



NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

2.3 Klorofyl *a*

Britta Pedersen[†]
Afdeling for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

Indhold

2.3 Klorofyl-a	2.3-3
2.3.1 Formål	2.3-3
2.3.2 Princip	2.3-3
2.3.3 Udførelse	2.3-3
2.3.4 Beregninger	2.3-4
2.3.5 Kvalitetssikring	2.3-5
2.3.6 Dataindberetning	2.3-6
2.3.7 Referencer	2.3-7

2.3 Klorofyl-a

2.3.1 Formål

Klorofylkoncentrationen er et mål for fytoplanktonbiomassen i vandet. Det er en vigtig parameter, som karakteriserer den biologiske struktur i økosystemet. Fytoplanktonbiomassen bestemmer, hvor stor en andel af lyset, som absorberes af fytoplankton og dermed er tilgængelig for produktion af organisk stof. Fytoplanktonbiomassen er dermed med til at bestemme den potentielle primærproduktion og derfor vigtig for modellering af systemet. Desuden er fytoplanktonbiomassen et mål for den mængde føde, der er tilgængelig for zooplankton. Klorofylkoncentrationen er tæt forbundet med mængden af næringssalte, som tilføres systemet, og klorofylkoncentrationen er derfor velegnet til at følge systemets respons på næringssaltbelastningen over tid. Endelig er klorofylkoncentrationen vigtig som skaleringsparameter for fotosyntesemålinger, således at fotosynteseraten kan udtrykkes pr. klorofylenhed.

2.3.2 Princip

Vandprøven filtreres, hvorefter pigmenterne ekstraheres fra de tilbageholdne alger med et organisk opløsningsmiddel, her ethanol. Ekstraktens absorbans bestemmes spektrofotometrisk ved absorptionsmaksimum, normalt ved bølglængden 663-665 nm, samt ved 750 nm til baggrundskorrektion. Koncentrationen af klorofyl beregnes ud fra absorbansen efter en baggrundskorrektion, ved brug af absorptionskoefficienten for klorofyl i ethanol.

2.3.3 Udførelse

Prøverne udtages som beskrevet i afsnittet om prøvetagning.

Før udtagning af delprøve til filtrering skal der sikres, at vandprøven er homogen, fx ved at den omrystes grundigt.

Absorbansen ved 665 nm og herved metodens følsomhed er afhængig af volumen af den filtrerede vandmængde, kuvettelængden og ekstraktens volumen.

Ved lave koncentrationer (< 2 µg/l) skal derfor en 5 cm kuvette altid bruges for at sikre en tilstrækkelig følsomhed.

Den relative fejl ved en spektrofotometrisk måling er generelt størst ved lave og høje absorbanser. Disse skal derfor undgås, og absorbansen ved 665 nm skal ligge mellem 0,04 og 0,8, uanset kuvettelængde.

I naturlige vandmasser varierer koncentrationen normalt fra ca. 0,2 µg/l om vinteren til 25 µg/l eller mere om sommeren, i meget sjældne tilfælde helt op til ca.100 µg/l. Den filtrerede vandmængde skal derfor afpasses efter den forventede klorofylkoncentration samt kuvettelængden, for at sikre at absorbansen ligger i det optimale måleområde.

Eksempler

Ved en koncentration på ca. 0,2 µg/l skal min. 4 l vand filtreres for at opnå en absorbans på mindst 0,04 med en 5 cm kuvette.

Ved en koncentration på ca. 20 µg/l, og hvis 4 l vand filtreres, opnås en absorbans på 0,8 med en 1 cm kuvette.

Baggrund

Partikler, fx fnug fra filterpapir der ikke er bundfældet ved centrifugeringen, kan sprede lyset ved alle bølgelængder og herved interferere med målingen. For at korrigere for dette ved beregningen af koncentrationen, måles absorbansen såvel ved klorofyls maksimum (663-665 nm) som ved 750 nm, hvor absorbansen primært skyldes partikler i prøven.

Absorbansen ved 750 nm må ikke overstige 0,005, såvel i en 5 cm som i en 1 cm kuvette.

Filtrering og måling

Filtrering, ekstraktionen og den spektrofotometriske måling udføres som beskrevet i Dansk Standard 2201 afsnit 3 - 5 (afsnit vedrørende reagenser, apparatur, fremgangsmåde) – dog med følgende afvigelse fra DS:

En graduering på centrifugeglasset må ikke bruges til at afmåle mængden ethanol. Ethanol skal i stedet tilsættes med en kalibreret dispenser/pipette.

Ved filtreringen skal der bruges et Whatman GF/F filter eller et G5 75 filter fra Advantec.

2.3.4 Beregninger

Absorbansen beregnes efter følgende udtryk:

$$A(665K) = A(665) - A(750)$$

hvor A(750) og A(665) er de målte absorbanser ved de respektive bølgelængder.

Koncentrationen af klorofyl *a* i vandprøven beregnes efter følgende udtryk:

$$C_v = 10^4 \times V_e \times A(665 \text{ K}) / 83,4 \times V_f \times l$$

hvor

C_v = vandprøvens klorofylkoncentration, $\mu\text{g}/\text{l}$

V_e = volumen af ethanolekstrakt i ml, her 10 ml

l = længden af kuvetten i mm

V_f = filtreret vandvolumen i liter (l)

83,4 = absorptionskoefficient i 96% ethanol, enhed: $\text{l} \times \text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

Resultatet angives som $\mu\text{g}/\text{l}$ og opgives med tre betydende cifre.

2.3.5 Kvalitetssikring

Generelt

Klorofylmålingen er en del af de vandkemiske målinger og skal derfor følge de generelle retningslinier, der er opstillet i de tekniske anvisninger for vandkemiske målinger, dvs:

- at de kritiske processer identificeres og beskrives i manualen for vandkvalitetsmålinger
- der udarbejdes en kontrolprocedure for de kritiske processer, der beskrives
- der udpeges en ansvarlig for hver kontrolprocedure
- at kontrollen er udført dokumenteres, fx ved at udfylde et skema (på papir eller som en fil)

For yderligere detaljer henvises til de tekniske anvisninger for vandkemiske målinger.

Absorbansmåling

Det er vigtigt, at absorbansen ved 750 nm ikke overstiger 0,005, såvel i en 5 cm som 1 cm kuvette for at sikre metodens præcision.

Det er af afgørende betydning for metodens nøjagtighed, at spektrofotometeret måler prøvens korrekte absorbans ved den korrekte bølgelængde. Spektrofotometerets bølgelængdeindstilling og absorbansmåling skal derfor kontrolleres inden hver absorbansmåling.

Metodens præcision og nøjagtighed

Laboratoriet skal beskrive deres interne kvalitetssikring for målingen samt opgive dets præcision og detektionsgrænse.

Den totale varians af en måling (s_t^2) er summen af variansen i selve prøven (inhomogenitet) (s_s^2), variansen fra prøvetagningen (s_p^2) og variansen fra selve målingen (s_m^2)

$$s_t^2 = s_s^2 + s_p^2 + s_m^2$$

Det er den totale varians, s_t^2 , som er af betydning, når klorofylkoncentrationen skal bruges til at følge systemets respons på nærings-saltbelastningen over tid, og ikke kun variansen fra selve målingen i laboratoriet.

Variansen i selve prøven ved prøvetagningstilfældet kan være af samme størrelse som variansen af målingen (DMU 1997).

For at kunne estimere s_t^2 , skal derfor minimum 6 uafhængige dobbeltbestemmelser pr. år udtages og analyseres i hvert område. Prøverne skal være ligeligt fordelt i perioden marts - oktober. Såvel dobbeltprøver fra klorofylmaksimum (min. 3) som i området mellem overfladen og klorofylmaksimum (min. 3) skal udtages.

Prøverne til dobbeltbestemmelse udtages ved at vandhenteren ned-sænkes to gange til den **samme** dybde, hvor den udløses/fyldes. En prøve fra hvert kast udtages og analyseres.

På grund af mulige interferenser fra andre pigmenter er det ikke muligt at præcisere metodens nøjagtighed.

Præstationsprøvninger

Laboratoriet skal deltage i nationale og internationale præstationsprøvninger for klorofyl målinger, hvis det er muligt.

2.3.6 Dataindberetning

Følgende data skal rapporteres sammen med klorofylkoncentrationen:

Stationsoplysninger:

Prøvetagningsdato og tidspunkt i UTC

Stationsnummer

Position

Dybde

Kvalitetssikringsparametre:

Resultat af dobbeltbestemmelser

Resultat af seneste præstationsprøvning

Interne kvalitetskontrolresultater

Metodens detektionsgrænse

2.3.7 Referencer

Dansk Standard 2201, 1986: Vandundersøgelse. Klorofyl a. Spektrofotometrisk måling i ethanolekstrakt., inklusive referencer heri.

DMU 1997: H. Frimor, B. Pedersen & H.Kaas: Variansen i vandkemiske målinger. Intern rapport, Afd. for Havmiljø og Mikrobiologi, DMU.

Draft Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM. Annex C-4 Phytoplankton chlorophyll-a. Version 22 September 1997.