

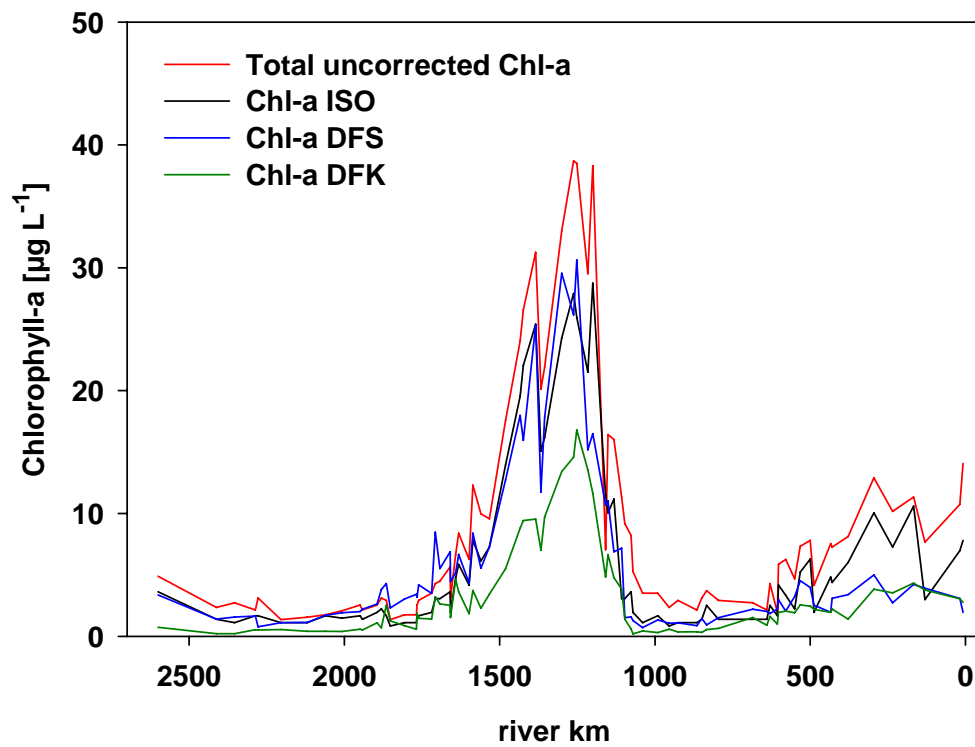
Annex D – Content:

This document includes

- 1. Comparison of Chlorophyll-a according to ISO, DFK and DFS as well as uncorrected total pigment (Chl-a ISO + Phaeopigment)**
- 2. Copy of the International Standard ISO 10260 Chl-a**
- 3. Copy of Bestimmung von Chlorophyll-a DIN 36 412**
- 4. Margalef's Pigment Ratio (Margalef 1960)**
- 5. Calculation of total carotenoids (Parsons et al. 1984)**

1. Chlorophyll-a comparison

Comparison of the longitudinal variation of chlorophyll-a in the Danube, estimated by the ISO extraction technique, Delayed Fluorescence kinetic (DFK) and Delayed Fluorescence Spectrometry (DFS). In addition, total uncorrected pigment (Chl-a ISO + Phaeopigment) is given.



Water quality — Measurement of biochemical parameters — Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration

1 Scope

1.1 This International Standard specifies a method for the determination of the chlorophyll-a concentration. The procedure can be applied for phytoplankton in natural surface waters and for testing algal growth in bio-assays. Using appropriate sampling it can also be applied to phytobenthic communities (see annex A).

1.2 Other algal pigments such as chlorophyll-b and chlorophyll-c and some chlorophyll metabolites do not contribute to the determination. Phaeopigments may be determined semiquantitatively, to correct for interference with chlorophyll-a determination and to indicate the portion of inactive algal biomass.

1.3 Chlorophyll is sensitive to light and oxygen, especially when it is extracted. To avoid oxidative and photochemical destruction, the samples shall not be exposed to bright light or air. Homogenization of the sample may in some cases increase the extraction efficiency.

1.4 The extraction procedure with ethanol involves heating to 75 °C for 5 min to inactivate chlorophyllase and accelerate the lysis of pigments. Storage of extracts (except filters containing suspended matter) prior to photometric measurement should be kept to a minimum, but is possible up to 3 d under refrigeration at 4 °C. Storage of extracts at less than – 25 °C is possible for at least 30 d.

1.5 Even though the procedure involves filtration or centrifugation to clarify the final extract, a slight turbidity may remain. The acidification step may also cause turbidity. Therefore, the absorbance measured at 665 nm has to be corrected for turbidity by subtracting the absorbance measured at 750 nm.

1.6 The pigment of certain rarely occurring phototrophic bacteria (e.g. *Chlorobium*) interferes with the determination of chlorophyll-a concentration [1]. The contribution of chlorophyll-b and chlorophyll-c to the absorbance at 665 nm is negligible [2].

2 Normative references

The following standards contain provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this International Standard. At the time of publication, the editions indicated were valid. All standards are subject to revision, and parties to agreements based on this International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of the standards indicated below. Members of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 5667-1:1980, *Water quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes*.

ISO 5667-2:1991, *Water quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques*.

3 Principle

Collection of algae and other suspended matter from a water sample by filtration. Extraction of algal pigments from the filter residue into hot ethanol. Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration in the extract. Evaluation of the chlorophyll-a and phaeopigment concentration from the difference in absorbance at 665 nm prior to and after acidification of the extract [3] [4].

4 Reagents

Use only reagents of recognized analytical grade and only deionized water of equivalent purity.

4.1 Hydrochloric acid, $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$.

4.2 Ethanol, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$, aqueous solution 90 % (V/V).

NOTE 1 Generally, a denaturant in ethanol does not interfere. Nevertheless, a comparative determination with pure ethanol (90 %) is recommended with each unknown batch [4].

5 Apparatus

Ordinary laboratory apparatus and the following:

5.1 Spectrometer, for use in the visible range up to 750 nm, with a resolution of 1 nm, a bandwidth of 2 nm or less, sensitivity less than or equal to 0,001 absorbance units and with optical cells of path length between 1 cm and 5 cm.

5.2 Vacuum filtration device, filter holder with clamp.

5.3 Glass-fibre filters free of organic binder, for filtration of water samples, retaining more than 99 % of particles greater than 1 μm . Suitable diameters range from 25 mm to 50 mm.

5.4 Filters for filtration of extracts, as described in 5.3 but of small diameter e.g. 25 mm.

Alternative: Centrifuge, with an acceleration of 6 000 g and a rotor suitable for appropriate extraction tubes.

5.5 Water bath, adjustable to $75^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ with a rack for extraction vessels.

5.6 Extraction vessels, e.g. wide-necked amber glass vials with polytetrafluoroethylene (PTFE)-lined screw caps, of typical capacity 30 ml to 50 ml, suitable for centrifugation at 6 000 g .

6 Sampling and storage

Sample according to ISO 5667-1 and ISO 5667-2. Refrigerated storage of water samples in the dark for less than 8 h is acceptable but should be avoided. If possible, perform steps 7.1 to 7.3 immediately after sampling. If necessary, store the raw extracts in air-tight brown glass extraction vessels (5.6) below -25°C for up to 30 d. Do not store frozen water samples or filters plus solids.

7 Procedure

7.1 Filtration

Shake the samples in order to mix thoroughly. Filter a measured volume of sample V_s (normally in the

range 0,1 litre to 2 litres, depending on the concentration of algae) through a glass-fibre filter (5.3) clamped in a suitable holder. Dry the filter in a vacuum, as soon as it is dry remove it from the holder and place it in the extraction vessel. If it does not fit into the extraction vessel, tear it into pieces.

Avoid contact with fingers.

7.2 Extraction variant A

Heat the required volume of ethanol (4.2) to 75°C .

Pour a small volume (usually 30 ml to 40 ml) of the hot ethanol into the vessel containing the filter or filter pieces. After cooling for a few minutes, grind the filter to facilitate extraction, preferably with a rod-shaped homogenizer. Wash the homogenizer rod with a small volume of ethanol (4.2) to remove particles of sample adhering to it. Extract the suspension for at least 3 min.

NOTE 2 Usually the extraction is carried out at room temperature for several hours or overnight. If the extraction is prolonged, or the extract is stored for several days (e.g. over the weekend), the extraction vessels should be stored in a refrigerator.

Filter the slurry through a dense filter (5.4) into a calibrated flask (of capacity 50 ml or 100 ml) with a stopper. Wash the extraction vessel with ethanol (4.2) to remove residual extract and transfer quantitatively while rinsing the filter into the calibrated flask. Fill to the mark, stopper and mix thoroughly. This is the extract volume V_e .

Proceed with step 7.4.

7.3 Extraction variant B

Dispense an exact volume V_E (usually 20 ml or 25 ml) of the ethanol (4.2) into the extraction vessel (5.6) and allow the filter pieces to submerge. Close the screw cap tightly to avoid losses from evaporation of extractant. Shake slightly to resuspend the filter residue. Place the tube in the water bath (5.5) so that the extractant level aligns with the level of the bath. Heat for 5 min, shaking slightly if necessary. Take the extraction vessels from the water bath and allow to cool to room temperature for 15 min.

The time between extraction and measurement should be kept to a minimum.

NOTE 3 Extracts at this stage may be stored in a refrigerator overnight prior to measurement (see 7.4). Prolonged storage shall not exceed 3 d.

Filter the supernatant extract through a filter (5.4) into a clean extraction vessel (5.6) but do not rinse with fresh solvent (see note 4).

Alternatively, centrifuge the extraction vessels for a period which is sufficient to obtain a clear supernatant.

Use a clear extract or supernatant for photometry.

NOTE 4 Using this procedure, it is sufficient to recover merely a part of the extract volume, because the initial volume V_e of extractant is known exactly and is not reduced due to evaporation during extraction because the caps are tightly closed. Furthermore, the residual water content of the filters (see 7.1) is negligible, contributing to far less than 5 % of the extract volume.

7.4 Photometry

7.4.1 Transfer part of the clear extract into the spectrometer cuvette using a pipette, leaving a sufficient volume for the acidification step (see 7.4.2).

Measure the absorbance at 665 nm (A_{665}) and 750 nm (A_{750}) against a reference cell filled with ethanol (4.2).

NOTE 5 The absorbance at 665 nm should fall between 0,01 and 0,8 units. This may be achieved by suitably choosing the water volume filtered, extractant volume, dilution, optical pathlength, etc. To start with, take 0,5 litre of sample, a 50 mm diameter filter, 20 ml of ethanol and a 5 cm cuvette.

7.4.2 Acidify part of the extract (usually 5 ml to 10 ml) with 0,01 ml of hydrochloric acid (4.1) per 10 ml of extract volume, shake and measure the absorbance again at 665 nm and 750 nm, after 5 min to 30 min.

8 Calculation and expression of results

8.1 The chlorophyll-a concentration ρ_c , in micrograms per litre, is calculated according to the equation

$$\rho_c = \frac{(A - A_a)}{K_c} \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{10^3 V_e}{V_s \cdot d} \quad \dots (1)$$

where

$A = A_{665} - A_{750}$ is the absorbance of the extract before acidification (see 7.4.1);

$A_a = A_{665} - A_{750}$ is the absorbance of the extract after acidification;

V_e is the volume, in millilitres, of extract;

V_s is the volume, in litres, of filtered sample;

$K_c = 82 \text{ l}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}$ is the specific operational spectral absorption coefficient for chlorophyll-a (the value is taken from [2]);

$R = 1,7$ is the ratio A/A_a for a solution of pure chlorophyll-a which is transferred to phaeophytin by acidification (see 7.4.2) (the value is taken from [2]);

d is the path length, in centimetres, of the optical cell;

10^3 is the dimension factor to fit V_e .

8.2 The phaeopigment concentration ρ_p , in micrograms per litre, is calculated according to the equation

$$\rho_p = A_a \times \frac{R}{K_c} \times \frac{10^3 V_e}{V_s \cdot d} - \rho_c \quad \dots (2)$$

8.3 When the value 82 is taken for the specific spectral absorption coefficient for chlorophyll-a in 90 % ethanol, and 1,7 is taken for the maximum acid ratio (R) for pure chlorophyll-a, the chlorophyll-a concentration ρ_c in the water sample simplifies to

$$\rho_c = (A - A_a) \times 29,6 \times \frac{V_e}{V_s \cdot d} \quad \dots (3)$$

and for the concentration of phaeopigment, equation 2 simplifies to equation (4)

$$\rho_p = A_a \times 20,8 \times \frac{V_e}{V_s \cdot d} - \rho_c \quad \dots (4)$$

NOTES

6 The calculated values for phaeopigments are less reliable than for chlorophyll-a concentrations. Interlaboratory trials have shown an interlaboratory variation of 5 % to 11 % for chlorophyll-a determinations and 6 % to 46 % for phaeopigment determinations.

7 The ratio A/A_a is 1,7, if only undegraded chlorophyll-a is present in the sample. It is 1, if only degradation products of chlorophyll-a are present in the sample.

The operational absorption coefficient (82) for chlorophyll-a in ethanol (4.2) is derived from the operational absorption coefficient, recommended in [5] at 665 nm. The value (84) given there makes allowance for the presence of chlorophyll-b and chlorophyll-c. The absorbance of equal concentrations of chlorophyll-a in acetone is 2 % to 3 % higher than in ethanol at 665 nm [2] [4].

8.4 Note the results, in micrograms per litre (or milligrams per cubic metre), with at most two significant figures or one figure after the decimal point, for example:

Chlorophyll-a concentration 5,5 µg/l
Phaeopigment concentration < 0,1 µg/l

9 Precision

An interlaboratory trial, carried out in 1983, produced the results [6] given in table 1.

10 Test report

The test report shall include the following information:

- a reference to this International Standard;
- identification of the water sample;
- expression of results, in accordance with clause 8;
- sample pretreatment, if relevant;
- any deviation from this method or any other circumstances which may have influenced the results.

Table 1 — Precision data

Sample	<i>I</i>	<i>n</i>	<i>n_a</i> %	\bar{x} µg/l	σ_r µg/l	VC _r %	σ_R µg/l	VC _R %
A	18	71	0	126,5	5,46	4,3	6,36	5,0
B	18	70	2,8	20,3	3,67	18,1	2,90	11,3
C	17	67	5,6	24,6	2,21	9,0	2,8	11,4

I is the number of laboratories
n is the number of values
n_a is the percentage of outliers
 \bar{x} is the total mean

σ_r is the repeatability standard deviation
VC_r is the repeatability variation coefficient
 σ_R is the reproducibility standard deviation
VC_R is the reproducibility variation coefficient

Annex B
(informative)

Bibliography

- [1] TOLSTOY, A. and TOTH, I., Bacteriochlorophyll-d and its interference on determination of chlorophyll-a, *Arch. Hydrobiol.* **89** (1980), pp. 160-170.
- [2] NUSCH, E.A., Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination, *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **14** (1980), pp. 14-36.
- [3] LORENZEN, C.J., Determination of chlorophyll and phaeopigments; spectrophotometric equations, *Limnol. Oceanogr.* **12** (1967), pp. 343-346.
- [4] MARKER, A.F.H., NUSCH, E.A., RAI, H. and RIEMANN, B., The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: Conclusions and recommendations, *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **14** (1980), pp. 91-106.
- [5] VOLLENWEIDER, R.A., A manual on methods of measuring primary production in aquatic environments, *IBP Handbook No 12*, 2nd ed. (1971) Blackwell Scient. Publ. Oxford, Edinburgh.
- [6] NUSCH, E.A., Results from an interlaboratory ring test concerning the determination of chlorophyll a, *Z. Wasser Abw. Forsch.* **17** (1984), pp. 189-194.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Testverfahren mit Wasserorganismen
(Gruppe L)

Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes von Oberflächenwasser (L 16)

DIN

38 412

Teil 16

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L);
determination of chlorophyll-a in surface water (L 16)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues; essais biologiques (groupe L);
détermination du chlorophyll-a dans l'eau de surface (L16)

Einsprüche bis 31. Okt. 1984

Anwendungswarnvermerk
auf der letzten Seite beachten!

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Erläuterungen).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Das Verfahren kann auf alle Oberflächenwässer, in denen sich Phytoplankton entwickelt, angewandt werden. Es ist geeignet, bei biologischen Tests zur Prüfung der Toxizität oder Produktivität von Wässern bzw. von in Wasser gelösten Stoffen das Wachstum (Zellvermehrung) von Algen zu quantifizieren. Die Bestimmung des Pigmentgehaltes benthischer Algen oder von Sedimenten erfordert eine entsprechende Modifikation bei der Probenahme. Akzessorische Pigmente (z. B. Chlorophyll-b und -c) sowie verschiedene Chlorophyllabbauprodukte (z. B. Chlorophyllide) lassen sich mit diesem Verfahren nicht bestimmen.

2 Allgemeines

Chlorophyll-a ist das bei allen grünen Pflanzen vorhandene essentielle Photosynthesepigment.

Der Chlorophyllgehalt einer Wasserprobe kann Aufschluß über den Trophiegrad eines Gewässers geben. Wenn dieser Wert auch nicht als absolutes Maß für die Phytoplanktonbiomasse gelten kann, gibt die Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes gemeinsam mit anderen Biomasse- und Bioaktivitätsparametern Auskunft über das mengenmäßige Vorkommen und die potentielle Stoffwechselleistung des Phytoplanktons in Gewässern. Als wichtigste primäre Abbauprodukte des Chlorophylls gelten Phaeophytin und Phaeophorbide. Das Verhältnis von Chlorophyll-a- zu Phaeopigmentkonzentration kann Hinweise auf den physiologischen Zustand der Algenzellen geben.

3 Grundlage des Verfahrens

Die Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes beruht auf der spektrophotometrischen Messung eines Extraktes aus dem Filterrückstand einer Wasserprobe, Schlammprobe oder Aufwuchsfläche. Durch Vergleichsmessung nach quantitativer Überführung des Chlorophylls in Phaeopigmente (Phaeophytin und Phaeophorbide) wird auf den ursprünglichen Chlorophyllgehalt der Wasserprobe rückgeschlossen.

4 Störungen

Chlorophyll ist, besonders in extrahierter Lösung, sehr lichtempfindlich. Wenn der Extrakt längere Zeit hellem Licht ausgesetzt wird, ist mit photochemischer Zerstörung des Pigments zu rechnen. Konzentrationsänderungen durch Verdunsten des Extraktionsmittels sind zu vermeiden.

Bei Verwendung ungeeigneter Filter können bei der Extraktion oder nach dem Ansäuern des Extraktes Trübungen auftreten.

Wenn diese bei einer Schichtdicke von 1 cm einen Extinktionswert von 0,005 übersteigen, ist der Extrakt durch erneutes Filtrieren oder Zentrifugieren zu klären. Ein Vergällungsmittel im Ethanol stört im allgemeinen die Bestimmung nicht. Dennoch wird bei jeder unbekannten Liefercharge eine Kontrollbestimmung im Vergleich mit reinem Ethanol ($w = 90\%$) empfohlen. Pigmente (selten vorkommender) autotropher Bakterien (z. B. Chlorobium-Chlorophyll, „Bacterioviridin“) können die Chlorophyll-a-Bestimmung stören. Die Störung durch Chlorophyll-b und -c ist vernachlässigbar klein.

5 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur Bestimmung von Chlorophyll-a (L 16):

Verfahren DIN 38 412 – L 16

6 Geräte *) und Chemikalien

6.1 Filtriereinrichtung, z. B. Wasserstrahlpumpe mit Saugflasche nach DIN 12 476

*) Auskunft über geeignete Geräte (z. B. Filtrierapparate, Homogenisatoren) und Materialien (z. B. Filter) sowie deren Hersteller erteilt auf Anfrage der Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN, Burggrafestraße 4–10, 1000 Berlin 30.

Fortsetzung Seite 2 bis 4

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit Genehmigung des DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, gestattet.

6.2 Filtrationsaufsatz mit Glasfritte oder Porzellannutsche

6.3 Filtrierapparat zur Aufnahme eines Meßkolbens (Abschnitt 6.7), z. B. Wittscher Topf, Höhe 200 mm, lichte Weite 150 mm mit Seitentubus oder Seitenrohr für Schlauchansatz, Planschliffdeckel mit Mitteltubus, rauhgeschliffen für Gummistopfenverbindung

6.4 Homogenisator, vorzugsweise stabförmig; ersatzweise auch Mörser mit Ausgießer

6.5 Extraktionsgefäß; lichtgeschützt, z. B. Weithalsflaschen aus Braunglas mit Schraubverschluß, Nennvolumen etwa 100 ml

6.6 Glasfaserfilter aus Borosilicatglas, ohne organischen Binder, 0,2 bis 0,4 mm dick, Abscheideleistung > 99 % für Partikel > 1 µm

6.7 Meßkolben, z. B. DIN 12 664 – MSA 100

6.8 Gefäß, z. B. Erlenmeyerkolben, mit Kühleraufsatz

6.9 Rundfilter, z. B. nach DIN 12 448 (Blauband)

6.10 Ethanol, C₂H₅OH, w = 90 %

6.11 Salzsäure, c(HCl) = 2 mol/l

7 Durchführung

– Je nach dem Trophiegrad und der zu erwartenden Algenkonzentration nach ausreichender Homogenisierung der Probe ein abgemessenes Volumen (bei Phytoplanktonproben etwa 0,5 bis 2 l) über ein geeignetes Filter filtrieren.

Anmerkung: Zur Filtration der Wasserproben sollen vorzugsweise Glasfaserfilter nach Abschnitt 6.6 benutzt werden. Bei Verwendung von anderen Filtern, z. B. Membranfiltern, ist deren Eignung hinsichtlich Rückhaltevermögen, Änderung des spezifischen Absorptionskoeffizienten und des Auftretens von Trübungen im Extrakt zu überprüfen. Zur Erhöhung des Rückhaltevermögens der Glasfaserfilter wurde ein Zusatz von MgCO₃ empfohlen. Bei Verwendung geeigneter Filter kann darauf verzichtet werden, zumal es Hinweise gibt, daß Chlorophyllabbauprodukte bei längerer Lagerung an MgCO₃ adsorbiert werden können.

– Das zur Extraktion erforderliche Volumen an Ethanol in einem Gefäß mit aufgesetztem Kühler zum Sieden (78 °C) erhitzen.

– Nach der Filtration der Wasserprobe das mit Algen belegte Filter falten, in Stücke reißen und im Extraktionsgefäß mit etwa 30 ml heißem Ethanol übergießen.

Anmerkung: Die vorstehenden Tätigkeiten können auch im Feld durchgeführt werden, wobei sich Thermosgefäße zur Mitnahme des heißen Ethanols bewährt haben. Die Filter können in Ethanol bis zur weiteren Behandlung aufbewahrt und transportiert werden.

- Nach dem Abkühlen die Filter im Extraktionsgefäß mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinern.
- Am Homogenisatorstab oder an den Gefäßwänden anhaftende Faserteilchen mit kleinen Ethanolmengen abspülen.
- Falls kein Homogenisator verfügbar ist, kann das Filter auch in einem Mörser mit etwa 5 ml Ethanol zerkleinert und das Homogenisat anschließend mit ungefähr 30 ml heißem Ethanol in das Extraktionsgefäß gespült werden. Die Extraktionsdauer beträgt in der Regel etwa 6 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Anmerkung: Aus arbeitstechnischen Gründen wird das Homogenisat zur Extraktion meist über Nacht stehen gelassen. Bei längerer Extraktionsdauer (> 24 Stunden) soll die Extraktion im Kühlschrank erfolgen. Achtung: Auffüllen und Messen darf erst nach Temperaturgleich erfolgen!

Bei Schnellanalysen mit kürzerer Extraktionsdauer (< 6 Stunden) wird das Filterhomogenisat im Wasserbad bis zum Sieden etwa 1 bis 2 Minuten erhitzt. Achtung: Längeres Sieden sowie Verdunstungs- und Spritzverluste sind zu vermeiden!

- Nach der Extraktion das Homogenisat durch ein Papier-Rundfilter (Blauband) filtrieren. Das klare Filtrat in einem Meßkolben, der in einem lichtgeschützten Filtrierapparat steht, auffangen.
- Das Filter mit dem zum Spülen des Extraktionsgefäßes benutzten Ethanol nachwaschen.

Anmerkung: Der Filtrierapparat kann mit Hilfe einer lichtundurchlässigen Folie oder durch Lackierung – mit Ausnahme eines Sichtfensters – vor übermäßigem Lichteinfall geschützt werden. Der Extrakt mag auch durch Zentrifugation (10 bis 20 Minuten bei etwa 100 Umdrehungen/s oder 5600 g) geklärt werden.

- Die klare Pigmentlösung im Meßkolben mit Ethanol bis zur Marke auffüllen, umschütteln und vor Licht schützen,
- die Extinktion bei 665 nm gegen Ethanol (90 % v/v) in der Vergleichsküvette bestimmen.

Falls trotz Filtration oder Zentrifugation eine Trübungskorrektur erforderlich ist, wird die Lösung bei 750 nm gegen Ethanol gemessen.

Anmerkung: Durch entsprechende Wahl der Anwendungsmenge, des Extraktionsvolumens, der Küvettenlänge, Verdünnung und anderes ist sicherzustellen, daß die gemessenen Extinktionswerte in den für photometrische Messungen geeigneten Extinktionsbereich fallen. Falls Filterphotometer benutzt werden, muß ein Korrektur-Faktor gegenüber einem korrekt justierten (anhand der 656 nm H-Linie überprüfen) Spektralphotometer ermittelt werden.

- Zur Differenzierung des Chlorophyll-a- und zur Bestimmung des Phaeopigmentgehaltes den Extrakt, gegebenenfalls ein Teilvolumen, mit 0,3 ml Salzsäure je 100 ml ansäuern, umschütteln und die Extinktion bei 665 nm (gegebenenfalls auch bei 750 nm) gegen angesäuertes Ethanol in der Vergleichsküvette nach 3 bis 30 Minuten erneut bestimmen.

8 Auswertung

Der Chlorophyll-a-Gehalt wird nach der Gleichung berechnet:

$$\beta_c = (A_v - A_n) \cdot \frac{R}{R - 1} \cdot \frac{V_E}{V_P \cdot d} \cdot \frac{10^3}{\alpha} \quad (1)$$

Hierin bedeuten:

β_c Massenkonzentration des Chlorophyll-a, in $\mu\text{g/l}$

A_v Extinktion des Extraktes vor Ansäuerung, gemessen bei 665 nm

A_n Extinktion nach Ansäuerung, gemessen bei 665 nm (gegebenenfalls Trübungskorrektur beider Extinktionswerte durch Subtraktion des Extinktionswertes bei 750 nm)

R Verhältnis von $A_v : A_n$ für reines Chlorophyll-a („Säurequotient“)

V_E Volumen des Extraktes, in ml

V_P Volumen der filtrierten Wasserprobe, in l

d Schichtdicke der Küvette, in cm

α spezifischer Absorptionskoeffizient für Chlorophyll-a, $\text{l}/\mu\text{g} \cdot \text{cm}$

Wenn der spezifische Absorptionskoeffizient α für Chlorophyll-a in Ethanol zu 82 und der Quotient R für reines Chlorophyll-a zu 1,7 angenommen wird, lautet die Gleichung:

$$\beta = 29,6 (A_v - A_n) \cdot \frac{V_E}{V_P \cdot d} \quad (2)$$

Der Phaeopigmentgehalt kann nach folgender Gleichung errechnet werden:

$$\beta_P = 20,8 \cdot A_n \cdot \frac{V_E}{V_P \cdot d} - \beta_c \quad (3)$$

Hierin bedeutet:

β_P Phaeopigmentgehalt, in $\mu\text{g/l}$

9 Angabe des Ergebnisses

Die Massenkonzentrationswerte werden auf $1 \mu\text{g/l}$ gerundet angegeben (höchstens 3 signifikante Stellen).

10 Verfahrenskenndaten

Bei einem Ringversuch zur Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes dreier Wasserproben, durchgeführt im Juni 1983, wurden folgende Werte ermittelt:

Probe	L	N	A %	\bar{x} $\mu\text{g/l}$	SR $\mu\text{g/l}$	VR %	SI $\mu\text{g/l}$	VI %
A	18	71	0	126,5	6,36	5,0	5,46	4,3
B	18	70	2,8	20,3	2,90	11,3	3,67	18,1
C	17	67	5,6	24,6	2,8	11,4	2,21	9,0

Hierin bedeuten:

L Anzahl der Laboratorien

A Anteil der Ausreißer, in %

\bar{x} Gesamtmittelwert, in $\mu\text{g/l}$

SR Vergleichsstandardabweichung, in $\mu\text{g/l}$

VR Vergleichsvariationskoeffizient, in %

SI Wiederholstandardabweichung, in $\mu\text{g/l}$

VI Wiederholvariationskoeffizient, in %

Anmerkung: Bei der Berechnung der Verfahrenskenn-
daten wurden auch die Ergebnisse der Labora-
torien berücksichtigt, die aufgrund unzureichender
Homogenisierung der Proben beim Ringversuch
laborinterne Ausreißer oder zu hohe Wiederhol-
standardabweichungen aufwiesen und demzufolge
nach DIN 38402 Teil 42 hätten eliminiert werden
können.

11 Analysenbericht

Der Bericht soll sich auf dieses Verfahren beziehen und
folgende Einzelheiten enthalten:

- Genaue Identifizierung der Wasserprobe
- Angabe des Ergebnisses nach Abschnitt 9
- Probenvorbehandlung, falls eine solche durchgeführt wurde
- Jede Abweichung von diesem Verfahren und Angabe aller Umstände, die gegebenenfalls das Ergebnis beeinflusst haben.

Normierte Normen

- IN 12 448 Laborgeräte aus Papierfaserstoffen; Papierfilter
IN 12 476 Laborgeräte aus Glas; Saugflaschen, konische Form
IN 12 664 Teil 1 Laborgeräte aus Glas; Meßkolben mit einer Marke; Meßkolben mit Bördelrand, Kegelhülse und Kegelschliffverbindung
IN 38 402 Teil 42 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Allgemeine Angaben (Gruppe A); Ringversuche, Auswertung (A 42)

Weitere Unterlagen

- [Nusch, E. A., und Palme, G.: Biologische Methoden für die Praxis der Gewässeruntersuchung; I. Bestimmung des Chlorophyll-a- und Phaeopigmentgehaltes in Oberflächenwasser; Gas- und Wasserfach 116 (12), (1975), 562-565
[Nusch, E. A.: Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination; Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14, (1980), 14-36
[Marker, A. F. H., Nusch, E. A., Rai, H., und Riemann, B.: The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: Conclusions and recommendations; Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14, (1980), 91-106
[Nusch, E. A.: Ergebnisse eines Ringversuchs von 18 Laboratorien zur Bestimmung des Chlorophyll-a- und Phaeopigmentgehaltes in Wasserproben; Z. Wasser Abwasser Forsch. (in Vorbereitung)

Erläuterungen

Der vorliegende Norm-Entwurf enthält das vom Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN und der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker gemeinsam erarbeitete „Deutsche Einheitsverfahren“

„Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes von Oberflächenwasser (L 16)“.

Darüber hinaus werden alle bisher in dem Loseblattwerk „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ der Verlag Chemie GmbH, Weinheim, enthaltenen Einheitsverfahren sukzessive in das Deutsche Normenwerk übernommen, so daß nach einer Übergangszeit sämtliche Einheitsverfahren als DIN-Normen vorliegen. Die DIN-Normen veröffentlichten Einheitsverfahren sind beim Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefaßt erhältlich.

Das obengenannte Loseblattwerk des Verlages Chemie wird daneben mit den genormten Einheitsverfahren weiterblanzt werden.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38 402)
physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38 404)
Metallionen (Gruppe D)	(DIN 38 405)
Organismen (Gruppe E)	(DIN 38 406)
Gemeinsam erfaßbare Stoffe (Gruppe F)	(DIN 38 407)
Stoffliche Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38 408)
Toxikologische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38 409)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38 411)
Verfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38 412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38 413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38 414)

Für die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt Ihnen die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen im VDE Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon (030) 26 01-4 23, oder der Beuth Verlag GmbH, Postfach 11 07, 1000 Berlin 30, gerne Auskunft.

Anwendungswarnvermerk

Der Norm-Entwurf wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Falls die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten an den Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstraße 4-10, 1000 Berlin 30.

RAPP. PROC-VERB. REUNIONS XV(2) 1960

277- 281

VALEUR INDICATRICE DE LA COMPOSITION DES PIGMENTS DU PHYTOPLANKTON SUR LA PRODUCTIVITÉ, COMPOSITION TAXONOMIQUE ET PROPRIÉTÉS DYNAMIQUES DES POPULATIONS

par R. MARGALEF

Introduction. La détermination quantitative du phytoplancton par la méthode du titrage des pigments solubles en acétone donne des chiffres qu'on ne peut pas accepter comme une mesure de la biomasse ni de la productivité (MARGALEF, 1954). La proportion de chlorophylle et d'autres pigments dans les cellules des organismes du plancton varie entre des limites fort larges : il n'est donc pas question de trouver un coefficient fixe pour passer de chlorophylle ou d'unités de pigment à poids sec. Une même quantité de pigment assimilateur, dans des conditions écologiques similaires, représente une production nette plus basse quand la masse de matière vivante qui respire est plus élevée. Il s'ajoute l'extraordinaire persistance des pigments dans les organismes morts et dans le milieu. Un autre élément perturbateur sont certains pigments du zoo-plancton. Malgré tout, il faut convenir que, même dans la forme imparfaite plus usée actuellement (expression en « unités Harvey » ou en « milligrammes de chlorophylle a » basée dans des déterminations faites sur une étroite bande spectrale) la méthode de l'extraction des pigments est très rapide et très exacte. Cette exactitude par rapport aux pigments et tout développement de la méthode doit viser à établir une concordance raisonnée et prévisible entre quantité des pigments et propriétés quantitatives et qualitatives des populations planctoniques.

Un progrès considérable est atteint quand on dispose des spectres d'absorption des extraits, par exemple entre 370 et 750 m μ . RICHARDS (1952), RICHARDS et THOMPSON (1952) et DUXBURY et YENTSCH (1956) ont fait le travail préalable pour simplifier la computation des quantités de chlorophylle a, b, c (les correspondantes phéophylines donnent des spectres très semblables) et de deux fractions de caroténoïdes à partir de tels spectres. Il suffit de connaître la densité optique des solutions à un nombre assez réduit de longueurs d'onde (480, 510, 630, 645, 665 m μ ; en sus 750 m μ comme contrôle de la turbidité de l'extract). On peut cartographier, par exemple, la distribution quantitative des différents pigments, ainsi que certains rapports intéressants (caroténoïdes/chlorophylle a + b, chlorophylle b/chlorophylle a + b, etc.). Les cartogrammes obtenus sont, en général, extrêmement significatifs. Évidemment, l'utilité de ces procédés en océanographie biologique dépend toujours de la connaissance que nous avons des rapports entre les caractéristiques des pigments et la composition taxonomique et l'état physiologique des populations desquelles ils dérivent.

Différences pigmentaires entre espèces. On possède des données sur la composition des pigments dans les différents groupement d'algues, qui peuvent fournir un point de départ. Mais ils ne sont pas suffisants. Il faut disposer d'une grande quantité de spectres des pigments de différents types du plancton *naturel*, de composition bien déterminée, telle que composition taxonomique, poids sec et, éventuellement, composition chimique. Nous avons réuni un certain nombre de tels spectres. Le simple rapport D_{430}/D_{665} (D est la densité optique, et le sous-indice, la longueur d'onde) est très significatif : il est de l'ordre de 3-3,5 dans un plancton à diatomées et monte à 4,5-6 dans un plancton composé principalement par des dinoflagellés. Un point très important est que la qualité du complexe pigmentaire est en rapport assez étroit avec la quantité relative de pigment, c'est-à-dire, avec le rapport quantité d'un quelconque des pigments/poids sec.

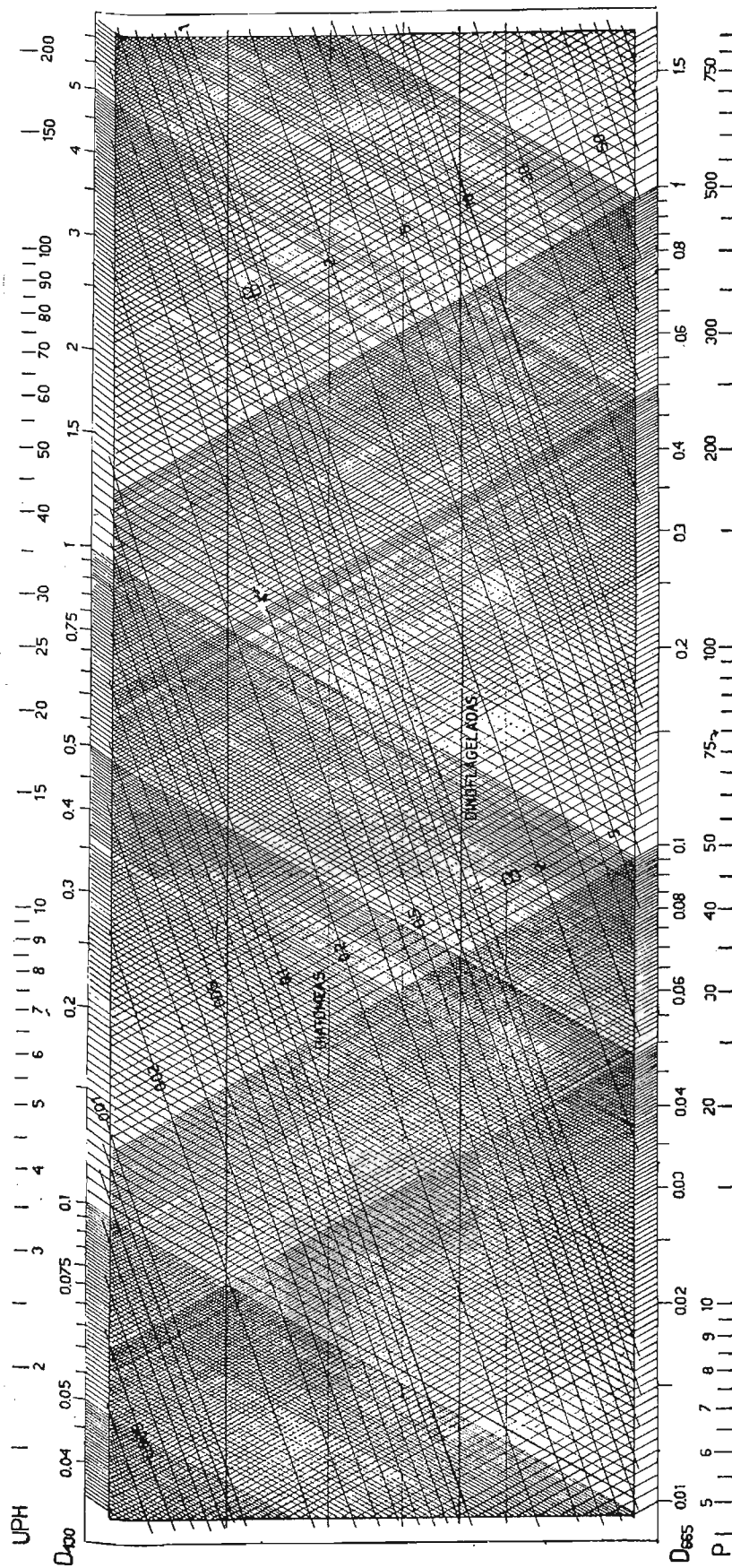


Fig. 1. — Nomogramme pour la représentation des caractéristiques du phytoplancton. Chaque point appartient à quatre échelles logarithmiques et peut être défini par les valeurs dans deux d'entre elles. D est la densité optique ($D = \log_{10} [100/\% \text{ de lumière transmise}]$) d'un extrait du plancton en acétone à 90% (1 l d'eau extrait en 1 ml d'acétone) à deux longueurs d'onde : 430 et 665 millimètres. D_{430} conserve une correspondance linéaire avec la quantité d'unités Harvey (UPH). D_{665} est, probablement, linéairement proportionnel à l'ordre de grandeur de la productivité (P en mg de poids sec par jour et m^2). Les lignes horizontales relient les points qui correspondent à une semblable composition qualitative du phytoplancton et à un semblable rapport production/biomasse. De haut en bas on trouve une participation croissante de dinoflagellés et une diminution de la productivité relative à la biomasse. Les lignes obliques qui vont de l'angle inférieur gauche au supérieur droit, relient les points dont la biomasse est semblable; les valeurs sont en mg/l ou g/m³ de poids sec sans cendres. Le monogramme peut être employé en considérant toutes les valeurs numériques multipliées ou divisées par 10. Les valeurs de la biomasse et de la productivité sont provisoires. L'expression de la biomasse est voisine de celle donnée dans la formule du texte, mais les exposants sont légèrement différents, pas entiers et plus ajustés aux déterminations empiriques.

Différences pigmentaires dans une même espèce. La composition des pigments et leur concentration totale change même dans une espèce. Différentes populations d'une espèce et échantillons pris dans une population unispécifique à des moments successifs montrent, d'ordinaire, des différences considérables. Ceci est très visible dans les cultures à gradient (HOLLDAL, 1958). La concentration de chlorophylle varie même au cours du développement d'une cellule (SOROKIN, 1958). On accepte qu'une accumulation de carotinoïdes est l'indice d'une nutrition déficiente. Quand une culture devient sénile et que la capacité nutritive du milieu est utilisée, les cellules accumulent des carotinoïdes (MEIER, 1929). KINGSBURY (1956) et ODUM et HOSKIN (1957) observent un changement du maximum d'extinction vers le jaune quand les cultures de cyanophycées vieillissent, même sans arrêt de la croissance. D'après KETCHUM (1957) dans *Dunaliella euclora* le rapport chlorophylle a/carotinoïdes et le rapport photosynthèse nette/photosynthèse brute sont en relation. Ce changement des pigments est simplement un aspect de la succession chimique, c'est-à-dire, du changement de la composition chimique au cours de la succession, avec diminution des protides et augmentation finale des lipides (WASSINK, 1954).

J'ai fait des déterminations spectrophotométriques périodiques des pigments dans des cultures de 5 chlorophycées d'eau douce : le vieillissement et le ralentissement de la multiplication se reflètent en un incrément de la quantité relative de carotinoïdes et, parfois, de la chlorophylle c, en même temps que la quantité totale des pigments décroît. Les cellules qui se sédimentent dans les cultures peu ou pas agitées, montrent en majeur degré, des changements analogues que les cellules qui restent en suspension. Dans les culturesensemencées avec des inocula venant de cultures vieilles, la composition des pigments de celles-ci ne se perd pas rapidement dès les premières divisions, mais se conserve pendant quelques jours. Dans *Chlorella pyrenoidosa* le rapport chlorophylle a/carotinoïdes (mg/unités; RICHARD with THOMPSON, 1952) est de 1,66 dans des cultures âgées qui ne croissent plus; après dilution (1:25) et rapide multiplication, le rapport maximum (2,85) n'est atteint que 13 jours après. En *Scenedesmus obliquus* le rapport maximum (2,1) est atteint 8 jours après inoculation avec des algues ayant un rapport initial de 0,53. Il y a donc une sorte d'inertie. Le taux relatif de chlorophylle b est plus élevé au moment de la multiplication la plus intense, dans *Ankistrodesmus nanmoselene* et peut-être aussi dans *Scenedesmus obliquus*. Mais d'ailleurs, dans le plancton marin en conditions naturelles, il semble qu'un rapport chlorophylle b/chlorophylle a + b élevé peut indiquer une fraction considérable de plancton mort, en vue d'une résistance probable plus grande de la chlorophylle b aux agents destructeurs.

Valeur générale des pigments comme indicateurs de succession. Un fait notable est que la succession des communautés naturelles représente une restructuration du système photosynthétiseur toujours dans le même sens, qu'il s'accomplisse par modification d'une seule souche (exemples cités) ou par sélection et concurrence entre différentes espèces (substitution des diatomées par des dinoflagellés dans le plancton marin, quand l'eau se stabilise et la concentration des sels nutritifs tombe). L'étude des pigments couvre, à la fois, les changements dans les proportions entre la représentation des différentes espèces, et les modifications subies par les individus d'une même espèce, devenant ainsi, de ce fait, un indicateur excellent de la « physiologie de l'écosystème ».

La succession comporte une accumulation de la biomasse, un ralentissement de la production et une réduction de la dissipation d'énergie. Dans la mer, la succession du phytoplancton accompagne à la réduction de la diffusivité et à la consommation des éléments nutritifs. Les premiers stades de la succession, avec une proportion plus élevée de chlorophylle a, représentent la puissance maximum, mais l'efficacité est médiocre, tant dans l'utilisation de la lumière absorbée que dans celle des éléments nutritifs. Dans les stades plus avancés, un mélange de pigments de façon à donner un spectre d'absorption se rapprochant davantage du spectre de l'énergie qui arrive dans l'eau représente une utilisation meilleure de la lumière; dans cette phase la puissance déployée est moindre.

Le phytoplancton peut être considéré comme un système photosynthétiseur dans lequel la concentration et la composition des pigments s'ajustent à une productivité totale décroissante et à une efficacité croissante au cours de la succession normale. La perte de puissance

et l'augmentation de l'efficacité peut s'accomplir par changement 1) des espèces ou 2) de leurs caractéristiques. Ce point de vue rentre dans le schéma général suggéré par ODUM et PINKERTON (1955) et ODUM (1956).

Biomasse et pigments. Le coefficient pour passer des valeurs des pigments au poids sec varie suivant le type de phytoplancton. Si celui-ci peut être connu d'après le spectre d'absorption des pigments, il est aisé de trouver des formules simples approximatives pour apprécier directement la biomasse.

La mesure de l'absorption à deux longueurs d'onde seulement, 430 et 665 mμ, suffit pour caractériser le phytoplancton. J'ai choisi 665 mμ comme étant le maximum d'absorption de la chlorophylle a. L'autre point, 430 mμ, est un bon indicateur des caroténoïdes et offre l'avantage, transitoire, d'une bonne corrélation avec des mesures en « unités Harvey » (UPH). 1 UPH = 35,7 D₄₃₀. D signifie toujours la densité optique, mesurée en cuvettes de 1 cm, d'une solution d'acétone à 90 %; chaque ml de la solution est l'extrait de 1 l d'eau de mer. Dans ce cas le résultat est en UPH/l.

Une UPH représente, approximativement, 0,013 mg de plancton sec, sans cendres (B), dans le cas des diatomées, et une quantité quelque trois fois plus grande d'un plancton à dino-flagellés. On peut généraliser ce facteur de conversion, F, en mettant approximativement, $F = 0,0016 (D_{430}/D_{665})^2$. Ce qui donne

$$B = 10^3 \cdot 35,7 D_{430} \cdot (0,04 D_{430}/D_{665})^2 = 60 (D_{430})^3 / (D_{665})^2,$$

avec expression de la biomasse (B) en mg de plancton sec sans cendres par m³. Cette expression empirique est imparfaite, parce que nous possédons encore trop peu de valeurs se rapportant au phytoplancton marin naturel, mais elle peut donner une idée de la forme des expressions auxquelles on aboutira. Des études plus serrées pourront améliorer les constantes. La production nette en matière organique sèche par m³ et par jour, dans les conditions habituelles de nos eaux superficielles, est de l'ordre de 500. D₆₆₅.

Nomographe pour l'étude synoptique des pigments. Quand on travaille avec un grand nombre d'échantillons, l'usage d'un nomographe à treillis a été trouvé pratique. Quatre échelles logarithmiques s'entrecroisent. Deux échelles similaires, dont l'intersection forme un angle de 120 degrés, se rapportent à D₄₃₀ et D₆₆₅ respectivement. Chaque échantillon dont on a mesuré l'extinction à ces longueurs d'onde est donc défini par un point, et tous les points sont comparables si tous les extraits sont équivalents (1 ml extrait = 1 l eau de mer) ou sont rendus équivalents en multipliant par le facteur approprié si le volume de l'extrait n'est pas celui convenu. L'échelle D₄₃₀ peut être doublée d'une échelle en UPH et la D₆₆₅, d'une indication approximative de la productivité, appréciée d'après le rythme de multiplication. Dans la disposition adoptée (fig. 1), un phytoplancton, avec une grande proportion de diatomées ou de flagellés à multiplication rapide, se place vers la partie supérieure du graphique (D₄₃₀/D₆₆₅ = 2-3), un plancton à un taux de renouvellement plus bas, composé par une plus grande proportion de dino-flagellés, occupe une place inférieure (D₄₃₀/D₆₆₅ = 5-6). Nous pouvons, donc, tracer une autre échelle qui donne une mesure de la composition taxonomique de plancton et de son activité. Enfin, les points qui correspondent à une biomasse semblable tombent sur des droites qui croisent le graphique obliquement, de l'angle inférieur gauche au supérieur droit. Ces droites forment, elles aussi, une échelle logarithmique qui donne la biomasse.

L'utilité de ce monographe se manifeste : 1) quand on y inscrit les stages d'une succession, naturelle ou expérimentale; l'échelle logarithmique aide à représenter la croissance exponentielle. L'augmentation de la biomasse et du rapport D₄₃₀/D₆₆₅ sont très caractéristiques de la succession normale et on peut la déceler quand il y a une discontinuité due à un transport des masses d'eau. 2) Pour comparer entre elles un grand nombre de valeurs se rapportant à différentes profondeurs ou différentes places d'une région qu'on peut considérer en état stationnaire.

BIBLIOGRAPHIE

- DUXBURY (A.C.) et YENTSCH (C.S.), 1956. — Plant pigments nomographs. — *J. Mar. Res.*, 15, p. 92-101.
- HALLDAL (P.), 1958. — Pigment formation and growth in blue-green algae in crossed gradients of light intensity and temperature. — *Physiol. Plant.*, 11, p. 401-420.
- KETCHUM (B. H.), 1957. — Productivity in relation to nutrients. — *Int. Coun. Expl. Sea, Symposium 1957: Measurements of primary production in the sea.*
- KINGSBURY (J.M.), 1956. — On pigment changes and growth in the blue-green alga, *Plectonema nostocorum* Bornet ex Gomont. — *Biol. Bull.*, 110, p. 310-319.
- MARGALEF (R.), 1954. — Consideraciones sobre la determinación cuantitativa del fitoplancton por la valoración de pigmentos solubles y los factores que afectan a la relación entre cantidad de pigmento y peso seco. — *P. Inst. biol. apl.*, 16, p. 71-84.
- MEIER (F.E.), 1929. — Recherches expérimentales sur la formation de la carotène chez les algues vertes unicellulaires et sur la production de la gelée chez un *Stichococcus* (S. mesenteroides). — *Bull. Soc. Bot. Genève*, 2^e s., 21, p. 11-197.
- ODUM (H.T.), 1956. — Efficiencies, size of organisms and community structure. — *Ecology*, 37, p. 592-597.
- ODUM (H.T.) et HOSTIN (C.M.), 1957. — Metabolism of a laboratory stream microcosm. — *Inst. Marine Science*, 4, p. 115-133.
- ODUM (H.T.) et PINKERTON (R.C.), 1955. — Time's speed regulator: The optimum efficiency for maximum power output in physical and biological systems. — *Amer. Scientist*, 43, p. 331-343.
- RICHARDS (F.A.), 1952. — The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses, I. — II (with Th. G. THOMPSON). — *J. Mar. Res.*, 11, p. 147-155; 156-172.
- SOROKIN (C.), 1958. — The effect of the past history of cells of *Chlorella* on their photosynthetic capacity. — *Physiol. Plant.*, 11, p. 275-283.
- WASSINK (E.C.), 1954. — Problems in the mass cultivation of photo-autotrophic micro-organisms. — *4th. Symposium of the Society for gen. Microbiology*, p. 247-270.

5. Calculation of total carotenoids (Parsons et al. 1984)

Total Carotenoids are calculated from absorbance readings at 480 and 510 nm. Both have to be corrected for background absorption at 750 nm.

$$(1) \quad \text{Plant carotenoids } (C_p) = 7.6 (E_{480} - 1.49 E_{510})$$

where E is the absorbance at 480 and 510 corrected for the 750 nm absorbance

Absolute amount is then calculated from (light path in the cuvette = 1 cm)

$$(2) \quad \text{Total carotenoids [mg m}^{-3}\text{]} = \frac{C_p * v}{V * 10}$$

where v is the volume of the extract in ml, V is the volume of water in Liters