



Titel: Klorofyl a koncentration			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA. nr.: M07	Version: 2	Oprettet: 20.12.2013
Forfattere: Stiig Markager og Henrik Fossing	Gyldig fra: 21.01.2014		
	Sider: 10		
	Sidst ændret: 21.01.2014		
TA henvisninger	M01 – M05		

0 Indhold

1 Indledning	1
2 Metode	2
2.1 Tid, sted og periode.....	2
2.2 Udstyr og reagenser	2
2.3 Procedure.....	3
2.4 Særlige forholdsregler - faldgruber	5
3 Databehandling	6
3.1 Beregninger.....	6
3.2 Data og koder.....	6
4 Kvalitetssikring	7
4.1 Kvalitetssikring af analyse	7
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering	7
5 Referencer	8
6 Bilag	9
6.1 Relaterede TA'er	9
7 Oversigt over versionsændringer	10

1 Indledning

Denne tekniske anvisning beskriver, hvordan klorofyl *a* koncentrationen i fytoplankton måles i vandsøjlen ved (1) at filtrere vandprøven, (2) ekstrahere klorofyl *a* med ethanol fra de tilbageholdte alger og (3) bestemme ekstraktets absorbans ved en spektrofotometrisk måling.

Klorofyl *a* koncentrationen anvendes som

- mål for fytoplanktonbiomassen (en af de primære effekter af eutrofiering), der igen er et mål for den mængde føde, der er tilgængelig for zooplankton,
- kvalitetsparameter i direktiver
- korrelerende parameter til mængden af næringssalte, som tilføres systemet og derfor er velegnet til at følge systemets respons på næringsstofftilførsler over tid,
- skaleringsparameter ved fotosyntesemålinger, således at fotosynteseraten kan udtrykkes pr. klorofylenhed,
- skaleringsparameter ved målinger af fytoplanktons antal og artsammensætning
- vigtig parameter for modelværktøj ved både dynamisk og empirisk modellering.

2 Metode

Metoden til bestemmelse af klorofyl *a* (kort: klorofyl) i en vandprøve omfatter

1. filtrering af vandprøven
2. ekstraktion af klorofyl med ethanol fra de tilbageholdte alger
3. bestemmelse af ekstraktets absorbans ved en spektrofotometrisk måling

og følger i hovedtræk Dansk Standard DS 2201 afsnit 3 - 5 vedrørende reagenser, udstyr og fremgangsmåde (se nedenfor).

2.1 Tid, sted og periode

Prøverne udtages som beskrevet i Teknisk anvisning M01 Prøvetagning i feltet.

2.2 Udstyr og reagenser

Det anvendte udstyr til brug for filtrering, klorofylekstraktion og spektrofotometrisk omfatter

- vanddunke (op til 5 l) til transport af vandprøver
- køletaske m/fryseelementer til vanddunke (afhænger af behov for transport)
- glasfiberfiltre: Whatman GF/F eller Advantec GF75
- filteropsats: sugeflaske og tragt
- køletaske m/tøris til frysning af filterresten/algerne (afhænger af behov for opbevaring)
- centrifuge med gravitationsfelt på ca. 10.000 m s^{-2}
- centrifugeglas: plast eller glas forsynet med tætsluttende låg eller prop
- kalibreret dispenser/pipette til afmåling af ethanol. Eventuel graduering på centrifugeglasset må ikke bruges
- spektrofotometer til bestemmelse af absorption ved hhv. 665 nm (klorofylabsorbans) og 750 nm (baggrundskorrektion)
- glaskuvetter: 10 mm og 50 mm lysvej.

Reagenser

- 96% etanol
- forfiltreret 'vand fra lokaliteten' til evt. skylning efter filtrering.

2.3 Procedure

Bemærk at klorofyl nedbrydes hurtigt i lys og ved udtørring, specielt efter filtrering og ekstraktion. Undgå derfor direkte sollys ved prøvetagning, transport og filtrering. Vandprøverne skal filtreres i dæmpet lys (aldrig i sollys) og hurtigst muligt, dvs. senest 24 timer, efter prøvetagningen. Ekstraktionen af klorofyl skal udføres umiddelbart efter filtreringen. Udføres ekstraktionen ikke umiddelbart efter filtreringen, skal filtret med filterresten (algerne) straks fryses og opbevares (i mørke) ved minimum -18°C . Husk at filteret skal foldes med 'partikelsiden' indad, således at partikler (alger) ikke tabes i indpakningen. Ekstraktionen af det frosne klorofyl skal være påbegyndt senest 3 måneder efter filtreringen.

- Delprøven til klorofyl bestemmelsen udtages efter grundig omrystning af vandet, så det sikres, at fytoplankton/algerne er homogent fordelt i vandet. Man skal være opmærksom på, at omrystning også skal ske, hvis der tages delprøver til andre parametre (fx næringsstoffer), før der udtages delprøve til klorofyl. Derved sikres det, at vandprøven er repræsentativ ved den efterfølgende prøvetagning til andre parametre.
- Det vandvolumen, der skal filtreres, skal afpasses det forventede indhold af klorofyl, således at den forventede absorption ved klorofylmålingen ligger i intervallet 0,0400 – 0,8000 abs.enheder (se Tabel 1). Hint: Under danske forhold varierer koncentrationen af klorofyl i naturlige vandmasser fra ca. 0,2 $\mu\text{g/l}$ om vinteren til 25 $\mu\text{g/l}$ eller mere om sommeren, i sjældne tilfælde op til over 100 $\mu\text{g/l}$.

Tabel 1. På grå baggrund ses volumen (V_f i liter) af en filtreret vandprøve med klorofyl koncentrationen C_v ($\mu\text{g liter}^{-1}$), der resulterer i absorbans ($A(665\text{K})$) på hhv. 0,0400 og 0,8000 i 10 mm eller 50 mm kuvette efter ekstraktion i 10 ml ethanol.

C_v ($\mu\text{g liter}^{-1}$)	10 mm kuvette		50 mm kuvette	
	$A(665\text{K})$		$A(665\text{K})$	
	0,0400	0,8000	0,0400	0,8000
0,2	24	480	4,80	96
1,0	4,8	96	0,96	19
20,0	0,24	4,8	0,048	0,96
50,0	0,10	1,9	0,019	0,38
100,0	0,048	0,96	0,010	0,19

- Prøver skal filtreres hurtigst muligt og senest 24 timer efter prøvetagning. Hvis vandprøven ikke filtreres straks, skal den opbevares koldt og mørkt indtil filtrering.
- Filtrer så tilpas hurtigt at algerne ikke sætter sig på tragtens sider. Undertrykket må dog ikke overstige 0,3 bar for ikke at ødelægge cellerne eller suge dem gennem filteret. Filtreringstiden må ikke overstige ½ time.

- Skyl tragten med vand fra lokaliteten med den sidste portion afmålte vand, så eventuelle alger på tragtens sider vaskes ned på filteret. Efter behov kan forfiltreret 'vand fra lokaliteten' også bruges til skylning.
- Filteret fjernes fra støttepladen ved at folde det på midten med algerne indad.
- Filteret anbringes i et centrifugeglas, der tilsættes 10 ml ethanol, så filtret er dækket og glasset lukkes med tætsluttende låg.
- Klorofyl ekstraheres ved stuetemperatur og i mørke i 6 – 20 timer. Vend centrifugeglasset et par gange i løbet af ekstraktionen.
- Efter ekstraktionen kontrolleres, at der ikke er fordampet ethanol. Efterfyld om nødvendigt med mere ethanol.
- Før centrifugeringen rystes eller whirlmixes centrifugeglasset kraftigt, så klorofyl fordeles homogent.
- Centrifuger derefter i 10 min ved 10.000 m s^{-2}
- Overfør straks klorofylekstraktet til 10 mm eller 50 mm glaskuvette og mål absorbansen ved 665 nm (klorofyls absorptionsmaksimum, $A(665)$) og 750 nm (baggrundskorrektion, $A(750)$). $A(750)$ skal være $< 0,01$ abs.enheder såvel i en 1 cm som 5 cm kuvette (se også afsnit 4.1).
- Absorptionen aflæses med fire decimaler (0,XXXX), og det ekstraherede klorofyls absorbans udtrykkes ved $A(665K) = A(665) - A(750)$.

2.4 Særlige forholdsregler - faldgruber

- Det vandvolumen, der filtreres, skal afmåles nøjagtigt og ved så få del-afmålinger som muligt. Fx afmåles 4 liter bedst i én portion – alternativt afmåles 2 x 2 liter frem for 4 x 1 liter. Hvis man udfører flere del-afmålinger er det vigtigt, at dunken rystes grundigt før hver ny afmåling.
- Det bedst mulige og mest optimale for en korrekt bestemmelse af klorofylkoncentrationen er at filtrere, ekstrahere og måle klorofylekstraktets absorption umiddelbart efter at prøven er indsamlet. Under transport og opbevaring af vandprøven nedbrydes algerne, klorofyl opløses og koncentrationen falder. Et lignende henfald sker under opbevaring (frysning) af filtret med filterresten (algerne) med reduceret klorofylkoncentration til følge.
- Det er vigtigt, at filtreringen af vandet foretages med stor omhu. Hul-ler i filteret, eller en utæthed omkring kanten vil reducere klorofyl koncentrationen i vandprøven.
- 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 maksimale absorbans i det røde område (665 nm) som ved 750 nm, hvor absorbansen primært skyldes partikler i prøven. I forhold til absorbansmåling er det vigtigt, at absorbansen ved 750 nm ikke overstiger 0,0100, 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. For bølgelængdeindstillingen sker det nemmest ved, at man sikrer, at der måles ved den maksimale absorption omkring 665 nm.

3 Databehandling

3.1 Beregninger

Absorbansen beregnes efter følgende udtryk:

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

hvor $A(665)$ og $A(750)$ er de målte absorbanser (med 4 decimaler; 0,XXXX) ved de respektive bølgelængder, hhv. 665 nm og 750 nm.

Koncentrationen af klorofyl i vandprøven beregnes efter følgende udtryk:

$$C_v = \frac{10^4 \cdot V_e \cdot A(665K)}{83,4 \cdot V_f \cdot l}$$

hvor

C_v = vandprøvens klorofylkoncentration, $\mu\text{g liter}^{-1}$

V_e = volumen af ethanolekstraktet, ml

l = længden af kuvetten, mm

V_f = filtreret vandvolumen, liter

83,4 = absorptionskoefficient i 96% ethanol, liter $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Resultatet angives som $\mu\text{g liter}^{-1}$ og opgives med tre betydende cifre.

3.2 Data og koder

Følgende nøgledata skal rapporteres sammen med klorofylkoncentrationen:

Stationsoplysninger

Prøvetagningsdato og tidspunkt i UTC

Stationsnummer

Position

Dybde

Se også TA M01 prøvetagning i felten.

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af analyse

Det skal sikres, at laboratoriet der udfører analysen, sammen med resultaterne fremsender dokumentation for kvaliteten af analysen, så klienten kan kvalitetssikre analyseresultaterne på et objektivi grundlag.

Dette indebærer, at analyseresultaterne skal ledsages af dokumentation vedr.

- Måleområde
- Linearitet
- Følsomhed
- Detektionsgrænse
- Eventuelt resultat af dobbeltbestemmelser
- Interne kvalitetskontrolresultater

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

Laboratoriet skal endvidere deltage i nationale og internationale præstationsprøvninger for klorofylmålinger og præsenterer resultaterne for klienten.

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

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

6 Bilag

6.1 Relaterede TA'er

TA M09 Fytoplankton og TA M08 Primærproduktion

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2	21.01.2014	2.3 Procedure	<p>Vandprøverne skal filtreres ... senest 8 timer, efter prøvetagningen. Ekstraktionen af klorofyl skal være påbegyndt senest 24 timer efter filtreringen. ... Ekstraktionen af det frosne klorofyl skal være påbegyndt senest 24 timer efter filtreringen.</p> <p>ÆNDRET TIL: Vandprøverne skal filtreres ... senest 24 timer, efter prøvetagningen. Ekstraktionen af klorofyl skal udføres umiddelbart efter filtreringen. ... Husk at filteret skal foldes med 'partikelsiden' indad, således at partikler (alger) ikke tabes i indpakningen. Ekstraktionen af det frosne klorofyl skal være påbegyndt senest 3 måneder efter filtreringen.</p>
2	21.01.2014	2.3 Procedure	<p>Prøver skal filtreres hurtigst muligt og senest 8 timer efter prøvetagning.</p> <p>ÆNDRET TIL: Prøver skal filtreres hurtigst muligt og senest 24 timer efter prøvetagning.</p>