



Titel: Primærproduktion			
Dokumenttype: Teknisk anvisning	TA nr.: M08	Version: 2	Oprettet: 29.04.2015
Forfattere: Stiig Markager og Henrik Fossing	Gyldig fra: 27.05.2015		
	Sider: 18		
	Sidst ændret: 27.05.2015		
TA henvisninger	M01 – M05 – M06 – M07		

Indhold

1 Indledning	1
2 Metode	2
2.1 Tid, sted og periode.....	2
2.2 Udstyr	3
2.3 Procedure.....	3
2.3.1 Prøvetagning, opbevaring og transport.....	3
2.3.2 Inkubation og måling af primærproduktion	6
2.3.3 Tilpasning af lysstyrken i inkubator	7
2.3.4 Koncentration af uorganisk kulstof.....	8
2.4 Vedligehold af instrumenter	9
2.5 Særlige forholdsregler - faldgruber	9
3 Databehandling	11
3.1 Beregning af primærproduktionen	11
3.1.1 Beregningen af primærproduktionen, fotosynteseraten eller kulstofoptaget i hver flaske	11
3.1.2 Beregningen af fotosynteserater ud fra PI-kurven.....	12
3.1.3 Beregningen af den dags- og dybdeintegrerede produktion	13
3.2 Data og koder.....	14
4 Kvalitetssikring	15
4.1 Kvalitetssikring af PI-kurven	15
4.2 Kvalitetssikring af data og dataaflevering	15
5 Referencer	16
6 Bilag	17
6.1 Beregning af $H^{14}CO_3^-$ forbrug ved inkubation.....	17
7 Oversigt over versionsændringer	18

1 Indledning

Denne tekniske anvisning beskriver, hvordan primærproduktionen (også benævnt fotosynteseraten eller kulstofoptaget) måles i vandsøjlen ved at måle indbygningen af radioaktivt mærket uorganisk kulstof (C-14) i cellerne.

Primærproduktionen måles for at bestemme:

- hvor meget organisk stof, der dannes pr. areal- og tidsenhed (fx mg C m⁻² døgn⁻¹)
- hvor meget ilt, der potentielt kan produceres og forbruges i bundvandet
- i hvilken grad primærproduktionen er næringssaltbegrænset, idet klorofylspecifikke fotosynteserater er tæt koblet til næringsstatus for fytoplanktonpopulationen.

2 Metode

Primærproduktionen (P), dvs. det samlede optag af uorganisk kulstof gennem fotosyntesen, bestemmes ved tilsætning af radioaktivt mærket uorganisk kulstof (fx $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$) til en vandprøve og derefter måling af, hvor stor en del af det tilsatte ^{14}C , der er optaget over tid (t). Med kendskab til den totale mængde uorganiske kulstof i vandsøjlen ($[\Sigma\text{CO}_2] = [\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{CO}_2]$) kan primærproduktionen udtrykkes ved

$$P = \frac{{}^{14}\text{C}_{\text{optag}}}{{}^{14}\text{C}_{\text{tilsat}}} \cdot 1,05 \cdot \frac{1}{t} \cdot [\Sigma\text{CO}_2] \text{ mg C liter}^{-1} \text{ time}^{-1} \quad (\text{Lign. 1})$$

Primærproduktionen afhænger især af lysintensiteten og klorofylkoncentrationen, som *in situ* varierer både i løbet af døgnet og med dybden. Beregning af arealproduktionen ($\text{mg C m}^{-2} \text{ døgn}^{-1}$) forudsætter derfor, at fotosynteseraten pr. volumen kan opsummeres over både tid og dybde. Dette kan gøres med kendskab til overfladelyset og lyssvækkelsen i vandsøjlen (se TA M06 Lyssvækkelse) ud fra en PI-kurve (eng. photosynthesis-irradiance curve; da. fotosyntese-lysintensitetskurve), der ved den pågældende prøvetagning fastlægger sammenhængen mellem lys og fotosynteserate, som derefter sammenholdes med klorofylkoncentrationen ned gennem vandsøjlen.

Den beregnede fotosynteserate er omtrentlig, idet det ikke er muligt at genskabe vandsøjlets fysiske-kemiske egenskaber i prøvetagningsflaskerne, hvor ^{14}C -optagelsen måles, ligesom det heller ikke er muligt at tage højde for ændringer i algerne fotosyntesekapacitet over døgnet.

2.1 Tid, sted og periode

Prøvetagningen til primærproduktion kan udføres i tidsrummet fra 1 time efter solopgang til 1 time før solnedgang, dvs. når solen står mere end 5° over horisonten (se TA M06 Lyssvækkelse).

2.2 Udstyr

Det anvendte udstyr til brug for opbevaring, transport og inkubation af vandprøver skal være giftfrie og syreskyllet og omfatter:

- prøvebeholdere af passende størrelse til blanding af vandprøver indsamlet i diskrete dybder
- vanddunke (5 liter) til opbevaring og transport af vandprøver
- køletaske med fryseelementer til vanddunke (transport)
- 1 liter flaske til batchprøve (blanding af vandprøve og 14C)
- dispenser (100 ml) til påfyldning af inkubationsflasker
- magnetomrører med magnet
- inkubationsflasker (celledyrkningsflasker; eng.: tissue culture bottles eller lign. med flade sider) volumen: 50-100 ml
- inkubator til lineær montage af inkubationsflasker
- metal skyggenet
- lyskilde: Osram Powerstar HQI-E 400w/D Pro Daylight med metalnet eller sort tylstof til lysdæmpning
- lysmåler
- stanniol eller lignende til mørklægning af flasker
- filtreringsudstyr
- 25 mm Whatman GF/F filter eller tilsvarende
- scintillationsvials

Reagenser

- $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ (radioaktivt bikarbonat)
- 0,1 N HCl
- scintillationsvæske

2.3 Procedure

Undgå så vidt muligt direkte sollys ved prøvetagningen og opbevar altid prøverne mørkt under opbevaring og transport.

2.3.1 Prøvetagning, opbevaring og transport

Prøvetagningen foretages med vandhenter, som det er beskrevet i *TA M01 Prøvetagning i feltet* samtidig med måling af fluorescens (se *TA M05 Fluorescens*), lyssvækkelse (se *TA M06 Lyssvækkelse*) og indsamling af prøver til klorofyl *a* bestemmelse (se *TA M07 Klorofyl a koncentration*).

Prøvetagningen foretages efter én af to metoder afhængig af lokaliteten.

Metode 1 anvendes på stationer, hvor vandsøjlen normalt er lagdelt, og dybden typisk er over 12 meter, fx stationer i Kattegat og Bælthavet samt enkelte fjorde. På disse stationer er der størstedelen af året en tydelig forskel i densitet mellem overflade og bund. Ofte er der et tydeligt springlag, hvor densiteten ændres mere end 1 kg m^{-3} pr m og et tilhørende klorofyl *a* maksimum. Dog kan stigningen i densitet med dybden i nogle tilfælde ske gradvist over en større del af vandsøjlen. Fuld opblanding af vandsøjlen sker kun undtagelsesvis i forbindelse stormhændelser.

Metode 2 anvendes på stationer, der er karakteriseret ved, at vanddybden er mindre end 12 meter, og vandsøjlen oftest er fuldt opblandet. Kortere perioder (dage til uger) med stratificering kan forekomme, især i sensommeren.

Prøvetagning – Metode 1:

Der udtages vandprøver fra to dybder til fremstilling af PI-kurver:

- Første prøve tages altid i 1 meters dybde.
- Anden prøve tages i én af følgende dybder (i prioriteret rækkefølge):
 1. den dybde, hvor der er et fluorescensmaksimum (se *TA M05 Fluorescens*) som ligger i eller under pyknoklinen (springlaget, dvs. hvor vægtyfyllen stiger mere en 1 kg m^{-3} over 1 m vandsøjle, hvilket svarer til en stigning i saltholdigheden på ca. 1 ‰), også selvom dette maksimum ligger dybere end dybden med 2 % lys
 2. hvis der er en tydelig pyknoklin, tages prøven 1-2 meter under denne
 3. hvis der ikke er en tydelig pyknoklin, tages prøven i dybden med 5-10 % lys (af overfladeindstrålingen). I dette interval tages prøven, hvor fluorescensen er højest
 4. er vandsøjlen anoxisk umiddelbart under pyknoklinen, tages kun den ene vandprøve i 1 meters dybde.

Den dybe prøve (dvs. den anden prøve, jf. ovenfor) kan udelades, hvis

- fluorescensprofilen indikerer, at der ikke er fytoplankton (se *TA M05 Fluorescens*)
- der er overlap (inden for ± 1 meter) mellem de to vandprøvet til fremstilling af PI-kurve.

HUSK at tage vandprøver til klorofyl *a* fra de to vandprøver, der bruges til fremstilling af PI-kurver. Prøverne tages som en delprøve fra den samme dunk, der bruges til PI-kurver (husk at blande vandet i dunken godt).

Desuden skal der tages prøver til klorofyl *a* i dybderne 5, 10, 15 og 20 meter (se også *TA M01 Prøvetagning i felten*).

Prøvetagning – Metode 2:

Der udtages vandprøver fra en eller to dybder til fremstilling af PI-kurver:

- Første prøve tages altid i 1 meters dybde.
- Anden prøve udtages, hvis der er enten
 1. en lagdeling af vandsøjlen, og vandsøjlen under pyknoklinen er >50 cm samtidig med, at fluorescensprofilen indikerer, at der er alger under pyknoklinen. I dette tilfælde tages prøven under pyknoklinen i den dybde, hvor fluorescensen er højest

eller

2. en tydelig højere fluorescens i vandsøjlets nederste halvdel i forhold til overfladen. I dette tilfælde tages prøven i den nederste halvdel af vandsøjlen, hvor fluorescensen er højest.

HUSK at tage vandprøver til klorofyl *a* fra de to (eller den ene) vandprøve(r), der bruges til fremstilling af PI-kurver (jf. ovenfor). Prøverne tages som en delprøve fra de(n) samme dunk(e), der bruges til PI-kurver (husk at blande vandet i dunken(e) godt).

Desuden skal der tages prøver til klorofyl *a* i dybderne svarende til 25, 10 og 2 % lys. En eller flere dybder kan dog udelades hvis

- fluorescensprofiler indikerer, at der ikke er fytoplankton
- der er overlap (inden for ± 1 meter) med prøven/prøverne til fremstilling af PI-kurver. I tilfælde af en høj lyssvækkelse kan 1 m overlappes med 25 % lys, ligesom prøver fra 2 og 10 % lys kan overlappes. I disse tilfælde reduceres antallet af klorofylprøver til 3 eller 2 dybder.

Fælles for metode 1 og 2 gælder:

- Hver vanddunk til opbevaring og transport af vandprøve skylles 3 gange med vandprøven før vanddunken fyldes med 5 liter vandprøve, lukkes og anbringes ved *in situ* temperatur (før transport).
- I tilfælde af at filtreringen af klorofyl *a* ikke foretages i forbindelse med primærproduktionsinkubation i laboratoriet, men fx ombord på et skib i forbindelse med prøvetagningen, fyldes dunken først helt, hvorefter der udtages et volumen, som filtreres på skibet (husk at vende dunken). Derefter transporteres dunken med resten af indholdet til videre behandling i laboratoriet.
- Vandprøven transporteres til laboratorium i køletaske ved en temperatur så tæt på *in situ* temperatur som muligt. Husk at om sommeren er vandtemperaturen ofte den samme eller højere end lufttemperaturen, og der skal derfor ikke anvendes køleelementer.

- Temperaturen af prøven skal noteres ved ankomsten til laboratoriet, og der skal gives en tilbagemelding til prøvetagerne således, at proceduren for at holde *in situ* temperatur løbende justeres igennem sæsonen.

HUSK at

- notere *in situ* temperaturen for vandprøven
- delprøver til klorofyl *a* og fremstilling af PI-kurve skal udtages fra én og samme vandprøve.

2.3.2 Inkubation og måling af primærproduktion

Inkubationen skal påbegyndes hurtigst muligt og senest 8 timer efter prøvetagningen.

Ved *in situ* temperatur fremstilles af hver vandprøve en batchprøve, som mærkes med ^{14}C og derefter fordeles på 12 inkubationsflasker.

- Inkubatoren og lyset tændes mindst 1 time før inkubationen startes for at stabilisere lys og temperatur.
- Vanddunken med vandprøven vendes (ikke rystes) mindst 10 gange inden vandprøven udtages til forsøget.
- Batchflasken skylles 3 gange med vandprøven og de 12 inkubationsflasker 1 gang.
- Batchflasken og én inkubationsflaske ("mørkeflasken") pakkes ind i stanniol eller tilsvarende, så vandprøven ikke får lys.
- Et kendt volumen af vandprøven (>12 gange inkubationsvolumen) tilsættes batchflasken.
- Batchprøven holdes homogen ved langsom omrøring på magnetomrører.
- Radioaktivt mærket bikarbonat ($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$) tilsættes batchprøven (se 6.1 *Beregning af $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ forbrug til inkubation*). Notér tidspunktet!
- Dispenser monteres på batchflasken.
- 2 minutter efter tilsætningen af ^{14}C til batchflasken overføres et præcist volumen (skal tjekkes ved udvejning) af den radioaktivt mærkede vandprøve til de 12 inkubationsflasker ved brug af dispenserens. Flasken skal fyldes netop så meget, at der er ca. 1 ml luft i flasken, når låget er påsat. BEMÆRK, at dispenserens skal håndteres med forsigtighed, så cellerne i vandprøven ikke udsættes for store trykforskelle. Alternativt kan ^{14}C tilsættes direkte til inkubationsflaskerne i stedet for til batchflasken.
- HUSK
 - hvis inkubatoren er mere en nogle meter fra arbejdspladsen for filtrering, skal transport af flasker til og fra inkubatoren foregå mørkt (dvs. med flaskerne tildækkede)
 - "mørkeflasken" skal være helt dækket med stanniol (også låget)
- Inkubationsflaskerne anbringes straks i inkubatoren som beskrevet i 2.3.3 *Tilpasning af lysstyrken i inkubator*.
- Tidspunktet noteres og vandprøverne inkuberer i 2 timer roterende om sin egen længdeakse. Inkubationen skal foregå ved *in situ* temperatur ± 1 °C. Hvis det medfører betydeligt mere arbejde, fordi man har prøver

fra flere stationer på samme dag, kan en afvigelse på ± 3 °C fra *in situ* accepteres.

- Efter 2 timer slukkes lyset eller rækken med inkubationsflasker tages op af inkubatoren. Tidspunktet noteres!
- Inkubationsflaskerne anbringes i mørke indtil filtreringen, som straks skal påbegyndes.
- Under så svagt lys som muligt filtreres indholdet i inkubationsflaskerne igennem hvert sit 25 mm Whatman GF/F filter eller tilsvarende ved maks. 0,3 atm undertryk. Filtreringen skal gennemføres inden for 5 minutter pr. flaske. Hvis det ikke er muligt, udtages et delvolumen af hele inkubationsflasken (husk at indberette det filtrerede volumen). Dette sker kun ved ekstremt høje klorofyl-/partikelkoncentrationer. Når hele flaskens volumen er filtreret, skylles flasken 2 gange med ca. 5 ml vand fra lokaliteten, som også hældes igennem filteret. "Mørkeflasken" filtreres til sidst. BEMÆRK at alle 12 flasker skal være filtreret i løbet af 20 minutter. Inkuberes vandprøver til flere PI-kurver samtidig, skal start- og sluttidspunktet for lysinkubationen afpasses således, at tiden med lyspåvirkning ligger inden for 110 til 140 minutter. Inkuberes flere end 12 prøver samtidig (fx 24 eller 36), skal alle vandprøverne være filtreret senest 60 min efter, at inkubationen er afsluttet.
- Filtret fra hver inkubationsflaske overføres til hver sin scintillationsvial, dvs. én vial til hver inkubationsflaske, og der tilsættes 300 µl 0,1 N HCl på filtret, idet det sikres, at filtret er gennemvædet med HCl.
- Scintillationsvial'ene skal henstå i mindst 1 døgn uden låg, hvorved ikke-omsat ^{14}C afgasser som $^{14}\text{CO}_2$.
- Vial'ene tilsættes scintillationsvæske, lukkes med skruelåg og anbringes i scintillationstæller. Tællingen må først startes, når kemoluminiscensen er ophørt, og tællingen skal om nødvendigt quench-korrigeres.

2.3.3 Tilpasning af lysstyrken i inkubator

Sammenhængen mellem lysintensitet og fotosynteserate fastlægges ved en PI-kurve ud fra målingerne af fotosynteseraterne i de 11 ^{14}C -mærkede vandprøver samt kontrolmålingen i "mørkeflasken".

Inkubationsflaskerne anbringes i række (stables) med metal skyggenet placeret mellem flaskerne på en sådan måde, at lyset dæmpes ved passagen gennem flaskerne og skyggenettene (*fig. 1*) (Markager et al. 1999).

Lysintensiteten i hver af de 11 flasker skal bestemmes nøjagtigt ved brug af lysmåler, og relativet til den anvendte indstråling skal lysintensiteten i flaskerne være ca. 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3½ %, 2 %, 1 %, ½ % og 0 %, hvor den sidste flaske er "mørkeflasken".

Lysintensiteten ved den første flaske (lys = 100 %) skal afpasses efter den lysintensitet prøven kommer fra. Det optimale er at vurdere PI-kurven fra den foregående prøvetagning.

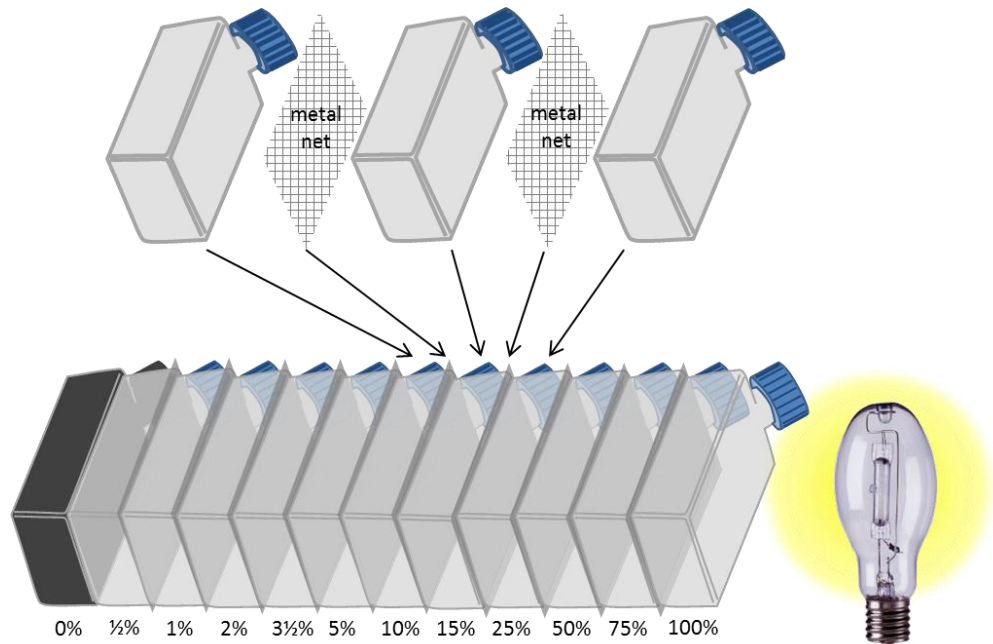


Fig. 1. Lineær opstilling af inkubationsflasker til fremstilling af PI-kurve. Lysindstrålingen dæmpes dels ved passage gennem vandprøverne, men især ved, at de indsatte metalnet spreder lyset i kombination med, at inkubationskassen har sorte sider. Inkubationsflasken længst væk fra lyskilden er indpakket i stanniol og er derfor ikke lyspåvirket ("mørkeflaske").

Retningslinjer for 100 % lys er: Blandingsprøven og vandprøven fra 1 m's dybde skal inkuberes med en lysintensitet, der ved inkubationsflasken nærmest lyskilden er $550-600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i sommerhalvåret (dvs. fra april til oktober) og $300-350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i vinterhalvåret (dvs. fra november til marts). Den "dybe prøve" inkuberes året rundt ved en lysintensitet på ca. $300-350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hele året (se også 2.6 *Særlige forholdsregler – faldgruber*).

Lyset justeres ved at placere et eller flere net mellem lampen og inkubatoren. Nettet kan være metalnet, sort tylstof eller lignende udspændt på en ramme. Det er vigtigt, at nettet ikke ændrer lysets spektrale sammensætning. Tre til fire kombinationer af net vil normalt være tilstrækkeligt til at dække alle typer prøver.

2.3.4 Koncentration af uorganisk kulstof

Koncentrationen af uorganisk kulstof i vandprøven, dvs. $[\Sigma\text{CO}_2] = [\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{CO}_2]$ bestemmes enten efter gældende Dansk Standard vedr. bestemmelse af alkalinitet eller ved Gran titrering (Mackereth et al. 1978).

2.4 Vedligehold af instrumenter

Der er intet særligt vedligehold af de instrumenter, der knytter sig til fotosynteseratemålinger ud over almindelig servicering af inkubator og scintillationstæller.

2.5 Særlige forholdsregler - faldgruber

Bestemmelse af primærproduktionen er et ratemål, hvilket betyder, at målingen er følsom over for alle forhold, som påvirker fytoplanktonets fysiologiske tilstand. Det kan fx være toksiske stoffer, indsamling og transport af for små vandmængder, for lang opbevaring, temperatursvingninger, stærkt lys og lign.

Derfor er derfor vigtigt, at

- udstyr til brug for opbevaring, transport og inkubation af vandprøver skal være giftfrie og syreskyllede (gamle dunke er ofte bedst)
- mindst 5 l vandprøve skal indsamles til hver inkubationsserie
- vandprøverne opbevares, transporteres og inkuberes ved *in situ* temperatur
- vandprøverne inkuberes hurtigst muligt og senest 8 timer efter indsamlingen
- vandprøverne må ikke udsættes for lys før og efter inkubationen.

En korrekt fremstillede PI-kurve er afgørende for at kunne beregne *in situ* fotosynteseraten som funktion af lysindstrålingen og klorofylkoncentrationen (se 3.1.1 *Beregning af primærproduktionen*).

Lysintensiteten i inkubatoren skal derfor justeres således, at PI-kurven både viser en stigende fotosynteserate med stigende lysintensitet og en tydelig lysmætning ved de højeste lysintensiteter, dvs. i inkubationsflaskerne nærmest lyskilden, uden at fotoinhibering indtræder (se fig. 2).

Det kan være vanskeligt at bestemme den maksimale fotosynteserate, hvis PI-kurven er fremstillet ved for lav eller høj lysintensitet og i værste fald målingen derfor kasseres.

Inkubationen skal udføres ved *in situ* temperatur ± 1 °C. Det er derfor vigtigt, at lampen ikke afgiver varme til inkubationsflaskerne, så temperaturen stiger. Træk omkring inkubatoren kan medføre temperatursvingninger og skal derfor undgås.

Som det er beskrevet i 4 *Kvalitetssikring* må parameteren for %-mørkeoptag må ikke overstige 5 % i mere end 5 % af målingerne, dvs. at for 95 % af prøverne skal mørkeoptaget være mindre end 5 % af P_m . Hvis mørkeoptaget er højere, kan det tyde på enten

- en utilstrækkelig afsyring af filtrene og dermed fjernelse af $^{14}\text{CO}_2$
- prøverne har været opbevaret for længe inden inkubationen startede
- filtrene har fået for meget lys under filtreringen.

Det skal dog bemærkes, at et forhøjet mørkeoptag kan forekomme om vinteren, hvor samfundet er domineret af heterotrofe organismer.

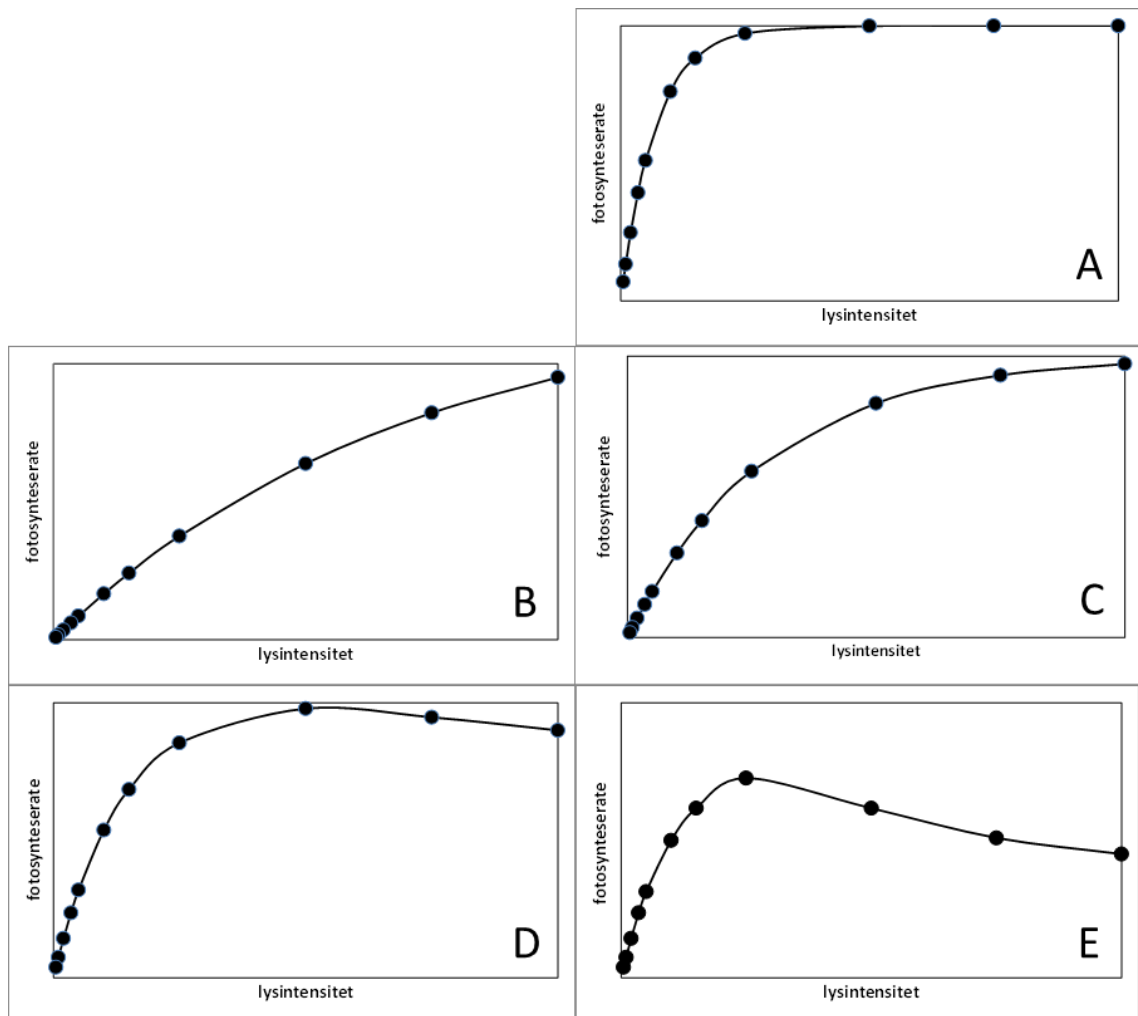


Fig. 2. Eksempler på PI-kurver. A: Ideel PI-kurve med lysmætning uden fotoinhibering. B og C: Lysmætning nås ikke. Kurve B er opnået ved alt for lidt lys, og den maksimale fotosynteserate (P_m) kan derfor ikke bestemmes, hvorfor kurven kasseres. Kurve C har fået lidt for lidt lys, så lysmætning ikke er opnået. Kurven kan dog anvendes. D og E: Fotoinhibering. Kurve D har fået lidt for meget lys, men kan dog anvendes. Kurve E har derimod fået så meget lys, at kurven ikke kan anvendes.

3 Databehandling

3.1 Beregning af primærproduktionen

Fotosynteseraten beregnes ud fra forholdet mellem optaget og tilsat radioaktivt ^{14}C (se *Lign. 1*). Radioaktiviteten bestemmes i en scintillationstæller, der tæller antallet af radioaktive henfald pr. min (DPM; eng. disintegrations per minute). Den mest nøjagtige bestemmelse af fotosynteseraten fås derfor, når ^{14}C -indhold på filterpapiret er signifikant højere end baggrundsværdien. Nøjagtigheden kan også øges ved at forlænge tælltiden; men mere end 20 min tælling pr. prøve synes ikke praktisk.

Beregningerne består af tre dele:

1. beregning af primærproduktionen (fotosynteseraten eller kulstofoptaget) i hver flaske
2. beregning af fotosynteserater ud fra PI-kurven
3. beregning af den dags- og dybdeintegrerede produktion.

3.1.1 Beregningen af primærproduktionen, fotosynteseraten eller kulstofoptaget i hver flaske

Primærproduktionen (P) i den lysinkuberede vandprøve beregnes:

$$P = \frac{DPM_{tælling} - DPM_{mørke}}{DPM_{tilsat}} \cdot 1,05 \cdot \frac{1}{t_{lys}} \cdot [\Sigma\text{CO}_2] \text{ mg C liter}^{-1} \text{ time}^{-1} \quad (\text{Lign. 2})$$

hvor DPM er det registrerede antal henfald (min^{-1}) på filterpapiret i den lysinkuberede prøve ($DPM_{tælling}$) og i "mørkeflasken" ($DPM_{mørke}$) samt den tilsatte radioaktivitet (DPM_{tilsat}) til inkubationsflasken, $1,05$ er en korrektionsfaktor (idet ^{14}C optages 5 % langsommere end ^{12}C), t_{lys} er tiden i timer, som vandprøven har været belyst i inkubatoren, og $[\Sigma\text{CO}_2]$ er den total uorganiske kulstofkoncentration.

Det samlede kulstofoptag i den mørkeinkuberede vandprøve, i løbet af tiden t_{Total} fra ^{14}C -tilsætningen til prøven filtreres og afsyres, beregnes:

$$P_{mørke} = \frac{DPM_{mørke}}{DPM_{tilsat}} \cdot 1,05 \cdot \frac{1}{t_{Total}} \cdot [\Sigma\text{CO}_2] \text{ mg C liter}^{-1} \text{ time}^{-1} \quad (\text{Lign. 3})$$

Beregningen af kulstofoptaget i den mørkeinkuberede vandprøve bruges til at kvalitetssikre inkubationen, som det er beskrevet i afsnit 4 *Kvalitetssikring*.

3.1.2 Beregningen af fotosynteserater ud fra PI-kurven

Den ideelle PI-kurve udtrykkes ved:

$$P(I) = P'_m \left(1 - \exp\left(\frac{-\alpha I}{P'_m}\right) \right) + c \quad (\text{Lign. 4})$$

hvor $P(I)$ er fotosynteseraten ($\text{mg C liter}^{-1} \text{ time}^{-1}$; se *Lign. 2*) ved lysintensiteten I ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), P'_m er den maksimale fotosynteserate for PI-kurven, α er lysudnyttelseeffektiviteten ($\frac{\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1}}{\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{ s}^{-1}}$) og c er en konstant, der parallelforskyder kurven på y-aksen, så den ikke tvinges gennem 0,0. Den maksimale fotosynteserate (P_m) beregnes derfor som $P'_m - c$.

Parametrene P'_m , α og c kan beregnes ud fra en ikke-lineær kurvetilpasning af det fotosyntetiske optag i lysflaskerne mod lysintensiteten (se *fig. 3*).

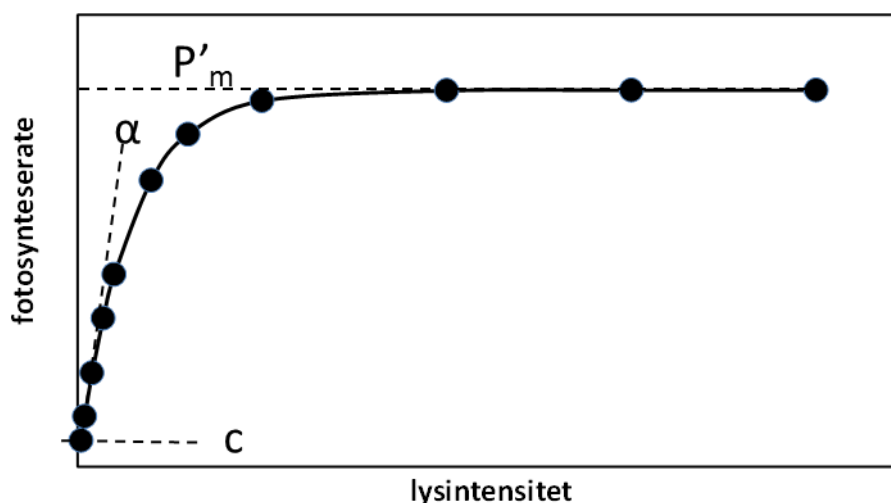


Fig. 3. Fremstilling af PI-kurve ud fra målte data og ikke-lineær kurvetilpasning. Bemærk at P'_m aflæses som den maksimale fotosynteserate, α som hældningen til den første del af kurven ved lav lysintensitet og c som kurvens skæring med y-aksen.

Ud over lysintensiteten er det klorofylindholdet i vandprøven, der er bestemmende for P_m og α og dermed bestemmer fotosynteseraten ved lysintensiteten I . Derfor er det nødvendigt at skalere fotosynteseparametrene P_m og α (der er beregnet ved den samme klorofylkoncentration i alle inkubationsflaskerne), så de udtrykkes ved *in situ* klorofylindholdet i de vanddybder, hvor fotosynteseraten skal beregnes.

Skaleringen foretages ved flg. beregning:

$$P_{m,i} = Chl_i \frac{P_{m,inkub}}{Chl_{inkub}} \quad (\text{Lign. 5a})$$

$$a_i = Chl_i \frac{a_{inkub}}{Chl_{inkub}} \quad (\text{Lign. 5b})$$

$$c_i = Chl_i \frac{c_{inkub}}{c_{inkub}} \quad (\text{Lign. 5c})$$

hvor $P_{m,i}$, a_i og c_i er parametrene i dybden i med klorofylkoncentrationen Chl_i , og $P_{m,inkub}$, a_{inkub} samt c_{inkub} er konstanterne bestemt ud fra PI-kurven (fig. 3) samt klorofylkoncentrationen (Chl_{inkub}) i inkubationsflaskerne.

Klorofylkoncentrationen bestemmes som beskrevet i *TA M07 Klorofyl a koncentration*.

Herefter beregnes fotosynteseraten ($P_i(I_i)$) i hver dybde (i) med lysintensiteten I_i , hvor klorofylkoncentrationen (Chl_i) er målt, ud fra de klorofylspecifikke rater iflg. *Lign 5*:

$$P_i(I_i) = P_{m,i} \left(1 - \exp\left(\frac{-\alpha_i I_i}{P_{m,i}}\right) \right) \quad (\text{Lign. 6})$$

3.1.3 Beregningen af den dags- og dybdeintegrerede produktion

Temperaturkorrektionen og integration over tid og dybde følger gældende Dansk Standard vedr. planktonalgers kulstofassimilation i inkubator med ^{14}C -metoden.

På lokaliteter, hvor der er taget 2 vandprøver, hhv. en blandingsprøve og en "dyb prøve" (se afsnit 2.3.1), anvendes PI-kurven for blandingsprøven ned til den dybde, hvorfra PI-kurven for "den dybe vandprøve" er gældende.

Med andre ord, hvis den "dybe vandprøve" stammer fra dybden med fluorescensmaksimum eller er indsamlet lige under springlaget, bruges denne PI-kurve fra overkanten af klorofylmaximaet hhv. underkanten af springlaget (= prøvetagningsdybden) og nedefter og PI-kurven fra blandingsprøven bruges ovenfor fluorescensmaksimaet/springlaget.

Hvis PI-kurven er lavet ud fra en vandprøve i dybden med 5-10 % lys, anvendes denne kurve fra denne dybde og nedefter.

Ellers anvendes kun én PI-kurve for hele vandsøjlen repræsenteret ved vandprøven indsamlet i 1 meters dybde.

3.2 Data og koder

Følgende parametre skal rapporteres:

station	nummer
dato	
tid_prøve	tid for prøvetagningen (UTC-tid)
n	antal prøvetagningsdybder
p ^{areal}	areal produktion (mg C m ⁻² dag)

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 PI-kurver:

temp	temperatur (°C)
a	lysudnyttelseeffektivitet $\left(\frac{\text{mg C m}^{-3} \text{ time}^{-1}}{\mu\text{mol fotoner m}^{-2} \text{ s}^{-1}} \cdot 1000 \right)$
P _m	maksimal fotosynteserate (mg C m ⁻³ time ⁻¹)
c	intercept (mg C m ⁻³ time ⁻¹)
ink_lys	100 % lysintensitet i inkubatoren (μmol fotoner m ⁻² sek ⁻¹)
r ²	r ² værdien for kurvetilpasningen*
n	antal punkter brugt i beregningen af PI-parameter
P1-Pn	kulstofoptag for hver flaske (mg C m ⁻³ time ⁻¹)
L1-Ln	lysintensitet for hver flaske (μmol fotoner m ⁻² 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 oprindelig forhandlet af VKI), 2 = lineær inkubator, 99 = anden type

For P_{pot} målinger:

P _{pot}	potentiell fotosynteserate (mg C m ⁻³ time ⁻¹)
%m _{opt}	mørkeoptaget i % af P _m

*r² for kurvetilpasningen beregnes som:

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

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

4 Kvalitetssikring

4.1 Kvalitetssikring af PI-kurven

Hver PI-Kurve skal kvalitetssikres efter følgende retningslinjer:

Den ideelle kurve skal have mindst tre punkter, som viser det maksimale optag (*fig. 2A og fig. 3*).

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

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 (se 3.2 Data og koder).

Hvis fotosynteseraten ved den højeste lysintensitet overstiger raten ved den næsthøjeste med mere end 5 % (*fig. 2B og C*), 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 fytoplankton er tilpasset et meget højt lysniveau. Det markeres med flag = 2.

En anden type fejl er, at fotoinhibering forekommer på en stor del af kurven, hvilket iagttages ved, at de højeste lysintensiteter ligger mere end 5 % under den højest målte værdi (*fig. 2D og E*). Kurven stiger op til en maksimumsværdi og falder derefter, men således at 3, 4 eller flere punkter ligger på den nedadgående del af kurven. Denne fotoinhibering kan forekomme i prøver fra dybtliggende klorofylmaksima, som er inkuberet under en for høj lysintensitet. Det giver en dårlig bestemmelse af både a og P_m og markeres med flag = 3.

Det er vigtigt, at årsager til afvigelser af enkeltpunkter fra PI-kurven overvejes, og at proceduren 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.

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

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

Markager, S., W.F. Vincent & E.P.Y. Tang 1999: Carbon fixation by phytoplankton in high Arctic lakes: Implications of low temperature for photosynthesis. *Limnology and Oceanography*, vol. 44, 597–607.

6 Bilag

6.1 Beregning af $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ forbrug ved inkubation

En præcis måling af kulstofoptaget er afhængig af, at DPM i prøven, der tælles, ligger signifikant over baggrundsværdien. Dette kan opnås ved tilstrækkelig stor tilsætning af ^{14}C og/ eller ved at øge tællertiden. Erfaringen viser, at DPM-værdien ved P_m bør være mindst 500.

Aktiviteten, der skal tilsættes prøven, afhænger af klorofylkoncentrationen, den klorofylspecifikke fotosynteserate og inkubationstiden. P_m pr. mg klorofyl ligger oftest mellem 0,5 og 1,5 mg C mg $\text{Chl}^{-1} \text{ time}^{-1}$.

Den mængde ^{14}C , der skal tilsættes til hver inkubationsflaske, beregnes ud fra *Lign. 1* ved antagelse af, at:

- der ønskes at tælles 500 DPM på filtret
- der inkuberes i 2 timer
- ΣCO_2 koncentrationen i inkubationsflaskerne er 2 mM
- den maksimale fotosynteserate $\frac{P_m}{[\text{Chl}]}$ er 1 mg C mg $\text{Chl}^{-1} \text{ time}^{-1}$
- klorofylkoncentrationen i inkubationsflaskerne er $[\text{Chl}]$ ($\mu\text{g liter}^{-1}$)

Herved fås:

$$\frac{P_m}{[\text{Chl}]} = \frac{{}^{14}\text{C}_{\text{optag}}}{{}^{14}\text{C}_{\text{tilsat}}} \cdot 1,05 \cdot \frac{1}{t} \cdot [\Sigma\text{CO}_2] \cdot \frac{1}{[\text{Chl}]}$$

som omskrives til:

$${}^{14}\text{C}_{\text{tilsat}} = \frac{{}^{14}\text{C}_{\text{optag}}}{[\text{Chl}]} \cdot 1,05 \cdot \frac{1}{t} \cdot [\Sigma\text{CO}_2] \cdot 12 \cdot 1000$$

hvor 12 og 1000 omregner hhv. mol C til mg C og mg Chl til $\mu\text{g Chl}$, dvs.:

$${}^{14}\text{C}_{\text{tilsat}} = \frac{500}{[\text{Chl}]} \cdot 1,05 \cdot \frac{1}{2} \cdot 2 \cdot 12 \cdot 1000 = \frac{6.300.000}{[\text{Chl}]}$$

6.300.000 DPM svarer til 105.000 DPS (henfald pr. sek), altså skal der under de anførte forudsætninger tilsættes 105 kBq per inkubationsflaske ved en klorofylkoncentration 1 $\mu\text{g liter}^{-1}$.

Bemærk at ovenstående er en gennemsnitsbetragtning. Ved lave temperaturer eller kraftig næringssaltbegrænsning vil fotosynteseraten ofte være lavere, og der skal derfor anvendes en højere aktivitet. Omvendt kan mindre aktivitet tilsættes inkubationsflaskerne fra områder med varmere vand og høje næringssaltkoncentrationer.

Det er vigtigt at huske, at en åbnet ^{14}C -ampul ikke kan gemmes, idet ^{14}C vil udveksles med atmosfæren.

7 Oversigt over versionsændringer

Version	Dato	Emne:	Ændring:
2	27.05.2015	2.3.1 Prøvetagning, opbevaring og transport	Indsat manglende overskrift: Prøvetagning – Metode 1