

Instituut voor Cultuurtechniek en Waterhuishouding
Wageningen

PIGMENT- EN CHLOROPHYLBEPALING
IN OPPERVLAKTE WATER

J. Harmsen

Nota's van het Instituut zijn in principe interne communicatiemiddelen, dus geen officiële publikaties.

Hun inhoud varieert sterk en kan zowel betrekking hebben op een eenvoudige weergave van cijferreeksen, als op een concluderende discussie van onderzoeksresultaten. In de meeste gevallen zullen de conclusies echter van voorlopige aard zijn omdat het onderzoek nog niet is afgesloten.

Bepaalde nota's komen niet voor verspreiding buiten het Instituut in aanmerking

318360



CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS

0000 0593 4324

INHOUD

	blz.
1. INLEIDING EN PUNTEN VAN ONDERZOEK	1
2. PRINCIPE	1
3. WERKWIJZE	2
4. BEREKENINGSWIJZE	2
5. RESULTATEN EN DISCUSSIE	4
5.1. Invloed verwarmingstijd	4
5.2. Phaeophytine	4
5.3. Dupliceerbaarheid en reproduceerbaarheid	7
6. SAMENVATTING EN CONCLUSIE	8
7. LITERATUUR	9

1. INLEIDING EN PUNTEN VAN ONDERZOEK

Het in algen aanwezige pigment bestaat hoofdzakelijk uit chlorophyl en verder uit het afbraakprodukt van chlorophyl, phaeophytine. Het pigment- en chlorophylgehalte is een maat voor de hoeveelheid in het water zwevende algen.

Deze nota behandelt een methode om het pigment en chlorophyl te bepalen en besteedt met name aandacht aan een aantal aspecten van de werkwijze en berekeningswijze zoals: de invloed van de verwarmingstijd, pigmentconcentratie en het te gebruiken zuur op de resultaten en de dupliceerbaarheid en reproduceerbaarheid van de methode.

2. PRINCIPE

De algen aanwezig in het te bepalen oppervlaktewater worden afgescheiden door filtratie over een glasvezelfilter. Door verwarmen van het filter in 80% ethanol gaan de algen kapot en komt het pigment vrij. Na centrifugeren wordt de extinctie van de verkregen oplossing gemeten. Chlorophyl absorbeert maximaal bij 665 nm (fig. 1). Om te corrigeren voor andere gekleurde verbindingen en de turbiditeit wordt de extinctie gemeten bij 750 nm en afgetrokken van de eerst gemeten extinctie. Bij 750 nm absorbeert chlorophyl nauwelijks.

Indien veel phaeophytine aanwezig is moet hiervoor gecorrigeerd worden, aangezien phaeophytine ook maximaal absorbeert bij 665 nm.

Door aan te zuren wordt alle chlorophyl omgezet in phaeophytine. Meting voor en na aanzuren geeft dan de mogelijkheid te corrigeren voor de in het watermonster aanwezige phaeophytine.

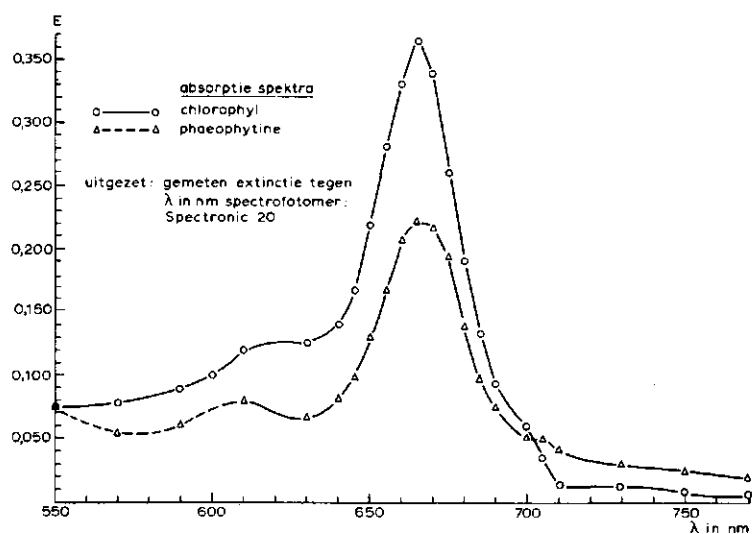


Fig. 1. Absorptiespektra chlorophyl en phaeophytine

3. WERKWIJZE

Er moet een zodanige hoeveelheid monster in behandeling worden genomen, dat de extinctie vóór aanzuren komt te liggen tussen 0,1 en 0,7 (100 tot 1000 ml). Indien na de monsternamen niet meteen met de bepaling kan worden begonnen, dienen de monsters bij -20°C te worden bewaard. Het monster wordt onder afzuigen gefiltreerd over een glasvezelfilter (Whatman GF/C \varnothing 55 mm). Het filter wordt drooggezogen en overgebracht in een centrifugebuisje.

Nadat 10 ml ethanol is bijgepipetteerd wordt het busje gedurende 5 minuten onder roeren in een waterbad van 70°C verwarmd. Hierna wordt het afgekoeld in ijs en 15 minuten bij 15 000 toeren per minuut gecentrifugeerd.

In ca. 5 ml van de heldere oplossing wordt de extinctie gemeten bij 665 en 750 nm (extinctie resp. a en b). Vanaf het verwarmen moeten de handelingen zo vlot mogelijk achter elkaar gebeuren, daar het chlorophyl onder invloed van licht ontleedt.

De oplossing wordt dan aangezuurd met 0,1 ml 4 n zoutzuur, waarna de extinctie direct wordt gemeten bij 665 en 750 nm (c en d).

4. BEREKENINGSWIJZE

Het pigmentgehalte (chlorophyl + phaeophytine) kan worden be-

rekend volgens (SCHMIDT- VAN DORP):

$$\frac{13,9 \times V \times (a - b)}{V_o} \quad \text{ug/l} \quad (1)$$

a = extinctie vóór aanzuren bij 665 nm

b = " " " " 750 nm

V = volume extract in ml

V_o = volume monster in l

13,9 = extinctiecoëfficiënt voor alcohol extract

Indien geen of vrijwel geen phaeophytine aanwezig is, is het pigmentgehalte tevens het chlorophylgehalte. Dit is het geval als

$$\frac{a - b}{c - d} \approx 1,7 \quad \begin{array}{l} c = \text{extinctie na aanzuren bij 665 nm} \\ d = \text{" " " " 750 nm} \end{array}$$

Als er wel phaeophytine aanwezig is, kan het chlorophylgehalte worden berekend volgens (GOLTERMAN, 1970):

$$2,43 \left\{ (a - b) - (c - d) \right\} \times \frac{1000}{K_{chl}} \times \frac{V}{V_o} \quad \text{ug/l} \quad (2)$$

en het phaeophytinegehalte volgens:

$$\left[(a - b) - 2,43 \left\{ (a - b) - (c - d) \right\} \right] \times \frac{1000}{K_{ph}} \times \frac{V}{V_o} \quad \text{ug/l} \quad (3)$$

K_{chl} = extinctiecoëfficiënt chlorophyl = 72

K_{ph} = " " phaeophytine = 42

$$2,43 = \frac{K_{chl}}{K_{chl} - K_{ph}}$$

De extinctiecoëfficiënten zijn afhankelijk van het extractiemiddel.

K_{chl} in ethanol is gelijk aan $\frac{1000}{13,4} = 72$

K_{ph} is zodanig dat $\frac{K_{chl}}{K_{ph}} = 1,7$ (GOLTERMAN, 1970)

Als de extincties zijn gemeten kan in fig. 2 direkt de samenstelling van het pigment worden afgelezen (GOLTERMAN, 1970).

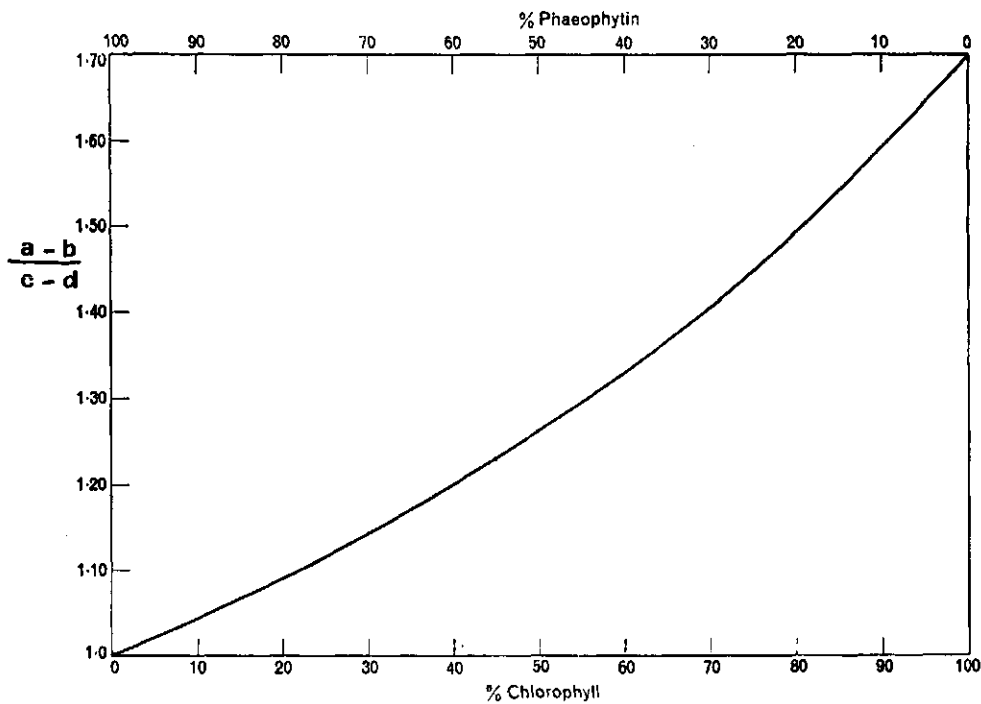


Fig. 2. Relatie tussen samenstelling pigment en de extincties voor en na aanzuren

5. RESULTATEN EN DISCUSSIE

5.1. Invloed verwarmingstijd

Vijf minuten verwarmen bij 70°C blijkt voldoende om alle pigment vrij te maken (zie fig. 3, blz. 5). Bij langer verwarmen wordt de extinctie kleiner door ontleden van de chlorophyl. De volumereduktie bedraagt bij 5 minuten verwarmen 1 à 2%.

5.2. Phaeophytine

Indien er phaeophytine aanwezig is, moet hiervoor worden gecorrigeerd bij de berekening van het chlorophylgehalte daar phaeophytine evenals chlorophyl absorbeert bij 665 nm. De berekening van het chlorophylgehalte vindt dan plaats volgens (2). Deze berekening gaat alleen op, als er zowel voor als na aanzuren een rechtlijnig verband bestaat tussen de gemeten extinctie en de hoeveelheid pigment in het monster.

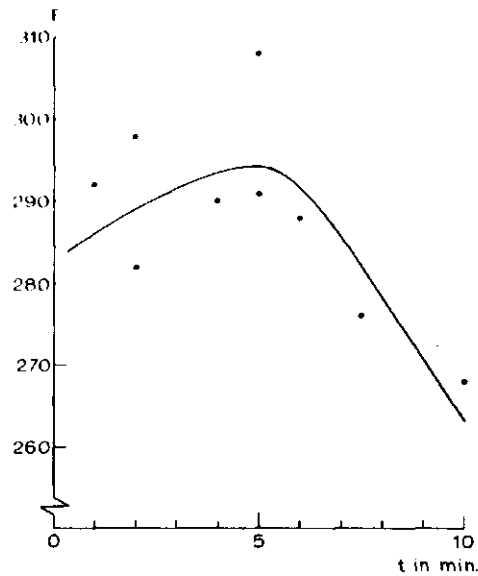


Fig. 3. Invloed verwarmingstijd op de gemeten extinctie

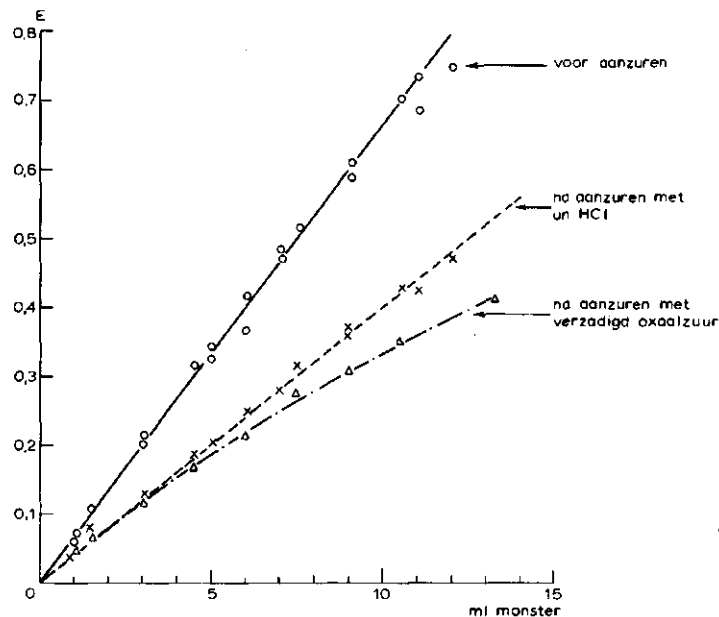


Fig. 4. Verband tussen de hoeveelheid monster met pigment en de extinctie

Bij aanzuren met verzadigd oxaalzuur (SCHMIDT-VAN DORP) is in dit onderzoek geen rechtlijnig verband verkregen (fig. 4). Wel is een rechtlijnig verband gevonden bij aanzuren met 4 n zoutzuur (fig. 4).

Bij het onderzoek naar de relatie tussen de gemeten extinctie en de hoeveelheid pigment en chlorophyl in het monster is gebruik ge-

maakt van water waarin het chlorophylgehalte vrijwel gelijk was aan het pigmentgehalte, daar $\frac{a-b}{c-d} \approx 1,7$ (tabel 1). De berekening van het chlorophylgehalte volgens (2) geeft een veel grotere standaardafwijking (S) dan de berekening van het pigmentgehalte volgens (1) (tabel 1). Dit wordt veroorzaakt doordat bij berekening (2) het gehalte op meer meetgegevens is gebaseerd en daardoor een grotere meetfout heeft. Berekening (1) moet in principe gehalten geven die gelijk zijn aan of groter dan die van berekening (2). Dit is bij monster 2, 5, 8 en 10 niet het geval daar $\frac{a-b}{c-d} > 1,7$.

Als $\frac{a-b}{c-d} \approx 1,7$ maakt het weinig uit of het chlorophylgehalte berekend wordt volgens (2) of gelijkgesteld wordt aan het pigmentgehalte. De gehalten liggen immers binnen elkaars standaardafwijking (tabel 1). Daar de standaardafwijking bij (2) groter is dan die bij (1) mag zolang $\frac{a-b}{c-d} = 1,68 \pm 0,06$, het chlorophylgehalte worden gelijkgesteld aan het pigmentgehalte zonder dat dit ten koste gaat van de nauwkeurigheid.

Tabel 1. Vergelijking pigment- en chlorophylgehaltenes berekend volgens (1) en (2)

no.	ml monster	a - b	c - d	chlorophyl in ug/l vlg. (2)	pigment in ug/l vlg. (1)	$\frac{a-b}{c-d}$
1	1	0,065	0,040	840	900	1,63
2	3	0,214	0,122	1040	990	1,75
3	5	328	200	860	910	1,64
4	6	367	221	820	850	1,66
5	7	487	278	1010	970	1,75
6	9	597	361	890	920	1,65
7	11	689	427	810	870	1,61
8	1,5	108	61	1060	1000	1,77
9	3	207	123	950	960	1,68
10	4,5	319	186	1000	990	1,72
11	6	420	249	960	970	1,69
12	7,5	520	314	940	960	1,66
13	9	610	372	890	940	1,64
14	10,5	710	432	<u>890</u>	<u>940</u>	<u>1,64</u>
				gem. 920	gem. 940	gem. 1,68
				S = 80	S = 45	S = 0,06

S = standaardafwijking

5.3. Dupliceerbaarheid en reproduceerbaarheid

Een watermonster is verdeeld over 7 flessen en ingevroren. Op verschillende dagen is het pigmentgehalte bepaald en berekend volgens (1). De bepaling is in duplo uitgevoerd, kort nadat het monster ontdooid was. Van de monsters 2, 3, 4 en 5 is twee maal een duplo bepaling uitgevoerd (2_1 en 2_2 enz.). De resultaten zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Pigmentgehalte in ug in 7 dagmonsters

Monster	Pigmentgehalte	Gemiddeld per monster
1	53,7	50,7
	47,7	
2_1	54,3	51,9
	52,4	
2_2	50,0	50,7
	50,7	
3_1	45,9	45,2
	44,8	
3_2	44,9	45,3
	45,3	
4_1	49,5	49,7
	50,6	
4_2	50,2	48,5
	48,5	
5_1	49,9	48,1
	47,1	
5_2	49,1	46,4
	46,4	
6	48,1	47,0
	46,0	
7	47,0	45,8
	44,5	
Gem.	48,5	Gem. 48,3
$S_{duplo} =$	1,8	$S =$ 2,5

De standaardafwijking berekend uit de duplo verschillen was 1,8 ug of 3,7%. Dit is bepalend voor de dupliceerbaarheid. De reproduceerbaarheid van één dagmonster is goed, want de duplo's (2_1 t. o. v. 2_2 enz.) liggen binnen elkaars standaardafwijking. De reproduceerbaarheid over alle 7 dagmonsters is minder goed. De standaardafwijking berekend uit de 7 gemiddelde gehalten was 2,5 ug of 5,1%. Deze grotere standaardafwijking wordt niet alleen veroorzaakt door verschillen in de analyse, maar ook door verschillen in monstername, mengen, invriezen en ontdooien. Deze laatste verschillen zullen ook bij nog te nemen monsters optreden, zodat een standaardafwijking van ca. 5% verder dient te worden aangehouden. Als het chlorophylgehalte wordt berekend volgens (2) is de standaardafwijking ca. 9% (tabel 1).

De resultaten dienen voorzichtig te worden geïnterpreteerd, daar voor de extinctiecoëfficiënten van chlorophyl en phaeophytine in de literatuur verschillende waarden worden gegeven. De resultaten kunnen dus een systematische afwijking hebben. Daar de systematische fout overal zal optreden, mogen de gehalten wel onderling worden vergeleken.

6. SAMENVATTING EN CONCLUSIE

Het pigment- en chlorophylgehalte is een maat voor de hoeveelheid in water zwevende algen. De hoeveelheid pigment en chlorophyl kan na filtratie van de algen en extractie in ethanol colorimetrisch worden bepaald. Phaeophytine, het afbraakprodukt van chlorophyl, absorbeert bij dezelfde golflengte als chlorophyl. Zolang er naar verhouding weinig phaeophytine aanwezig is, mag het pigmentgehalte gelijk worden gesteld aan het chlorophylgehalte. Als dit niet het geval is, is het mogelijk bij de berekening van het chlorophylgehalte voor de phaeophytine te corrigeren. De standaardafwijking voor het pigmentgehalte is ca. 5%. Als er gecorrigeerd is voor phaeophytine is de standaardafwijking voor het chlorophylgehalte ca. 9%.

Daar bij deze methode niet van een standaard gebruik kan worden gemaakt, moet rekening worden gehouden met een eventuele systematische afwijking. De gevonden gehalten kunnen onderling wel worden

vergeleken als van dezelfde extinctiecoëfficiënten voor chlorophyl en phaeophytine is uitgegaan.

7. LITERATUUR

GOLTERMAN, H. L., 1970. I. B. P. Handbook no. 8. Methods for chemical analysis of fresh water, 2nd ed.

SCHMIDT-VAN DORP. Analysevoorschrift chlorophylbepaling.
Hoogheemraadschap van Rijnland.