

# Fluorescentiemetingen van fytoplankton in vivo

## 1. Inleiding

Na zijn afstuderen aan de Landbouwhogeschool te Wageningen heeft de auteur op het laboratorium van de NV Waterwinning-bedrijf Brabantse Biesbosch onderzoek verricht naar de toepassing van de fluorometrie in de praktijk van de oppervlaktewaterwinning.

De fluorometrie van fytoplankton is een recente ontwikkeling ten behoeve van de limnologie en is in Nederland nog niet op rivier- en spaarbekkenwater toegepast. Onder fluorometrie verstaat men het meten



IR. H. VRIJHOF  
Rijksinstituut voor Natuur-  
beheer te Leersum.

van fluorescentie. Fluorescentie is de emissie van straling die volgt op de absorptie van straling.

Na een inleidend literatuuroverzicht wordt enige aandacht besteed aan de theorie van de fluorescentie. Vervolgens wordt de praktische toepassing toegelicht met resultaten afkomstig uit eigen onderzoek. Tenslotte worden op basis van dit onderzoek enige conclusies getrokken ten aanzien van de toepasbaarheid van de fluorometrie in de praktijk.

## 2. Literatuuroverzicht van de fluorometrie van fytoplankton

Het chlorofyl <sup>1)</sup> a-gehalte van een bepaald water verschaft informatie over de biomassa van het fytoplankton in dat water. De spectrofotometrische bepaling van Chl a is bewerkelijk omdat filtratie en extractie van een bepaalde hoeveelheid watermonster noodzakelijk is. Afhankelijk van de gevolgde methode moeten er voor elke bepaling twee of meer golflengten op de spectrofotometer nauwkeurig ingesteld worden.

Chl a is een van de weinige stoffen die rood licht uitstralen na absorptie van blauw licht. De fluorescentie-emissie van Chl a is dan ook een parameter, specifiek voor de biomassa van het fytoplankton.

De fluorometrische bepaling van Chl a is eenvoudiger dan de spectrofotometrische, en enkele malen gevoeliger (Berman, 1972; Kiefer, 1973a). Voor een exacte bepaling is minder watermonster nodig. Het blauwe excitatielicht kan gemakkelijk volledig gescheiden worden van het rode fluorescentielicht.

Extractie is alleen nodig als de grootste

gevoeligheid vereist is. In alle andere gevallen kan het Chl a-gehalte direkt in het watermonster gemeten worden. Kort samengevat kan de fluorescentie van het Chl a op twee manieren gemeten worden:

1. *in vitro*: geëxtraheerd uit de cel en meestal opgelost in een organisch oplosmiddel,
2. *in vivo*: in levende toestand, in de intacte cel of in de chloroplast.

De *in vivo* Chl a-fluorometrie leent zich niet alleen voor afzonderlijke, maar ook voor continue meting in een doorstroomcuve. Continue fluorometrie is tot nu toe vrijwel alleen *in situ* (in het veld of onder veldomstandigheden) toegepast. Voor zover bekend zijn Maerker en Szekiolda (1976) de enigen die een doorstroomcuve hebben gebruikt om hun fytoplanktoncultures te meten.

Een probleem vormde tot voor kort de variabele fluorescentie, die de calibrering ten opzichte van *in vitro* spectrofotometrisch of fluorometrisch bepaalde Chl a-concentraties bemoeilijkt (Glooschenko, 1974). De verhouding *in vivo* fluorescentie/Chl a, het 'fluorescentiegetal' (Kiefer, 1973a, b, c), kan sterk wisselen.

Het fluorescentiegetal hangt onder meer af van de soortensamenstelling van het fytoplankton (Blasco, 1973; Kiefer, 1973a; Strickland, 1968) en van de leeftijd van de populatie (Maerker en Szekiolda, 1976; Tunzi et al., 1974). Voor een bepaalde soort is de verhouding *in vivo* fluorescentie/Chl a constant gedurende de exponentiële groeifase, maar neemt toe zodra er een tekort aan de groeifactoren licht of de nutriënten N, P en Si ontstaat (Blasco, 1973; Kiefer, 1973a, b). Het fluorescentiegetal is per soort negatief gecorreleerd met de concentratie Chl a per cel (Blasco, 1973). Tijdens de meting is (extern) licht als milieu-factor van invloed op de fluorescentie. Aangezien er een competitief verband bestaat tussen de *in vivo* fluorescentie en de fotosynthese (zie 3. theorie) wordt er in het donker ('s nachts) een groter fluorescentiegetal gevonden dan in het licht (overdag) (Blasco, 1973; Kiefer, 1973 a, b). Bij extreem hoge lichtintensiteiten is er sprake van fotoinhibitie: de *in vivo* fluorescentie en de fotosynthese worden in gelijke mate geremd (Kiefer, 1973a, b). Door het toevoegen van de fotosyntheseremmer 3-(3,4 dichloorophenyl)-1,1-dimethylureum (DCMU) wordt de variabele fluorescentie maximaal, en een constante functie van (cellulair) Chl a, onafhankelijk van de fysiologische toestand en de soort (Samuelsson et al., 1978; Slovacek en Hannan, 1977).

Een fluorometrische bepaling van *in vivo* Chl a in fytoplankton voor en na het toevoegen van DCMU, verschaft informatie over:

- a. de concentratie Chl a in het fytoplankton en
- b. de fotosynthetische capaciteit van het fytoplankton (Samuelsson, 1978).

Een correctie voor de afbraakproducten van Chl a, met name de feopigmenten, is *in vivo* niet mogelijk. Kiefer (1973c) stelt echter dat de fluorescentie van de feopigmenten *in vivo* uiterst gering is, zodat het fluorescentiegetal nauwelijks door wisselingen in de concentratie feopigmenten beïnvloed wordt.

## 3. Theorie van de fluorescentie

Voor de theorie van de fluorescentie wordt hier verwezen naar de literatuur, vermeld aan het slot van dit artikel. Een eenvoudig overzicht geeft Richter (1976).

Wij volstaan hier met de opmerking dat de fluorescentie-emissieband in het rode deel van het spectrum ligt, onafhankelijk van de excitatiegolflengte.

In een eenvoudige werkhypothese is de *in vivo* fluorescentie bij kamertemperatuur en lage lichtintensiteiten afkomstig van Chl a 680 in fotosysteem II, aangeduid als 'F687<sub>II</sub> + vibratieband bij 740 nm'. Zie afb. 1. De (relatieve) fluorescentieopbrengst, of de fluorescentie-efficiency, is de quantumopbrengst van de fluorescentie; en is een getal  $\leq 1$ .

$$\varphi_f = \frac{\text{aantal fotonen geëmitteerd}}{\text{aantal fotonen geabsorbeerd}}$$

Afb. 1 - De pigmentsamenstelling van fotosysteem I en II in groenalgen (naar: Govindjee en Braun, 1974; Govindjee en Papageorgiou, 1971).

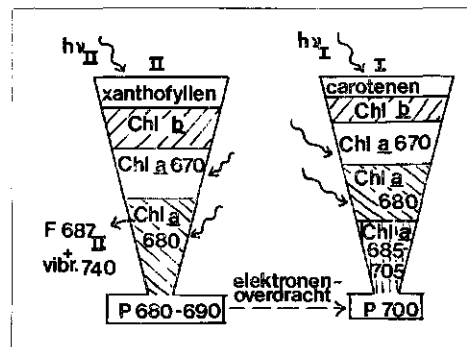
Chl a 670, 680, 685-705 = verschillende Chl a *in vivo*-vormen.

P 680-690 = reactiecentrum Chl a-molecuul fotosysteem II.

P 700 = reactiecentrum Chl a-molecuul fotosysteem I.

(De nummers verwijzen naar de maxima in het rode deel van het absorptiespectrum, P staat voor 'pigment').

In bruinalgen en diatomeeën wordt Chl b vervangen door Chl c, in blauwalgen en roodalgren door fycobilinen.



<sup>1)</sup> In dit artikel afgekort tot: Chl.

De fluorecentieopbrengst is *in vivo* laag, aanzienlijk lager dan de *in vitro* gevonden waarde, aangezien de meeste energie verbruikt wordt in de fotosynthese. De fotosynthese beconcurrert eenvoudig gezegd de fluorescentie, hetgeen blijkt uit de verhoging van de fluorecentieopbrengst wanneer:

- de fotosynthese geremd wordt door vergist(en),
- de fotoreacties verzadigd zijn van licht, of
- de temperatuur verlaagd wordt (Govindje en Papageorgiou, 1970).

Deze bewering is slechts ten dele waar. De excitatieenergie wordt daarnaast voor een belangrijk deel stralingsvrij omgezet in warmte. Slechts enkele procenten zijn beschikbaar voor de emissie van fluorescentie.

$$\varphi_f + \varphi_h + \varphi_p = 1$$

Hierin is: f = fluorescentie, h = warmteverlies en p = fotosynthese. Drie getallen-voorbeelden worden gegeven in onderstaande tabel.

TABEL I - *Quantumopbrengst van de verschillende vervalprocessen van de  $S_1$ -aangeslagen toestand, voor fotosysteem II van de groenalg Chlorella en de blauwalgen Porphyridium en Microcystis. (Ontleend aan Govindje en Braun, 1974).*

	$\varphi_f$	$\varphi_h$	$\varphi_p$
Chlorella	.04	.30	.66
Porphyridium	.02	.30	.68
Microcystis	.02	.38	.60

Samenvattend kan gesteld worden dat de drie genoemde kenmerken van de fluorescentie, te weten het fluorescentie-emissiespectrum, het fluorescentie-excitatiespectrum en de fluorescentieopbrengst, afhankelijk zijn van de volgende parameters:

- de expositietijd en de intensiteit van de belichting
- de spectrale samenstelling van de belichting
- de voorbehandeling
- de toevoeging van chemicaliën
- de temperatuur
- de soort
- de fysiologische toestand.

Tabel II vat de theorie van de fluorescentie nog eens samen.

#### 4. Praktijk: fluorometrie met een filter-fluorometer

De fluorescentie kan eenvoudig direct gemeten worden met een filter-fluorometer (zie afb. 2).

TABEL II - *Overzicht van de fotosynthetische pigmenten in vivo. Toelichting zie tekst.*

fotosynthetische organismen pigmentsamenstelling in:	fotosynthetische pigmenten <i>in vivo</i>						
	chlorofyllen Chl a Chl b		Chl c	fycobilinen fycocyaninen	fycocerythrinen	carotenoïden carotenen	xanthofyllen
hogere planten en groenalgen	+	+				+	+
bruinalgen en diatomeeën	+		+			+	+
blauwalgen en roodalg	+			+(+)	(+)+		
absorptiespectrum <i>in vivo</i> ( $\lambda_{max}$ , in nm)	435 675	480 650	470 645		545	400 —	590
fluorescentie-emissiespectrum <i>in vivo</i> ( $\lambda_{max}$ , in nm)	687 (681)	—	—	—	—	—	—
fluorescentie-excitatiespectrum <i>in vivo</i> (energieoverdracht aan Chl a)	++	+++	+++	+++	+++	+	+

De relatieve intensiteit van de fluorescentie  $I_f/I_0$ , kortweg de relatieve fluorescentie, wordt op de fluorometer aangegeven in relatieve eenheden.

In verdunde oplossing geldt dat de relatieve fluorescentie een lineaire functie is die van de (onbekende) concentratie (Turner, 1972 b):

$$I_f = K \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot \varphi_f$$

waarin:

- K = versterkingsfactor van de fotodetector
- $\varepsilon$  = specifieke extinctiecoëfficiënt [ $m^2 \cdot mg^{-1}$ ]
- c = concentratie [ $mg \cdot m^{-3}$ ]
- d = weglengte (cuvet-diameter) [m]
- $\varphi_f$  = relatieve fluorescentieopbrengst.

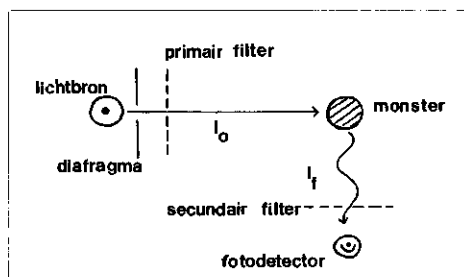
Voor de fluorometrie van Chl a wordt geëxciteerd met blauw licht, dat praktisch volledig gescheiden kan worden van het rode fluorescentielicht.

Om verzadiging van de fotosynthese en fotodestructie van celmateriaal te vermijden worden zeer lage lichtintensiteiten ( $I_0$ ) aangewend.

#### 5. Onderzoek

Ten behoeve van het limnologisch onderzoek van rivier- en spaarbekkenwater op de Waterwinning Brabantse Biesbosch wordt gezocht naar een adequate analytische bepalingmethode, waarmee op snelle wijze de juiste informatie te verkrijgen valt omtrent de biomassa van het fytoplankton.

Afb. 2 - *Diagram van een filter-fluorometer. Toelichting zie tekst.*



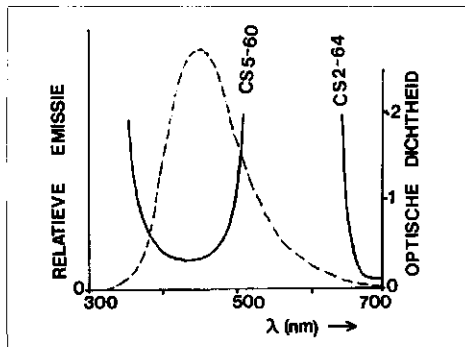
Dit leidde tot de vraag of er een overeenkomst bestaat tussen fluorometer- en spectrofotometerwaarden.

#### 5.1. Methodes

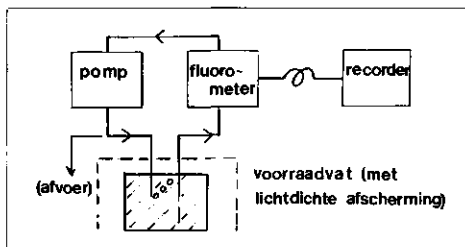
Voor de spectrofotometrische bepaling van Chl a is de methode gevolgd, zoals die is beschreven in het normvoorschrift van de 'Werkgroep Chlorofyl' (1978). De fytoplanktoncellen werden uit het watermonster afgefilterd. De pigmenten werden geëxtraheerd met warme ethanol. Het verschil tussen de extincties van de oplossing, gemeten bij een golflengte van 665 nm (Chl a + afbraakproducten) en 750 nm (troebeling) is een maat voor het Chl a-gehalte in het watermonster. Voor sommige feopigmenten werd gecorrigeerd door de toename van het verschil tussen de extincties na aanzuren te meten. Van bepaalde monsters uit de spaarbekken werd tevens de verhouding tussen de extincties bij 430 en 410 nm bepaald. De verhouding 430/410 is een relatieve maat voor het feofytinegehalte van het fytoplankton. Voor de continue *in vivo* Chl a-fluorometrie van fytoplankton werd de Turner filter-fluorometer, model 111-003, als volgt uitgerust (Turner, 1972a, b 1973):

- lichtbron: Turner 110-853 (blauw)
- primair filter: Turner 110-922 = CS 5-60 (blauw)
- secundair filter: Turner 110-921 = CS 2-64 (rood)
- fotodetector: R-136 (roodgevoelig)
- meetcuvet: Turner 110-880 (doorstroomcuvet). Volume (totaal) = 47 ml, volume (verlichte deel) = 13 ml; inwendige diameter = 19 mm.
- recorder: Shimadzu 0-10 mV = 0-100 eenheden.

Het rode fluorescentielicht werd volledig gescheiden van het blauwe excitatielicht, zoals blijkt uit afb. 3. De opstelling is schematisch weergegeven in een diagram (afb. 4).



Afb. 3 - Het emissiespectrum van de lichtbron 110-853 (Turner, 1972a) en de absorptiespectra van de optische filters (Holm-Hansen et al., 1965).



Afb. 4 - Diagram van de opstelling voor de continue in vivo Chl a-fluorometrie van fytoplankton. Toelichting zie tekst.

De fytoplanktonsuspensie werd vanuit het voorraadvat door de meetcuvet in de fluorometer gepompt met behulp van een slangpomp. Naar keuze kon de suspensie worden rondgepompt of direct worden afgevoerd. Door het debiet van de pomp te wijzigen, kon de expositietijd ( $t_{exp}$ ), dat is de tijd gedurende welke een deeltje van de fytoplanktonsuspensie in het verlichte deel van de meetcuvet verblijft, ingesteld worden. De voordelen van het gebruik van een pomp zijn:

- een blijvende volledige menging van het watermonster, zodat bij gebruik van een doorstroomcuvet van groot volume een versterkt integratie-effekt optreedt;
- $t_{exp}$  is nauwkeurig instelbaar een reproduceerbaar;
- de temperatuur in de meetcuvet blijft constant.

De pomp was achter de fluorometer opgesteld, zodat eventuele luchtballen in het voorraadvat konden ontsnappen. Alle verbindingsslagen, alsmede de pomp waren van ondoorschijnend materiaal, of lichtdicht afgeschermd. Zwart rubber tuinslang voldeed in dit opzicht goed. Ook het voorraadvat kon lichtdicht worden afgeschermd. De relatieve intensiteit van de fluorescentie werd door de fluorometer gemeten en kon op de schrijver (recorder) gemakkelijk worden afgelezen.

De meetprocedure verliep als volgt:

- a. De relatieve fluorescentie werd voor elke reeks metingen op nul gesteld, nadat het primaire of het secundaire filter was afgedekt met een stuk ondoorschijnend zwart karton.
- b. De gewenste diafragmaopening ('lx') werd voor de lichtbron geschoven.
- c. In dit onderzoek werd  $t_{exp} = 1$  s aangehouden. Het debiet van de pomp was dan 760 ml. min.<sup>-1</sup>, hetgeen voor elke reeks metingen werd gecontroleerd. De volgende handelingen werden bij zoveel mogelijk gedempt licht uitgevoerd:
- d. Van twee liter watermonster werd een liter afgezogen over een glasvezelfilter. (Het filter met de afgefilterde fytoplanktoncellen was bestemd voor de spectrofotometrische bepaling.)

e. Het ongefiltreerde watermonster en het bijbehorende filtraat werden geleidelijk op kamertemperatuur (20 °C) gebracht.

f. Van het ongefiltreerde watermonster werd, nadat de pomp was aangezet en de lichtdichte afscherming was aangebracht, de relatieve fluorescentie gemeten.

g. Vervolgens werd ook het filtraat gemeten. Het is niet nodig gebleken het filtraat tegen licht af te schermen.

Voorafgaand aan het rondpompen werd het systeem voorgespoeld met circa 0,5 l van het watermonster. Na elke reeks metingen werd het systeem ruim gespoeld met gedemineraliseerd water. De relatieve fluorescentie werd

afgelezen in relatieve eenheden (0-100) tot op 0,5 % nauwkeurig.

In verband met het meetbereik van de fluorometer werd het watermonster zonodig 1x verdund met filtraat. Voor het geval dat de relatieve fluorescentie snel verliep, werd de waarde na een halve minuut genoteerd. De relatieve fluorescentie van de afgefilterde fytoplanktoncellen wordt gevonden uit:

$$F_{gef} = F_{ongef} - F_{filtr}$$

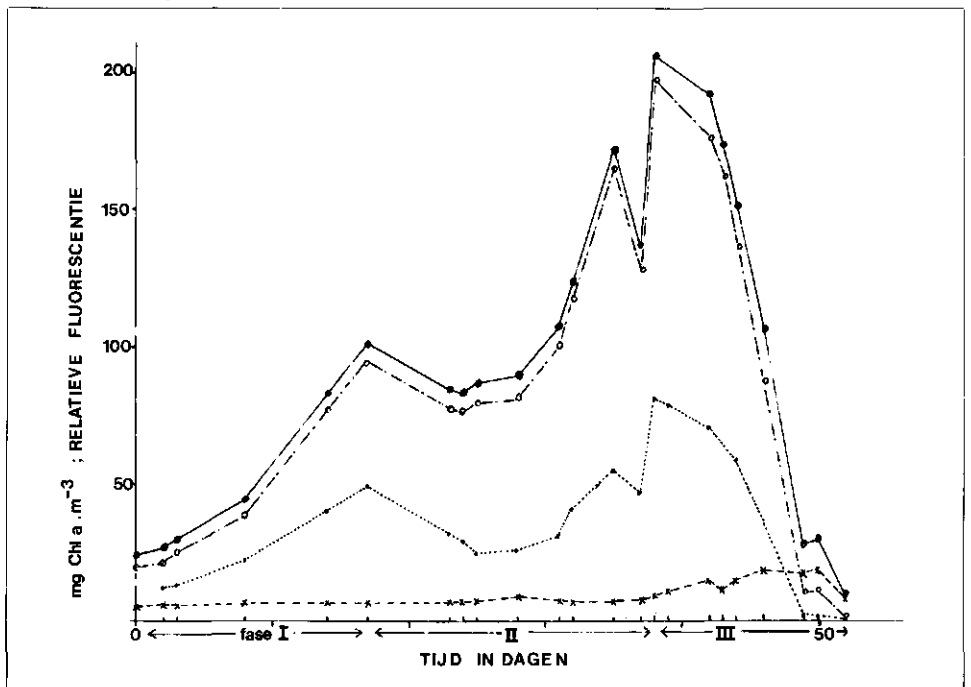
waarin:  $F_{gef}$ ,  $F_{ongef}$  en  $F_{filtr}$  = relatieve fluorescentie van resp. afgefilterd watermonster, ongefiltreerd watermonster en filtraat. Relatieve fluorescenties > 100 werden berekend op grond van 1x verdunnen met filtraat.

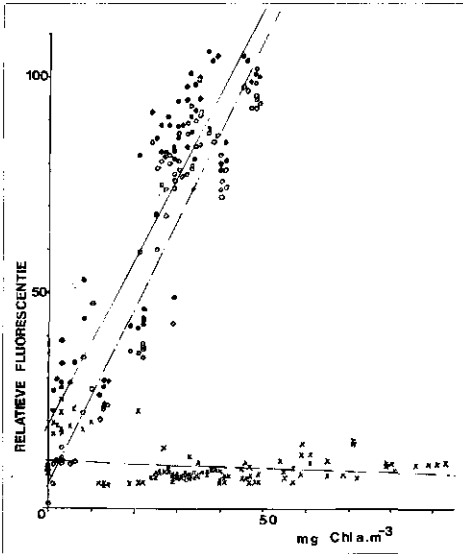
### 5.2. Resultaten

Het verloop van de relatieve fluorescentie tijdens de voorjaarsbloei van fytoplankton in het spaarbekken Petrusplaat is weergegeven in afb. 5. De watermonsters werden genomen op 4 meter diepte, op een vast punt. De meetperiode liep van de eerste week van april tot begin juni 1979. Tevens is het verloop van het spectrofotometrisch bepaalde Chl a-gehalte uitgezet. De toename en de afname van de biomassa van het fytoplankton worden duidelijk weerspiegeld, zowel in  $F_{ongef}$  en  $F_{gef}$ , als in de Chl a-concentratie.

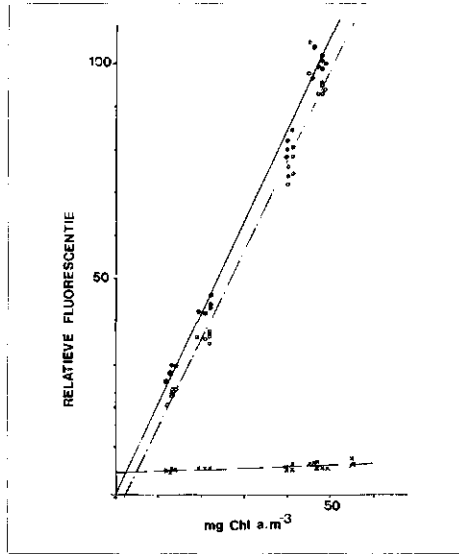
Het verband tussen  $F_{gef}$  en de Chl a-concentratie bleek lineair te zijn. In afb. 6 is dit aangegeven voor metingen aan watermon-

Afb. 5 - De relatieve fluorescentie en de Chl a-concentratie als functie van de tijd, gemeten in het spaarbekken Petrusplaat, voorjaar 1979. Bemonstering bij meetpaal 1 op 4 m diepte.  $F_{ongef}$  —•,  $F_{gef}$  — — —,  $F_{filtr}$  — - - x, Chl a = .....•.

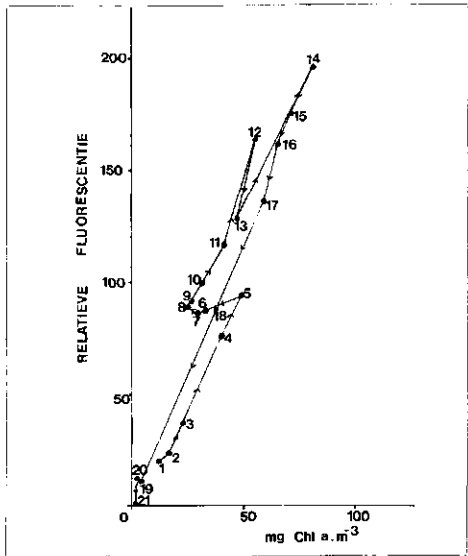




Afb. 6 - De relatieve fluorescentie als functie van de Chl a-concentratie. Spaarbekken Petrusplaat, meetpaal I: 0-12 m, voorjaar 1979.  $F_{ongef}$  = ●,  $F_{gef}$  = ○,  $F_{filtr}$  = -x-



Afb. 8 - De relatieve fluorescentie als functie van de Chl a-concentratie in de beginfase. Spaarbekken Petrusplaat, meetpaal I: 0-12 m, voorjaar 1979.  $F_{ongef}$  = ●,  $F_{gef}$  = ○,  $F_{filtr}$  = -x-



Afb. 7 -  $F_{gef}$  als functie van de Chl a-concentratie in chronologische volgorde. Spaarbekken Petrusplaat, meetpaal I: 4 m, voorjaar 1979.

sters over de gehele waterdiepte (0-12 m), uitgezonderd die, welke door verdunning berekend moesten worden (zie afb. 6). Het evenwijdige verloop van  $F_{ongef}$  en  $F_{gef}$  wordt verstoord door de toename van  $F_{filtr}$ , vooral aan het einde van de bloei-periode.

Wanneer men de  $F_{gef}$ -waarden uit afb. 5 in chronologische volgorde uitzet tegen de Chl a-concentratie, dan blijkt de ligging van de ijklijn per deelperiode verschillend te zijn. Zie afb. 7.

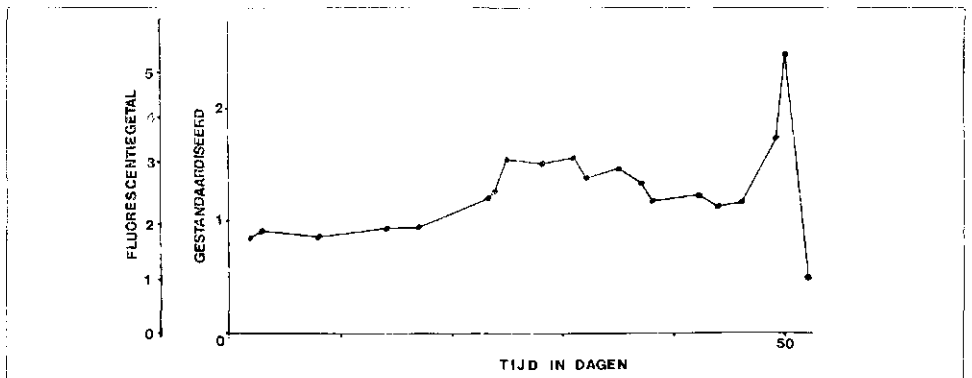
Vooraf in de beginfase, tot aan het eerste maximum in afb. 5 (fase I) en de punten 1 t/m 5 in afb. 7, bleek het verband tussen  $F_{gef}$  en de Chl a concentratie zuiver lineair.

Dit is in bovenstaande afb. (afb. 8) nog eens aangegeven voor waarden over de gehele waterdiepte. Mede op grond van de verhouding 430/410 krijgt men de indruk dat de fytoplanktonpopulatie zich aanvankelijk in een exponentiële groeifase bevond met constante soortensamenstelling. Aangezien  $F_{filtr}$  in deze fase vrijwel constant was, loopt  $F_{ongef}$  praktisch evenwijdig met  $F_{gef}$ . Op grond hiervan zou men het affiltreren achterwege kunnen laten, wat een belangrijke tijdsbesparing betekent. Het affiltreren en op kamertemperatuur brengen van de monsters vergt immers veel meer tijd dan de eigenlijke meting.

Na de beginfase verschuift het lineaire verband. Reeds uit afb. 5 blijkt de verhouding  $F_{gef}/Chl a$ , het fluorescentiegetal, na de beginfase op te lopen van circa 2 tot 3, om vervolgens weer af te nemen (zie afb. 9).

Als men aanneemt dat in fase I vrijwel alleen Chl a aanwezig was, kan een

Afb. 9 - Het fluorescentiegetal als functie van de tijd. Spaarbekken Petrusplaat, meetpaal I: 4 m, voorjaar 1979.



TABEL III - De gevoeligheidsfactor S in relatieve eenheden per mg Chl a.m.<sup>-3</sup>, voor de verschillende monsterpunten. De getallen tussen haakjes zijn berekend tussen fase I uit afb. 5. Overigens zijn waarden voor de gehele meetperiode vermeld.

	S
Hoge Druk Pompstation	1,79 (1,85)
Spaarbekken Petrusplaat, meetpaal I	2,10 (2,06)
Spaarbekken Honderd en Dertig, meetpaal II	1,42
Spaarbekken Honderd en Dertig, meetpaal III	1,37
Inlaatpompstation Kerksloot	1,37
Maas (Keizersveer)	1,09

gevoeligheidsfactor 'S' berekend worden, die gelijk is aan de richtingscoëfficiënt van de  $F_{gef}$ -lijn uit afb. 8. Daar is  $S = 2,06$  relatieve eenheden/mg Chl a.m.<sup>-3</sup>. S wordt in het fluorescentiegetal verwerkt tot een gestandaardiseerd fluorescentiegetal (Kiefer, 1973c):  $S^{-1} \cdot F_{gef}/Chl a$ . Zie afb. 9. Door de standaardisering wordt het mogelijk om het fluorescentiegetal van de verschillende monsterpunten met elkaar te vergelijken. De gevoeligheidsfactor S komt grafisch tot uitdrukking in de helling van de lijn die het verband aangeeft tussen  $F_{gef}$  en de Chl a-concentratie. S liep namelijk voor de verschillende monsterpunten nogal uiteen (zie tabel III).

### 5.3. Storende stoffen bij de bepaling

De fluorometrische bepaling van Chl a wordt gestoord door stoffen die evenals Chl a rood fluoresceren na absorptie van blauw licht.

Glooschenko (1974) noemt met name cellulose en humuszuren. De emissieband van de humuszuren ligt echter bij kleinere golflengten (zogenaamde 'Gelbstoffe', L. A. van Geldermalsen, pers. meded. 1979).

Wanneer de fytoplanktoncellen beschadigd worden, bijv. tijdens het affiltreren, kunnen er pigment-eiwitcomplexen naar de waterige fase diffunderen. De *in vitro*-fluorescentie van chloroproteïnen en biliproteïnen (met een fycobiline als prosthethische groep) kunnen dan zichtbaar worden (zie ook Goedheer, 1972).

In ons onderzoek zijn duidelijke aanwezigingen gevonden dat zulks ook mogelijk is door lysis van fytoplanktoncellen in een gevorderde groeifase of afstervingsfase, of ten gevolge van zoöplankton-grazing. De toename van  $F_{\text{filtr}}$  in afb. 6 illustreert dit: fase II en III (cf. Herbland en Voituriez, 1978).

Bovengenoemde storingen zijn *in vivo*-fluorescenties, afkomstig van opgeloste stoffen die door filtratie verwijderd kunnen worden. In deze gevallen geeft  $F_{\text{ref}}$  de juiste informatie.

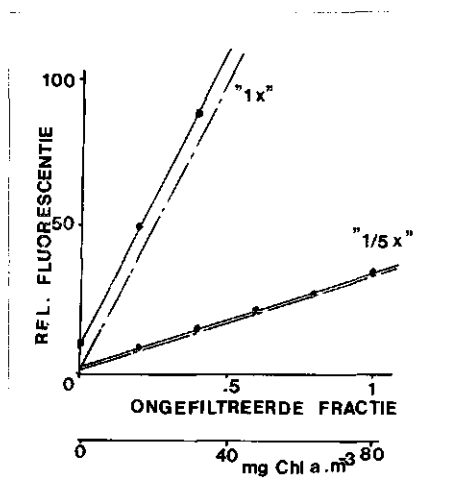
Chl a en Chl-derivaten in het spijsverteringskanaal van fytoplankton worden niet 'gezien', omdat het excitatielicht niet in de dieren kan doordringen, of omdat het zwakke fluorescentielicht niet kan ontsnappen (Samuelsson et al., 1978). Deze informatie kon worden bevestigd voor spaarbekkenwater en rivierwater. Hiertoe werd de relatieve fluorescentie van het ongefiltreerde watermonster ( $F_{\text{ongef}}$ ) gemeten voor en na het afzeven van zoöplankton door een planktonzeefje met een maaswijdte van 100 nm. Ook toen aan het einde van de bloeiperiode (afb. 5: fase III) lage  $F_{\text{ongef}}$ -waarden gemeten werden in combinatie met hoge aantallen zoöplanktoncellen per ml, bleef  $F_{\text{ongef}}$  voor en na het afzeven volkomen gelijk.

De uitdoving, en ook de lichtverstrooiing van de exciterende lichtbundel neemt toe met de concentratie van gesuspendeerde fytoplanktoncellen en andere zwevende deeltjes (= troebeling). Een hoge concentratie van fytoplankton-Chl a kan bovendien leiden tot een sterke reabsorptie van het reeds geëmitteerde fluorescentielicht (Goedheer, 1972; Turner, 1972b). Bij hoge Chl a-concentraties werd een exponentiële afname van de relatieve fluorescentie verwacht (onder andere in Glooschenko, 1974; vergelijk Strickland, 1968). De remedie tegen deze twee afwijkingen van de lineariteit is eenvoudig: verdunnen.

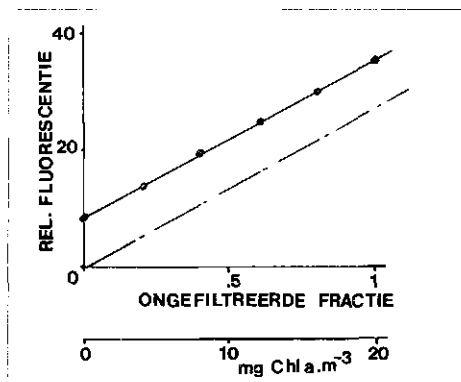
In dit onderzoek kon de literatuur op dit punt niet bevestigd worden. In een verdunningsexperiment met water met maximaal Chl a-gehalte uit het spaarbekken Petrusplaat, nam de relatieve fluorescentie volkomen lineair toe met afnemende verdunning. Om de hoge Chl a-concentraties te kunnen meten, werd een extra kleine diafragmaopening ('1/5 x') toegepast. Geen hinder werd ondervonden van de troebeling door Ca-precipitaat <sup>1)</sup> (zie afb. 10).

In een ander experiment werd water uit de Maas (Keizersveer) verdund. Dit water had een hoog slibgehalte. Het verband tussen

<sup>1)</sup> Dit Ca-precipitaat ontstaat in het bekken ten gevolge van een sterke verhoging van de pH die van biogene aard is en overigens in stand wordt gehouden door dosering van natronloog (deelontharding).



Afb. 10 - De relatieve fluorescentie als functie van de verdunning. Spaarbekken Petrusplaat, voorjaar 1979.



Afb. 11 - De relatieve fluorescentie als functie van de verdunning. De Maas bij Keizersveer, voorjaar 1979.

$F_{\text{ref}}$  en Chl a was hier eveneens volledig lineair (zie afb. 11).

De fluorescenties van bacteriochlorofyllen ( $\geq 750$  nm) zouden kunnen storen. Het voorkomen van bacteriochlorofyl is echter gebonden aan een anaeroob milieu, dat in de spaarbekken juist bestreden wordt door lucht te injecteren.

Protochlorofyl wordt door algen in het donker in het algemeen niet gesynthetiseerd. Bovendien is de fototransformatie bij kamertemperatuur zó efficiënt, dat de bij 675 nm voorspelde fluorescentie-emissie *in vivo* niet gemeten kan worden (Goedheer, 1972).

## 6. Conclusies

1. De toename en de afname van de biomassa van het fytoplankton in rivier- en spaarbekkenwater worden duidelijk weerspiegeld in de relatieve fluorescentie.
2. Bij de metingen in de spaarbekken is vooral in het begin van de voorjaarsbloei een lineair verband waargenomen tussen

de relatieve fluorescentie en de Chl a-concentratie.

3. Tijdens de bloeiperiode in de spaarbekken neemt de relatieve fluorescentie van de opgeloste stoffen steeds meer toe, waarschijnlijk door een combinatie van lysis en zoöplankton-grazing.
4. De gevoeligheid, grafisch tot uitdrukking gebracht in de helling van de lijn die het verband aangeeft tussen de relatieve fluorescentie van het afgefiltreerde watermonster en de Chl a-concentratie, verschilt voor elk monsterpunt.
5. Zoöplankton stoort de *in vivo* fluorometrische bepaling niet, evenmin als de troebeling.
6. Hoge Chl a-concentraties (tot circa  $100 \text{ mg.m}^{-3}$ ) kunnen goed gemeten worden.
7. Tijdens de opkomst van het fytoplankton in de spaarbekken zou het filteren achterwege kunnen blijven.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat de *in vivo* Chl a-fluorometrie een goede mogelijkheid biedt tot bewaking van de biomassa van fytoplankton.

## Dankwoord

De schrijver dankt prof. dr. P. G. Fohr voor zijn waardevolle opmerkingen tijdens de voorbereiding van dit artikel en het kritisch doorlezen van het manuscript, en de medewerkers van het laboratorium van de Waterwinning Brabantse Biesbosch voor hun bijdrage en interesse, zonder welke dit onderzoek niet mogelijk zou zijn geweest, in het bijzonder de medewerkers en de chef van de afdeling Biologie drs. L. W. C. A. van Breemen.

## Literatuur

- in vivo* = *in vivo* Chl a-fluorometrie van fytoplankton.  
*in situ* = *in situ* Chl a-fluorometrie van fytoplankton  
*in vitro* = *in vitro* Chl a-fluorometrie van fytoplankton  
 spectro = spectrofotometrie van Chl a in fytoplankton  
 theorie = theorie van de fluorescentie).
- Berman, T. (1972): Profiles of chlorophyll concentrations by *in vivo* fluorescence: some limnological applications. *Limnol. Oceanogr.* 17: 616-618 (*in situ*).
- Blasco, D. (1973): Estudio de las variaciones de la relación fluorescencia *in vivo*/clorofila a, y su aplicación en oceanografía. *Influencia de la limitación de diferentes nutrientes, efecto del día y noche y dependencia de la especie estudiada.* *Inv. Pesq.* 37: 533-556 (*in vivo*).
- Duysens, L. N. M. (1970): *Photobiological principles and methods.* In: *Photobiology of microorganisms* (P. Halldal, ed.), Wiley-Interscience. 1: 1-16 (theorie).
- Glooschenko, A. (1974): *in vivo* fluorescence techniques. In: *IBP-Handbook no. 12, 2nd ed.* (R. Vollenweider, ed.), 2, 17: 30-1 (*in situ*).

# Ervaring in Canada: NTA tast waterkwaliteit niet aan

Commentaar van ir. N. T. de Oude op het artikel van Stoveland, Lester en Perry

Goedheer, C. (1972): *Fluorescence in relation to photosynthesis*. Ann. Rev. Plant Physiol. 23: 87-112 (theorie).

Govindjee en B. Z. Braun (1974): *Light absorption, emission and photosynthesis*. In: Algal physiology and biochemistry (W. D. P. Stewart, ed.), Blackwell Scientific Publ. 12: 346-390 (theorie).

Govindjee en G. Papageorgiou (1971): *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: Fluorescence transients*. In: Photophysiology; Current topics in photobiology and photochemistry (A. C. Giese, ed.), Academic Press, VI: 1,1-46 (theorie).

Herbland, A. en B. Voituriez (1977): *Relation chlorophylle a-fluorescence in vivo dans l'atlantique tropical. Influence de la structure hydrologique*. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Océanogr., XV (1): 67-77 (in situ).

Holm-Hansen, O.; C. J. Lorenzen; R. W. Holmes en J. D. H. Strickland (1965): *Fluorometric determination of chlorophyll*. J. Cons. perm. int. Explor. Mer. 30 (1): 3-15 (in vivo).

Kiefer, D. A. (1973a): *The in vivo measurement of chlorophyll by fluorometry*. In: Estuarine Microbial Ecology (L. Harold Stevenson en R. R. Colwell, eds.), The Belle W. Baruch Library in Marine Science, no. 1. VI: 421-430 (in vivo, in situ).

Kiefer, D. A. (1973b): *Fluorescence properties of natural phytoplankton populations*. Marine Biology 22: 263-269 (in situ).

Kiefer, D. A. (1973c): *Chlorophyll a fluorescence in marine centric diatom responses of chloroplasts to light and nutrient stress*. Marine Biology 23: 39-46 (in vivo).

Maerker, M. en K.-H. Szekiela (1976): *Chlorophyll determination of phytoplankton: A comparison of in vivo fluorescence with spectrophotometric absorption*. J. Cons. int. Explor. Mer. 36 (3): 217-219 (in vivo).

Richter, G. (1976): *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Eine Einführung in die Physiologie und Biochemie des Primärstoffwechsels*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag: 97-142 (theorie).

Samuelsson, G.; G. Öquist en P. Halldal (1978): *The variable chlorophyll a fluorescence as a measure of photosynthetic capacity in algae*. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21: 207-215 (in vivo).

Slovacek, R. E. en P. J. Hannan (1977): *In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophylla*. Limnol. Oceanogr. 22: 919-925 (in vivo, in situ).

Strickland, J. D. H. (1968): *Continuous measurement of in vivo chlorophyll: a precautionary note*. Deep-Sea Research 15: 225-227 (in vivo).

Tunzi, M. G.; M. Y. Chu en R. C. Bain, Jr. (1974): *In vivo fluorescence, extracted fluorescence, and chlorophyll concentrations in algal mass measurements*. Water Research 8: 623-626 (in vivo, in situ, in vitro).

Turner, G. K., Associates (1972a): *Operating and service manual model III fluorometer*: 1-33.

Turner, G. K., Associates (1972b): *Fluorometry-Principles and Uses; Filter Fluorometers*. In: Turner Laboratory Instruments; 1-12 (theorie).

Turner, G. K., Associates (1973): *Determination of algae in natural waters by fluorometry*. In: Fluorometry reviews (G. K. Turner Associates, eds.) May 1973: 1-4 (in vivo, in situ, in vitro).

Werkgroep Chlorofyl (1978): *De spectrofotometrische bepaling van chlorofyl a volgens normvoorschrift 'Werkgroep Chlorofyl' (spectro)*.

In H<sub>2</sub>O van 2 augustus 1979 verscheen onder de titel 'De invloed van NTA op de metaalbalans in het actief-slibproces' een bijdrage van Stoveland, Lester en Perry over de biologische afbreekbaarheid van en mogelijk metaaltransport door NTA (nitrilotriacetaat). Het artikel bespreekt de vraag of NTA in staat is metalen te transporteren over een rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI) en de mogelijke gevolgen daarvan voor oppervlaktewater.

Dit onderwerp is uitvoerig besproken en bestudeerd in de praktijk — RWZI's in Canada — waar NTA sinds 1970 gebruikt wordt. De ervaring in Canada is dat NTA onder praktische omstandigheden goed verwijderd wordt, de verontreiniging met metalen niet doet toenemen en de kwaliteit van oppervlakte- of drinkwater niet beïnvloedt. Deze studies (zie referenties) over het effect van NTA op metaaltransport, gebruiken woorden als 'hardly discernable, inconclusive, negligible, little practical significance, and little or non-detectable'. Het meest diepgaande rapport over de ecologische effecten van NTA is onlangs gepubliceerd door een werkgroep — onder voorzitterschap van Shapiro — van de International Joint Commission (Canada en de Verenigde Staten). De conclusie daarin is '... the use of NTA does not constitute an obvious environmental hazard' en 'NTA should not be prohibited from use as a detergent builder'.

Stoveland c.s. lieten na in hun artikel een aantal rapporten te vermelden, waarop deze conclusies gebaseerd zijn. Zij hebben daarentegen een laboratoriumexperiment gedaan met synthetisch afvalwater en een niet gedefinieerd inoculum, waaraan NTA of NTP (in feite een mengsel van fosfaten) en verschillende metalen werden toegevoegd. Hun resultaten leidden tot beschouwingen over metaaltransport die veel verder reiken dan het laboratoriumexperiment en in strijd zijn met de resultaten van praktijkstudies. Dit commentaar richt zich op een aantal technische aspecten van het experiment die tot de tegenstrijdige resultaten geleid hebben.

De auteurs vatten hun resultaten samen in een tweetal korte tabellen (tabel IV en V). Helaas geeft tabel IV geen informatie over de statistische variatie in de resultaten; dit maakt het onmogelijk te beoordelen of de gerapporteerde verschillen tussen NTA en NTP significant zijn. De verschillen in verwijderingspercentage die gevonden worden als gevolg van de berekeningsmethode, suggereren dat de variatie niet onaanzienlijk was. Zo geeft bijv. berekeningsmethode A voor de verwijdering van Pb in de aanwezigheid van NTA of van NTP een percentage van 74 resp. 92, terwijl methode B 81, resp. 77 % geeft. Het is dan ook niet

duidelijk hoe aan de hand van deze cijfers geconcludeerd mag worden dat 'de aanwezigheid van sporen NTA in een actief-slibstelsel, dat deze stof naar behoren afbreekt, de verwijdering van ... lood ... uit het effluent in negatieve zin beïnvloedt'. Op maandag, de traditionele wasdag in Nederland, neemt over een periode van enige uren de concentratie aan wasmiddelbestanddelen in afvalwater toe, van de zeer lage waarden gedurende de nacht tot een maximum; daarna neemt de concentratie geleidelijk af. In plaats van deze klokvormige concentratieverandering, gebruiken Stoveland c.s. een sprongsgewijze toename, waarna de hoge concentratie gehandhaafd wordt. Het verwijderingsrendement op een wasdag (tabel VI) heeft blijkens de tekst betrekking op mobilisatie gedurende 50 uur. Aangezien geen enkele wasdag 50 uur duurt, geeft het gebruikte model de praktijk niet juist weer.

De Canadese ervaring en de vele andere studies voorspellen niet noodzakelijk wat er in het Verenigd Koninkrijk of Nederland gebeuren zou, maar die ervaringen zijn wel realistischer dan de hier gerapporteerde laboratoriumstudies. De auteurs hebben gelijk met hun impliciete suggestie dat de bewezen veiligheid van NTA vereist dat een potentieel vervangingsmiddel grondig bestudeerd wordt voor ieder land waar het gebruik — om welke reden dan ook — in overweging wordt genomen. Een evenwichtige, wetenschappelijke beoordeling van NTA moet de vele, niet door Stoveland c.s. vermelde rapporten die o.i. de positieve, hierboven weergegeven conclusies van de IJC-werkgroep rechtvaardigen, in aanmerking nemen.

Ir. N. T. de Oude

Manager Environmental Safety Assessment  
Procter & Gamble European Technical Center, Temselaan 100, B - 1820, Strombeek-Bever

## Referenties

Woodiwiss, C. R., Walker, R. D. en Brownridge, F. A. (1979). *Concentraties van NTA en zekere metalen in Canadese afvalwateren en stromen: 1971 - 1975*. Water Research 13, 599-612.

Wei, N., Stickney, R., Crescuolo, P. en LeClair, B. P. (1979). *Invloed van NTA op een actief-slib waterzuiveringsstation*. Environment Canada, Research Report No. 91.

Matheson, D. H. (1977). *Nitrilotriacetaat (NTA) in het Canadese milieu*. Environment Canada Scientific Series No. 74.

Shannon, E. E., Kamp, L. J. (1973). *Studie van de detergentvervangingsmiddelen aan C.F.S.* Gloucester. Environment Protection Service Report No. EPS 4 - WP-73-3.

Allen, H. E., en Boonlayangoo (1978). *Mobilisatie van metalen uit sedimenten door NTA*. Verh. Internat. Verein. Limnol. 20, 1956-1962.