



Titel: Fluorescens			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M05	Version: 1	Oprettet: 27.01.2014
Forfattere: Stiig Markager og Henrik Fossing	Gyldig fra: 27.01.2014		
	Sider: 10		
	Sidst ændret:		
TA henvisninger	M01 - M03 - M07		

0 Indhold

1 Indledning	1
2 Metode	2
2.1 Tid, sted og periode.....	2
2.2 Udstyr	2
2.3 Procedure.....	2
2.4 Vedligehold af fluorometer	3
3 Databehandling	4
3.1 Beregninger.....	4
3.2 Data og koder.....	4
4 Kvalitetssikring	5
4.1 Kvalitetssikring af metode	5
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering	5
5 Referencer	6
6 Bilag	7
6.1 Kobling mellem fluorescenssignal og klorofyl <i>a</i> koncentration.....	7
6.2 Tjek af fluorometeret.....	9
7 Oversigt over versionsændringer	10

1 Indledning

Denne tekniske anvisning beskriver måling af fluorescens til brug for bestemmelse af algers fordeling i vandsøjlen og til identifikation af dybe klorofylmaksima, så der kan udtages prøver af disse.

Endvidere vises en beregningsmetode til at 'oversætte' et kontinuert fluorescenssignal til et kontinuert klorofyl *a* koncentrationsprofil baseret på samtidigt målte klorofyl *a* koncentrationer i diskrete dybder.

2 Metode

Ved fluorescensmålingen belyses vandet med blått lys (eksitationslys: 430 – 440 nm), som absorberes effektivt af algepigmenter, dog således at ca. 1 % af lyset fluorescerer ved en højere bølgelængde på omkring 685 nm (emissionslys: det røde område). Resultatet af en måling er en profil af pigmentrelateret fluorescens, som afspejler fordelingen af fytoplankton biomasse i vandsøjlen. En række andre stoffer fluorescerer også, når de belyses bl.a. humusstoffer, rhodamin og olie (Markager og Rasmussen, 2004). Endvidere er fluorescenssignalet påvirket af, hvor tæt klorofyl *a* er pakket i cellen, og dermed afhængigt af forhold som cellestørrelse, klorofylindhold pr. celle, art og næringstilstand. Den målte fluorescens kan derfor ikke direkte omsættes til en klorofylkoncentration i vandsøjlen, også selvom mange fabrikater i deres programmer angiver, at enheden ved udlæsning er fx $\mu\text{g Chl l}^{-1}$.

2.1 Tid, sted og periode

Fluorescensmålinger foretages i forbindelse med CTD-profiler. For nærmere beskrivelse af CTD-udstyr og måleprocedure henvises til *TA M01 Prøvetagning i felten* og *TA M03 CTD måling*.

Fluorescensmålinger skal udføres på alle stationer, hvor dybden er over 2 meter. Hvis dybden er under 2 meter, og forskellen mellem overflade og bund er mindre end 2 °C eller 1 PSU, kan man undlade fluorescensmålinger.

2.2 Udstyr

Der anvendes et fluorometer af anerkendt fabrikat monteret på CTD (dvs. CTD-fluorometer).

2.3 Procedure

Dataindsamling af fluorescens gennemføres samtidig med CTD-målingerne og følger derfor rutinerne beskrevet i *TA M03 CTD måling*.

2.4 Vedligehold af fluorometer

CTD-fluorometeret skal rengøres med demineraliseret vand efter hver profilmåling. Selv små rester af saltvand på sensorer kan påvirke det efterfølgende måleresultat, idet saltvand ved indtørring efterlader saltkrystaller.

I forbindelse med måling af klorofyl *a* koncentration i vandsøjlen (se *TA M07 Klorofyl a koncentration*) vurderes fluorescenssignalet pr. klorofyl (se Bilag 6.1) og en gang årligt gennemføres en funktionstest af fluorometeret efter producentens anvisninger.

3 Databehandling

3.1 Beregninger

Der skal ikke gennemføres beregninger forud for indberetningen af fluorescensværdier, idet det er de målte/rå fluorescensværdier, der skal indberettes med 4 decimaler. Der henvises dog til Bilag 6.1, som beskriver, hvordan fluorescenssignalet kan omsættes til en klorofylkoncentration baseret på punktmålinger af klorofyl *a* koncentrationen i vandsøjlen (se også TA M07 Klorofyl *a* koncentration).

3.2 Data og koder

Dataindberetningen for de målte/rå fluorescensværdier følger proceduren som beskrevet for salinitet og temperatur i teknisk anvisning M03 CTD måling.

Følgende nøgledata skal rapporteres sammen med fluorescensværdierne for at sikre, at disse data har en unik og entydig kobling til andre målinger foretaget samme sted og tid (fx klorofyl *a*):

Stationsoplysninger
Prøvetagningsdato og tidspunkt i UTC
Stationsnummer
Position
Dybde

Se også TA M01 Prøvetagning i felten.

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af metode

Fluorescenssignalet (F) kan ikke forventes at være konstant relativt til klorofylkoncentrationen ($[Chl]$) pga. de forhold, som er nævnt i indledningen. Der vil derfor være en variation i forholdet $\frac{F}{[Chl]}$ ($= F_{Chl}$), som ikke er udtryk for instrumentproblemer, men blot afspejler en naturlig variation i F_{Chl} . Derfor er det heller ikke muligt at lave en egentlig kalibrering af fluorometeret baseret på kendte klorofyl a koncentrationer for på den måde at kvalitets-sikre fluorescensmålingen. Metoden kvalitetssikres derfor først og fremmest ved at gennemføre en funktionstest af fluorometeret efter producentens anvisninger mindst en gang om året, eller hvis der opstår mistanke om fluorescenssignalets kvalitet (se også Bilag 6.2).

4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering

En udførlig beskrivelse af kvalitetssikringen vil blive udarbejdet i en separat datateknisk anvisning knyttet til denne tekniske anvisning.

5 Referencer

Markager, S. og Rasmussen, J.G. (2004). NOVANA Teknisk anvisning for marin overvågning. 1.2 Fluorescens, pp.4

6 Bilag

6.1 Kobling mellem fluorescenssignal og klorofyl *a* koncentration

I en given dybde (D) kan fluorescenssignalet (F_D , Fig. 1A) omregnes til en tilnærmet klorofylkoncentration ($[Chl]_D$) ved følgende udtryk (se også 4.1):

$$[Chl]_D = F_D \times F_{Chl}$$

idet beregningen skal foretages med det forbehold, at F_{Chl} ikke kan forventes af være konstant i alle dybder inden for samme profil.

F_{Chl} skal derfor beregnes for hver dybde (D_i), hvor der på samme tidspunkt er målt en klorofyl *a* koncentration (Fig. 1B), og udtrykkes ved en repræsentativ $\bar{F}_{Chl,i}$ -værdi (Fig. 1C)

$$\bar{F}_{Chl,i} = \frac{[Chl]_i}{\bar{F}_i}$$

hvor \bar{F}_i udtrykker middelfluorescensværdien omkring vanddybden ($D_i \pm d$). Intervallet ($\pm d$) på hver side af prøvetagningsdybden D_i skal afpasses efter vanddybde, bølgegang og fluorescensprofil. Størrelsen af intervallet d beror på erfaring med måling af fluorescens og klorofyl *a* og kan derfor ikke værdisættes; men ved stor dybde og/eller bølger, hvor den absolutte dybde for prøvetagning bliver usikker, skal intervallet være minimum 0,5 meter. Ved stille vejr/lav dybde, og især hvis der er en meget skarp fluorescensstop, skal intervallet være mindre (Tabel 1).

For hver dybde D , hvor der er foretaget en fluorescensmåling, beregnes $F_{Chl,D}$ herefter ved interpolation mellem D_i og D_{i+1} , hvor ($D_i \leq D \leq D_{i+1}$, Fig. 1C)

$$F_{Chl,D} = \frac{\bar{F}_{Chl,i+1} - \bar{F}_{Chl,i}}{D_{i+1} - D_i} \times (D - D_i) + \bar{F}_{Chl,i}$$

I dybden D kan den tilnærmede klorofyl *a* koncentration herefter udtrykkes ud fra den målte fluorescens F_D i den pågældende dybde (Fig. 1D)

$$[Chl]_D = F_D \times F_{Chl,D}$$

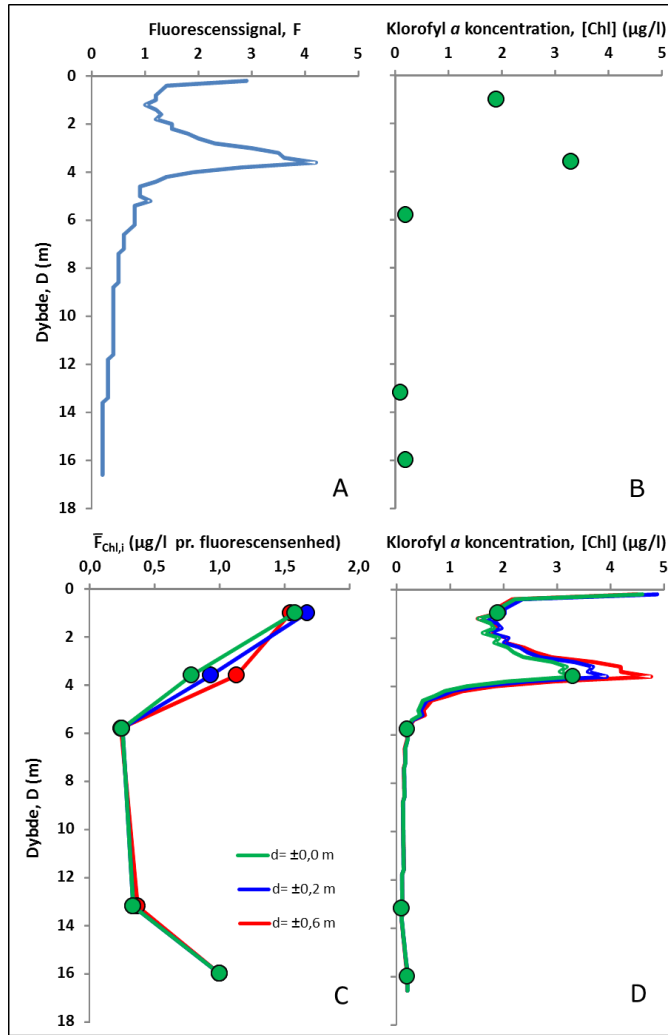


Fig. 1. Omregning af fluorescenssignal til klorofyl a koncentration. A: Fluorescenssignal. B: Målt klorofyl a koncentration. C: $\bar{F}_{ChI,i}$ bestemt i 5 dybder, for tre dybdeintervaller omkring dybden D , hhv. 0,0 m, 0,2 m og 0,6 m (se også Tabel 1). D: Klorofyl a koncentration beregnet ud fra fluorescenssignalet (A) og $\bar{F}_{ChI,i}$ (C) vist for de tre d -værdier. Ved koncentrationsberegninger for $D < D_1$ (her < 1 m) og $D > D_5$ (her > 16 m) bruges de konstante værdier for hhv. $\bar{F}_{ChI,1}$ og $\bar{F}_{ChI,5}$.

Tabel 1. Målt klorofyl a koncentration ($[ChI]$) og fluorescenssignal (F) samt beregning af midlet fluorescenssignal (\bar{F}) og \bar{F}_{ChI} (dvs. $\frac{[ChI]}{\bar{F}}$) i 5 dybder (D). Værdien i parentes angiver dybdeintervallet omkring D_i , hvor middelfluorescensen (\bar{F}) er beregnet.

Dybde, D	$[ChI]$	Fluorescenssignal					
		(F)	midlet (F)		\bar{F}_{ChI}		
(m)	($\mu\text{g/l}$)		($\pm 0,2$ m)	($\pm 0,6$ m)	(0,0 m)	($\pm 0,2$ m)	($\pm 0,6$ m)
D1 1,0	1,9000	1,2000	1,1333	1,2286	1,5833	1,6765	1,5465
D2 3,6	3,3000	4,2000	3,5333	2,9143	0,7857	0,9340	1,1324
D3 5,8	0,2000	0,8000	0,8000	0,8286	0,2500	0,2500	0,2414
D4 13,2	0,1000	0,3000	0,3000	0,2714	0,3333	0,3333	0,3684
D5 16,0	0,2000	0,2000	0,2000	0,2000	1,0000	1,0000	1,0000

6.2 Tjek af fluorometeret

Fluorometeret kan tjekkes ved at plotte klorofylkoncentrationen mod fluorescenssignalet. Dette plot bør vise en tilnærmelsesvis ret linje med en skæring tæt på nul. Fejkilder er typisk et stigende/højt intercept over tid (F-værdien når $[Chl]=0$). Dette kan tyde på belægning med alger i eller på instrumentets optik, og en rensning vil derfor være påkrævet. En anden fejl er lav/aftagende hældning, hvilket kan tyde på lav følsomhed, fx fordi lampen er slidt, optikken er ude af justering eller andre forhold, som giver lavt signal. Denne vurdering kan kun bruges som en rettesnor for fluorescensmålinger og kan derfor ikke erstatte den årlige funktionstest (se 2.4).

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring: