

De spectrofotometrische bepaling van chlorophyll-a in oppervlaktewater (NEN 6520) kritisch bekeken

Chlorophyll-a als waterkwaliteitsparameter

Zonder overdrijving kan gesteld worden dat het chlorophyll-a-gehalte van oppervlaktewater – als maat voor de biomassa van algen – een van de belangrijkste waterkwaliteitsparameters is geworden.

In het IMP 1975-1979 wordt nog geen norm voor chlorophyll-a gesteld, waarschijnlijk mede omdat toen nog geen gestandaardiseerde analyse-methode beschikbaar was: NEN 6520 dateert van december 1981.



G. VAN URK
Rijkswaterstaat
Dienst Binnenwateren/RIZA



T. H. HELMERHORST
Technische Universiteit Delft
Vakgroep Civiele Techniek



H. RUITER
Rijkswaterstaat
Dienst Binnenwateren/RIZA

In het volgende IMP wordt voor de basiskwaliteit een norm genoemd van $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (als zomergemiddelde; april tot en met september); deze waarde is in de 3e Nota Waterhuishouding als getalswaarde voor de algemene milieukwaliteit (kwaliteitsdoelstelling 2000) gehandhaafd. Ook voor bepaalde gebruiksfuncties van het oppervlaktewater, zoals bij voorbeeld de productie van drinkwater wordt het gehalte aan chlorophyll-a als norm gehanteerd: de RIWA noemt een streefwaarde van $< 25 \mu\text{g l}^{-1}$, terwijl een grenswaarde van $< 100 \mu\text{g l}^{-1}$ geldt. Het chlorophyll-a-gehalte van het water is mede de basis voor indeling van meren volgens trofiegraad (Tabel I) en daarmee is ook de relatie tussen chlorophyll-gehalte en ecologische doelstellingen aangegeven (zie ook het rapport van de Gezondheidsraad [1990]).

In het biologisch beoordelingssysteem volgens Caspers & Karbe [Klapwijk, 1988] is het chlorophyll-a-gehalte eveneens een van de belangrijkste parameters gebleken; een overzicht van de gehanteerde klassengrenzen staat in Tabel II.

Het chlorophyll-a-gehalte wordt in alle gevallen als maat voor de biomassa van algen gehanteerd; het is uiteindelijk de

Samenvatting

De meest gebruikte methode voor de bepaling van chlorophyll-a in oppervlaktewater is de spectrofotometrische methode volgens NEN 6520. Volgens ringonderzoekingen blijkt deze methode goed reproduceerbare resultaten op te leveren. Het praktische probleem dat chlorophyll-a in 80% ethanol onder invloed van licht niet stabiel is, kan door een zorgvuldige werkwijze worden ondervangen.

Een principieel probleem is echter dat bij de spectrofotometrische methode een aantal afbraakproducten onvoldoende van chlorophyll-a kan worden onderscheiden. Bij voorgaande scheiding van pigmenten in een extract door middel van vloeistof-chromatografie is dit wel mogelijk; de gehalten aan chlorophyll-a, bepaald via HPLC, zijn systematisch lager dan die bepaald met spectrofotometrische methoden.

Met HPLC kan, door kwantificering van andere pigmenten, zoals fucoxanthine, zeaxanthine, luteine of chlorophyll-b, tevens worden vastgesteld of het fytoplankton gedomineerd wordt door Diatomeeën, cyanobacteriën of groenwieren.

TABEL I – Kenmerken van meren met verschillende trofiegraad [Carlson, 1977].

Trofiegraad	Doorzicht	Chlorophyll-a $\mu\text{g l}^{-1}$	Totaal P $\mu\text{g l}^{-1}$	Totaal N $\mu\text{g l}^{-1}$
Oligotroof	$> 5 \text{ m}$	> 2	> 5	> 300
Mesotroof	$3-6 \text{ m}$	$2-8$	$5-20$	$300-500$
Eutroof	$1-4 \text{ m}$	$6-35$	$20-100$	$350-600$
Hypertroof	$< 2 \text{ m}$	$30-400$	> 100	> 1.000

hoeveelheid algen waar het om gaat en niet het chlorophyll-a zelf. De reden voor het gebruik van het chlorophyll-a-gehalte is dat dit in alle algen voorkomt als centraal bestanddeel van het fotosynthese-apparaat en dat het goed en reproduceerbaar te meten zou zijn. Berekening van biomassa van algen vanuit het chlorophyll-a-gehalte wordt verondersteld beter reproduceerbaar te zijn dan een directe meting van de algen biomassa. Bij het gebruik van het drooggewicht van het zwevende materiaal als maat voor de biomassa stoort zowel anorganische zwevende stof als detritus, en bij bepaling van het organisch koolstofgehalte is het detritus nog steeds een bron van storing.

Voor de bepaling van het chlorophyll-a-gehalte van een watermonster bestaat een groot aantal methoden, zo groot dat ze in kort bestek niet allemaal genoemd kunnen worden. Sommige methoden zijn spectrofotometrisch, andere gebruiken de fluorescentie van chlorophyll als basis voor de kwantificering. Er zijn 'in vivo' metingen waarbij geen enkele voorbereiding van het monster plaats vindt; in de meeste gevallen wordt het chlorophyll-a echter eerst uit het fytoplankton geëxtraheerd. Als extractiemiddelen worden onder andere gebruikt ethanol, methanol, aceton, dimethylsulfoxide en er kan al dan niet een celdestructie-stap in de analysemethode zijn opgenomen. Voor de eigenlijke meting kan het chlorophyll-a ook door

TABEL II – Invulling van het schema van Caspers & Karbe (uit [Klapwijk, 1988]).

Klasse	Chlorophyll-a $\mu\text{g l}^{-1}$	BOD mg l^{-1}	O ₂ -minima mg l^{-1}
II	< 25	< 3	7
III A	< 50	< 6	5
III B	< 100	< 9	3
IV A	< 150	< 13	–
IV B	< 150	< 20	–
V	pm	< 30	$> 0,5$
VI	–	< 30	$> 0,5$

chromatografische technieken van andere pigmenten gescheiden worden.

Het zal duidelijk zijn dat het aantal mogelijke varianten voor de meting van het chlorophyll-a-gehalte legio is. In de praktijk hebben we echter vooral te maken met de gestandaardiseerde methode volgens NEN-norm 6520 [Nederlands Normalisatie Instituut, 1981]; nagenoeg dezelfde methode wordt ook als DIN-norm (DIN 38412 Teil 16) beschreven en als ISO 'draft proposal' (ISO DP 10260). Het is ook de enige analysemethode voor chlorophyll-a waarvan voldoende gegevens over de reproduceerbaarheid in verschillende laboratoria voorhanden zijn [Helmerhorst, 1989].

Reproduceerbaarheid van chlorophyll-a-metingen volgens NEN 6520

De methode volgens NEN-norm 6520 is gebaseerd op extractie met 80% ethanol bij 75°C zonder celdestructie; in de DIN-

TABEL III – Precisie van de bepaling van chlorophyll-a in oppervlaktewater [Hazenber, 1983; Nusch, 1984].

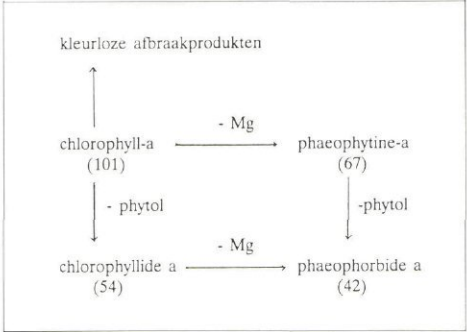
Onderzoek	Gemiddeld chl-a gehalte µg l ⁻¹	Variatie binnen lab	Variatie tussen labs
Hazenber [1983]	9,5 235,8	6,8% 3,0%	21,3% 13,9%
Nusch [1984]	127,4 19,8 24,3	5,4% 10,0% 8,8%	6,7% 14,6% 14,5%

en ISO-norm is dit 90% ethanol. De kwantificering van chlorophyll-a gebeurt spectrofotometrisch bij 665 nm, waarbij via aanzuring voor aanwezigheid van zogenaamde 'phaeopigmenten' gecorrigeerd wordt. Volgens NEN 6520 zou bij goede uitvoering een precisie van 5% haalbaar moeten zijn. Afgaande op de resultaten van ring-onderzoekingen in Nederland en de publikatie van Nusch [1984] is dit ook inderdaad het geval, althans bij hoge chlorophyll-gehaltes (chlorophyll-a > 160 µg l⁻¹). Bij lage chlorophyll-a-gehaltes is de spreiding aanzienlijk groter (Tabel III). De precisie van de bepaling van 'phaeopigmenten' is veel slechter. In het door Hazenber [1983] beschreven onderzoek werd overigens niet door alle laboratoria de methode volgens NEN 6520 gebruikt. Dit verklaart de

grotere variatie tussen laboratoria onderling. Tegelijk wordt daarmee duidelijk dat ook andere methoden dan NEN 6520 tot eenzelfde precisie binnen één laboratorium kunnen leiden. Volgens Nusch [1984] zijn het vooral de verschillen in de spectrofotometrische meting die de variatie in de uitkomsten tussen de laboratoria bepalen. Dit baseert hij op de variatie in de metingen aan een rondgezonden chlorophyll-a-extract in 90% ethanol; de variatiecoëfficiënt van deze metingen was 4%, na aanzuren zelfs 9%. Chlorophyll-a is echter in 80% ethanol niet stabiel. Afb. 1 toont een HPLC-chromatogram van een *Chlorella pyrenoidosa*-extract direct na het aanmaken en nadat het extract enige tijd in het daglicht heeft gestaan. Duidelijk is het verdwijnen van chlorophyll-a te onderkennen. In aceton is chlorophyll-a aanzienlijk stabiel.

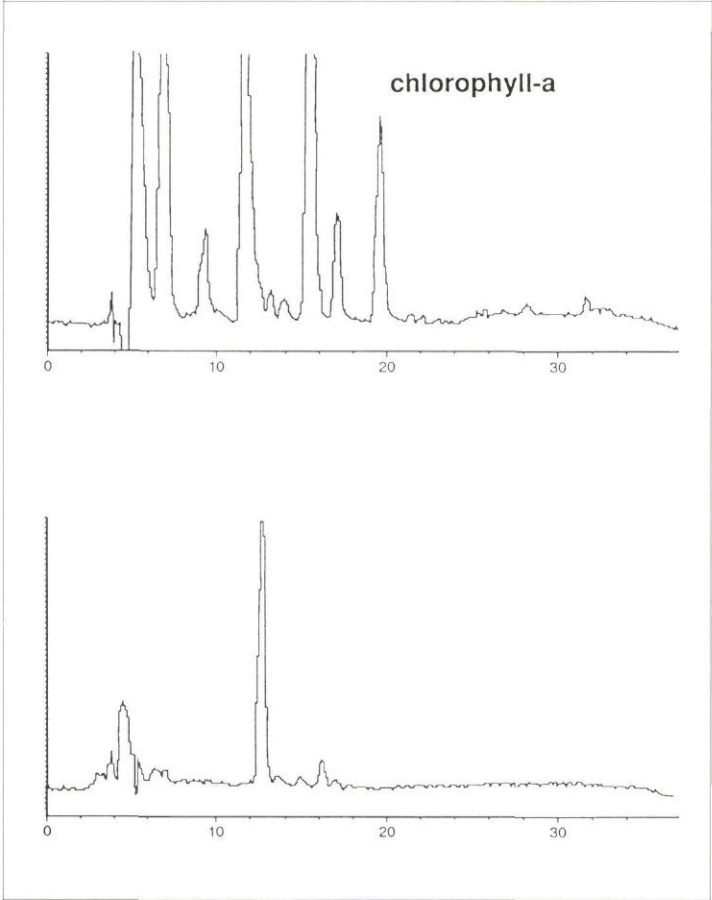
De correctie voor 'Phaeopigmenten'

Zoals in de vorige paragraaf is aangegeven is de variatiecoëfficiënt van extinctie-metingen aan chlorophyll-oplossingen na aanzuren groter dan voor het aanzuren [Nusch, 1984]. Het is daarmee de vraag of het aanzuren de precisie ten goede komt; omdat geen berekeningen gepubliceerd



Afb. 2 - Mogelijke afbraakroutes van chlorophyll-a volgens Daley & Brown [1973]; tussen haakjes staat de relatieve absorptie bij 665 nm aangegeven (naar Daley & Brown [1973] en Schwartz & Von Elbe [1982]).

zijn van chlorophyll-gehaltes zonder aanzuren, is dit niet verder na te gaan. Een geringere precisie zou gecompenseerd moeten worden in een grotere nauwkeurigheid van de bepaling van het werkelijke chlorophyll-gehalte. De correctie voor aanwezigheid van afbraakprodukten is echter zeer gebrekkig. Volgens NEN-6520 is de aanzuur-procedure een correctie voor 'phaeopigmenten', de berekening wordt echter uitgevoerd alsof het alleen pheophytine-a betreft; of andere phaeopigmenten dezelfde spectrale eigenschappen hebben, wordt niet besproken. Met HPLC kan worden aangetoond dat in algenextracten vrijwel nooit pheophytine-a aanwezig is, maar wel andere afbraakprodukten [Helmerhorst, 1989]. Uit het onderzoek van Daley & Brown [1973] is al gebleken dat niet noodzakelijkerwijs phaeopigmenten worden gevormd in 'senescent' phytoplankton. Een schema van mogelijke afbraakroutes wordt gegeven in afb. 2. Afgaande op de conclusies van Daley & Brown [1973] is het aanzuren voor oppervlaktewater-monsters een ongeschikte procedure om de conditie van algen te bepalen: er wordt gecorrigeerd voor afbraakprodukten waarvan de vorming in intacte algencellen in de waterfase (bij licht) onwaarschijnlijk is. Wanneer in een watermonster geresuspendeerd bodemmateriaal aanwezig kan zijn, is de aanwezigheid van phaeopigmenten goed mogelijk, omdat deze in het donker wel gevormd kunnen worden [Daley & Brown, 1973]. In dit geval echter kunnen weer geen conclusies over de fysiologische conditie van de algen worden getrokken uit de aanwezigheid van deze phaeopigmenten. In de praktijk blijkt ook dat veelal weinig verschillen in phaeopigment-gehalte in de loop van een jaar worden gemeten; een voorbeeld zijn de gegevens met betrekking tot het IJsselmeer [RIWA, 1988].



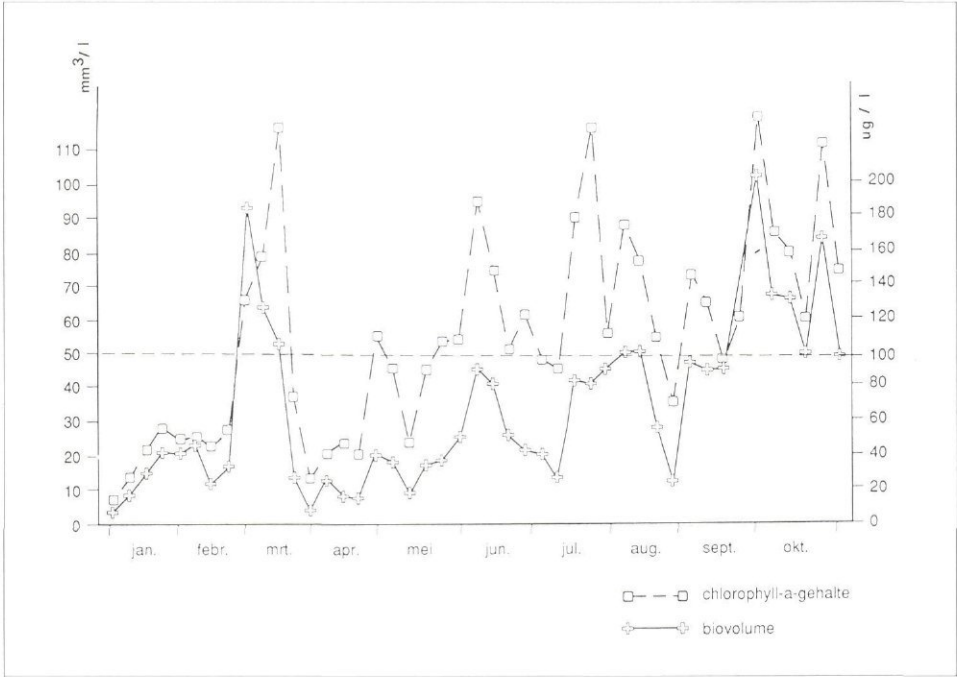
Afb. 1 - HPLC-chromatogram (452 nm) van een extract in 80% ethanol van *Chlorella pyrenoidosa*.

Boven: onmiddellijk na extractie. Onder: na 3h expositie aan licht, chlorophyll-a is volledig verdwenen.

Onbekend is hoe andere afbraak-
produkten dan phaeophytine-a zich bij
aanzuren gedragen en het risico bestaat
dat sommige afbraakprodukten als
chlorophyll-a worden meebepaald.
Hoe ook gecorrigeerd wordt, bij aanwezig-
heid van afbraakprodukten wordt het
gehalte aan chlorophyll-a bij spectro-
fotometrische bepaling steeds overschat
[Satory, 1985; Jacobsen *et al*, 1988;
Gieskes & Kraay, 1984]. Riemann [1978]
heeft bovendien aangetoond dat
fucoxanthine – een pigment dat de bruine
kleur van Diatomeën veroorzaakt – na
aanzuren een zeer sterke absorptie heeft in
de range van 600-750 nm. Dit is een
andere potentiële bron van storing,
waarvan de betekenis voor de praktijk nog
moeilijk is in te schatten; dit hangt
namelijk sterk af van de nauwkeurigheid
waarmee de aanzuurprocedure wordt
uitgevoerd.

Carotenoïd-chlorophyll interacties

In het voorgaande zijn interferenties
besproken van verbindingen die evenals
chlorophyll-a een absorptie vertonen bij
665 nm. Er is echter ook een ander type
van interferentie mogelijk.
In een algencel komt chlorophyll-a voor
als een onderdeel van een carotenoïd-
chlorophyll-poteïne-complex (LHC =
Light Harvesting Complex in Engelstalige
literatuur). De structuur van deze
complexen is overigens niet volledig; ook
lipiden kunnen een onderdeel van het
LHC zijn en bij de diverse groepen algen
kunnen carotenen een verschillende
functie hebben in het LHC. Het LHC als
geheel kan een ander absorptiespectrum
hebben dan de verschillende
bestanddelen in oplossing, en ook een
ander fluorescentie-emissie-spectrum.
In een extract zal de oorspronkelijke
structuur door denaturatie van de poteïne-
component natuurlijk niet behouden
blijven. Toch lijkt het erop dat ook in
extracten een zekere vorm van
interferentie mogelijk is. Dit kan afgeleid
worden uit de resultaten van Schanz & Rai
[1988] die concludeerden dat de aanwezig-
heid van grote hoeveelheden carotenoïden
kon leiden tot storingen in de chlorophyll-
a-bepaling; deze storingen waren het
grootste bij de spectrofotometrische
methode en leidden tot overschattingen
van maximaal 31%.
Zoals Schanz & Rai [1988] zelf ook
aangeven, zijn deze resultaten bijzonder
moeilijk interpreteerbaar en is verder
onderzoek nodig om de aard van deze
interacties op te helderen.
Uit fysiologisch onderzoek van het foto-
synthese-proces kan overigens worden
afgeleid dat het gebruik van uitsluitend



Afb. 3 - Phytoplankton IJsselmeer 1977. Verloop van chlorophyll-a gehalte in biovolume.

TABEL IV – Chlorophyll-a-gehalten in het IJsselmeer bij Breezanddijk in 1979

Week nrs.	14	18	22	26	30	34	38	117 µg l ⁻¹
	15	19	23	27	31	35	39	99 µg m ⁻¹
	16	20	24	28	32	36		118 µg l ⁻¹
	17	21	25	29	33	37		132 µg l ⁻¹

Gemiddeld chl-a-gehalte van april tot september 116 µg l⁻¹ s.d. 48 µg l⁻¹

chlorophyll-a-getallen als basis voor
productieberekeningen minder juist is.
Absorptie van licht (energie) in een
intacte algencel vindt voor een groot deel
plaats via de zogenaamde ‘hulppigmenten’
(accessory pigments in Engelstalige
literatuur), waarbij dan uiteindelijk de
geabsorbeerde energie aan chlorophyll-a
wordt overgedragen, maar waarbij de
efficiëntie van het gehele proces niet door
de hoeveelheid chlorophyll-a wordt
bepaald.

Chlorophyll-a-bepaling en de normstelling

Voor de normtoetsing zijn de genoemde
analytische problemen eigenlijk van
ondergeschikt belang: de waarde van
100 µg l⁻¹ is een gemiddelde voor de
periode van april tot september.
Alle genoemde oorzaken van storing zijn
qua grootte-orde ondergeschikt aan de
fluctuaties van de hoeveelheid algen die
in deze periode van april tot september
kunnen optreden. De voornaamste
onzekerheid zit in de representativiteit van
de monsters en niet in de analytische
precisie. Een voorbeeld van variaties in de
fytoplanktonbiomassa wordt gegeven in
afb. 3.
Bij een geringe bemonsteringsfrequentie
(te beschouwen als een beperkte steek-

proef) kan het gevonden gemiddelde sterk
afwijken van de werkelijke gemiddelde.
Worden met de gegevens in afb. 3
chlorophyll-gehalten berekend voor
verschillende series monsters met tijds-
intervallen van 4 weken, dan ontstaat het
resultaat van tabel IV. De maximale
chlorophyll-concentratie wordt bovendien
gevonden buiten de periode april-
september.
Op basis van gepubliceerde chlorophyll-
gegevens van 56 meren berekenen
Marshall *et al* [1988] dat in een serie van
10 waarnemingen een variatiecoëfficiënt
van 20% verwacht mag worden.
Uit afb. 3 blijkt overigens ook dat de
relatie tussen het biovolume en het
chlorophyll-a-gehalte in verschillende
perioden verschillend kan zijn: bij groen-

TABEL V – Omrekenings coëfficiënten gehanteerd in
het algengroei-model BLOOM II.

Groep	Limitatie	C/Chl-a	Dr w/Chl-a
Diatomeeën	licht	25	75
	Si	40	100
groenalgen	licht	30	60
	N	40	80
	P	40	80
cyanobacteriën	licht	30	75
	N	50	125
	P	50	125

(Bron: Waterloopkundig Laboratorium)

algen (zomer-periode) wordt het biovolume onderschat. Dit wordt ook weerspiegeld in de in het algengroei-model BLOOM II gehanteerde coëfficiënten (Tabel V).

Uit het voorgaande kan afgeleid wordt dat chlorophyll-a-gegevens beter interpreteerbaar worden als we tegelijk weten welke groep algen dominant is; dat staat ook in NEN 6520 uitdrukkelijk vermeld. Ook in ecologisch opzicht is het van groot belang of het fytoplankton voornamelijk bestaat uit Diatomeeën of uit cyanobacteriën. De meeste Diatomeeën (bijvoorbeeld *Stephanodiscus*-soorten) zijn goed consumeerbaar voor zoöplankton of bentische filter-feeders, terwijl cyanobacteriën in het algemeen als slecht consumeerbaar voor andere organismen worden beschouwd.

Het chlorophyll-a-gehalte van het oppervlaktewater geeft geen informatie welke soorten algen aanwezig zijn; hiervoor is aanvullend onderzoek nodig. De gangbare methode om de fytoplankton-samenstelling te bepalen is microscopisch onderzoek van een fytoplankton-preparaat. Dit is echter zeer arbeidsintensief en resulteert bovendien in een opgave van aantallen cellen, draden of kolonies van algen van waaruit de biomassa niet onmiddellijk te berekenen is.

Bepaling van het chlorophyll-a-gehalte van oppervlaktewater met hoge druk vloeistof-chromatografie

In het voorgaande hebben we geconcludeerd dat aan de spectrofotometrische bepaling van chlorophyll-a nogal wat problemen verbonden zijn; het voornaamste voordeel van de bepaling via NEN-norm 6520 is dat deze een goed reproduceerbaar geval oplevert. De bruikbaarheid van dit getal is echter zeer discutabel.

Het voornaamste bezwaar tegen de spectrofotometrische bepaling is dat de meting van de absorptie bij 665 nm onvoldoende specifiek is voor chlorophyll-a [Jacobsen *et al*, 1988]. Zoals al in een vorige paragraaf vermeld, zijn er methoden om de pigmenten voor de kwantificering te scheiden.

Deze methoden zijn zelfs zeer oud: de allereerste toepassing van chromatografische technieken was de scheiding van plantenpigmenten (door de Russische botanicus Tsvet, [1906]).

Een voordeel van een scheiding van chlorophyll-a van andere pigmenten is dat chlorophyll-a gemeten kan worden zonder interferentie met andere pigmenten die eveneens bij 665 nm absorberen en dit is ook in de meeste gevallen de reden voor toepassing van HPLC voor bepaling van

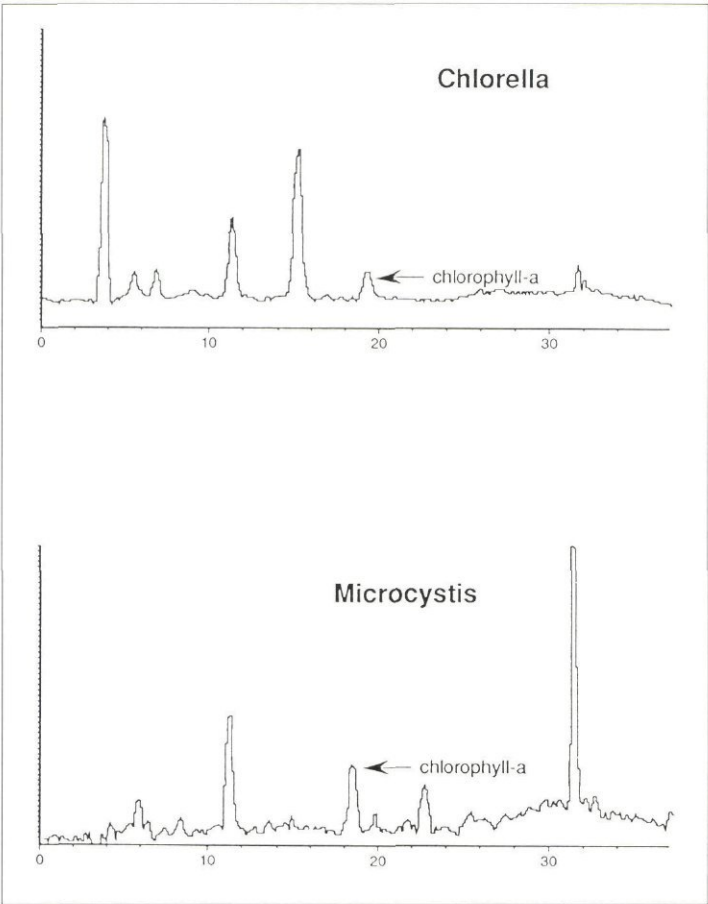
chlorophyll-a [Jacobsen *et al*, 1988; Satory, 1985]. Daarmee worden de mogelijkheden van de techniek echter maar voor een klein deel benut: het is namelijk ook mogelijk om andere aanwezige pigmenten te kwantificeren, zoals chlorophyll-b en -c, de phaeopigmenten en chlorophylliden en de diverse carotenoïden. Anders dan hogere planten vertonen algen grote verschillen in de pigmentsamenstelling van hun fotosynthese-apparaat. Een overzicht van de aanwezigheid van de verschillende chlorophyllen en carotenoïden in de belangrijkste groepen algen wordt gegeven in tabel VI. De pigmentsamenstelling van groenwieren vertoont veel overeenkomst met die van hogere planten die eveneens chlorophyll-b bezitten en luteïne als een van de voornaamste carotenoïden hebben. Diatomeeën daarentegen hebben chlorophyll-c en als voornaamste carotenoïden diadinoxanthine en fucoxanthine. De grootste verschillen in pigmentsamenstelling vertonen echter de cyanobacteriën: daar is een reeks carotenoïden bekend die specifiek zijn voor een bepaald geslacht of misschien zelfs kenmerkend voor een enkele soort. Wanneer ook deze carotenoïden gescheiden, geïdentificeerd en gekwantificeerd zouden kunnen worden,

TABEL VI – Pigmentsamenstelling van cyanobacteriën, diatomeeën en groenwieren (schema uit 'Photosynthetic pigments of Algae', door K. S. Rowan, vereenvoudigd weergegeven).

Pigment	Cyano-bacteriën	Diatomeeën	Groen-wieren
apahanizofyl	x		
α-caroteen			x
β-caroteen	x	x	x
chlorofyl-a	x	x	x
chlorofyl-b			x
chlorofyl-c		x	
diadinoxanthine		x	
echinenone	x		
fucoxanthine		x	
luteïne			x
myxoxanthofyl	x		
neoxanthine			x
oscillaxanthine	x		
violaxanthine			x
zeaxanthine	x		x

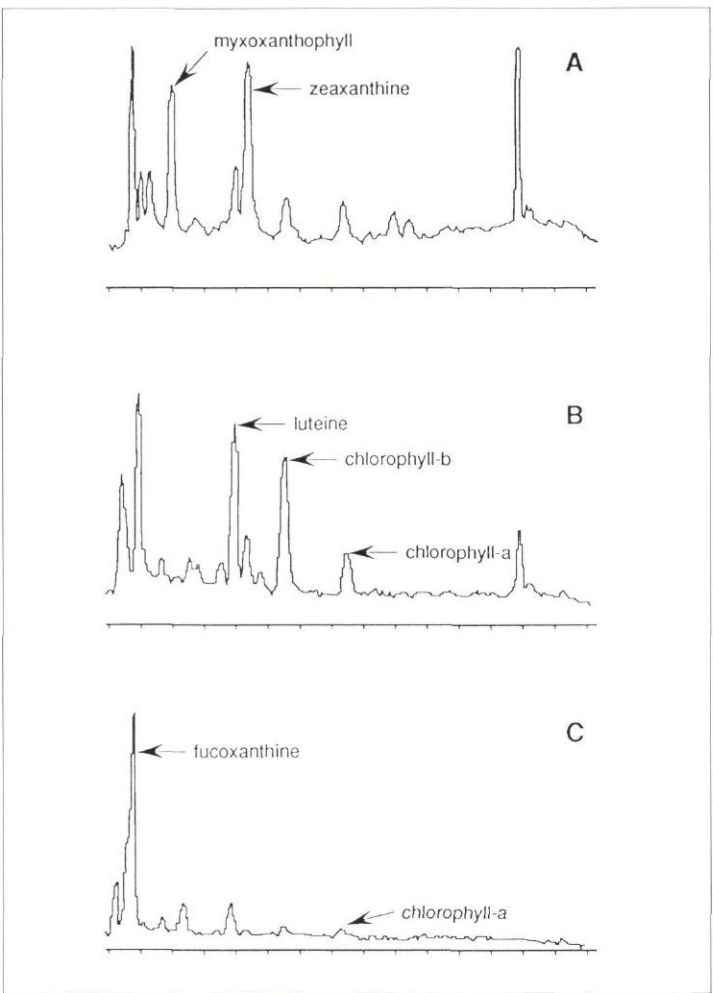
is het mogelijk om de hoeveelheid van een bepaald carotenoïd te gebruiken om de biomassa van een bepaalde groep te kwantificeren, op dezelfde manier als chlorophyll-a gebruikt wordt om de totale biomassa van algen te kwantificeren. Aan een dergelijke kwantificering van de biomassa per groep zijn deels dezelfde problemen verbonden als aan het gebruik van chlorophyll-a getallen; een belangrijk probleem is dat de relatie pigment/ biomassa per soort kan verschillen en ook afhankelijk zou kunnen zijn van milieu-

Afb. 4 - HPLC-chromatogrammen van extracten van twee algensoorten (452 nm).

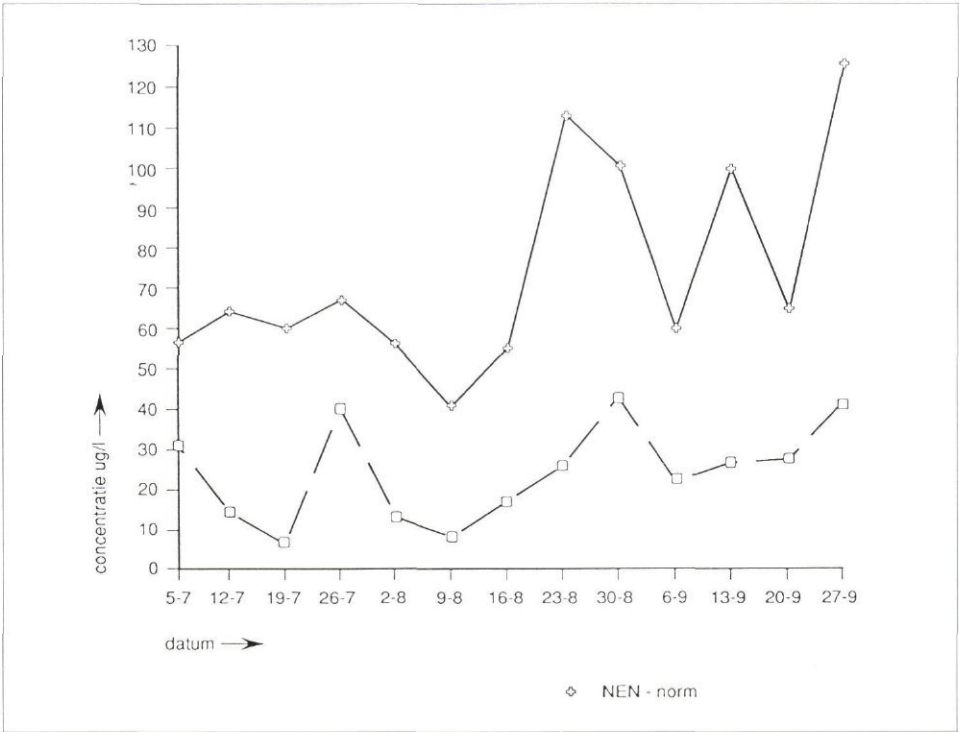


omstandigheden zoals licht- of nutriënten-limitatie. Dit geldt echter ook voor chlorophyll-a (Tabel V). Scheiding van algenpigmenten is mogelijk door middel van papierchromatografie, dunne laag-chromatografie en hoge druk vloeistof-chromatografie. Alleen bij hoge druk vloeistofchromatografie is het mogelijk direct na het chromatografisch systeem een detectiesysteem te koppelen. Uiteraard is daarom voor het genoemde doel vloeistofchromatografie te prefereren boven de andere technieken. Afb. 4 toont enkele chromatogrammen van pigment-extracten van reïncultures van enkele algensoorten. Details van de chromatografische condities en het detectiesysteem worden gegeven door Helmerhorst [1989]. De detector was een diode-array-spectrofotometer en de registratie van de pigmenten verschilt in principe niet van de gebruikelijke spectrofotometrische bepalingen. In de chromatogrammen blijkt een beperkt aantal, onderling goed gescheiden pieken aanwezig te zijn. Uiteraard komt de piek van chlorophyll-a in alle extracten voor en zouden de chromatogrammen gebruikt kunnen worden om alleen het chlorophyll-a te kwantificeren. Daarmee zou echter veel informatie uit de chromatogrammen ongebruikt worden gelaten. Als de gebruikte algensoorten model mogen staan voor de verschillende hoofdgroepen van algen, kunnen de pieken die niet gemeenschappelijk zijn, gebruikt worden om na te gaan welke groep dominant is in het onderzochte monster. Om dit verder te illustreren, worden in afb. 5 enkele chromatogrammen van extracten van oppervlaktewater gegeven. Duidelijk blijkt dat ook in deze chromatogrammen het piekenpatroon behorend bij groenalgen en cyanobacteriën is te herkennen. Op de kwantificering van de verschillende groepen met behulp van specifieke pigmenten willen we hier niet nader ingaan. Kwantificering van chlorophyll-a via HPLC is goed mogelijk. De variatie-coëfficiënt van de bepaling via HPLC is circa 10%, wat iets meer is dan de variatie coëfficiënt bij spectrofotometrische bepalingen. Zoals verwacht mag worden, zijn de uitkomsten bij toepassing van HPLC doorgaans lager dan bij de spectrofotometrische methoden: een voorbeeld wordt gegeven voor het Markermeer, waar veel resuspensie van bodemmateriaal optreedt (afb. 6). Speciaal in een dergelijke situatie – die in de ondiepe Nederlandse oppervlaktewateren frequent voorkomt – is het van

Afb. 5 - HPLC-chromatogramma (452 nm) van oppervlaktewater-extracten.
A: Wolderwijd: 13 april 1989
cyanobacteriën
B: Markermeer: 27 september 1988
groenwieren + cyanobacteriën
C: IJssel: 24 april 1990
Diatomeeën



Afb. 6 - Chlorophyll-a concentraties in het Markermeer, zomer 1988, bepaald volgens NEN-6520 (gegevens RIJP) en met HPLC (DBW/RIZA).



belang het onderscheid te kunnen maken tussen chlorophyll-a en afbraakprodukten die in detritus voorkomen. Alleen al om deze reden zou aan HPLC-analyse de voorkeur moeten worden gegeven boven spectrofotometrische bepalingen; de mogelijkheid van kwantificering van carotenoiden met HPLC is een ander groot voordeel van deze methode.

Conclusies

1. De bepaling van chlorophyll-a via NEN 6520 levert goed reproduceerbare getallen. Dit is het enige positieve wat van de NEN-norm gezegd kan worden.
2. Het aanzuren van de extracten voor de bepaling van phaeopigmenten levert geen betrouwbare resultaten op over de hoeveelheid phaeopigmenten noch een indicatie van de conditie van de algen.
3. Interferentie met carotenoiden kan de analyse van chlorophyll-a beïnvloeden.
4. Door toepassing van HPLC kan interferentie van chlorophyll-a met afbraakprodukten of carotenoiden vermeden worden.
5. Uit HPLC-chromatogrammen kan aan de hand van het piekenpatroon bepaald worden of in een watermonster cyano-bacteriën dominant zijn.
6. HPLC-analyse biedt grote perspectieven als naast de hoeveelheid fytoplankton, ook de samenstelling als basis voor kwaliteitsbeoordeling wordt gebruikt.

Literatuurlijst

- Carlson, R. E. (1977). *A trophic state index for lakes*. Limnology and Oceanography 22: 361-369.
- Daley, R. J. S. and Brown, S. R. (1973). *Experimental characteristics of lacustrine chlorophyll diagenesis. I physiological and environmental effects*. Archiv für Hydrobiologie 72: 277-304.
- Foy, R. H. (1987). *A comparison of chlorophyll-a and carotenoid concentrations as indicators of algal volume*. Freshwater biology 17: 237-250.
- Gieskes, W. W. C. and Kraay, G. W. (1984). *Phytoplankton, its pigments and primary production at a central North Sea station in May, July and September 1981*. Netherlands Journal of Sea Research 18: 51-70.
- Hazenbergh, J. (1983). *Laboratorium-evaluatie. Bepaling van chlorophyll-a en faecofytine-a in oppervlaktewater*. Project 23. Verslag Rijksinstituut voor zuivering van afvalwater.
- Helmerhorst, T. H. (1989). *Chlorofyl-a bepaling met behulp van hoge druk vloeistof chromatografie*. DBW/RIZA werkdokumentnr.: 89.089X.
- Helmerhorst, T. H. (1989). *Identificering en kwantificering van groenwieren, cyanobacteriën en diatomeeën met behulp van pigmentanalyse*. DBW/RIZA werkdokumentnr.: 89.121X.
- Jacobsen, T. R., Rai, H. and Nusch, E. A. (1988). *The measurement of phytoplankton pigments in freshwater: Where do we go from here?* Verh. Internat. Freshw. Limnol. 23: 952-956.
- Klapwijk, S. P. (1988). *Eutrophication of surface waters*. Proefschrift Technical University of Delft.
- Marshall, T. C., Morin, A. and Peters, R. H. (1988). *Estimates of mean chlorophyll-a concentration: precision, accuracy, and sampling design*. Water resources bulletin vol 24, no. 5, 1027-1034.
- Nederlands Normalisatie Instituut (1981).

- Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyll-a (NEN 6520)*.
- Nusch, E. A. (1984). *Ergebnisse eines Ringversuches zur Chlorophyll-a-bestimmung im Wasser*. Zeitschrift für Wasser abwasserforschung 17: 89-94.
- Riemann, G. (1978). *Carotenoid interference in the spectrofotometric determination of chlorophyll degradation products from natural populations of phytoplankton*. Limnology & Oceanography 23: 1059-1066.
- RIWA (1988). *De samenstelling van het Rijnwater in 1986 en 1987*. Amsterdam, 228 pp.
- Rowan, K. S. (1989). *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press, 334 pp.
- Satory, D. P. (1985). *The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry*. Water Research 19: 605-610.
- Schanz, F. S. and Rai, H. (1988). *Extract preparation and comparison of fluorometric, chromatographic (HPLC) and spectrophotometric determinations of chlorophyll-a*. Archiv für Hydrobiologie 112: 533-539.
- Schwartz, S. J., and Elbe, J. H. von (1982). *High performance liquid chromatography of plant pigments. A review*. Journal of liquid Chromatography 5, suppl 1: 43-73.



3x Rijn op Radio 5

Op de woensdagen 24 en 31 oktober en 7 november 1990 brengt de educatieve omroep RVU op Radio 5 drie programma's over de Rijn. De uitzendingen zijn van 09.30 tot 10.00 uur.



STORA-onderzoek-programma PN's 1992 gestart

Juist voor de zomer zijn de eerste projecten in het kader van het STORA-onderzoekprogramma PN's (= fosfaat, stikstof en slib) 1992 gestart. In dit artikel worden achtergrond en inhoud van dit programma belicht en worden de eerste activiteiten gemeld.

Opstelling van PN's 1992

Als uitvloeisel van internationale overeenkomsten bij de eutrofiëeringsbestrijding heeft de Onderzoekadviescommissie (OAC) van de STORA in opdracht van het bestuur van de stichting een onderzoekprogramma opgesteld dat is gericht op verwijdering van fosfaat- en stikstof op rioolwaterzuiveringsinrichtingen (rwzi's). Doel van dit programma is vragen en knelpunten te elimineren, zodat 'in 1995 met betrekking tot thans operationele technieken geen vragen of onduidelijkheden meer zullen bestaan'. Ook de steeds actueler wordende slibverwerking is in het programma betrokken.

Het programma is opgesteld door een werkgroep bestaande uit ir. J. Boschloo, (Zuiveringsschap Drenthe); ir. R. den Engelse, (Hoogheemraadschap Uitwaterende Sluizen); ir. A. E. van Giffen, (Hoogheemraadschap West-Brabant); ir. C. Kerstens, (Zuiveringsbeheer Provincie Groningen); ir. K. F. de Korte, (Riolering en Waterhuishouding Amsterdam); ir. Tj. Meijer, (Waterschap Zuiveringsschap Limburg); ir. W. van Starkenburg, (DBW/RIZA, projectleider rwzi 2000).

Voor het STORA-secretariaat namen deel drs. J. F. Noorthoorn van der Kruijff en ir. P. C. Stamperius; voorbereiding en uitvoering van de werkzaamheden werden verzorgd door prof. ir. J. H. J. M. van der Graaf en ir. P. de Jong van Witteveen + Bos Raadgevende Ingenieurs. Laatstgenoemde vervulde tevens het secretariaat van de werkgroep. Voorzitter was de heer Van Giffen; het programma werd op 4 april 1990 door het Algemeen Bestuur van de STORA vastgesteld. Op het gebied van de biologische defosfatering en het pho-strippen bestaat een raakvlak met het RWZI 2000-programma. Afbakening en overlapping op dit punt worden met name bewaakt door ir. W. van Starkenburg.

Inhoud van het programma

PN's 1992 omvat projecten die naast lopende programma's (onder andere korrelreactor en magnetische defosfatering) op korte termijn moeten worden uitgevoerd om knelpunten en problemen bij de invoering van groot-schalige defosfatering en stikstof-verwijdering op te lossen. Daarnaast zijn enkele belangrijke onderwerpen op het gebied van de slibverwerking opgenomen.

Belangrijke aspecten van PN's 1992 zijn:

- instelling van een platform waarop de zuiverende STORA-deelnemers praktijkervaringen met P- en N-verwijdering kunnen uitwisselen en verspreiden;
- veel onderzoek op pilot-plant- en praktijkschaal om problemen uit de praktijk snel en zeker te kunnen oplossen;
- analyse van technologische, technische en economische randvoorwaarden;
- inbreng van experimenten en proeven die op diverse plaatsen (zullen) plaatsvinden, in het bijzonder met biologische defosfatering;
- aandacht voor de toepasbaarheid van de onderzoeksresultaten, onder meer door het opstellen van handboeken.

Het programma richt zich nagenoeg uitsluitend op technieken die op korte