

0 Orientering

Klorofylkoncentrationen i en vandprøve bruges ved mange rutineundersøgelser som et tilnærmet mål for biomassen af planteplankton. Klorofylkoncentrationen i planteplankton afhænger af artssammensætning og alder af populationen og påvirkes af lys, temperatur og næringssalttilførsel. Der kan derfor være en betydelig variation i koncentrationen af klorofyl. På trods af dette har klorofylmetoden fundet stor udbredelse, især fordi den er enkel at udføre. Det er fælles for flertallet af metoderne til bestemmelse af klorofyl a, at vandprøven først filtreres, og at pigmenterne ekstraheres fra de tilbageholdte alger med et organisk opløsningsmiddel. Ekstraktets absorbans bestemmes spektrofotometrisk.

1 Formål og anvendelsesområde

Denne standard beskriver en spektrofotometrisk metode til bestemmelse af klorofyl a i ethanolekstrakt ved måling af absorbansen ved 665 nm. Standarden er anvendelig for vand fra såvel ferske som marine vandområder. Metodens følsomhed er afhængig af den filtrerede vandmængde; kuvettelængden og ekstraktets volumen. Den mindste klorofylkoncentration, der kan bestemmes ved brug af fx 4 liter vand, 10 mm kuvetter og 10 ml ekstraktvolumen, er ca. 1,5 µg/l.

1.1 Interferens

Interferens fra eventuel klorofyl b i ekstraktet fra øjealger og grønalger medfører ved bestemmelse af klorofyl a i ethanol en overestimering af klorofyl a på 3 % – 9 %, når klorofyl b udgør 10 % – 30 % af klorofyl a. Der korrigeres ikke for denne interferens i nærværende metode.

Interferens fra klorofyl c er minimal. Derimod kan interferens fra eventuelle klorofylderivater være større end interferensen fra klorofyl b. Korrektion for klorofylderivater kan kun foretages ved kromatografisk separation og er ikke medtaget i nærværende metode.

Visse typer bakterieklorofyl, som absorberer lys ved store bølgelængder, kan forstyrre målingerne. Grønne svovlbakteriers klorobiumklorofyl giver fejlagtige målinger i området 600 til 700 nm. Svovlbakterier kan forekomme i grænseområdet mod anaerobt vand. Klorofyl fra svovlbakterier eller purpurbakterier kan forårsage unormalt høje aflæsninger ved 750 nm. I sådanne tilfælde bliver analysen forkert. Normal aflæsning ved 750 nm skal være mindre end 0,01 ved brug af 10 mm kuvetter (ved brug af længere kuvetter sættes grænsen proportionalt højere). Er aflæsningen ved 750 nm efter gentagen centrifugering højere end 0,01, bør prøven kasseres.

2 Princip

Klorofyl ekstraheres med 96 % ethanol, og ekstraktets absorbans måles ved absorptionsmaksimum, normalt ved bølgelængden 665 ± 1 nm.

Spektrofotometerets båndbredde skal være 1 til 2 nm. Da analysen ikke relateres til en klorofylstandard, bør bølgelængden kontrolleres ofte ved bestemmelse af absorptionsstoppen (665 ± 1 nm) i et klorofyl-ekstrakt eller ifølge apparatets håndbog.

Korrektion for turbiditet foretages ved at fratække absorbansen ved 750 nm, hvor klorofyl ikke absorberer.

Ved beregningen bruges en specifik absorptionskoefficient på

$$83 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ for klorofyl } \underline{a} \text{ i } 96 \% \text{ ethanol.}$$

3 Reagenser

3.1 Ethanol

Ethanol, 96 % (V/V) (densitet = 0,808)

4 Apparatur

4.1 Filter

Glasfiberfilter. Whatman GF/C, diameter 42,5 eller 47 mm.

4.2 Filteropsats

Filteropsats bestående af sugeflaske og tragt. Støtteplade af sintret glas fjerner mest vand fra filterne.

4.3 Centrifuge

Centrifugen skal kunne frembringe et gravitationsfelt på ca. 10 000 m/s².

4.4 Centrifugeglas

10 ml graduerede (0,2 ml) centrifugeglas af plast eller glas forsynet med prop (jf. 8.1).

4.5 Spektrofotometer

Spektrofotometer med en båndbredde på 1 til 2 nm i området 630 til 670 nm.

4.6 Kuvetter

Kuvetter af glas med længden 10 mm, subsidiært 50 mm.

5 Fremgangsmåde

Undgå direkte sollys ved prøveudtagning, transport og filtrering. Ekstraktet behandles i dæmpet belysning (mørkekammer eller indirekte glødelampelys).

5.1 Filtrering

Før udtagning af delprøve til filtrering omrystes vandprøven grundigt.

Filtreringen gennemføres så hurtigt som muligt efter prøvetagningen. Hvis filtreringen ikke kan udføres umiddelbart efter prøvetagningen, skal prøveflaskerne opbevares mørkt og koldt, dog højst 24 timer.

I naturlige vandmasser ligger klorofyl a koncentrationen normalt fra 0,1 µg/l om vinteren til 150 µg/l eller mere om sommeren (eutrofe søer). Ved en koncentration på 0,1 µg/l og benyttelse af 10 ml ekstraktvolumen og 50 mm kuvetter skal der filtreres mindst 12 l vand for at opnå en absorbans på mindst 0,05. Ved en koncentration på 150 µg/l og benyttelse af 10 ml ekstraktvolumen og 10 mm kuvetter skal der filtreres mellem 0,04 og 0,6 l vand for at opnå en absorbans mellem 0,05 og 0,08 (jf. 6.2 og 8.2).