

NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

2.4 Primærproduktion

Stiig Markager
Afdeling for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

Indhold

2.4	Primærproduktion	2.4-3
2.4.1	Formål	2.4-3
2.4.2	Princip	2.4-3
2.4.3	Udførelse	2.4-4
2.4.4	Beregninger	2.4-7
2.4.5	Kvalitetssikring	2.4-10
2.4.6	Dataindberetning	2.4-11
2.4.7	Referencer	2.4-12
2.4.8	Appendiks 1	2.4-13
2.4.9	Appendiks 2 - Beregning af nødvendig mængde ¹⁴ C	2.4-17

2.4 Primærproduktion

2.4.1 Formål

Måling af primærproduktion tjener to hovedformål i overvågningsprogrammet. Det ene er at bestemme, hvor meget organisk stof der dannes i systemet per tid. Dette er vigtigt i modeller, hvor primærproduktionen er en nøgleparameter i beskrivelsen af økosystemets funktion. Primærproduktionen indgår også i andre typer beregninger, f.eks. af det potentielle iltforbrug ved bunden. I begge tilfælde er vi interesseret i arealproduktionen. Et andet formål med primærproduktionsmålinger er at måle klorofylspecifikke fotosynteserater som er tæt koblet til næringsstatus for fytoplanktonpopulationen og kan fortælle os, i hvilken grad primærproduktionen er næringsaltbegrænset.

2.4.2 Princip

Det grundlæggende måleprincip er at vi måler indbygningen af radioaktivt mærket uorganisk kulstof i cellerne. Når vi kender den mængde ^{14}C vi har tilsat, og den totale mængde uorganiske kulstof i vandet, kan vi beregne det samlede optag af uorganisk kulstof ved fotosyntesen (Fig. 1).

$$^{12}\text{C}_{\text{optag}} = \frac{^{14}\text{C}_{\text{optag}}}{^{14}\text{C}_{\text{tilsat}}} \times ^{12}\text{C}_{\text{koncentrationen}} \quad \text{Fig. 1}$$

Fotosynteseraten er nøje forbundet med lysintensiteten som *in situ* varierer både over tid og med dybden. Beregning af arealproduktionen forudsætter derfor, at fotosynteseraten per volumen kan opsummeres over dybden og over tid, f.eks. per døgn, så vi opnår et mål for produktionen per areal ($\text{mg C m}^{-2} \text{døgn}^{-1}$). Dette gøres ved at fastlægge sammenhængen mellem lys og kulstofoptag i en såkaldt P-I kurve. Ud fra overfladelyset, lyssvækkelsen i vandsøjlen og P-I kurven kan vi så beregne fotosyntesen per volumen til et givent tidspunkt og dybde og summere op til en arealproduktion per døgn.

Vi kan ikke opnå et sandt udtryk for primærproduktionen i vandsøjlen, fordi vi ikke kan genskabe vandsøjlenes fysisk-kemiske forhold i en flaske. I praksis kan vi heller ikke tage højde for ændringer i algernes fotosyntesekapacitet over døgnet. Vi kan dog tilnærmet måle processen, således at vores mål for primærproduktionen gennemsnitligt er korrekt. I denne anvisning er det tilstræbt at optimere brugen af de informationer vi har om lys-fotosyntese sammenhængen, lyssvækkelsen i vandsøjlen, klorofyl koncentrationen og variationen i overfladeindstrålingen over tid, således at vi opnår det mest korrekte mål for systemets produktion, inden for de praktiske rammer i overvågningsprogrammet.

Der anvendes to forskellige strategier for beregning af arealproduktionen i overvågningsprogrammet. På havstationer laves der P-I kurver på to prøver, en blandprøve fra 0-10 m og en dyb prøve. Den dybe prøve tages enten i et evt. klorofyl maksimum eller i den standarddybde som er nærmest over dybden for 2% lys (Tabel 2.1.2 i teknisk anvisning 2.1 'Prøvetagning i felten'). Det er vigtigt at prøven ikke tages under dybden for 2% lys, i det algerne så ikke vil have noget signifikant bidrag til arealproduktionen. Fotosynteseparametrene fra disse kurver skaleres til klorofyl, og volumen specifikke fotosyntese parametre i de øvrige dybder beregnes vha. klorofylkoncentrationen som vist i lig. 2

$$Parameter(z_i) = Parameter(z_{p-1}) \frac{Chl(z_i)}{Chl(z_{p-1})} \quad \text{Lig. 2}$$

hvor z_i er en vilkårlig dybde og parameteren kan være enten α eller P_m . I repræsentative områder og typeområder anvendes kun en P-I kurve, som laves på en prøve fra dybden 1 m. Desuden laves der separate målinger af potentielt kulstof optag i dybderne for 25% og 2% af overfladeindstrålingen samt i et evt. klorofyl maksimum. Disse målingen bruges til at skalere fotosyntese parametrene fra P-I kurven til de øvrige dybder på samme måde som klorofyl koncentrationen er brugt i Lig. 2. Den procedurer følger Dansk Standard 293. Grunden til at man bruger forskellige metoder er, at havstationer ofte har en lagdelt vandsøjle med en dybtlevende fytoplankton population, som er tilpasset temperatur og lysforholdene i eller under springlaget. En dybtlevende population kan udvikle et egentligt dybtliggende alge maksimum og vil ofte have en anden P-I karakteristik end en overflade population. Man er derfor nødt til at fastlægge to separate P-I kurver. Omvendt er repræsentative områder og typeområder normalt så lavvandede og vandsøjlen så omrørt, at man med rimelig kan antage, at den samme P-I kurve gælder i hele vandsøjlen. Man kan derfor nøjes med at korrigere kulstofoptaget målt i overfladen for evt. variationer i biomassen ned gennem vandsøjlen.

2.4.3 Udførelse

Prøverne udtages som beskrevet i afsnittet om prøvetagning. Prøverne skal tages og opbevares i giftfri beholdere, hvilket vil sige uden metal eller gummidele. Beholdere af polyethylen, polypropylen, polycarbonat eller glas anbefales. Beholdere og flasker skal syrevaskes og skylles 3x i prøve. Syrevasken er nødvendig for at fjerne metaller som kan forårsage inhibering af fotosyntesen ved meget lave koncentrationer. Prøverne skal beskyttes mod lys. Tiden for prøvetagningen og *in situ* temperaturen i prøvetagningsdybden noteres. Inkubationen skal påbegyndes hurtigst muligt og senest 8 timer efter prøvetagningen. Prøverne skal opbevares mørkt og ved *in situ* temperatur. Fytoplankton vil hurtigt sedimentere i en flaske. Flasken skal derfor vendes (ikke rystes) mindst 10 gange inden man udtager prøven til forsøget.

Inkubationen udføres i en inkubator, hvor flaskerne rotere under inkubationen og belyses med forskellige lysintensiteter. Inkubatoren kan være af den type hvor flaskerne er monteret på et stort roterende hjul foran en serie af cool-white lysstofrør (farve 33). Alternativt kan man bruge en lineær type hvor flaskerne står på række og lysgradienten skabes af flaskernes skygning (Babin et al. 1994). Temperaturen bør ideelt holdes inden for ± 1 °C af *in situ* temperaturen. Imidlertid vil *in situ* temperaturen mellem de forskellige prøvetagningsdybder ofte være forskellig, således at dette krav ikke kan opfyldes for alle prøver. Man skal da vælge den temperatur i inkubatoren som ligger nærmest temperaturen for P-I kurve prøven, men sådan at ingen prøver inkuberes mere end 3 °C fra deres *in situ* temperatur. Hvis dette krav ikke kan opfyldes skal der laves separate inkubationer ved forskellig temperatur. Lyset i inkubatoren skal justeres, således at man får den optimale fordeling af punkterne på kurven som beskrevet i afsnittet om vurdering af P-I kurven og Appendiks 1.

Som beskrevet i afsnittet om måleprincippet er der to typer af målinger; P-I kurver og måling af potentielt kulstof optag P_{pot} . Disse er beskrevet hver for sig.

P-I kurve

En lys-fotosyntese kurven (P-I kurve) skal indeholde mindst syv lysflasker og en mørkeflaske. Hvert sæt indeholder således minimum 8 flasker (Tabel 2.4.1).

Tabel 2.4.1 Skema over primærproduktionsmålinger.

Havstationer	
Blandprøve 0-10 m	
Partikulær prod., lys	7
Partikulær prod., mørke	1
I alt	8
Klorofyl maks. eller z = 2% lys	
Partikulær prod., lys	7
Partikulær prod., mørke	1
I alt	8
Totalt for en station	
16	
Type og repræsentative områder	
Prøve fra 1m	
Partikulær prod., lys	7
Partikulær prod., mørke	1
I alt	8
Prøve fra z = 25% lys*	
Partikulær potentiel. prod., lys	2
Partikulær potentiel prod., mørke	1
Prøve fra z = 2% lys	
Partikulær potentiel prod., lys	2
Partikulær potentiel prod., mørke	1
Total for en station	
14 eller 17	
* plus en prøve fra et evt. klorofylmaksimum.	

Lyset og målinger af lyset i inkubatoren er beskrevet i Appendiks 1. Tilsætningen af ^{14}C kan ske på to måder. Det som anbefales er at et prøvevolumen (skal afmåles præcist) overføres til en flaske, f.eks. en

BlueCap flaske. Tiden for ^{14}C -tilsætningen noteres. Den sættes på en magnetomrører og skærmes mod lys. Derefter tilsættes ^{14}C (præcist volumen) og en dispenser påsættes flasken. Beregning af den nødvendig mængde ^{14}C er beskrevet i Appendiks 2. Dispenseren er på forhånd indstillet så den fylder flaskerne indtil der er ca. 1 ml luft tilbage. Dette volumen bestemmes nøjagtigt ved udvejning. Efter 2 minutters langsom omrøring fyldes flaskerne til en P-I kurve med præcist samme volumen med dispenseren. Dispenseren skal håndteres forsigtigt, så man ikke udsætter cellerne for store trykforskelle. Mørkeflaskerne er på forhånd skærmet mod lys, og proppen tildækkes hurtigst muligt. Flaskerne placeres straks i inkubatoren og inkuberes i 2 timer. Flaskerne skal holdes tildækkede til og fra inkubatoren. Den mængde DPM der tilsættes hver inkubationsflaske beregnes ud fra aktiviteten i ampullen, volumen af hele flasken, det tilsatte volumen ^{14}C og volumenet af inkubationsflaskerne som vist i lig. 3,

$$DPM \text{ pr flaske} = \frac{\text{aktivitet} * ^{14}\text{C volumen} * \text{flaskevolumen}}{\text{batchvolumen}} \quad \text{Lig. 3}$$

hvor aktiviteten er DPM/ μl i ampullen og ^{14}C volumen er den mængde der tilsættes batchen i μl . Inkubationsflaskerne skal skylles med havvand (*in situ* temperatur) og derefter tømmes mest muligt, umiddelbart inden de fyldes med prøve.

Et alternativ til ovenstående procedure er at tilsætte ^{14}C direkte til hver inkubationsflaske, efter at de er fyldt med prøve. Den metode giver normalt en større variation omkring P-I kurven og kan derfor ikke anbefales. Hvis man har problemer med at overholde kravet til variabilitet (r^2 for kurvetilpasningen) skal den første metode anvendes.

Potentielt kulstofoptag

Målinger af potentielt kulstofoptag udføres principielt på samme måde som en P-I kurve, men man måler kun optaget ved en lysintensitet som giver et optag tilsvarende P_m . Tre flasker (to lys og en mørkeflaske) fyldes med prøve. Det eksakte volumen er ikke kritisk så længe hele volumenet filtreres, men flasker bør fyldes til ca. samme niveau som for P-I målingerne. ^{14}C tilsættes til hver flaske med en udvejet pipette og flaskerne anbringes i inkubatoren. Dette gentages for hver dybde (Tabel 2.4.1).

Fælles for P-I kurve og potentielt optags målinger

Når inkubation skal afsluttes slukkes lyset i inkubatoren og tiden noteres. Den nøjagtig tid flaskerne har været belyst i inkubatoren beregnes. Indholdet af flaskerne filtreres straks igennem 25 mm Whatman GF/F filtre eller tilsvarende, f.eks. Advantec, GF75, ved maksimum 0,3 atm undertryk (= 280 mm Hg). Filtreringen bør ikke tage mere end 5 minutter per flaske, ellers bør man kun filtrere et delvolumen. Når hele flaskens volumen filtreres, skal flaskerne skylles 2 gange med 5 ml havvand som også hældes igennem filteret.

Mørkeflaskerne skal filtreres sidst. Filtrene kommes straks i vials og der tilsættes 200 µl 0.1 N HCl direkte på filteret som henstår mindst 12 timer uden låg inden scintillationsvæske tilsættes. Prøver tælles når kemiluminiscensen er ophørt og med brug af quench-kurve for den pågældende type vials og scintillationsvæske. Når man måler på vand fra flere dybder eller stationer samtidig, må hele proceduren, fra lyset slukkes i inkubatoren til HCl er tilsat den sidste flaske, ikke tage mere end 60 minutter. Filtreringen af et enkelt sæt flasker til en P-I kurve må ikke tage mere end 20 minutter. Det er vigtigt, at man er opmærksom på at kulstoffikseringen forsætter på filteret indtil der tilsættes syre. Prøver og filtre skal derfor holdes i svagt lys under hele proceduren. Fra flaskerne kommer ud af inkubatoren skal mørke og lysflasker behandles ens og udsættes for samme lysforhold, dvs. at afskærmning af mørkeflasker, f.eks. alufolie, aftages. På den måde kan optaget i mørkeflaskerne bruges som kvalitetskontrol for at filtreringen er udført korrekt.

Koncentration af uorganisk kulstof bestemmes enten efter Dansk Standard 9963-1 og 9963-2. Alternativt kan alkaliniteten bestemmes ved Gran titrering (Mackereth et al. 1978). Buch tabeller (Buch 1945) må ikke anvendes.

2.4.4 Beregninger

Beregningerne består af tre dele; beregningen af kulstofoptaget i hver flaske, beregningen af fotosynteseparametre vha. P-I kurven, og endelig beregningen af den dags og dybde integrerede produktion

Beregning af kulstofoptag

Kulstofoptaget i hver flaske beregnes ud fra ligning 4 og 5.

Mørkeflasker:

Lig. 4

$$M_{\text{optag}} (\text{mg C m}^{-3} \text{ t}^{-1}) = \frac{\text{TotCO}_2 (\text{mg C m}^{-3}) * \text{DPM talt} * 1.05 * 60}{\text{DPM tilsat} * \text{total tid (minutter)}}$$

Total tid er tiden fra ¹⁴C-tilsætningen til kulstofoptaget stoppes ved syretilsætning.

Lysflasker:

Lig. 5

$$P (\text{mg C m}^{-3} \text{ t}^{-1}) = \frac{\text{TotCO}_2 (\text{mg C m}^{-3}) * (\text{DPM talt} - \text{DPMmørke}) * 1.05 * 60}{\text{DPM tilsat} * \text{lystid (minutter)}}$$

Lystid er den tid flaskerne er belyst i inkubatoren.

Beregning af fotosyntese parametre ud fra P-I kurve

Det fotosyntetiske optag i lysflaskerne afbildes mod lysintensiteten og parametrene α , P'_m og c i lig. 6 beregnes ved ikke-lineær kurvetilpasning.

$$P = P'_m (1 - e^{(-\alpha I / P'_m)}) + c$$

P'_m er den maksimale fotosynteserate for kurven, α er lysudnyttelseseffektiviteten og I er indstrålingen ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Parameteren c parallel forskyder kurven på y-aksen, således at kurven ikke tvinges gennem 0,0. Den maksimale fotosyntese rate (P_m) beregnes som $P'_m - c$.

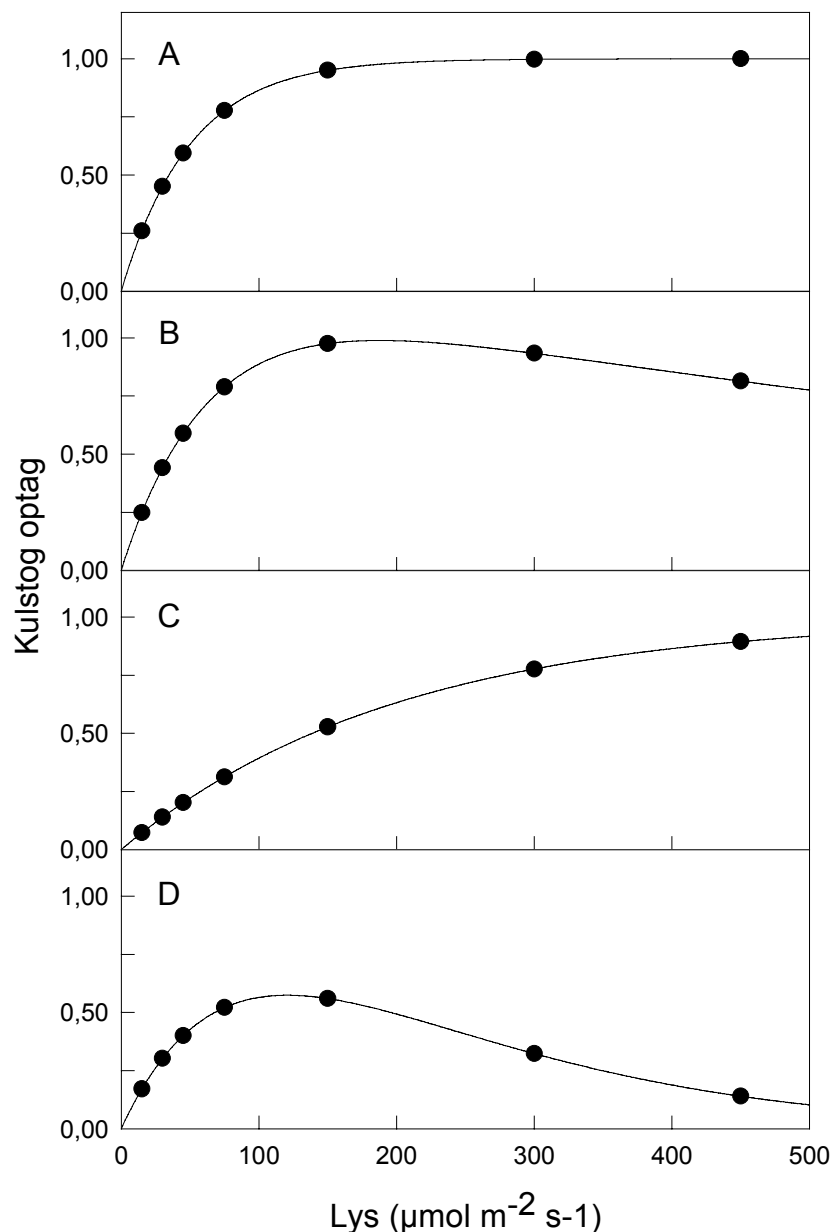
Hver P-I kurve skal vurderes efter følgende retningslinier.

Den ideelle kurve har minimum 4 punkter på den opadstigende del af kurven og minimum tre punkter som viser det maksimale optag (Figur 2.4.1a)

Hvis punkterne fra de højeste lysintensiteter ligger mere end 5% under den højest målte værdi, er det pga. af fotoinhibering, dvs. at for højt lys under inkubationen har nedsat fotosyntesen. Sådanne punkter udelades af beregningerne inden kurvetilpasningen. Se eksempel på Figur 2.4.1b.

Et eller to meget afvigende punkter (afviger med mere en 30% fra den forventede værdi) skyldes normalt fejl ved håndteringen eller filtreringen, og disse punkter udelades. Derefter beregnes fotosyntese parametrene igen.

Den lysmættede del af kurven skal indeholde mindst to punkter, som har samme fotosynteserate ($\pm 5\%$). Så er kurven i orden, hvilket markeres med flag = 1. Hvis fotosynteseraten ved den højeste lysintensitet overstiger raten ved den næsthøjeste med mere end 5% (Figur 2.4.1c), har man ikke opnået lysmætning i forsøget, og den maksimale fotosynteserate er ikke bestemt. Det kan især forekomme i overfladeprøver om sommeren i stille vejr, hvor fytoplanktonet er tilpasset et meget højt lys niveau. Det markeres med flag = 2. En anden type fejl er, at fotoinhibering forekommer på en stor del af kurven. Kurven stiger op til en maksimumsværdi og falder derefter, men således at 3, 4 eller flere punkter ligger på den nedadgående del af kurven (Figur 2.4.1d). Dette skyldes fotoinhibering og forekommer i prøver fra dybtliggende klorofyl maksima som er inkuberet i for højt lys. Det giver en dårlig bestemmelse af både α og P_m og markeres med flag = 3.



Figur 2.4.1 Figuren viser fire eksempler på P-I kurver. A) en ideel fordeling af punkterne hver fire punkter ligger på den lysbegrænsede del af kurven, og tre punkter ligger på den lysmættede del. Det giver en god bestemmelse af både α og P_m . Samtidig er der ingen fotoinhibering. B) Eksempel hvor der er en let fotoinhibering ved den højeste lysintensitet. Dette punkt medtages ikke i beregningen af kurveparametrene, men kurven er ellers i orden. Kurver som i A og B markeres med flag = 1. C) Eksempel hvor man ikke har opnået lysmætning, da P for den højeste lysintensitet er mere end 5% højere end P for den næsthøjeste. En kurve af denne type markeres med flag = 2. Hvis det er muligt, skal lysniveauet i inkubatoren hæves for en lignende prøve i fremtiden. D) Eksempel på en kraftig fotoinhibering. P for de to højeste lysintensiteter er kraftigt fotoinhiberet, men de øvrige punkter kan også være det. Hverken P_m eller α er således bestemt med sikkerhed. Dette markeres med flag = 3, og lignende prøver skal i fremtiden inkuberes ved et lavere lysniveau som beskrevet i Appendiks 1.

Beregning af arealproduktionen

I type områder og repræsentative områder beregnes arealproduktionen efter Dansk Standard nr. 293. Princippet er at P-I kurven antages at gælder i alle dybder, men skaleres til den målte P_{pot} i hver dybde. Hvis der er et klorofyl maksimum, indsættes et beregningspunkt lige over og under toppen, således at den vertikal betydning af et klorofyl maksimal svarede til dets aktuelle udstrækning. Udstrækningen vurderes ud fra fluorescensprofilen fra stationen.

For havstationer følges også dansk standard nr. 293 men med følgende modifikationer. I stedet for at skalere de volumenspecifikke rater til målinger af P_{pot} , beregnes fotosynteseraten i hver dybde, hvor der er målt klorofyl, ud fra de klorofylspecifikke rater som angivet i lig. 2. Temperaturkorrektionen og integration over tid og dybde følger Dansk Standard nr. 293. P-I kurven fra 0-10 m prøven anvendes ned til 10 m. Hvis der er lavet en P-I kurve fra et klorofyl maksimum bruges denne P-I kurve fra overkanten af klorofylmaksimaet og nedefter og P-I kurven fra 0-10 m bruges ovenfor klorofylmaksimaet. Hvis der er lavet en P-I kurve fra 2% lysdybden, anvendes denne kurve fra 10 m og nedefter.

For alle stationer gælder det, at en evt. fotoinhiberingen ikke medtages i beregningen af arealproduktionen. Det ligger implicit i at P-I kurven ikke indeholder et udtryk for fotoinhibering, og at punkter som udviser inhibering derfor ikke medtages i beregningerne. Dette har en faglig baggrund, da fotoinhibering er en tidsafhængig proces. Under inkubationen er flaskerne fastholdt i højt lys i to timer, og vil derfor være mere udsat for fotoinhibering end fytoplankton i vand-søjlen, hvor cellerne cirkulerer op og ned i en lysgradient. Erfaringen viser, at fotoinhibering oftest forekommer om vinteren, hvor lyset i vandet sjældent når op på et niveau der give inhibering. Omvendt er lyset forår og sommer højere end i inkubatoren, således at inkubator målingen alligevel ikke giver et korrekt udtryk for fotoinhiberingen. Undersøgelser viser, at fotoinhiberingens betydning for areal produktionen normalt er mindre end 5%, hvis det overhoved forekommer *in situ* (Markager 1994 og referencer heri).

2.4.5 Kvalitetssikring

Kvalitetssikringen ligger på 3 niveauer: 1. niveau er at anvisningerne overholdes. Primærproduktionsmålingerne er, som den eneste af parametrene i det pelagiale program, er et ratemål. Det betyder, at målingen er følsom over for alle forhold som påvirker fytoplanktonets fysiologiske tilstand. Det kan f.eks. være toksiske stoffer, opbevaring, temperatur svingninger eller stærkt lys. 2. niveau af kvalitetssikringen ligger i vurderingen af P-I kurven og i valg af lysniveau i inkubatoren. Det er vigtigt, at årsager til afvigelser af enkeltpunkter fra P-I kurven overvejes, og at procedure for håndtering af flasker, filtrering og efterbehandling justeres, hvis man gentagne gange har problemer med afvigende punkter. Desuden bør man bruge erfaringen til at justerer lysniveauet i inkubatoren, således at kurven er

lysmættet men ikke fotoinhiberet. 3. niveau ligger i krav til de to kvalitetsparametre som skal indrapporteres.

Parameteren for % mørkeoptag må ikke overstige 5% i mere end 5% af målingerne, dvs. for 95% af prøverne skal mørkeoptaget være mindre end 5% af P_m . Hvis mørkeoptaget er højere, tyder det på en utilstrækkelig fjernelse af uorganisk ^{14}C , at prøverne har været opbevaret for længe inden inkubationen startede eller at filtrene har fået for meget lys under filtreringen. Høje mørkeoptag kan dog forekomme om vinteren, hvor samfundet er domineret af heterotrofe organismer.

Parameteren for kurvetilpasning (r^2) er et mål for, hvor reproducerbart målingerne på de enkelte flasker er udført. Erfaringen viser, at det er muligt at komme over 0,98 for r^2 i mere end 90% af prøverne.

2.4.6 Dataindberetning

Følgende parametre skal rapporteres:

station	nummer
dato	
tid_prøve	tid for prøvetagningen (UTC-tid)
n	antal prøvetagningsdybder
P^{areal}	areal produktion ($\text{mg C m}^{-2} \text{ dag}^{-1}$)

For hver dybde rapporteres:

tid_ink	tid for start af inkuberingen (UTC-tid)
dybde	prøvetagningsdybde (m)
type_flag	P-I = 1, P_{pot} = 2

For P- I kurver:

temp	temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
α	lysudnyttelseeffektivitet ($\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1} (\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{ sek}^{-1})^{-1}$)*1000
P_m	maksimal fotosynteserate ($\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1}$)
c	intercept ($\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1}$)
ink_ly	100% lysintensitet i inkubatoren ($\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{ sek}^{-1}$)
r^2	r^2 værdien for kurvetilpasningen*
n	antal punkter brugt i beregningen af P-I parameter
P1-Pn*	kulstofoptag for hver flaske ($\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1}$)
L1-Ln*	lysintensitet for hver flaske ($\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{ sek}^{-1}$)
flag	1 angiver at kurven er i orden. 2 angiver at lysmætning ikke er opnået. 3 angiver at der her været kraftig fotoinhibering.
%m_opt	mørkeoptaget i % af P_m

flag_ink flag type af inkubator, 0 = ikke oplyst, 1 = hjul type (type oprindeligt forhandlet af VKI), 2 = lineær inkubator, 99 = anden type

For P_{pot} målinger:

P_{pot} potentiel fotosynteserate ($\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1}$)
%m_opt mørkeoptaget i % af P_m

* r^2 for kurvetilpasningen beregnes som:

Lig. 9

$$r^2 = 1 - \left(\frac{\sum (P - P_{\text{est}})^2}{\sum (P - P_{\text{middel}})^2} \right)$$

hvor P_{est} de estimerede værdier for P og P_{middel} er middelværdien af P for flaskerne. Summationen sker over de punkter, der indgår i kurvefitningen.

*) antallet af flasker kan variere man skal være minimum 7.

2.4.7 Referencer

Dansk Standard 293. 1983. Vandundersøgelser. Planktonalgers kulstofassimilation i inkubator med ^{14}C -metoden. Dansk Standardiseringsråd, København.

Dansk Standard 9963-1. 1996. Vandundersøgelser. Bestemmelse af Alkalinitet. Del 1: Totalalkalinitet og phenolphthaleinalkalinitet. Dansk Standardiseringsråd, København.

Dansk Standard 9963-2. 1996. Vandundersøgelser. Bestemmelse af Alkalinitet. Del 1: Carbonatalkalinitet. Dansk Standardiseringsråd, København.

Babin, M., A. Morel og R. Gagnon. 1994. An incubator designed for extensive and sensitive measurements of phytoplankton photosynthesis parameters. *Limnology and Oceanography*, 39, s. 694-702.

Mackereth, F.J.H., J. Heron & J.F. Talling (1978) Water analysis: some revised methods for limnologists. *Freshwater Biological Association*, 36.

Markager, S. (1994) Open-water measurement of areal photosynthesis in a dense phytoplankton community. *Archiv für Hydrobiologie*, 129, s. 405-424.

2.4.8 Appendiks 1

Måling af lys i inkubatoren - gammel type

I det følgende forudsættes det, at der anvendes en inkubator af samme type, som den der tidligere blev forhandlet af Vandkvalitets Institut nu DHI - Institut for Vand og Miljø eller en ligende type. Denne består af en rektangulær glaskasse som belyses forfra med 14 lysstofrør. Inden i kassen er et hjul, hvorpå flaskerne monteres. Flaskerne kan dækkes med en sort kasse påmonteret skyggefiltre som nominelt svækker lyset til henholdsvis 50%, 25%, 15%, 10% og 5%. Hvis der benyttes en anden typer inkubator, må det godtgøres, hvilken lysintensitet der er, der hvor flaskerne er placeret.

For lysmålingen skelnes mellem rutine kontrol af 100% lysniveauet i inkubatoren og en opmåling af lysets fordeling og skyggefiltrenes svækkelse. Rutine målingen skal udføres ved afslutningen af hver inkubation. Opmåling af lysets fordeling og skyggefiltre skal udføres en gang årligt.

Rutine målinger

Disse målinger har til formål at måle 100% lysniveauet i inkubatoren. Den udføres ved at en 2π PAR sensor, f.eks. LICORs UW190, placeres 4 steder i inkubatoren og gennemsnittet beregnes. Sensorens placering er kritisk* og skal være sådan at sensorens diffusor er i samme plan som midten af flaskerne under inkubationen. De fire positioner skal være 0° , 90° , 180° og 270° i den yderste ring på hjulet.

Hvis der udføres flere inkubationen med meget forskellig temperatur skal 100% lysniveauet kontrolleres ved hver temperatur.

Opmåling af lysets fordeling og skyggefiltre

Denne måling inkludere 1) en rutine måling som beskrevet ovenfor, 2) en måling af lysets fordeling i inkubatoren i den afstand fra front-ruden som flaskerne befinder sig i og 3) en måling af svækkelsen af hvert enkelt filter.

Rutine målingen udføres som beskrevet ovenfor. Denne værdi sættes lig 100% lys.

Det gennemsnitlige lys i inkubatoren måles* for den ydre og indre ring separat, ved at sensoren aflæses i mindst 20 positioner jævnt fordelt på cirklen. Nu kan man beregne den gennemsnitlige lysintensitet en flaske modtager for henholdsvis den ydre og indre ring. Denne udtrykkes i procent af lysniveauet målt under punkt 1. Der ved opnår man, at man efter hver rutine måling kan beregne den gennemsnitlige lysintensitet en flaske modtager på henholdsvis den ydre og den indre ring.

Inkubatoren er forsynet med en skyggekasse som svækker lyset over flaskerne i den indre ring. Skygningen for hvert filter er opgivet i %. I praksis har det vist sig at disse værdier kun er tilnærmet rigtige, og de skal derfor måles op for hver inkubator. Dette gøres ved at placerer lyssensoren på skiven umiddelbart bag et filter. Derefter fjernes kassen og lysmåleren aflæses. Det er nu vigtigt at sensoren ikke flyttes, f.eks. kan hjulet holdes så sensoren er i 0° positionen hele tiden. Derefter placeres hvert filter i kassen over sensoren, værdien aflæses, og man kan nu beregne svækkelsen af filteret i procent:

$$\text{filter svækkelse} = \frac{100 * \text{måling efter filter}}{\text{måling uden filter}} \quad \text{Lig. 10}$$

Lyset en flaske modtager under inkubationen (I_{flaske}) beregnes nu som følger:

$$I_{\text{flaske}} = I_{\text{rutine}} * \frac{I_{\text{ring}}}{I_{\text{rutine}}^*} * \text{filter svækkelse} \quad \text{Lig. 8}$$

hvor $I_{\text{ring}}/I_{\text{rutine}}^*$ er forholdet mellem det gennemsnitlige lys for den pågældende ring og I_{rutine} som er målt under punkt 2. De to sidste led beregnes en gang årligt mens I_{rutine} måles ved hver inkubation.

* Sensorens placering er absolut kritisk. En lille drejning eller ændring af afstanden vil ændre signalet. Man kan derfor med fordel bore et hul i pladen som passer til sensorens diameter, således at sensoren nemt kan fastholdes i en given position.

Styring af lyset i inkubatoren og kritiske forhold

Lyset i inkubatoren påvirkes af en række forhold. I det følgende er beskrevet forhold som erfaringsmæssigt kan give anledning til problemer.

Lysstofrørens alder påvirker deres effekt. Effekten falder hurtigt til ca. 80% af det initiale niveau, hvorefter faldet er langsommere. Når lysniveauet falder til under $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ skal rørene skiftes.

Lysstofrørens temperatur er afgørende for deres effekt. Det er temperaturen på det koldeste punkt som bestemmer lysudbyttet. Det betyder, at røres udbyttet nedsættes, hvis de rører en kold kant på inkubatoren. Træk omkring inkubatoren bør undgås, og lampen bør af samme grund være forsynet med en bagplade. Det er naturligvis vigtigt, at inkubationen og målinger af lyser først sker, når rørene har nået deres arbejdstemperatur.

Lampens placering er vigtig for lyset i inkubatoren. Normalt kan og bør lampen kunne flyttes, men der skal være noget, f.eks. små klodser, som sikre at lampen altid står i samme position under brug. Lampen bør være så tæt på ruden så muligt, men uden at lampen rører ruden eller andre dele af inkubatoren og sådan at der er plads til at placerer skyggenet (se nedenfor).

Ruden skal holdes ren både udvendig og især indvendig, hvor den er udsat for begroning. Ligeledes bør vandet i inkubatoren skiftes med mellemrum så det holdes rent. Det har yderligere den fordel at evt. kontaminering med ^{14}C fjernes.

Justering af lysniveauet i inkubatoren

Overfladeprøver skal inkuberes ved fuldt lys, dvs. at alle 14 rør er tændt. Dette niveau må ikke være mindre end $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ved målingen af P-I kurver på dybe prøver er det ofte nødvendigt at justerer lyset ned, således at der ikke forekommer lyshæmning. Dette må beror på en vurdering af forholdene, der hvor prøven kommer fra. En prøve som kommer fra en stabil vandmasse med lavt lys og lav temperatur vil være mest udsat for lyshæmning. Det er vigtigt at man udnytter tidligere målinger under lignende forhold og justerer lysniveauet så 175% lys giver lysmætning, men ingen eller kun en svag hæmning.

Lyset justeres ved at placere et eller flere net mellem lampen og inkubatoren. Nettet kan være stålnet, sort tylstof eller lignede udspændt på en ramme som dækker hele frontrudens areal. Det er vigtigt at nettet ikke ændre lysets spektrale sammensætning. Det må derfor ikke have en farve. Tre til fire kombinationer af net vil normalt være tilstrækkeligt til at dække alle typer prøver. For hver net kombination der anvendes, skal man naturligvis måle 100% lysniveauet.

Måling af lys i inkubatoren - ny type med flasker på linie

I en nyere type af inkubator bruger man lysets dæmpning gennem en række af flasker til at skabe en lysgradient (Babin et al. 1994). Typen er senere videreudviklet af bl.a. Hansen Holding i samarbejde med Danmarks Miljøundersøgelser. Fordelene ved denne type inkubator er at man kan bruge flere flasker, og dermed få en bedre bestemmelse af P-E kurven. Desuden kan man få en højere maksimal lysintensitet og selve inkubatoren er mere kompakt.

Ligesom for den anden type inkubator skelnes der mellem rutine kontrol af den maksimale lysintensitet og en årlig måling af lyssvækkelsen.

Rutinemålingen foretages med en 2π PAR sensor, f.eks. LICORs UW190, som placere umiddelbart bag ruden. Der måles i 4 positioner som dækker det felt hvor flaskerne er, og der beregnes et gennemsnit. Målingerne foretages ved hver måling når lampen er varmet op og med vand i inkubatoren.

Målingen af lyssvækkelsen foretages med en 4π -sensor, fx Biosphericals QSL-101. Sensoren placeres 9 steder fordelt systematisk i hver flaske i linien og gentages for alle flasker. Der beregnes et gennemsnit for hver flaske i linien. Ud fra målingen med 2π -sensoren bag frontruden beregnes en relativ skygning for hver flaske. Målingen foretages med rent vand i flasker. Det er vigtigt at de to sensorer er korrekt kalibreret.

Skygningen gennem flaskerne afhænger af vandets indhold af partikler, herunder fytoplankton. Erfaringen viser at der ikke er nogen signifikant effekt af fytoplankton op til ca. 20 µg Chl l⁻¹. Ved højere koncentrationer af fytoplankton skal der måles en ny lyssvækkelse.

2.4.9 Appendiks 2 - Beregning af nødvendig mængde ^{14}C

Dette afsnit er en hjælp, hvis man ønsker at reducere ^{14}C -forbruget, f.eks. af miljømæssige eller økonomiske årsager. I forhold til at bruge samme tilsætninger året rundt er der især noget at spare, hvis man har stationer, hvor der i perioder er meget lave klorofyl koncentrationer. Beregningen er baseret på den forventede klorofyl koncentration som kan vurderes ud fra fluorescensmålinger.

En præcis måling af kulstofoptaget afhængig af, at man har et tilstrækkeligt antal DPM i prøven som tælles. I princippet kan man øge præcisionen ved at øge tælltiden, men tælltider over f.eks. 20 minutter er normalt upraktiske. Desuden skal tælltallet være signifikant højere end baggrunden. Erfaringen viser at DPM-værdien ved P_m bør være minimum 1000. Den aktivitet der skal tilsættes prøven afhænger af klorofyl koncentrationen, den klorofylspecifikke fotosyntese rate og inkubationstiden. P_m^{chl} vil ofte ligge mellem 0.5 og 1.5 $\text{mg C mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$. Hvis man antager at den er 1 $\text{mg C mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$, og omskriver ligning 1 fås:

$$DPM \text{ pr flaske} = \frac{13.230.000}{[Chl]} \quad \text{Lig. 11}$$

hvor [Chl] er den forventede klorofyl koncentrationen i prøven ($\mu\text{g l}^{-1}$) og tallet 13.230.000 fremkommer fra ligning 1 når man antager, at der er 2,1 mmol uorganisk kulstof per liter og at inkubationstiden er 120 minutter. Der er ca. $2,2 \cdot 10^6$ DPM/ μCi , så ligning 2 kan omskrives til:

$$\mu\text{Ci pr flaske} = \frac{6}{[Chl]} \quad \text{Lig. 12}$$

Dette er en gennemsnitsbetragtning. Ved lave temperaturer eller kraftig næringssalt begrænsning vil fotosynteseraten ofte være lave, og man skal anvende en højere aktivitet. Omvendt kan man klare sig med en mindre aktivitet i områder med varmere vand og høje næringssalt koncentrationer. Det er vigtigt at huske, at en åbnet ampul ikke kan gemmes, i det ^{14}C vil udveksles med atmosfæren.