



NOVANA

Teknisk anvisning for marin overvågning

5.2 Pigmenter

Jørgen Hansen
Berit Langkilde Møller
Afdeling for Marin Økologi

Miljøministeriet
Danmarks Miljøundersøgelser

Indhold

| | | |
|------------|------------------------------------|--------------|
| 5.2 | Pigmenter | 5.2-3 |
| 5.2.1 | Formål | 5.2-3 |
| 5.2.2 | Prøveindsamling | 5.2-4 |
| 5.2.3 | Analyse | 5.2-4 |
| | 5.2.3.1 Skæring af kerner | 5.2-4 |
| | 5.2.3.2 Vejning | 5.2-5 |
| | 5.2.3.3 Frysetørring | 5.2-5 |
| | 5.2.3.4 Ekstraktion | 5.2-6 |
| | 5.2.3.5 HPLC-analyse | 5.2-6 |
| | 5.2.3.6 Beregning af koncentration | 5.2-7 |
| 5.2.4 | Kvalitetssikring | 5.2-7 |
| 5.2.5 | Rapportering | 5.2-7 |
| 5.2.6 | Litteratur | 5.2-8 |

5.2 Pigmenter

Denne tekniske anvisning beskriver formål, indsamlingsmetodik, analyse, kvalitetssikring og rapportering af den overvågning af pigmenter i marine sedimenter, som skal gennemføres inden for rammerne af NOVANA-programmet.

5.2.1 Formål

Pigmentmålinger i sediment kan anvendes til at detektere og kvantificere sedimentation af planktonalger og dermed dele af den tilførsel af organisk materiale, der sker fra vandsøjlen og til bunden. Ved at foretage regelmæssige målinger af dette input, kan man få information om, hvilke konsekvenser eventuelle ændringer i næringsstofftilførslen til havmiljøet har for koblingen mellem økosystemerne på bunden og i vandsøjlen.

For størstedelen af de danske havområder med blødbund er vanddybden så stor, at der ikke foregår nogen primærproduktion af betydning. Dette betyder, at den bentiske fødekæde i disse områder hovedsageligt er baseret på det materiale, som bliver tilført fra vandsøjlen. Det er i flere tilfælde blevet vist, at der er en positiv sammenhæng mellem produktionen i vandsøjlen og biomassen af blødbundsfaunaen (fx *Josefson & Rasmussen 2000*). Inputtet af partikulært organisk materiale kan enten foregå, ved at filtratorerne på bunden optager suspenderet materiale direkte fra vandsøjlen, eller ved at materialet tilføres til bunden via sedimentation fra de frie vandmasser. I de områder, hvor vandsøjlen er lagdelt, og hvor filtratorerne derfor ikke har tilgang til det materiale, der er suspenderet i det øverste produktive lag, er det følgelig sedimentationen, der er den vigtigste proces. Der foregår løbende en sedimentation til havbunden, men i forbindelse med forårsopblomstringen ses der i regelen en distinkt puls af helt friskt materiale, som hovedsageligt består af kiselalger (*Josefson & Hansen 2003*). Da det er levende alger, der sedimenterer, og da det tillige har vist sig, at de overlever forholdsvis lange perioder nedgravet i sedimentet (*Itakura et al. 1997, Lewis et al. 1999, Hansen & Josefson 2001, Josefson & Hansen 2003*), er det muligt at registre og kvantificere dette input ved at måle pigmentindholdet i overfladesedimentet. Det input, der tilføres bunden i forbindelse med forårsopblomstringen, svarer sandsynligvis til størstedelen af primærproduktionen under forårsopblomstringen og dermed til størstedelen af den mængde uorganisk kvælstof, som er blevet akkumuleret i den fotiske zone i løbet af vinteren.

Måles sedimentets pigmentindhold før og efter forårsopblomstringen, er det muligt at beregne berigelsen. Denne berigelse repræsenterer den del af primærproduktionen, som ikke omsættes i planktonet men derimod bliver tilført direkte til bunden. Ved at foretage årlige målingen af sedimentationen på en række stationer er det muligt at afgøre, om ændringer i næringsstofftilførslen påvirker transporten af

algemateriale fra vandsøjlen til bunden og dermed denne vigtige kobling mellem det bentiske og pelagiske økosystem.

5.2.2 Prøveindsamling

Prøveindsamlingen sker to gange om året – før og efter forårsopblomstringen – på en række stationer fordelt i de indre danske farvande. Første prøveindsamling sker i midten af februar, samtidigt med at der foretages målinger af vandkemiske og fysiske forhold (se kap. 1.1 og 2.2). Anden indsamling sker i maj, sammenfaldende med prøvetagning af bundfauna.

På hver station indsamles der 5 individuelle hapskerner. Fra hver kerne udtages en mindre delprøve med et transparent plexiglasrør med diameter $\varnothing=4,5$ cm. Røret på HAPS med kernen afmonteres og plexiglasrøret presses igennem kerne og forsegles med prop i begge ender. Herefter skylles overfladen og profilen inspiceres for at checke, om kerne er uforstyrret. Er dette ikke tilfældet, tages en ny kerne. Overfladen af sedimentkernen må under opbevaringen højst være dækket af ca. 5 mm vand. Er der mere vand til stede, dekanteres det overskydende vand bort efter en times henstand.

Prøver opbevares mørkt og køligt (maks. 5°C - dog må prøverne ikke fryses) ind til de skæres.

Fortløbende nummer; husk at notere i logbog hvilket nr., der hører til hvilken station, kerne og dybde.

5.2.3 Analyse

5.2.3.1 Skæring af kerner

Kernerne skæres i følgende dybdeintervaller 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-8, 8-12 og 12-16. Kernen bliver målt ud med lineal. I de første fem niveauer deles hver skive to halvdele, som hver for sig overføres til vejebakker, hvor materialet omrøres, indtil det er fuldstændigt homogeniseret. Det ene sæt af "halv-skiver" holdes adskilt dybde for dybde, mens det andet sæt puljes og homogeniseres for de øverste fem niveauer. Denne prøve udgør dermed den integrerede prøve. Fra hver prøve udtages der tre replikater hver bestående af ca. 3-5 g vådt sediment. Sedimentet bliver fordelt i tre på forhånd mærket 20 ml glasvials med tætsiddende låg (som er forvejede – se nedenfor), hvor materialet opbevares indtil frysetørring. Prøverne etiketteres ifølge journal med oplysning om:

- *Station (ifølge faste stationer og stationsoplysninger)*
- *Dato*
- *Kerne nummer*

- *Kernedybde*
- *Prøvetype*
- *Delprøve nummer*

Når samtlige prøver er taget, frysetørres to af replikatene fra hver dybdeinterval og integreret prøve, mens den tredje prøve gemmes mørkt og ved ca. 5°C til eventuel senere podning af kiselalger. Indtil materialet er blevet frysetørret, opbevares prøverne mørkt og køligt 5°C. Det har vist sig, at algematerialet kan holde sig forholdsvis længe under disse forhold, uden at der sker nævneværdig reduktion i indholdet af alger. Den samlede opbevaring af prøverne fra indsamlingstidspunkt og til prøverne er frysetørret må dog ikke overstige tre uger. Efter frysetørring opbevares prøver i fryser maks. -2°C, indtil pigmenterne måles på HPLC (se nedenfor).

5.2.3.2 Vejning

Når kernen er skåret, skal prøverne straks derefter vejes på Mettler Toledo at 261, akkrediteret vægt med fire decimaler, uden låg. Våd-vægten bestemmes af hver prøve ved vejning af vial + prøve. Vials er som udgangspunkt forvejede individuelt uden låg, medmindre at stikprøvevejning af den pågældende batch af vials kan godtgøre at variationer i vægt bidrager med en usikkerhed på sedimentvægten, der er mindre end 2%. Efter frysetørring vejes prøverne atter, og vandindholdet bestemmes. Sammenligninger af frysetørring og tørring i varmeskab ved 70 grader giver sammenfaldende tørstofbestemmelser.

5.2.3.3 Frysetørring

Prøverne **skal** være frosne, inden de bliver sat i frysetørren.

NB! Undgå at prøverne bliver udsat for lys og varme.

Sæt prøverne i en plastikbakke med plads til 50 prøver – der kan stå to bakker i frysetørren af gangen. Frys herefter prøverne i ca. to timer (indfrysning).

NB! Husk at tage lågene af inden frysetørring.

Det tager ca. tre døgn afhængig af materialetype og -mængde på program 20, før prøverne er helt tørre.

Efter tørring skal prøverne ned i temperatur (rumtemp.) og tørvægtbestemmes med fire decimaler (Mettler Toledo at 261 akkrediteret vægt).

NB ! Prøverne vejes uden låg.

Tørstofbestemmes efter Dansk Standard (DS 204).

Hvis prøverne umiddelbart herefter skal ekstraheres, sættes prøverne mørkt og ved stuetemperatur; ved længere tids opbevaring skal prøverne stå mørkt og koldt (-20°C).

5.2.3.4 Ekstraktion

Inden afvejning pulveriseres samtlige prøver med en metalspatel.

Afvej ca. 1,0 g tørret og knust prøvemateriale og overfør til en mærket 20 ml glasvial.

Overskudsmateriale gemmes og opbevares mørkt og ved -20°C.

Til ca. 1,0 g prøve tilsættes 10,0 ml iskold 100% acetone (HPLC grade), til 0,5 g prøve tilsættes 5,0 ml osv.

Prøverne rystes godt (minishaker) og stilles mørkt og koldt (køleskab) i 24 timer. Efter 4-5 timer ultralydsbades prøverne i 15 minutter i isvand på maks. styrke.

Efter 24 timer filtreres prøverne gennem et 0,5 µm filter (Cameo 25 GF, fra Frisenette) påsat en 20 ml engangssprøjte. 1,0 ml overføres ved hjælp af en pipette til en ny glasvial og blandes med 0,3 ml HPLC-vand. Ca. 0,7 ml af blandingen overføres til et mørkt analyseglas. Prøverne skal øjeblikkeligt sættes i prøverack (ca. 8°C). Prøverne skal stadig stå så mørkt som muligt, og det er meget vigtigt, at prøverne bliver analyseret umiddelbart herefter.

5.2.3.5 HPLC-analyse

Pigmentkoncentrationen bliver målt på en **Gilson** reverse-phase HPLC med en **UV/VIS** detektor (Gilson 119).

Der anvendes to mobile faser (A og B):

- Mobilfase A: 75% acetone og 25% milli-q vand (hplc-grade)
- Mobilfase B: 80% acetone og 20% methanol (hplc-grade)

Stationær fase:

- Kolonne fra mikrolab, Århus, pakket med Devolosil C8-5, 150 x 4,6 mm
- Injektionsvolumen: 100 µl
- Flow rate: 0,85 ml/min

Gradient:

| Tid min | Flow rate ml/min | Solvent A % | Solvent B % |
|------------|---------------------|----------------|----------------|
| 0 | 0,85 | 100 | 0 |
| 10 | 0,85 | 50 | 50 |
| 20 | 0,85 | 0 | 100 |
| 25 | 0,85 | 0 | 100 |
| 27 | 0,85 | 100 | 0 |
| 35 | 0,85 | 100 | 0 |

Målingerne bliver udført ved følgende bølgelængder:

- 449 nm for fucoxanthin
- 662 nm for chl a

5.2.3.6 Beregning af koncentration

Pigmentkoncentrationen bliver målt over for kendte standarder indkøbt hos DHI, Hørsholm. Arealet af pigmenterne bliver omregnet til pigmentkoncentration ud fra en 4-punkts kalibreringskurve.

Beregningsformel:

1) $\mu\text{g pigment/l}$:

Areal/faktor (fundet ud fra kalibreringskurven)

2) $\mu\text{g pigment/kg tørt sediment}$:

$\mu\text{g pigment/l} * \text{ekstraktionsvolumen (ml)} / \text{tørvægt (g)} * \text{fortyndingsfaktor (ml)}$

5.2.4 Kvalitetssikring

Kvalitetssikringen omfatter følgende procedurer:

- Inspektion af kerne i felten, hvor kun uforstyrrede kerner anvendes.
- Der gemmes et sæt replikate prøver, som kan måles senere som sikkerhed i tilfælde af tvivlsomme data. Alle rådata gemmes.
- HPLC-udstyret kalibreres løbende til certificerede pigmentstandarder. Der foretages krydscheck af stikprøver på forskelligt apparatur. Kalibreringsdata gemmes for det anvendte apparatur og rapporteres årligt sammen med målingerne det pågældende år.
- Der foretages hvert år podninger af integrerede prøver og resultaterne sammenholdes med de anvendte omregningsfaktorer mellem pigment og algekulstof.

5.2.5 Rapportering

For hver station beregnes profiler 0-16 cm af pigmenterne fucoxanthin og klorofyl a før og efter forårsopblomstringen som gennemsnit af 5 replikater. Den integrerede pigmentpulje før og efter rapporteres stationsvis og akkumulationen beregnes som differencen mellem værdierne i maj og værdierne i februar. Den samlede akkumulation beregnes samlet for alle stationer som mg/m^2 og omregnes til partikulært kulstof og partikulært kvælstof med følgende foreløbige omregningsfaktorer efter (Hansen & Josefson 2003):

- Organisk N = $8,7 * \text{Fucoxanthin/chlorophyll a (g/m}^2)$
- Organisk C = $50 * \text{Fucoxanthin/chlorophyll a (g/m}^2)$

Det må dog bemærkes, at disse faktorer kan ventes at blive modificeret i takt med, at datamængden forøges.

Tidsserier for det integrerede pigmentindhold før, efter og difference fremstilles i plot i den årlige rapportering. Udviklingstendenserne og de aktuelle årlige målinger diskuteres og relateres til den generelle udvikling i eutrofieringsniveauet.

5.2.6 Litteratur

Hansen, J.L.S. & Josefson, A.B. 2001: Pools of chlorophyll and live planktonic diatoms in aphotic marine sediments. – *Marine Biology* 139: 289-299.

Hansen, J.L.S. & Josefson, A.B. 2003: Accumulation of algal pigments and live planktonic diatoms in aphotic sediments during the spring bloom in the transition zone of the North and Baltic Seas. – *Marine Ecology Progress Series* 248: 41-54.

Itakura, S., Imai, I. & Itoh, K. 1997: "Seed bank" of coastal planktonic diatoms in bottom sediments of Hiroshima Bay, Seto Inland, Japan. – *Marine Biology* 128: 508.

Josefson, A.B. & Rasmussen, B. 2000: Nutrient retention by benthic macrofaunal biomass of Danish estuaries: Importance of nutrient load and residence time. – *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 50: 205-216.

Josefson, A.B. & Hansen J.L.S. 2003: Quantifying plant pigments and live diatoms in aphotic sediments of Scandinavian coastal waters confirms a major route in the benthic coupling. – *Marine Biology* 142: 649-658.

Lewis, J., Harris, A.S.D., Jones, K.J. & Edmonds, R.L. 1999: Long-term survival of marine planktonic diatoms and dinoflagellates in stored sediment samples. – *Journal of Plankton Research* 21: 343-354.