Biomarker pigment signatures in Cochin back water system – a tropical estuary south west coast of India. Estuar. Coast. Shelf Sci. 99, 182-190.

[11] Antoniades D., Veillette J., Martineau M.-J., Belzile C., Tomkins J., Pienitz R., Lamoureux S., Vincent W.F., 2009. Bacterial dominance of phototrophic communities in a high arctic lake and its implications for paleoclimate analysis. Polar Sci. 3, 147-161.

[12] Arar E.J., 1997. Method 447.0. Determination of chlorophylls *a* and *b* and identification of other pigments of interest in marine and freshwater algae using high performance liquid chromatography with visible wavelength detection. Version 1,0. National Exposure Research Laboratory Office of research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio, USA.

[13] Arfi R., Guiral D., 1994. Chlorophyll budget in a productive tropical pond: algal production, sedimentation, and grazing by microzooplankton and rotifers. Hydrobiologia 272, 239-249.

[14] Ariztegui D., Chondrogianni C., Lami A., Guilizzoni P., Lafargue E., 2001. Lacustrine organic matter and Holocene paleoenvionmental record of Lake Albano (central Italy). J. Paleolimnol. 26, 283-292.

[15] Arnon D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant. Physiol. 24, 1-15.

[16] Barlow R.G., Burkill P.H., Mantoura R.F.C., 1988. Grazing and degradation of algal pigments by marine protozoan *Oxyrrhis marina*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 119, 119-129.

[17] Bartosz G., 1995. Druga twarz tlenu. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
[18] Battle J.M., Mihuc T.B., 2000. Decomposition dynamics of aquatic macrophytes in the lower Atchafalaya, a large floodplain river. Hydrobiologia 418, 123-136.
[19] Becker E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnol. Adv. 25, 207-210.
[20] Belcher J.H., Fogg G.E., 1964. Chlorophyll derivatives and carotenoids in the sediments of two English lakes. Recent Researches in the fields of hydrosphere, atmosphere and nuclear chemistry. Sugawara Festival Volume. Maruzen Co. Ltd. Tokyo, 39-48.
[21] Belova M., 1993. Microbial decomposition of freshwater macrophytes in the littoral zone of lakes. Hydrobiologia 251, 59-64.
[22] Benfield E.F., 2006. Decomposition of leaf material. [In:] Methods in stream ecology, eds. F.R. Hauer, G.A. Lamberti, Academic Press Amsterdam, 711-720.
[23] Bennett A., Bianchi T.S., Means J.C., 2000. The effects of PAH contamination and grazing on the abundance and composition of microphytobenthos in salt marsh sediments (Pass Fourchon, LA, USA). II: The use of plant pigments as biomarkers. Estuar. Cost. Shelf Sci. 50, 425-429.
[24] Bernasconi S.M., Barbieri A., Simona M., 1997. Carbon and nitrogen isotope variations in sedimenting organic matter in Lake Lugano. Limnol. Oceanogr. 42, 1755-1765.
[25] Bernatowicz S., Wolny P., 1974. Botanika dla limnologów i rybaków. PWRiL Warszawa.
[26] Bianchi T.S., Demetropulos A., Hadjichristophorou M., Argyrou M., Baskaran M., Lambert C., 1996. Plant pigments as biomarkers of organic matter sources in sediment and coastal waters of Cyprus (eastern Mediterranean). Estuar. Cost. Shelf Sci. 42, 103-115.
[27] Bianchi T.S., Dibb J.E., Findlay S., 1993. Early diagenesis of plant pigments in Hudson River sediments. Estuar. Cost. Shelf Sci. 36, 517-527.
[28] Bianchi T.S., Engelhaupt E., McKee B.A., Miles S., Elmgren R., Hajdu S., Savage C., Baskaran M., 2002. Do sediments from coastal sites accurately reflect time trends in water column phytoplankton? A test from Himmerfjärden Bay (Baltic Sea proper). Limnol. Oceanogr. 47, 1537-1544.
[29] Bianchi T.S., Findlay S., 1991. Decomposition of Hudson Estuary macrophytes: photosynthetic pigment transformations and decay constants. Estuaries 14(1), 65-73.
[30] Bianchi T.S., Findlay S., Dawson R., 1993. Organic matter sources in the water column and sediments of the Hudson River estuary: the use of plant pigments as tracers. Estuar. Cost. Shelf Sci. 36, 359-376.
[31] Bianchi T.S., Findlay S., Fontvieille D., 1991. Experimental degradation of plant materials in Hudson River sediments. I: Heterotrophic transformations of plant pigments. Biogeochemistry 12, 171-187.
[32] Bianchi T.S., Johansson B., Elmgren R., 2000. Breakdown of phytoplankton pigments in Baltic sediments: effects of anoxia and loss of deposit-feeding macrofauna. J. Experiment. Mar. Biol. Ecol. 251, 161-183.
[33] Bianchi T.S., Lambert C., 1995. Plant pigment as markers of high-molecular--weight dissolved organic carbon. Limnol. Oceanogr. 40(2), 422-428.

[34] Bianchi T.S., Lambert C., Biggs D.C., 1995. Distribution of chlorophylls and phaeopigments in the northwestern Gulf of Mexico: a comparison between fluorimetric and high-performance liquid chromatography measurements. Bull. Mar. Sci. 56, 25-32.
[35] Bianchi T.S., Westmann P., Rolff C., Engellhaupt E., Andren T., Elmgren R., 2000. Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: natural or human induced? Limnol. Oceanogr. 45, 716-726.
[36] Bidigare R.R., 1991. Analysis of algal chlorophylls and carotenoids. [In:] Marine particles: analysis and characterization, eds. D.C. Hurd, D.W. Spencer, Geophysical Monograph 63, American Geophysical Union Washington, 119-124.
[37] Bidigare R.R., Kennicutt II M.C., Brooks J.M., 1985. Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography. Limnol. Oceanogr. 30(2), 432-435.
[38] Bidigare R.R., Kennicutt II M.C., Ondrusek M.E., Keller M.D., Guillard R.R.L., 1990. Novel chlorophyll-related compounds in marine phytoplankton: distributions and geochemical implications. Ener. Fuel. 4(6), 653-657.
[39] Bidigare R.R., Ondrusek M.E., Kennicutt II M.C., Iturriaga R., Harvey H.R., Hoham R.W., Macko S.A., 1993. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. J. Phycol. 29, 427-434.
[40] Bidigare R.R., Trees Ch.C., 2000. HPLC phytoplankton pigments, sampling, laboratory methods, and quality assurance procedures. [In:] Ocean optics protocols for satellite ocean colour sensor validation, revision 2, eds. G.S. Fargion, J.L. Mueller, National Aeronautical and Space Administration Washington, NASA report TM-2000-209966, 154-161.
[41] Bidigare R.R., van Heukelem L., Trees Ch.C., 2003. HPLC phytoplankton pigments, sampling, laboratory methods, and quality assurance procedures. [In:] Ocean optics protocols for satellite ocean colour sensor validation, revision 4, vol. V: Biogeochemical and bio-optical measurements and data analysis methods, eds. J.L. Mueller, G.S. Fargion, Ch.R. McClain, National Aeronautical and Space Administration Greenbelt, NASA report TM-2003-21621/Rev-vol V, 5-14.
[42] Bidigare R.R., van Heukelem L., Trees Ch.C., 2005. Analysis of algal pigments by high-perfprmance liquid chromatography. [In:] Algal culturing techniques, ed. R.A. Andersen, Academic Press New York, 327-345.
[43] Bjørnland T., Liaaen-Jensen S., 1989. Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. [In:] The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives, eds. J.C. Green, B.S.C. Leadbeater, W.I. Diver, Clarendon Press Oxford, 37-60.
[44] Bolliger H.R., König A., 1969. Vitamins, including carotenoids, chlorophylls and biologically active quinones. [In:] Thin-layer chromatography. A laboratory handbook, ed. E. Stahl, Springer-Verlag Berlin – Heidelberg – New York, 266-273.
[45] Borghini F., Colacevich A., Bargagli R., 2007. Water geochemistry and sedimentary pigments in northern Victoria Land lakes, Antarctica. Polar Biol. 30, 1173-1182.
[46] Borkowski B. (red.), 1973. Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej. PZWL Warszawa.
[47] Bossard P., Gammeter S., Lehmann Ch., Schanz F., Bachofen R., Bürgi H.-R., Steiner D., Zimmermann U., 2001. Limnological description of the Lakes Zürich, Lucerne, and Cadagno. Aquat. Sci. 63, 225-249.

[48] Brassell S.C., 1993. Applications of biomarkers for delineating marine paleoclimatic fluctuations during the Pleistocene. [In:] Organic Geochemistry: Principles and Applications, eds. M.H. Engel, S.A. Macko, Plenum Press New York, 699-738.
[49] Brassell S.C., Comet P.A., Eglinton G., Isaacson P.J., McEvoy J., Maxwell J.R., Thomson I.D., Tibbetts P.J.C., Volkman J.K., 1980. Preliminary lipid analyses of sections 440A-7-6, 440B-3-5, 440B-8-4, 440B-68-2, and 436-11-4: Legs 56 and 57, Deep Sea Drilling Project. [In:] Scientific Party, Init. Rep. DSDP, Vols. 56, 57. U.S. Govt. Printing Office Washington, 1367-1390.
[50] Braumann T., Grimme L.H., 1979. Single-step separation and identification of photosynthetic pigments by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 170, 264-268.
[51] Braun M., Tóth A., Alapi K., Dévai Gy., Lakatos Gy., Posta J., Szalóki I., 2000. Environmental history of oxbow ponds: a sediment geochemical study of Marót--zugi-Holt-Tisza, NE-Hungary. [In:] Ecology of river valleys, eds. L. Gallé, L. Körmöczi, TISCIA monograph series, University of Szeged, Hungary, 133-138.
[52] Britton G., Goodwin T.W., 1971. Biosynthesis of carotenoids. Met. Enzymol. 18 C, 654-701.
[53] Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., 2004. Carotenoids Handbook. Birkhäuser Basel.
[54] Brotas V., Plante-Cuny M.-R., 2003. The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. Acta Oecol. 24, 109-115.
[55] Brown S.B., Daley R.J., McNeely R.N., 1977. Composition and stratigraphy of the fossil derivatives of Little Round Lake, Ontario. Limnol. Oceanogr. 22(2), 336-348.
[56] Brown S.B., Houghton J.D., Hendry G.A.F., 1991. Chlorophyll breakdown. [In:] Chlorophylls, ed. H. Scheer, CRC Press Boca Raton, 465-489.
[57] Brown S.R., 1969. Paleolimnological evidence from fossil pigments. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 17, 95-103.
[58] Buchaca T., Catalan J., 2008. On the contribution of phytoplankton and benthic biofilms to the sediment record of marker pigments in high mountain lakes. J. Paleolimnol. 40, 369-383.
[59] Buchaca T., Felip M., Catalan J., 2005. A comparison of HPLC pigment analyses and biovolume estimates of phytoplankton groups in an oligotrophic lake. J. Plankt. Res. 27(1), 91-101.
[60] Buffan-Dubau E., Carman K.R., 2000. Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses. Mar. Ecol. Prog. Ser. 204, 293-297.
[61] Bungard R.A., Ruban A.V., Hibberd J.M., Press M.C., Horton P., Scholes J.D., 1999. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1135-1139.
[62] Burford M.A., Long B.G., Rothlisberg P.C., 1994. Sedimentary pigments and organic carbon in relation to microalgal and benthic faunal abundance in the Gulf of Carpentaria. Mar. Ecol. Prog. Ser. 103, 111-117.
[63] Burnison B.K., 1980. Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 729-733.
[64] Bustillos-Guzmán J., Gárate-Lizárraga I., López-Cortés D., Hernández--Sandoval F., 2004. The use of pigment "fingerprints" in the study of harmful algal blooms. Rev. Biol. Trop. 52 (Suppl. 1), 17-26.

[65] Cardoso J.N., Wardroper A.M.K., Watts C.D., Barnes P.J., Maxwell J.R., Eglinton G., Mound D.G., Speers G.C., 1978. Reports of the Deep Sea Drilling Project 17.
[66] Cariou-Le Gall V., Blanchard G.F., 1995. Monthly HPLC measurements of pigment concentration from an intertidal muddy sediment of Marennes-Oléron Bay, France. Mar. Ecol. Prog. Ser. 121, 171-179.
[67] Carpenter S.R., Bergquist A., 1985. Experimental testing of grazing indicators based on chlorophyll *a* degradation products. Arch. Hydrobiol. 102, 303-317.
[68] Carpenter S.R., Elser M.M., Elser J.J., 1986. Chlorophyll production, degradation, and sedimentation, implications for paleolimnology. Limnol. Oceanogr. 31(1), 112-124.
[69] Carpenter S.R., Leavitt P.R., Elser M.M., Elser J.J., 1988. Chlorophyll budgets, response to food web manipulation. Biogeochemistry 6, 79-90.
[70] Cavender-Bares K.K., Mann E.L., Chisholm S.W., Ondrusek M.E., Bidigare R.R., 1999. Differential response of equatorial Pacific phytoplankton to iron fertilization. Limnol. Oceanogr. 44(2), 237-246.
[71] Charles D.F., Smol J.P., Engstrom D.R., 1994. Paleolimnological approaches to biological monitoring. [In:] Biological monitoring of aquatic systems, eds. S.L. Loeb, A. Spacie, CRC Press Boca Raton, 233-293.
[72] Cheesman D.F., Lee W.L., Zagalsky P.F., 1967. Carotenoproteins in invertebrates. Biol. Rev. 42, 132-160.
[73] Cheever B.M., Kratzer E.B., Webster J.R., 2012. Immobilization and mineralization of N and P by heterotrophic microbes during leaf decomposition. Freshwat. Sci. 31, 133-147.
[74] Cieślewicz J., 2012. Zmiany właściwości spektrometrycznych ekstraktów barwników z inkubowanych liści rdestu ziemnowodnego (*Polygonum amphibium* L.). Ochr. Środ. Zas. Natur. 54, 116-130.
[75] Claustre H., Hooker S.B., van Heukelem L., Berthon J.-F., Barlow R., Ras J., Sessions H., Targa C., Thomas C.S., van der Linde D., Marty J.-C., 2004. An intercomparison of HPLC phytoplankton pigment methods using in situ samples, application to remote sensing and database activities. Mar. Chem. 85, 41-61.
[76] Common solvents used in chromatography, both thin-layer and column, *http://infohost.nmt.edu/*.
[77] Conver R.J., Durvasula R., Roy S., Wang R., 1986. Probable loss of chlorophyll-derived pigments during passage through the gut of zooplankton, and some of the consequeces. Limnol. Oceanogr. 3, 878-886.
[78] Cornett R.J., Rigler F.H., 1979. Hypolimnetic oxygen deficits: their prediction and interpretation. Science 205, 580-581.
[79] Cottingham K.L., Rusak J.A., Leavitt P.R., 2000. Increased ecosystem variability and reduced predictability following fertilisation: evidence from paleolimnology. Ecol. Lett. 3, 340-348.
[80] Craft N.E., Wise S.A., Soares J.H. Jr., 1992. Optimization of an isocratic high--performance liquid chromatographic separation of carotenoids. J. Chromatogr. 589, 171-176.
[81] Cranwell P.A., 1976. Decomposition of aquatic biota and sediment formation, lipid components of two blue-green algal species and the detritus resulting from microbial attack. Freshwat. Biol. 6, 481-488.

[82] Cuny P., Marty J.-C., Chiaverini J., Vescovali I., Raphel D., Rontani J.-F., 2002. One-year seasonal survey of the chlorophyll photodegradation process in the northwestern Mediterranean Sea. Deep Sea Res. II 49, 1987-2005.
[83] Czeczuga B., 1982. Badania barwników fikobilinowych u glonów. Wiad. Botan. XXVI(4), 171-186.
[84] Czeczuga B., 1985. Light-harvesting phycobiliprotein pigments of the red alga *Leptosomia siplex* from the Antarctic. Polar. Biol. 4, 179-181.
[85] Czeczuga B., Czerpak R., 1968. Investigations on vegetable pigments in post--glacial bed sediments of lakes. Hydrologie 30(1), 217-231.
[86] Czerpak R., Czeczuga B., 1978. Występowanie, biosynteza i rola biologiczna karotenoidów u glonów. Wiad. Botan. XXII(1), 47-59.
[87] Czerpak R., Czeczuga B., 1979. Występowanie i biosynteza karotenoidów u bakterii. Wiad. Botan. XXIII(2), 73-94.
[88] D'Arcy P., Carignan R., 1997. Influence of catchments topography on water chemistry in southeastern Quebec shield lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54, 2215-2227.
[89] Daley R.J., 1973. Experimental characterization of lacustrine chlorophyll diagenesis. 2: Bacterial, viral and herbivore grazing effects. Arch. Hydrobiol. 72, 409-439.
[90] Daley R.J., Brown S.R., 1973. Experimental characterization of lacustrine chlorophyll diagenesis. 1: Physiological and environmental effects. Arch. Hydrobiol. 72, 277-304.
[91] Daley R.J., Brown S.R., McNeely R.N., 1977. Chromatographic and SCDP measurements of fossil phorbins and the postglacial history of Little Round Lake, Ontario. Limnol. Oceanogr. 22(2), 349-360.
[92] Das B., 2007. Reconstruction of historical productivity using visible-near infrared (VNIR) reflectance properties from boreal and saline lake sediments. Aquat. Ecol. 41, 209-220.
[93] Das B., Vinebrooke R.D., Rivard B., Sanchez-Azofeifa A., Wolfe A.P., 2005. Inferring lake sediment chlorophyll concentrations with reflectance spectroscopy: a novel approach to reconstructing historical changes in the lake trophic status of mountain lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 62, 1067-1078.
[94] Das S.K., Routh J., Roychoudhury A.N., 2009. Biomarker evidence of macrophyte and plankton community changes in Zeekoevlei, a shallow lake in South Africa. J. Paleolimnol. 41, 507-521.
[95] Daugbjerg N., Henriksen P., 2001. Pigment composition and rbcL sequence data from the silicoflagellate *Dictyocha speculum*: a heterokont alga with pigments similar to some Haptophytes. J. Phycol. 37, 1110-1120.
[96] Davies B.H., 1976. Carotenoids. [In:] Chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol. II, ed. T.W. Goodwin, Academic Press New York, 38-165.
[97] Demmig-Adams B., 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochim. Biophys. Acta 1020, 1-24.
[98] Dere S., Güneş T., Sivaci R., 1998. Spectrophometric determination of chlorophyll – *a*, *b* and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Tr. J. Botany 22, 13-17.
[99] Devesa R., Moldes A., Díaz-Fierros F., Barral M.T., 2007. Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs. Talanta 72, 1546-1551.

[100] Dickman M., Han X., 1995. Paleopigment evidence of competition between phytoplankton and a cyanobacterial algal mat in a meromictic lake near Toronto, Ontario Canada. Hydrobiologia 306, 131-146.
[101] Dimier C., Corato F., Tramontano F., Brunet Ch., 2007. Photoprotection and xanthophyll-cycle activity in three marine diatoms. J. Phycol. 43, 937-947.
[102] Dixit A.S., Hall R.I., Leavitt P.R., Quinlan R., Smol J.P., 2000. Effects of sequential depositional basins on lake response to urban and agricultural pollution, a palaeoecological analysis of the Qu′Appelle Valley, Saskatchewan, Canada. Freshwat. Biol. 43, 319-337.
[103] Dunn J.L., Turnbull J.D., Robinson S.A., 2004. Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of higher plants. Funct. Plant Biol. 31, 195-202.
[104] Eadie B.J., Chambers R.L., Gardner W.S., Bell G.E., 1984. Sediment trap studies in Lake Michigan, resuspension and chemical fluxes in the southern basin. J. Great Lakes Res. 10, 307-321.
[105] Eckardt C.B., Keely B.J., Maxwell J.R., 1991. Identification of chlorophyll transformation products in a lake sediment by combined liquid chromatography--mass spectrometry. J. Chromatogr. 557, 271-288.
[106] Eckardt C.B., Keely B.J., Waring J.R., Chicarelli M.I., Maxwell J.R., de Leeuw J.W., Boon J.J., Runnegar B., Macko S., Hudson J.D., 1991. Preservation of chlorophyll-derived pigments in sedimentary organic matter [and discussion]. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 333, 339-348.
[107] Ediger D., Raine R., Weeks A.R., Robinson I.S., Sagan S., 2001. Pigment signatures reveal temporal and regional differences in taxonomic phytoplankton composition off the west coast of Ireland. J. Plankt. Res. 23(8), 893-902.
[108] Ellegaard M., Clarke A.L., Reuss N., Drew S., Weckström K., Juggins S., Anderson N.J., Conley D.J., 2006. Multi-proxy evidence of long-term changes in ecosystem structure in a Danish marine estuary, linked to increased nutrient loading. Estuar. Coast. Shelf Sci. 68, 567-578.
[109] Eskins K., Scholfield C.R., Dutton H.J., 1977. High-performance liquid chromatography of plant pigments. J. Chromatogr. 135, 217-220.
[110] EuLakes European Lakes Under Environmental Stressors (Supporting lake governance to mitigate the impact of climate change), EuLakes WP3.1. Lake ecological history characterization TRANSNATIONAL Output 3.1.3. Long term ecological evaluation of Ce lakes. Reporting period: project months 9-19 (Dec.2010-Oct.2011).
[111] Evans N., Games D.E., Jackson A.H., Matlin S.A., 1975. Applications of high--pressure liquid chromatography and field desorption mass spectroscopy in studies of natural porphyrins and chlorophyll derivatives. J. Chromatogr. 115(2), 325-333.
[112] Falkowski P.G., Sucher J., 1981. Rapid, quantitative separation of chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 213, 349-351.
[113] Felip M., Catalan J., 2000. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. J. Plankt. Res. 22(1), 91-105.
[114] Fietz S., Sturm M., Nicklisch A., 2005. Flux of lipophilic photosynthetic pigments to the surface sediments of Lake Baikal. Glob. Planet. Change 46, 29-44.

[115] Findlay D.L., Kasian S.E.M., Stainton M.P., Beaty K., Lyng M., 2001. Climatic influences on algal populations of boreal forest lakes in the Experimental Lakes Area. Limnol. Oceanogr. 46, 1784-1793.
[116] Fleituch T., 2010. Dekompozycja gruboziarnistej materii organicznej a funkcjonowanie ekosystemów małych rzek w warunkach antropopresji. Studia Naturae 57, Instytut Ochrony Przyrody PAN Kraków.
[117] Fleituch T., Leichtfried M., 2007. Electron Transport System (ETS) activity in alder leaf litter in two contrasting headwater streams. Int. Rev. Hydrobiol. 92, 378-391.
[118] Fogg G.E., Belcher J.H., 1961. Pigments from the bottom deposits of an English Lake. New. Phytol. 60, 129-138.
[119] Foppen F.H., 1971. Tables for identification of carotenoid pigments. Chromatogr. Rev. 14, 133-298.
[120] Fox D.L., Updegraff D.M., Novelli G.D., 1944. Carotenoid pigments in the ocean floor. Arch. Biochem. 5, 1-23.
[121] Freiberg R., Nõmm M., Tõnn I., Alliksaar T., Nõges T., Kisand A., 2011. Dynamics of phytoplankton pigments in water and surface sediments of a large shallow lake. Eston. J. Earth Sci. 60(2), 91-101.
[122] Furuya K., Hayashi M., Yabushita Y., 1998. HPLC determination of phytoplankton pigments using N,N-dimethylformamide. J. Oceanogr. 54, 199-203.
[123] García-Plazaola J.I., Matsubara S., Osmond C.B., 2007. The lutein epoxide cycle in higher plants: its relationships to other xanthophyll cycles and possible functions. Funct. Plant Biol. 34, 759-773.
[124] Garrido J.L., Rodríguez F., Campaña E., Zapata M., 2003. Rapid separation of chlorophylls *a* and *b* and their demetallated and dephytylated derivatives using a monolithic silica C18 column and a pyridine-containing mobile phase. J. Chromatogr. 994, 85-92.
[125] Garrido J.L., Zapata M., 1993. High performance liquid chromatography of chlorophylls c_3, c_1, c_2 and *a* and of carotenoids of chromophyte algae on a polymeric octadecyl silica column. Chromatographia 35(9-12), 543-547.
[126] Garrido J.L., Zapata M., 1996. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of algal chlorophylls. J. Chromat. A 738, 285-289.
[127] Garrido J.L., Zapata M., 1997. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of mono- and divinyl chlorophyll forms using pyridine--containing mobile phases and a polymeric octadecylsilica column. Chromatographia 44, 43-49.
[128] Garrigue C., 1998. Distribution and biomass of microphytes measured by benthic chlorophyll *a* in a tropical Lagoon (New Caledonia, South Pacific). Hydrobiologia 385, 1-10.
[129] Gieskes W.W.C., Engelkes M.M., Kraay G.W., 1991. Degradation of diatom chlorophyll to colour less, non-fluorescing compounds during copepod grazing. Hydrobiol. Bull. 25(1), 65-72.
[130] Gieskes W.W.C., Kraay G.W., 1983. Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis pigment. Mar. Biol. 75, 179-185.
[131] Gieskes W.W.C., Kraay G.W., 1983. Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. Limnol. Oceanogr. 28(4), 757-766.

[132] Gin K.Y.H., Lin X., Zhang S., 2000. Dynamics and size structure of phytoplankton in the costal waters of Singapore. J. Plankt. Res. 22(8), 1465-1484.
[133] Gin K.Y.H., Zhang S., Lee Y.K., 2003. Phytoplankton community structure in Singapore's castal waters using HPLC pigment analysis and flow cytometry. J. Plankt. Res. 25(12), 1507-1519.
[134] Goodwin T.W., 1980. The Biochemistry of the carotenoids. Vol. 2: Animals. Chapman & Hall New York.
[135] Gorham E.J., Lund J.W.G., Sanger J.E., Dean W.E. Jr., 1974. Some relationships between algal standing crop, water chemistry, and sediment chemistry in the English Lakes. Limnol. Oceanogr. 19(4), 601-617.
[136] Gorham E.J., Sanger J.E., 1967. Plant pigments in woodland soils. Ecology 48, 306-308.
[137] Gorham E.J., Sanger J.E., 1972. Fossil pigments in the surface sediments of a meromictic lake. Limnol. Oceanogr. 17, 618-622.
[138] Gorham E.J., Sanger J.E., 1975. Fossil pigments in Minnesota lake sediments and their bearing upon balance between terrestrial and aquatic inputs to sedimentary organic matter. Verh. Int. Ver. Theor. Ang. Limnol. 19, 2267-2273.
[139] Gossauer A., Engel N., 1996. Chlorophyll catabolism – structures, mechanisms, conversions. J. Photochem. Photobiol. 32, 141-151.
[140] Guilizzoni P., Bonomi G., Galanti G., Ruggiu D., 1983. Relationship between sedimentary pigments and primary production: evidence from core analyses of twelve Italian lakes. Hydrobiologia 103, 103-106.
[141] Guilizzoni P., Lami A., 2002. Paleolimnology, use of algal pigments as indicators. [In:] Encyclopedia of Environmental Microbiology, ed. G. Britton, John Wiley & Sons New York, 2306-2317.
[142] Guilizzoni P., Lami A., Manca M., Musazzi S., Marchetto A., 2006. Palaeoenvironmental changes inferred from biological remains in short lake sediment cores from the Central Alps and Dolomites. Hydrobiologia 562, 167-191.
[143] Guilizzoni P., Lami A., Marchetto A., 1992. Plant pigment ratios from lake sediments as indicators of recent acidification in alpine lakes. Limnol. Oceanogr. 37(7), 1565-1569.
[144] Guilizzoni P., Lami A., Marchetto A., 1993. The sediment core analyses in high altitude lakes of Central Alps, comparison of three inferring-pH techniques and effect of temperature on lake acidification. [In:] Strategies for lake ecosystems beyond 2000, eds. R. de Bernardi, R. Pagnotta, A. Pugnetti, Mem. Ist. Ital. Idrobiol. 52, 387-400.
[145] Guilizzoni P., Lami A., Marchetto A., Appleby P.G., Alvisi F., 2001. Fourteen years of palaeolimnological research of a past industrial polluted lake (L. Orta, Northern Italy), an overview. J. Limnol. 60(2), 249-262.
[146] Guilizzoni P., Lami A., Ruggiu D., Bonomi G., 1986. Stratigraphy of specific algal and bacterial carotenoids in the sediments of Lake Varese (N. Italy). Hydrobiologia 143, 321-325.
[147] Guilizzoni P., Levine S.N., Manca M., Marchetto A., Lami A., Ambrosetti W., Brauer A., Gerli S., Carrara E.A., Rolla A., Guzzella L., Vignati D.A.L., 2012. Ecological effects of multiple stressors on a deep lake (Lago Maggiore, Italy) integrating neo and palaeolimnological approaches. J. Limnol. 71(1), 1-22.

[148] Guilizzoni P., Marchetto A., Lami A., Brauer A., Vigliotti L., Musazzi S., Langone L., Manca M., Lucchini F., Calanchi N., Dinelli E., Mordenti A., 2006. Records of environmental and climatic changes during the late Holocene from Svalbard, palaeolimnology of Kongressvatnet. J. Paleolimnol. 36, 325-351.

[149] Hager A., 1967. Untersuchungen über die rückreaktionen im xanthophyll-cyclus bei Chlorella, Spinacia und Taxus. Planta 74, 148-172.

[150] Hager A., Stransky H., 1970. Das carotenoidmuster und die verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklasen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophycae, Euglenophycae, Bacillariophyceae und Phaeophyceae. Arch. Mikrobiol. 73, 77-89.

[151] Hagerthey S.E., Louda J.W., Mongkronsri P., 2006. Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll *a* determination and chemotaxonomic assessment. J. Phycol. 42, 1125-1136.

[152] Hajibrahim S.K., Tibbetts P.J.C., Watts C.D., Maxwell J.R., Eglinton G., Colin H., Guiochon G., 1978. Analysis of carotenoid and porphyrin pigments of geochemical interest by high-performance liquid chromatography. Analyt. Chem. 50(4), 549-553.

[153] Hall N.S., Paerl H.W., Peierls B.L., Whipple A.C., Rossignol K.L., 2013. Effects of climatic variability on phytoplankton community structure and bloom development in the eutrophic, microtidal, New River Estuary, North Carolina, USA. Estuar. Coast. Shelf Sci. 117, 70-82.

[154] Hall R.I., Leavitt P.R., Quinlan R., Dixit A.S., Smol J.P., 1999. Effects of agriculture, urbanization, and climate on water quality in the northern Great Plains. Limnol. Oceanogr. 44(3, part 2), 739-756.

[155] Hallegraeff G.M., Mous I.J., Veeger R., Flik B.J.G., Ringelberg J., 1978. A Comparative study on the carotenoid pigmentation of the zooplankton ok Lake Mararsseveen (Netherlands) and of Lac Pavin (Auvergne, France). II: Diurnal variations in carotenoid content. Comp. Biochem. Physiol. 60, 59-62.

[156] Han X., Dickman M., 1995. Changes in ^{13}C content of the organic component of lake sediments during the last 500 years in Crawford Lake, South Ontario, Canada. Hydrobiologia 310, 177-187.

[157] Han X., Shen H., Wang S., Yu Y., 1992. Fossil pigments as indicators for palaeoclimatic interpretations – a case study of Qinghai Lake. Chin. J. Oceanol. Limnol. 10(4), 320-324.

[158] Hansson L.-A., 1988. Chlorophyll *a* determination of periphyton on sediments: identification of problems and recommendation of method. Freshwat. Biol. 20, 347-352.

[159] Havens K.E., East T.L., Hwang S.-J., Rodusky A.J., Sharfstein B., Steinman A.D., 1999. Algal responses to experimental nutrient addition in the littoral community of a subtropical lake. Freshwat. Biol. 42(2), 329-344.

[160] Head E.J.H., Harris L.R., 1992. Chlorophyll and carotenoid transformation and destruction by *Calanus* spp. grazing on diatoms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 86, 229-238.

[161] Hegazi M.M., Pérez-Ruzafa A., Almela L., Candela M.-E., 1998. Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 829, 153-159.

[162] Hegazi M.M.I., 2002. Separation, identification and quantification of photosynthetic pigments from three Red Sea seaweeds using reversed-phase high--performance liquid chromatography. Egypt. J. Biol. 4, 1-6.
[163] Hendry G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B., 1987. The degradation of chlorophyll – a biological enigma. New Phytol. 107, 255-302.
[164] Hendry G.A.F., Stobart A.K., 1986. Chlorophyll turnover in greening barley. Phytochemistry 25, 2735-2738.
[165] Herring P.J., 1968. The carotenoid pigments of *Daphnia magna* Straus. I: The pigments of animals fed *Chlorella pyrenoidosa* and pure carotenoids. Comp. Biochem. Physiol. 24, 187-203.
[166] Herring P.J., 1968. The carotenoid pigments of *Daphnia magna* Straus. II: Aspects of pigmentary metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 24, 205-221.
[167] Hessen D.O., Sorensen K., 1990. Photoprotective pigmentation in alpine zooplankton populations. Aqua Fenn. 20, 165-170.
[168] Hickman M., Schweger Ch.E., 1991. Oscillaxanthin and myxoxanthophyll in two cores from Lake Wabamum, Alberta, Canada. J. Paleolimnol. 5, 127-137.
[169] Hinder B., Schelleberg M., Rodoni S., Ginsburg S., Vogt E., Martinoia E., Matile P., Hörtensteiner S., 1996. How plants dispose of chlorophyll catabolites. J. Biol. Chem. 271(44), 27233-27236.
[170] Hobbs W.O., Lalond S.V., Vinebrooke R.D., Konhauser K.O., Weidman R.P., Graham M.D., Wolfe A.P., 2010. Algal-silica cycling and pigment diagenesis in recent alpine lake sediments: mechanisms and paleoecological implications. J. Paleolimnol. 44, 613-628.
[171] Hodgson D.A., Wright S.W., Tyler P.A., Davies N., 1998. Analysis of fossil pigments from algae and bacteria in meromictic Lake Fidler, Tasmania, and its application to lake management. J. Paleolimnol. 19, 1-22.
[172] Hoff A.J., Amesz J., 1991. Visible absorption spectroscopy of chlorophylls. [In:] Chlorophylls, ed. H. Scheer, CRC Press Boca Raton, 723-738.
[173] Holm G., 1954. Chlorophyll mutations in barley. Acta Agr. Scand. 4, 457-471.
[174] Hooks C.E., Bidigare R.R., Keller M.D., Guillard R.R.L., 1988. Coccoid eucariotic marine ultraplankters with four different HPLC pigment signatures. J. Phycol. 24, 571-580.
[175] Hörtensteiner S., 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. Cell. Mol. Life Sci. 56, 330-347.
[176] Hörtensteiner S., Chinner J., Matile P., Thomas H., Donnison I.S., 2000. Chlorophyll breakdown in *Chlorella protothecoides*: characterization of degreening and cloning of degreening-related genes. Plant Molecul. Biol. 42, 439-450.
[177] Hörtensteiner S., Kräutler B., 2000. Chlorophyll breakdown in oilseed rape. Photosynth. Res. 64, 137-146.
[178] Hörtensteiner S., Wüthrich K.L., Matile P., Ongania K.H., Kräutler B., 1998. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. J. Biol. Chem. 273(25), 15335-15339.
[179] Humphrey G.F., 1979. Photosynthetic characteristic of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 40, 63-70.
[180] Hurley J.P., Armstrong D.E., 1990. Fluxes and transformations of aquatic pigments in Lake Mendota, Wisconsin. Limnol. Ocenogr. 35(2), 384-398.

[181] Hurley J.P., Armstrong D.E, 1991. Pigment preservation in lake sediments: a comparison of sedimentary environments in Trout Lake, Wisconsin. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 472-486.
[182] Hurley J.P., Garrison P.J., 1993. Composition and sedimentation of aquatic pigments associated with deep plankton in lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 2713-2722.
[183] Hutchinson G.E., Vallentyne J.R., 1955. New approaches to the study of lake sediments. Verh. Int. Ver. Limnol. 12, 669-670.
[184] Hynninen P.H., Hyvärinen K., 2002. Tracing the allomerization pathways of chlorophylls by ^{18}O-labeling and mass spectrometry. J. Org. Chem. 67, 4055-4061.
[185] Indelicato S.R., Watson D.A., 1986. Identification of the photosynthetic pigments of the tropical benthic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Mar. Fish. Rev. 48(4), 44-47.
[186] Iriyama K., Yoshiura M., Shiraki M., 1978. Micro-method for the qualitative and quantitative analysis of photosynthetic pigments using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 154, 302-305.
[187] Itoh N., Tani Y., Nagatani T., Soma M., 2003. Phototrophic activity and redox condition in Lake Hamana, Japan, indicated by sedimentary photosynthetic pigments and molybdenum over the last ~250 years. J. Paleolimnol. 29, 403-422.
[188] Itoh N., Tani Y., Soma M., 2003. Sedimentary photosynthetic pigments of algae and phototrophic bacteria in Lake Haruna, Japan, temporal changes of anoxia in its five basins. Limnology 4, 139-148.
[189] Itoh N., Tani Y., Soma Y., Soma M., 2007. Accumulation of sedimentary photosynthetic pigments characterized by pyropheophorbide *a* and steryl chlorin esters (SCEs) in a shallow eutrophic coastal lake (Lake Hamana, Japan). Estuar. Coast. Shelf Sci. 71, 287-300.
[190] IUPAC nomenclature of carotenoid, *http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/carot/*.
[191] Jahns P., Latowski D., Strzalka K., 2009. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta 1787, 3-14.
[192] Jeffrey S.W., Humphrey G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 191-194.
[193] Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Bjørnland T., 1997. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. [In:] Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods, eds. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO Publishing Paris, 447-559.
[194] Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds.), 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods. UNESCO Publishing Paris.
[195] Jeffrey S.W., Vesk M., 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. [In:] Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods, eds. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO Publishing Paris, 37-84.
[196] Jeffrey S.W., Welschmeyer N.A., 1997. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. [In:] Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods, eds. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO Publishing Paris, 597-615.

[197] Jeffrey S.W., Wright S.W., 1987. A new spectrally distinct component in preparations of chlorophyll *c* from the macro-alga, *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). Biochim. Biophys. Acta 894, 180-188.
[198] Jen J.J., Mackinney G., 1970. On the photodecomposition of chlorophyll in vitro. I: Reaction rates. Photochem. Photobiol. 11, 297-302.
[199] Jen J.J., Mackinney G., 1970. On the photodecomposition of chlorophyll in vitro. II: Intermediates and breakdown products. Photochem. Photobiol. 11, 303-308.
[200] Jensen A., Aasmundrud O., 1963. Paper chromatographic characterization of chlorophylls. Acta Chrom. Scand. 13, 907-912.
[201] JGOFS Protocols, 1994. Measurement of algal chlorophylls and carotenoids by HPLC. UNESCO Paris, 111-117.
[202] Jinglu W., Chengmin H., Haiao Z., Schleser G.H., Battarbee R., 2007. Sedimentary evidence for recent eutrophication in the northern basin of Lake Taihu, China, human impacts on a large shallow lake. J. Paleolimnol. 38, 13-23.
[203] Jodłowska S., Latała A., 2003. Simultaneous separation of chlorophylls and carotenoids by RP-HPLC in some algae and cyanobacteria from the southern Baltic. Ocean. Hydrobiol. Stud. XXXII(2), 81-89.
[204] Josefson A.B., Hansen J.L.S., 2003. Quantifying plant pigments and live diatoms in aphotic sediments of Scandinavian costal waters confirms a major route in the pelagic benthic coupling. Mar. Biol. 142, 649-658.
[205] Juhler R.K., Cox R.P., 1991. High-performance liquid chromatographic determination of chloroplast pigments with optimized separation of lutein and zeaxanthin. J. Chromatogr. 508, 232-235.
[206] Jütter I., Lintelmann J., Michalke B., Winkler R., Steiberg Ch.E.W., Kettrup A., 1997. The acidification of the Herrenwieser See, Black Forest, Germany, before and during industrialization. Wat. Res. 31(5), 1194-1206.
[207] Kadłubowska J.F., 1975. Zarys algologii. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
[208] Kajak Z., 1995. Hydrobiologia. Ekosystemy wód śródlądowych. Wyd. filii UW w Białymstoku.
[209] Kamenik Ch., Koinig K.A., Schmidt R., Appleby P.G., Dearing J.A., Lami A., Thompson R., Psenner R., 2000. Eight hundred years of environmental changes in a high Alpine lake (Gossenköllesee, Tyrol) inferred from sediment records. [In:] Paleolimnology and ecosystem dynamics at remote European Alpine lakes, eds. A. Lami, N. Cameron, A. Korhola, J. Limnol. 59 (Suppl. 1), 43-52.
[210] Ke B., Imsgard F., Kjøsen H., Liaaen-Jensen S., 1970. Electronic spectra of carotenoids at 77K. Biochim. Biophys. Acta 210, 139-152.
[211] Keely B.J., 2006. Geochemistry of chlorophylls. [In:] Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications, eds. B. Grimm, R.J. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer, Springer Dordrecht, 535-561.
[212] Keely B.J., Blake S.R., Schaeffer P., Maxwell J.R., 1995. Distribution of pigments in the organic matter of marls from the Vena del Gesso evaporitic sequence. Org. Geochem. 23, 527-539.
[213] Kimble B.J., Maxwell J.R., Philp R.P., Eglinton G., Albrecht P., Ensminger A., Arpino P., Ourisson G., 1974. Tri- and tetraterpenoid hydrocarbons in the Messel oil shale. Geochim. Cosmochim. Acta 38, 1165-1181.
[214] King L., 1995. A mass balance of chlorophyll degradation product accumulation in Black Sea sediments. Deep Sea Res. I 42(6), 919-942.

[215] Klein B., Gieskes W.W.C., Kraay G.G., 1986. Digestion of chlorophylls and carotenoids by the marine protozoan *Oxyrrhis marina* studied by H.P.L.C. analysis of algal pigments. J. Plankton Res. 8, 827-836.
[216] Klein B., Riaux-Gohin C., 1991. Algal pigment diversity in coastal sediments from Kerguelen (sub-Antarctic Islands) reflecting local dominance of green algae, euglenoids and diatoms. Polar. Biol. 11, 439-448.
[217] Kleppel G.S., Lessard E.J., 1992. Carotenoid pigments in microzooplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 84, 211-218.
[218] Kleppel G.S., Willbanks L., Pieper R.E., 1985. Diel variations in body carotenoid content and feeding activity in marine zooplankton assemblages. J. Plankton Res. 7, 569-580.
[219] Kopcewicz J., Lewak S. (red.), 2012. Fizjologia roślin. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
[220] Korponai J., Varga K.A., Lengré T., Papp I., Tóth A., Braun M., 2011. Paleolimnological reconstruction of the trophic state in Lake Balaton (Hungary) using Cladocera remains. Hydrobiologia 676, 237-248.
[221] Kowalewska G., 1993. Identification of phytoplankton pigments by RP-HPLC with diode-array type detector. Chem. Anal. (Warsaw) 38, 711-718.
[222] Kowalewska G., Szymczak M., 2001. Influence of selected factors on the decomposition of chlorophylls. Oceanologia 43(3), 315-328.
[223] Kowalewska G., Warzyniak-Wydrowska B., Szymczak-Żyła M., 2004. Chlorophyll *a* and its derivatives in sediments of the Odra estuary as a measure of its eutrophication. Mar. Pollut. Bull. 49, 148-153.
[224] Kowalewska G., Winterhalter B., Talbot H.M., Maxwell J.R., Konat J., 1999. Chlorins in sediments of the Gotland Deep (Baltic Sea). Oceanologia 41(1), 81-97.
[225] Köst H.-P. (ed.), 1988. CRC handbook of chromatography plant pigments. Vol. I: Fat-soluble pigments. CRC Press Boca Raton.
[226] Krinsky N.I., 1979. Carotenoid pigments. Multiple mechanisms for coping with the stress of photosensitized oxidations. [In:] Strategies of microbial life in extreme environments, ed. M. Shilo, Dahlem Konferenzen Berlin, 163-177.
[227] Krinsky N.I., 1979. Carotenoid protection against oxidation. Pure Appl. Chem. 51, 649-660.
[228] Krinsky N.I., Deneke S.M., 1982. Interactions of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. JNCI 69, 205-210.
[229] Kuronen P., Hyvarinen K., Hynninen P.H., Kipelainen I., 1993. High--performance liquid chromatographic separation and isolation of the methanolic allomerization products of chlorophyll *a*. J. Chromatogr. A 654, 93-104.
[230] Lami A., Buchaca T. Sedimentary pigment analysis. C, N, S analysis. [In:] European Mountain lake Ecosystems: Regionalisation, diaGnostics & socio--economic Evaluation (EMERGE). CNR Istituto Italiano di Idrobiologia Pallanza, University of Barcelona, 1-4, *http://www.mountain-lakes.org/emerge/Methods/19.pdf*.
[231] Lami A., Guilizzoni P., Marchetto A., 2000. High resolution analysis of fossil pigments, carbon, nitrogen and sulphur in the sediment of eight European Alpine lakes, the MOLAR Project. [In:] Paleolimnology and ecosystem dynamics at remote European Alpine lakes, eds. A. Lami, N. Cameron, A. Korhola, J. Limnol. 59 (Suppl. 1), 15-28.

[232] Lami A., Guilizzoni P., Ruggiu J.D., Polli B., Simona M., Barbieri A., 1992. Role of pigments on algal communities and photosynthesis. Aquat. Sci. 54(3/4), 321-330.
[233] Lami A., Marchetto A., Guizzolini P., Giogis A., Masafeno J., 1994. Paleolimnological records of carotenoids and carbonaceous particles in sediments of some lakes in Southern Alps. Hydrobiologia 274, 57-64.
[234] Lampert W., Sommer U., 1996. Ekologia wód śródlądowych. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
[235] Latasa M., Landry M.R., Schlüter L., Bidigare R.R., 1997. Pigment-specific growth and grazing rates of phytoplankton in the central equatorial Pacific. Limnol. Oceanogr. 42(2), 289-298.
[236] Lawrenz E., Fedewa E.J., Richardson T.L., 2011. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. J. Appl. Phycol. 23, 865-871.
[237] Leavitt P.R., 1988. Experimental determination of carotenoid degradation. J. Paleolimnol. 1, 215-227.
[238] Leavitt P.R., 1993. A review of factors that regulate carotenoid and chlorophyll deposition and fossil pigment abundance. J. Paleolimnol. 9, 109-127.
[239] Leavitt P.R., Brown S.R., 1988. Effect of grazing by *Daphnia* on algal carotenoids, implications for paleolimnology. J. Paleolimnol. 1, 201-214.
[240] Leavitt P.R., Carpenter S.R., 1989. Effects of sediment mixing and benthic algal production on fossil pigment stratigraphies. J. Paleolimnol. 2, 147-158.
[241] Leavitt P.R., Carpenter S.R., 1990. Aphotic pigment degradation in the hypolimnion, implications for sedimentation studies and paleolimnology. Limnol. Oceanogr. 35(2), 520-534.
[242] Leavitt P.R., Carpenter S.R., 1990. Regulation of pigment sedimentation by herbivory and photo-oxidation. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47, 1166-1176.
[243] Leavitt P.R., Carpenter S.R., Kitchell J.F., 1989. Whole-lake experiments. The annual record of fossil pigments and zooplankton. Limnol. Oceanogr. 34(4), 700-717.
[244] Leavitt P.R., Findlay D.L., Hall R.I., Smol J.P., 1999. Algal responses to dissolved organic carbon loss and pH decline during whole-lake acidification, evidence from paleolimnology. Limnol. Oceanogr. 44(3), 757-773.
[245] Leavitt P.R., Hodgson D.A., 2001. Sedimentary pigments. [In:] Tracking environmental change using lake sediments. Vol. 3, eds. J.P. Smol, H.J.B. Birks, W.M. Last, Kluwer Dordrecht, 295-325.
[246] Leavitt P.R., Schindler D.E., Paul A.J., Hardie A.K., Schindler D.W., 1994. Fossil pigment records of phytoplankton in trout-stocked alpine lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51, 2411-2423.
[247] Leeben A., Tõnno I., Freiberg R., Lepane V., Bonningues N., Makarõtševa N., Heinsalu A., Alliksaar T., 2008. History of anthropogenically mediated eutrophication of Lake Peipsi as revealed by the stratigraphy of fossil pigments and molecular size fractions of pore-water dissolved organic matter. Hydrobiologia 599, 49-58.
[248] Leonard C.L., Bidigare R.R., Seki M.P., Polovina J.J., 2001. Interannual mesoscale physical and biological variability in the North Pacific Central Gyre. Prog. Oceanogr. 49, 227-244.

[249] Levinton J.S., McCartney M., 1991. Use of photosynthetic pigments in sediments as a tracer for sources and fates of macrophyte organic matter. Mar. Ecol. Prog. Ser. 78, 87-96.
[250] Lewis W.M. Jr., Weibezahn F.H., 1981. Chemistry of a 7.5-m sediment core from Lake Valencia, Venezuela. Limnol. Oceanogr. 26(5), 907-924.
[251] Li H.-P., Gong G.-Ch., Hsiung T.-M., 2002. Phytoplankton pigment analysis and its application in algal community investigations. Bot. Bull. Acad. Sin. 43, 283-290.
[252] Liaaen-Jensen S., 1990. Marine carotenoids. New J. Chem. 14, 747-759.
[253] Liaaen-Jensen S., 1998. Carotenoids in chemosystematics. [In:] Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. Vol. 3, eds. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkhäuser Basel, 217-247.
[254] Liaaen-Jensen S., Andrewes A.G., 1985. Analyses of carotenoids and related pigments. Methods Microbiol. 18, 235-255.
[255] Liaaen-Jensen S., Jensen A., 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissue. Methods Enzymol. 23, 586-602.
[256] Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 11, 591-592.
[257] Likens G.E., Bormann F.H., 1974. Linkages between terrestrial and aquatic ecosystems. Bioscience 24, 447-456.
[258] Llewellyn C.A., Harbour D.S., 2003. A temporal study of mycosporine-like amino acids in surface water phytoplankton from the English Channel and correlation with solar irradiation. J. Mar. Biol. Assoc. UK 83, 1-9.
[259] Llewellyn C.A., Mantoura R.F.C., 1997. A UV absorbing compound in HPLC pigment chromatograms obtained from Icelandic basic phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 158, 283-287.
[260] Lotter A., Hofmann W., Kamenik Ch., Lami A., Ohlendorf Ch., Sturm M., van der Knaap W.O., van Leewen J.F.N., 2000. Sedimentological and biostratigraphical analyses of short sediment cores from Hagelseewli (2339 m a.s.l.) in the Swiss Alps. [In:] Paleolimnology and ecosystem dynamics at remote European Alpine lakes, eds. A. Lami, N. Cameron, A. Korhola, J. Limnol. 59 (Suppl. 1), 53-64.
[261] Louda J.W. Paleoecological considerations of the sediment-water interface of Florida Bay as derived from chlorophylls, chlorophyll derivatives, and carotenoids, *http://www.aoml.noaa.gov/flbay/louda.html*.
[262] Louda J.W., Joseph W., Loitz J.W., Rudnick D.T., Baker E.W., 2000. Early diagenetic alteration of chlorophyll-*a* and bacteriochlorophyll-*a* in a contemporaneous marl ecosystem, Florida Bay. Org. Geochem. 31, 1561-1580.
[263] Louda J.W., Liu L., Baker E.W., 2002. Senescence and death-related alteration of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. Org. Geochem. 33, 1635-1653.
[264] Louda J.W., Neto R.R., Magalhaes A.R.M., Schneider V.F., 2008. Pigment alterations in the brown mussel *Perna perna*. Comp. Biochem. Physiol. B 150, 385-394.
[265] Lucas C.H., Holligan P.M., 1999. Nature and ecological implications of algal pigment diversity on the Molenplaat tidal °at (Westerschelde estuary, SW Netherlands). Mar. Ecol. Prog. Ser. 180, 51-64.

[266] Lud D., Buma A., van de Poll W., Moerdijk T., Huiskes A., 2001. DNA damage and photosynthetic performance in 28 the Antarctic terrestrial alga *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* (*Chlorophyta*) under manipulated UV-B radiation. J. Phycol. 37, 459-467.

[267] Mackey M.D., Mackey D.J., Higgins H.W., Wright S.W., 1996. CHEMTAX-a program for estimating class abundances from chemical markers: Application to HPLC measurements of phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 144, 265-283.

[268] Mallorquí N., Arellano J.B., Borrego C.M., Garcia-Gil L.J., 2005. Signature pigments of green sulphur bacteria in lower Pleistocene deposits from the Banyoles lacustrine area (Spain). J. Paleolimnol. 34, 271-280.

[269] Mangoni O., Imperatore C., Tomas C.R., Costantino V., Saggiomo V., Mangoni A., 2011. The new carotenoid pigment moraxanthin is associated with toxic microalgae. Mar. Drug. 9, 242-255.

[270] Mangos T.J., Berger R.G., 1997. Determination of major chlorophyll degradation products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A 204, 345-350.

[271] Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments in natural waters by reverse-phase High--Performance Liquid Chromatography. Anal. Chim. Acta 151, 297-314.

[272] Marchetto A., Lami A., Musazzi S., Massaferro J., Langone L., Guilizzoni P., 2004. Lake Maggiore (N. Italy) trophic history: fossil diatom, plant pigments, and chironomids, and comparison with long-term limnological data. Quat. Int. 113, 97-110.

[273] Marković M.S., Pavlović D.V., Tošić S.M., Stankov-Jovanović V.P., Krstić N.S., Stamenković S.M., Mitrović T.L.J., Marković V.L.J., 2012. Chloroplast pigments in post-fire-grown cryptophytes on Vidlič Mountain (Southeastern Serbia). Arch. Biol. Sci. Belgrade 64(2), 531-538.

[274] Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H., 1999. Chlorophyll degradation. Ann. Rev. Plant Mol. Biol. 50, 67-95.

[275] Mayzaud P., Razouls S., 1992. Degradation of gut pigment during feeding by a subantarctic copepod: Importance of feeding history and digestive acclimation. Limnol. Oceanogr. 37(2), 393-404.

[276] McGowan S., 2007. Pigment studies. [In:] Encyclopedia of Quaternary Science, ed. S. Elias, Elsevier Amsterdam, 2062-2074.

[277] McGowan S., Juhler R.K., Anderson N.J., 2008. Autotrophic response to lake age, conductivity and temperature in two West Greenland lakes. J. Paleolimnol. 39, 301-317.

[278] McLeroy-Etheridge S.L., McManus G.B., 1999. Food type and concentration affect chlorophyll and carotenoid destruction during copepod feeding. Limnol. Oceanogr. 44(8), 2005-2011.

[279] Mendes C.R., Cartaxana P., Brotas V., 2007. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments, comparing resolution and sensitivity of a C_{18} and C_8 method. Limnol. Oceanogr. Methods 5, 363-370.

[280] Meyers P.A., 1997. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, paleoclimatic processes. Org. Geochem. 27(5-6), 213-250.

[281] Meyers P.A., Eadie B.J., 1993. Sources, degradation, and recycling of organic matter associated with sinking particles in Lake Michigan. Org. Geochem. 20, 47-56.

[282] Meyers P.A., Ishiwatari R., 1993. The early diagenesis of organic matter in lacustrine sediments. [In:] Organic geochemistry. Principles and applications, eds. M.H. Engel, S.A. Macko, Plenum Press New York – London, 185-209.
[283] Meyers P.A., Ishiwatari R., 1995. Organic matter accumulation records in lake sediments. [In:] Physics and chemistry of lakes, eds. A. Lerman, D. Imboden, J. Gat, Springer-Verlag Berlin – Heidelberg – New York – London – Paris, 279-328.
[284] Meyers P.A., Lallier-Vergès E., 1999. Lacustrine sedimentary organic matter records of Late Quaternary paleoclimates. J. Paleolimnol. 21, 345-372.
[285] Mikomägi A., Punning J.-M., 2007. Fossil pigments in surface sediments of some Estonian lakes. Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol. 56(3), 239-250.
[286] Milenković S.M., Zvezdanović J.B., Andjelković T.D., Marković D.Z., 2012. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. Adv. Technol. 1(1), 16-24.
[287] Minguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B., 1995. High-performance liquid chromatographic study of alkaline treatment of chlorophyll. J. Chromatogr. A 690, 161-176.
[288] Morata N., 2007. Sedimentary pigments as biomarkers of spatial and seasonal variations arctic pelagic-benthic coupling and sediment processes. University of Connecticut (PhD thesis).
[289] Moss B., 1967. A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to pheo-pigments in extracts of alga. Limnol. Oceanogr. 12, 335-340.
[290] Moss B., 1968. Studies on the degradation of chlorophyll *a* and carotenoids in freshwaters. New Phytol. 67, 49-59.
[291] Muri G., Wakeham S.G., Pease T.K., Faganeli J., 2004. Evaluation of lipid biomarkers as indicators of changes in organic matter delivery to sediments from Lake Planina, a remote mountain lake NW Slovenia. Org. Geochem. 35, 1083-1093.
[292] Murphy M.T.J., McCormick A., Eglinton G., 1967. Perhydro-β-carotene in the Green River shale. Science 15, 1040-1042.
[293] Müllner A.N., Schagerl M., 2003. Abundance and vertical distribution of the phytobenthic community within a pool and riffle sequence of an alpine gravel stream. Int. Rev. Hydrobiol. 88, 243-254.
[294] Nelson J.R., 1989. Phytoplankton pigments in macrozooplankton feces, variability in carotenoid alternations. Mar. Ecol. Prog. Ser. 52, 129-144.
[295] O′Neil C.A., Schwartz S.J., 1992. Chromatographic analysis of *cis*/*trans* carotenoid isomers. J. Chromatogr. 624, 235-252.
[296] Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J., 2000. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. J. Appl. Phycol. 12, 553-556.
[297] Overmann J., Sandmann G., Hall K.J., Northcote T.G., 1993. Fossil carotenoids and paleolimnology of meromictic Mahoney Lake, British Columbia, Canada. Aquat. Sci. 55(1), 31-39.
[298] Owens T.G., Falkowski P.G., 1982. Enzymatic degradation of chlorophyll *a* by marine phytoplankton *in vitro.* Phytochemistry 21, 979-984.
[299] Pakosz B., Sobol E., Szkiłądź C., Szkiłądź H., Zagrodzka M. (red.), 1991. Słownik wyrazów obcych. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.

[300] Pandolfini E., Thys I., Leporcq B., Descy J.-P., 2000. Grazing experiments with two freshwater zooplankters: fate of chlorophyll and carotenoid pigments. J. Plankt. Res. 22(2), 305-319.
[301] Patoine A., Leavitt P.R., 2006. Century-long synchrony of fossil algae in a chain of Canadian prairie lakes, Ecology 87(7), 1710-1721, *http://www.esapubs.org/archive/ecol/E087/099/appendix-A.htm*.
[302] Parsons T.R., Strickland J.D.H., 1963. Discussion of spectrophotometic determination of marine plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. Mar. Res. 21, 155-163.
[303] Pasquet V., Chérouvrier J.-R., Farhat F., Thiéry V., Piot J.-M., Bérard J.-B., Kaas R., Serive B., Patrice T., Cadoret J.-P., Picot L., 2011. Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction. Process Biochem. 46(1), 59-67.
[304] Pasternak F., Drits A.V., 1988. Possible degradation of chlorophyll-derived pigments during gut passage of herbivorous copepods. Mar. Ecol. Prog. Ser. 49, 187-190.
[305] Pieczyńska E., 1972. Ecology of the eulittoral zone of lakes. Ekol. Pol. – Pol. J. Ecol. 20, 637-368.
[306] Pieczyńska E., 1993. Detritus and nutrient dynamics in the shore zone of lakes. A review. Hydrobiologia 251, 49-58.
[307] Pieczyńska E., Balcerzak D., Kołodziejczyk A., Olszewski Z., Rybak J.I., 1984. Detritus in the littoral of several Masurian Lakes (sources and fates). Ekol. Pol. – Pol. J. Ecol. 32, 387-440.
[308] Pinckney J.L., Richardson T.L., Millie D.F., Paerl H.W., 2001. Application of photopigment biomarkers for quantifying mikroalgal community composition and in situ growth rates. Org. Geochem. 32, 585-595.
[309] Plante-Cuny M.-R., Barranguet Ch., Bonin D., Grenz Ch., 1993. Does chlorophyllide *a* reduce reliability of chlorophyll *a* measurements in marine coastal sediments? Aquat. Sci. 55(1), 19-30.
[310] Pocock T., Król M., Huner N.P.A., 2006. The determination and quantification of photosynthetic pigments by reverse phase high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, and spectrophotometry. [In:] Methods in molecular biology. Vol. 274: Photosynthesis Research Protocols, ed. R. Carpentier, Humana Press Totowa, 137-148.
[311] Podbielkowski Z., 1996. Glony. WSiP Warszawa.
[312] Podbielkowski Z., Tomaszewicz H., 1982. Zarys hydrobotaniki. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
[313] Porra R.J., Pfündel E.E., Engel N., 1997. Metabolism and function of photosynthetic pigments. [In:] Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods, eds. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO Publishing Paris, 85.
[314] Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta 975, 384-394.

[315] Porter K.G., Saunders P.A., Haberyan K.A., Macubbin A.E., Jacobsen T.R., Hodgson R.E., 1996. Annual cycle of autotrophic and heterotrophic production in a small monomictic Piedmont lake (Lake Oglethorpe): analog for the effects of climatic warming on dimictic lakes. Limnol. Oceanogr. 41, 1041-1051.

[316] Poryvkina L., Babichenko S., Leeben A., 2000. Analysis of phytoplankton pigments by excitation spectra of fluorescence. Proceedings of 4th EARSeL Workshop Lidar Remote Sensing of Land and Sea, Dresden, 224-232.

[317] Ren D., Zhang S., 2008. Separation and identification of the yellow carotenoids in *Potamogeton crispus* L. Food Chem. 106, 410-414.

[318] Repeta D.J., 1989. Carotenoid diagenesis in recent marine sediments. II: Degradation of fucoxanthin to loliolide. Geochim. Cosmochim. Acta 53, 699-707.

[319] Repeta D.J., 1990. Carotenoid diagenesis in pleistocene to miocene sediments from the Peru margin. [In:] Procedings of the Ocean Drilling Program, Vol. 112: Scientific Results, ed. S.K. Stewart, Callao –Valparaiso, 567-572.

[320] Repeta D.J., 1993. A high resolution historical record of Holocene anoxygenic primary production in the Black Sea. Geochim. Cosmochim. Acta 57, 4337-4342.

[321] Repeta D.J., Gagosian R.B., 1984. Transformation reactions and recycling of carotenoids and chlorins in the Peru upwelling region (15°S, 75°W). Geochim. Cosmochim. Acta 48, 1265-1277.

[322] Repeta D.J., Gagosian R.B., 1987. Carotenoid diagenesis in recent marine sediments. I: The Peru continental shelf (15°S,75°W). Geochim. Cosmochim. Acta 51, 1001-1009.

[323] Reuss N., Conley D.J., Bianchi T.S., 2005. Preservation conditions and the use of sediment pigments as a tool for recent ecological reconstruction in four Northern European estuaries. Mar. Chem. 95, 283-302.

[324] Reuss N., Leavitt P.R., Hall R.I., Bigler Ch., Hammarlund D., 2010. Development and application of sedimentary pigments for assessing effects of climatic and environmental changes on subarctic lakes in northern Sweden. J. Paleolimnol. 43, 149-169.

[325] Rhodes S.H., Netting A.G., Milborrow B.V., 1988. Normal-phase high--performance liquid chromatography of carotenes. J. Chromatogr. 442, 412-419.

[326] Ribas A.C., Tanaka M.O., de Souza A.L., 2006. Evaluation of macrofaunal effects on leaf litter breakdown rates in aquatic and terrestrial habitats. Austral. Ecol. 31, 783-790.

[327] Richards F.A., Thompson T.G., 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II: A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. J. Mar. Res. 11, 156-172.

[328] Rmiki N.E., Brunet C., Cabioch J., Lemoine Y., 1996. Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. Hydrobiologia 326/327, 407-413.

[329] Rmiki N.E., Lemoine Y., Schoefs B., 1999. Carotenoids and stress in higher plants and algae. [In:] Handbook of plant and crop stress, ed. M. Pessarakli, Marcel Dekker Press New York, 465-482.

[330] Rolland T., Fayolle S., Cazaubon A., Pagnetti S., 1997. Methodological approach to distribution of epilithic and drifting algae communities in French subalpine river: Inferences in water quality assessment. Aquat. Sci. 59, 57-73.

[331] Romero L., Camacho A., Vicente E., Miracle M.R., 2006. Sedimentation patterns of photosynthetic bacteria based on pigment markers in meromictic Lake La Cruz (Spain), paleolimnological implications. J. Paleolimnol. 35, 167-177.
[332] Rontani J.-F., Beker B., Raphel D., Baillet G., 1995. Photodegradation of chlorophyll phytyl chain and dead phytoplanktonic cells. J. Photochem. Photobiol. 85(1-2), 137-142.
[333] Rosell-Melé A., Koç N., 1997. Paleoclimatic significance of the stratigrafic occurrence of photosynthetic biomarker pigments in the Nordic seas. Geology 25, 49-52.
[334] Rowan K.S., 1989. Photosynthetic pigments of algae. Cambridge University Press Cambridge – New York – New Rochelle – Melbourne – Sydney.
[335] Roy S., 1987. High-performance liquid chromatographic analysis of chloropigments. J. Chromatogr. 391, 19-34.
[336] Roy S., Chanut J.P., Gosselin M., Sime-Ngando T., 1996. Characterization of phytoplankton communities in the lower St. Lawrence Estuary using HPLC detected pigments and cell microscopy pigments and cell microscopy. Mar. Ecol. Prog. Ser. 142, 55-73.
[337] Rusak J.A., Leavitt P.R., McGowan S., Chen G., Olson O., Wunsam S., Cumming B.F., 2004. Millennial-scale relationships of diatom species richness and production in two prairie lakes. Limnol. Oceanogr. 49(4, part 2), 1290-1299.
[338] Rybak M., 1979. Barwniki osadów dennych Jeziora Mutek. Zesz. Nauk. ART w Olsztynie 9, 85-92.
[339] Rybak M., Rybak I., 1982. Plant pigments in contemporary bottom sediments of Lake Długie in Olsztyn. Acta Hydrobiol. 24(1), 21-28.
[340] Sahlberg I., Hynninen P.H., 1984. Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on sucrose layers. J. Chromatogr. 291, 331-338.
[341] Saitoh K., Awaka I., Suzuki N., 1995. Determination of chlorophylls by reversed-phase high-performance liquid chromatography with isocratic elution and the column-switching technique. J. Chromatogr. A 693, 176-180.
[342] Sanger J.E., 1988. Fossil pigments in paleoecology and paleolimnology. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 62, 342-359.
[343] Sanger J.E., Crowl G.H., 1979. Fossil pigments as a guide to the paleolimnology of Browns Lake, Ohio. Quat. Res. 11, 342-352.
[344] Sanger J.E., Gorham E., 1970. The diversity of pigments in lake sediments and its ecological significance. Limnol. Oceanogr. 15(1), 59-69.
[345] Sanger J.E., Gorham E., 1972. Stratigraphy of fossil pigments as a guide to postglacial history of Kirchner Marsh, Minnesota. Limnol. Oceanogr. 17(6), 840-854.
[346] Sapozhnikov D.I., Kyzsovskaya T.A., Maevskaya A.N., 1957. Change in the interrelationship of the basis carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light. Dokl. Akad. Nauk USSR 113, 74-76.
[347] Savage C., Leavit P.R., Elmgren R., 2010. Effects of land use, urbanization, and climate variability on coastal eutrophication in the Baltic Sea. Limnol. Oceanogr. 55(3), 1033-1046.
[348] Schagerl M., Donabaum K., 2003. Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 1: Cyanoprokaryota, Rhodophyta and Cryptophyta. Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 39(1), 35-47.

[349] Schagerl M., Pichler C., Donabaum K., 2003. Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 2: Dinophyta, Euglenophyta, Chlorophyceae and Charales. Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 39(1), 49-62.
[350] Scheer H., 1991. Structure and occurrence of chlorophylls. [In:] Chlorophylls, ed. H. Scheer, CRC Press Boca Raton, 3-30.
[351] Scheumann V., Schoch S., Rüdiger W., 1999. Chlorophyll *b* reduction during senescence of barley seedlings. Planta 209, 364-370.
[352] Schindler D.W., Fee E.J., Ruszczynski T., 1978. Phosphorus input and its consequences for phytoplankton standing crop and production in the experimental lakes area and in similar lakes. J. Fish. Res. Board Can. 35, 190-196.
[353] Schmid H., Bauer F., Stich H.B., 1998. Determination of algal biomass with HPLC pigment analysis from lakes of different trophic state in comparison to microscopically measured biomass. J. Plankt. Res. 20(9), 1651-1661.
[354] Schmid H., Stich H.B., 1995. HPLC-analysis of algal pigments, comparison of columns, column properties and eluents. J. Appl. Phycol. 7, 487-494.
[355] Schmidt R., Psenner R., Müller J., Indinger P., Kamenik Ch., 2002. Impact of late glacial climate variations on stratification and trophic state of the meromictic lake Längsee (Austria): validation of a conceptual model by multi proxy studies. J. Limnol. 61(1), 49-60.
[356] Schüller S.E., Savage C., 2011. Spatial distribution of diatom and pigment sedimentary records in surface sediments in Doubtful Sound, Fiordland, New Zealand. J. Mar. Freshwat. Res. 45(4), 591-608.
[357] Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H.K., Rohmer M., 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. Biochem. J. 316, 73-80.
[358] SCOR-UNESCO Working Group 17, 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. Monographs on Oceanographic Methodology 1, UNESCO Paris.
[359] Seely G.R., Duncan M.J., Vidaver W.E., 1972. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. Mar. Biol. 12, 184-188.
[360] Shafique S., Siddiqui P.J.A., Aziz R.A., Burhan Z.-U.-N., Mansoor S.N., 2010. Weight loss and changes in organic, inorganic and chlorophyll contents in three species of seaweeds during decomposition. Pak. J. Bot. 42(2), 2599-2604.
[361] Shoaf W.T., 1978. Rapid method for separation of chlorophylls *a* and *b* by high--pressure liquid chromatography. J. Chromatogr. 152, 247-249.
[362] Siefermann-Harms D., 1985. Carotenoids in photosynthesis. I: Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. Biochim. Biophys. Acta 811, 325-335.
[363] Sievers G., Hynninen P.H., 1977. Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers. J. Chromatogr. 134, 359-364.
[364] Sigee D.C., 2005. Freshwater microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment. John Wiley & Sons, The Atrium, Southern Gate, Chichester.
[365] Simon D., Halliwell S., 1998. Extraction and quantification of chlorophyll *a* from freshwater green algae. Wat. Res. 32(7), 2220-2223.

[366] Simon W., Wright S.W., Jeffrey S.W., 2006. Pigment markers for phytoplankton production. [In:] Marine organic matter. The handbook of environmental chemistry, ed. J.K. Volkman, Springer-Verlag Berlin – Heidelberg, 71-104.
[367] Simpson K.L., Lee T.-C., Rodriguez D.B., Chichester C.O., 1976. Metabolism in senescent and stored tissues. [In:] Chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol. I, ed. T.W. Goodwin, Academic Press New York, 797-842.
[368] Sin Y., Ryu S.O., Song E., 2009. Characteristics of benthic chlorophyll *a* and sediment properties in the tidal flats of Kwangyang Bay, Korea. Algae 24(3), 149-161.
[369] Sinninghe Damsté J.S., Koopmans M.P., 1997. The fate of carotenoids in sediments: an overview. Pure Appl. Chem. 69(10), 2067-2074.
[370] Sivathanu B., Palaniswamy S., 2012. Purification and characterization of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC--MS-APCI. Biomed. Prevent. Nutr. 2, 276-282.
[371] Smith J.H.C., Benitez A., 1955. Chlorophylls: analysis in plant materials. [In:] Modern methods of plant analysis. Vol. 4, eds. K. Paech, M. Tracey, Springer Heidelberg, 142-196.
[372] Soma Y., Tanaka A., Soma M., Kawai T., 1996. Photosynthetic pigments and perylene in the sediment of southern basin of Lake Baikal. Org. Geochem. 24(5), 553-561.
[373] Soma Y., Tani Y., Soma M., Mitake H., Kurihara R., Hashomoto S., Watanabe T., Nakamura T., 2007. Sedimentary steryl chlorin esters (SCEs) and other photosynthetic pigments as indicators of paleolimnological change over the last 28,000 years from the Buguldeika Saddle of Lake Baikal. J. Paleolimnol. 37, 163-175.
[374] SooHoo J.B., Kiefer D.A., 1982. Vertical distribution of pheopigments. I: A Simple grazing and photooxidative scheme for small particles. Deep Sea Res. 29, 1539-1551.
[375] SooHoo J.B., Kiefer D.A., 1982. Vertical distribution of pheopigments. II: Rates of production and kinetics of photooxidation. Deep Sea Res. 29, 1553-1563.
[376] Squier A.H., Hodgson D.A., Keely B.J., 2002. Sedimentary pigments as markers for environmental change an Antarctic lake. Org. Geochem. 33, 1655-1665.
[377] Squier S.H., Hodgson D.A., Keely B.J., 2005. Evidence of late Quaternary environmental change in a continental east Antarctic lake from lacustrine sedimentary pigment distributions. Antarctic Sci. 17(3), 361-376.
[378] Sridhar K.R., Krauss G., Bärlocher F., Raviraja N.S., Wennrich R., Baumbach R., Krauss G.-J., 2001. Decomposition of alder leaves in two heavy metal--polluted streams in central Germany. Aquat. Microbial Ecol. 26, 73-80.
[379] Starmach K., Wróbel S., Pasternak K., 1976. Hydrobiologia. Limnologia. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.
[380] Stauffer R.E., Lee G.F., Armstrong D.E., 1979. Estimating chlorophyll extraction biases. J. Fish. Res. Board Can. 36, 152-157.
[381] Stewart D.E., Farmer F.H., 1984. Extraction, identification, and quantification of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton. Limnol. Oceanogr. 29(2), 392-397.
[382] Stoń J., Kosakowska A., 2002. Phytoplankton pigments designation – an application of RP-HPLC in qualitative and quantitative analysis. J. Appl. Phycol. 14, 205-210.

[383] Stoń J., Kosakowska A., Łotocka M., Łysiak-Pastuszak E., 2002. Pigment composition in relation to phytoplankton community structure and nutrient content in the Baltic Sea. Oceanologia 44(4), 419-437.
[384] Stransky H., Hager A., 1970. Carotenoid pattern and occurrence of light induced xanthophyll cycle in various classes of algae. Arch. Mikrobiol. 73, 315-323.
[385] Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1968. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Ottawa, 185-203.
[386] Sun M.-Y., Aller R.C., Lee C., 1991. Early diagenesis of chlorophyll-*a* in Long Island Sound sediments: A measure of carbon flux and particle reworking. J. Mar. Res. 49, 379-401.
[387] Sun M.-Y., Dai J., 2005. Relative influence of bioturbation and physical mixing on degradation of bloom-derived particulate organic matter. Clue from microcosm experiments. Mar. Chem. 96(3-4), 201-218.
[388] Sun M.-Y., Lee C., Aller R.C., 1993. Laboratory studies of oxic and anoxic degradation of chlorophyll-*a* in Long Island Sound sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 57, 147-157.
[389] Suzuki K., Handa N., Kiyosawa H., Ishizaka J., 1995. Distribution of the prochlorophyte *Prochlorococcus* in the central Pacific Ocean as measured by HPLC. Limnol. Oceanogr. 40(5), 983-989.
[390] Suzuki K., Kishino M., Sasaoka K., Saitoh S.-I., Saino T., 1998. Chlorophyll--specific absorption coefficients and pigments of phytoplankton off Sanriku, northwestern North Pacific. J. Oceanogr. 57, 517-526.
[391] Suzuki N., Saitoh K., Adachi K., 1987. Reversed-phase high-performance thin--layer chromatography and column liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives. J. Chromatogr. 408, 181-190.
[392] Swain E.B., 1985. Measurement and interpretation of sedimentary pigments. Freshwat. Biol. 15, 53-76.
[393] Swan C.M., Palmer M.A., 2004. Leaf diversity alters litter breakdown in a piedmont stream. J. North Amer. Benthol. Soc. 23, 15-28.
[394] Šporka F., Štefková E., Bitušík P., Thompson A.R., Agustí-Panareda A., Appleby P.G., Grytnes J.A., Kamenie C., Krno I., Lami A., Rose N., Shilland N.E., 2002. The paleolimnological analysis of sediments from high mountain lake Nižné Terianske pleso in the High Tatras (Slovakia). J. Paleolimnol. 28, 95-109.
[395] Takaichi S., 2011. Carotenoids in algae: distribution, biosyntheses and functions. Mar. Drugs 9, 1101-1118.
[396] Tester P.A., Geesey M.R., Guo C., Paerl H.W., Millie D.F., 1995. Evaluating phytoplankton dynamics in the Newport River Estuary (North Carolina, USA) by HPLC derived pigment profiles. Mar. Ecol. Prog. Ser. 124, 237-245.
[397] Tett P., 1982. The Loch Eil project, planktonic pigments in sediments from Loch Eil and the Firth of Lorne. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 56(1), 101-114.
[398] Thomas K.E., Hall R.I., Scrimgeour G.J., 2013. Evaluating the use of algal pigments to assess the biological condition of streams. Environ. Monit. Assess. 185, 7895-7913.
[399] Touchstone J.C., Dobbins M.F., 1983. Practice of thin layer chromatography. John Wiley & Sons New York – Chichester – Brisbane – Toronto – Singapore.
[400] Tsugeki N.K., Ishida S., Urabe J., 2009. Sedimentary records of reduction in resting egg production of *Daphnia galeata* in Lake Biwa during the 20th century: a possible effect of winter warming. J. Paleolimnol. 42, 155-165.

[401] Tukendorf A., 1979. Niektóre funkcje karotenoidów w organizmach fotosyntezujących. Wiad. Botan. XXIII(3), 169-180.
[402] Vallentyne J.R., 1954. Biochemical limnology. Science 119, 605-606.
[403] Vallentyne J.R., 1955. Sedimentary chlorophyll determination as a paleobotanical method. Can. J. Bot. 33, 304-313.
[404] Vallentyne J.R., 1957. Carotenoids in 20000-year old sediment from Searles Lake, California. Arch. Biochem. Biophys. 70, 29-34.
[405] van Heukelem L., Thomas C.S., 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. J. Chromatogr. A 910, 31-49.
[406] van Leeuwe M.A., Villerius L.A., Roggeveld J., Visser R.J.W., Stefels J., 2006. An optimized method for automated analysis of algal pigments. Mar. Chem. 102, 267-275.
[407] van Lenning K., Latasa M., Estrada M., Sáez A.G., Medlin L., Probert I., Véron B., Young J., 2003. Pigment signatures and phylogenetic relationships of the *Pavlovophyceae* (Haptophyta). J. Phycol. 39, 379-389.
[408] Vernet M., 1991. Phytoplankton dynamics in the Barents Sea estimated from chlorophyll budget models. [In:] Proceedings of the Pro Mare Symposium on Polar Marine Ecology, eds. E. Sakshaug, C.C.E. Hopkins, N.A. Britsland, Trondheim, 129-145.
[409] Verzegnassi L., Riffé-Chalard C., Kloeti W., Gülaçar F.O., 1999. Analysis of tetrapyrrolic and derivatives in sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Fres. J. Anal. Chem. 364, 249-253.
[410] Villanueva J., Grimalt J.O., de Wit R., Keely B.J., Maxwell J.R., 1994. Chlorophyll and carotenoid pigments in solar saltern microbial mats. Org. Geochem. 22, 739-757.
[411] Villanueva J., Hastings D.W., 2000. A century-scale record of the preservation of chlorophyll and its transformation products in anoxic sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 64(13), 2281-2294.
[412] Volkman J.K., Burton H.R., Everitt D.A., Allen D.I., 1988. Pigment and lipid compositions of algal and bacterial communities in Ace Lake, Vestfold Hills, Antarctica. Hydrobiologia 165, 41-57.
[413] Waters M.N., Patrick Ch.H., Golladay S.W., 2013. The paleolimnology of Lake Seminole, GA: phosphorus, heavy metals, cyanobacteria and two invasive species. Proceedings of the 2013 Georgia Water Resources Conference, University of Georgia, *http://hdl.handle.net/1853/51492*.
[414] Waters M.N., Schelske C.L., Kenney W.F., Chapman A.D., 2005. The use of sedimentary algal pigments to infer historic algal communities in Lake Apopka, Florida. J. Paleolimnol. 33, 53-71.
[415] Waters M.N., Smoak J.M., Saunders C.J., 2013. Historic primary producer communities linked to water quality and hydrologic changes in the northern Everglades. J. Paleolimnol. 49, 67-81.
[416] Watts C.D., Maxwell J.R., 1977. Carotenoid diagenesis in a marine sediment. Geochim. Cosmochim. Acta 41, 493-497.
[417] Weber A., Wettern M., 1981. Some remarks on the usefulness of algal carotenoids as chemotaxonomic markers. [In:] Pigments in plants, ed. F.-Ch. Czygan, Akademie-Verlag Berlin, 104-114.

[418] Wellburn A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J. Plat. Physiol. 144, 307-313.
[419] Welschmeyer N.A., Lorenzen C.J., 1985. Chlorophyll budgets: Zooplankton grazing and phytoplankton growth in a temperate fjord and the Central Pacific Gyres. Limnol. Oceanogr. 30(1), 1-21.
[420] Welschmeyer N.A., Lorenzen C.J., 1985. Role of herbivory in controlling phytoplankton abundance, annual pigment budget for a temperate marine fjord. Mar. Biol. 90, 75-86.
[421] Wettstein D., 1957. Chlorophyll letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. Exp. Cell Res. 12, 427-434.
[422] Wetzel R.G., 1970. Recent and postglacial production rates of a marl lake. Limnol. Oceanogr. XV(4), 491-503.
[423] Wetzel R.G., 1983. Limnology. Saunders College Publishing/Harcourt Brace College Publishers Fort Worth – New York – Philadelphia.
[424] Wetzel R.G., Likens G.E., 1990. Limnological analyses. Springer New York – Berlin.
[425] Whitehead D.R., Charles D.F., Jackson S.T., Smol J.P., Engstrom D.R., 1989. The developmental history of Adirondack (N.Y.) Lakes. J. Paleolimnol. 2, 185-206.
[426] Wiltshire K.H., Boersma M., Möller A., Buhtz H., 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). Aquat. Ecol. 34, 119-126.
[427] Winfree N.M., Louda J.W., Baker E.W., Steiman A.D., Havens K.E., 1997. Application of chlorophyll and carotenoid pigments for the chemotaxonomic assessment of seston, periphyton, and cyanobacteria mats of Lake Okeechobee, Florida. Molec. Mark. Environ. Geochem. 671, 77-91.
[428] Witkiewicz Z., 2000. Podstawy chromatografii. WNT Warszawa.
[429] Wong C.K., Wong C.K., 2003. HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tool Harbour, Hong Kong. Chemosphere 52, 1633-1640.
[430] Woulds C., Cowie G.L., 2009. Sedimentary pigments on the Pakistan margin: controlling factors and organic matter dynamics. Deep Sea Res. II 56, 347-357.
[431] Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. [In:] Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods, eds. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO Publishing Paris, 261-282.
[432] Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjørland T., Repeta D., Welschmeyer N., 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 77, 183-196.
[433] Wright S.W., Shearer J.D., 1984. Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. J. Chromatogr. 294, 281-295.
[434] Wulff A., Sirje Vilbaste S., Truu J., 2005. Depth distribution of photosynthetic pigments and diatoms in the sediments of a microtidal fjord. Hydrobiologia 534, 117-130.

[435] Yacobi Y.Z., Mantoura R.E.C., Llewellyn C.A., 1991. The distribution of chlorophylls, carotenoids and their breakdown products in Lake Kinneret (Israel) sediments. Freshwat. Biol. 26, 1-10.

[436] Yacobi Y.Z., Ostrovsky I., 2008. Downward flux of organic matter and pigments in Lake Kinneret (Israel): relationships between phytoplankton and the material collected in sediment traps. J. Plankt. Res. 30, 1189-1202.

[437] Yacobi Y.Z., Ostrovsky I., 2012. Sedimentation of phytoplankton: role of ambient conditions and life strategies of algae. Hydrobiologia 698, 111-120.

[438] Yacobi Y.Z., Ostrovsky I., Talbot H.M., 2001. Occurrence of high concentrations of unique degradation product of chlorophyll-*a* an particles residing below the thermocline throughout a period of oxygen depletion in Lake Kinneret. J. Limnol. 60(2), 201-207.

[439] Yacobi Y.Z., Pollingher U., Gonen Y., Gerhardt V., Sukenik A., 1996. HPLC analysis of phytoplankton pigments from Lake Kinneret with special reference to the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium gatunense* (Dinophyceae) and chlorophyll degradation products. J. Plankt. Res. 18(10), 1781-1786.

[440] Yamamoto H.Y., Chang J.L., Aihara M.S., 1967. Light-induced interconversions of violaxanthin and zeaxanthin in New Zealand spinach-leaf segments. Biochim. Biophys. Acta 141, 342-347.

[441] Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M., Chichester C.O., 1962. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. Arch. Biochem. 97, 168-173.

[442] Yoshida E., Nakamura A., Watanabe T., 2003. Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a′* and naphthoquinones in photosystem I of red algae, existence of two menaquinone-4 molecules in photosystem I of *Cyanidum caldarium*. Anal. Sci. 19, 1001-1005.

[443] Zapata M., Ayala A.M., Franco M., Garrido J.L., 1987. Separation chlorophylls and their degradation products in marine phytoplankton by reversed-phase high--performance liquid chromatography. Chromatographia 23(1), 26-30.

[444] Zapata M., Edvardsen B., Rodríguez F., Maestro M.A., Garrido J.L., 2001. Chlorophyll c_2 monogalactosyldiacylglyceride ester (chl c_2-MGDG). A novel marker pigment for *Chrysochromulina* species (Haptophyta). Mar. Ecol. Prog. Ser. 219, 85-98.

[445] Zapata M., Garrido J.L., 1991. Influence of injection conditions in reversed--phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. Chromatographia 31(11/12), 589-594.

[446] Zapata M., Jeffrey S.W., Wright S.W., Rodríguez F., Garrido J.L., Clementson L., 2004. Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: implications for oceanography and chemotaxonomy. Mar. Ecol. Prog. Ser. 270, 83-102.

[447] Zapata M., Rodríguez F., Garrido J.L., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine containing mobile phases. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195, 29-45.

[448] Zechmeister L., 1962. *Cis-trans* isomeric carotenoids, vitamin A and arylpolyenes. Academic Press New York.

[449] Zhao J., Yao P., Yu Z., Bianchi T.S., 2011. Orthogonal design for optimization of pigment extraction from surface sediments of the Changjiang River Estuary. Acta Oceanol. Sin. 30(4), 33-42.

[450] Züllig H., 1981. On the use of carotenoid stratigraphy in lake sediments for detecting past developments of phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 26(5), 970-976.
[451] Züllig H., 1986. Carotenoids from plankton and photosynthetic bacteria in sediments as indicators of trophic changes in Lake Lobsigen during the last 14000 years. Hydrobiologia 143, 315-320.
[452] Züllig H., 1989. Role of carotenoids in lake sediments for reconstructing trophic history during the late Quaternary. J. Paleolimnol. 2, 23-40.
[453] Zvezdanović J., Marković D., 2008. Bleaching of chlorophylls by UV irradiation *in vitro*: the effects on chlorophyll organization in acetone and *n*-hexane. J. Serb. Chem. Soc. 73(3), 271-282.
[454] Zykov V.V., Rogozin D.Yu., Kalugin I.A., Dar'in A.V., Degermendzhi A.G., 2012. Carotenoids in bottom sediments of Lake Shira as a paleoindicator for reconstruction of lake states in Khakassiya, Russia. Contemp. Probl. Ecol. 5(4), 434-442.
[455] Żmudziński L., Pęczalska A., 1984. Słownik hydrobiologiczny. Wyd. Nauk. PWN Warszawa.

Plant pigments in sediments of aquatic ecosystems

Summary

The deposited bottom sediments provide a valuable and unique record of phenomena occurring in water bodies and their drainage basins. Their main components include organic matter whose main sources are algae from the photic zone, as well as microorganisms and macrophytes. In many cases also the content of detritus that comes from terrestrial vegetation is considerably high. Organic matter is exposed to different processes which may change its character in a relatively short period of time between its synthesis and long-term deposition at the bottom of a water body. Less reactive forms of organic matter begin to dominate, while more reactive and water-soluble forms are used as food by microorganisms and animals feeding on sediments. Despite the total decomposition of morphological structures, plant pigments and their derivatives (synthesized by algae, phototrophic bacteria and embryophytes) are preserved in bottom sediments.

This paper presents characteristics and sources of plant pigments deposited in sediments. The processes responsible for their degradation have been described, including the processes of cell senescence, the influence of herbivores and physicochemical factors occurring in the water column and bottom sediments and affecting the preservation of plant pigments. The possible uses of pigment analysis in ecological and paleolimnological studies were presented, as well as an overview of indices used in this kind of studies. Methods applied in the analysis of pigments were also presented, starting from the methods of extraction and solvents used, through the technique of separation by thin-layer chromatography, and finally the high-performance liquid chromatography. The presented paper may serve as a valuable source of information for students of broadly defined environmental sciences.