

HET IS GROEN EN HET VERANDERT

- meer dan vijftientig jaar chlorofylanalyses -

Paul Frintrop, Hero Prins en Hans Ruiter

Werkdocument 2002.148x

**RIZA - Lelystad
Hoofdafdeling Informatie en Meettechnologie
augustus 2002**

N.B. De inhoud van dit document geeft de visie van de auteurs weer, die niet noodzakelijkerwijs in overeenstemming hoeft te zijn met de visie van het Ministerie van Verkeer en Waterstaat

INHOUDSOPGAVE

WOORD VOORAF	3
0 SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 BEPALINGSMETHODEN VOOR CHLOROFYL-A	9
2.1 Algemeen	9
2.2 Extractie van chlorofyl-a	9
2.3 Meting van chlorofyl-a	11
2.4 Correctie voor faeofytine	13
2.5 Toegepaste methoden bij het RIZA	13
2.6 Conclusies ten aanzien van de bepalingsmethoden	15
3 RINGONDERZOEKEN	17
3.1 RIZA-ringonderzoek maart 1982	17
3.2 RIZA-ringonderzoek juni 1983	18
3.3 Conclusies ten aanzien van de ringonderzoeken 1982 en 1983	19
4 KRITISCHE BESCHOUWING VAN DE CHLOROFYL-A GEHALTEN	21
4.1 Gegevens tot 1985 (RIZA-methode met aceton extractie)	21
4.2 Gegevens van 1985 (RIZA-methode met ethanol extractie)	23
4.3 Gegevens van 1986 tot 1-4-1987 (RIZA-methode met ethanol extractie)	23
4.4 Gegevens vanaf 1-4-1987 (NEN 6520)	24
5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	27
6 LITERATUUR	29
7 BIJLAGEN	33

WOORD VOORAF

Het voorliggende werkdocument is in 1995 door de auteurs opgesteld op verzoek van de afdeling WSE. Het concept: Het is groen en veranderd – *twintig jaar chlorofylanalyses* – is voor commentaar verspreid onder een brede groep betrokkenen en belangstellenden. Na verwerking van het commentaar en de vele suggesties is het document blijven liggen. Dit is veroorzaakt door functieveranderingen van de auteurs en door verschil van inzicht in de wijze van omgang met de conclusies en aanbevelingen.

Op aandringen van WSE is het document najaar 2002 afgerond. Bij het afronden zijn nog enkele gegevens opgenomen die het historisch beeld van de chlorofylanalyses meer compleet maken.

De conclusies en aanbevelingen zijn ten opzichte van 1995 niet veranderd.

Noot van de projectleider monitoring.

Op 7 januari 2003 heeft de Staf van IM een besluit genomen over hoe de gegevens aan te passen. Conform dit besluit zijn de gegevens in DONAR aangepast met een factor 0,81. De overige aanbevelingen bleken praktisch moeilijk uitvoerbaar. Om verdere vertraging in de uitvoering te voorkomen is besloten om in februari 2004 DONAR aan te passen conform aanbeveling 4 van de conclusies en aanbevelingen en het onderhavige rapport definitief te maken. In bijlage 8 is het discussiestuk voor de Staf van de afdeling IM opgenomen en een samenvatting van het besluit dat de staf op grond hiervan heeft genomen.

25 februari 2004.

Jaap van Steenwijk

0 SAMENVATTING

De meetmethoden voor de bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a zijn in de periode 1974 tot 1987 aan verandering onderhevig geweest. Voor de beoordeling van het waterkwaliteit is het van belang om de veranderingen in het gehalte aan chlorofyl-a in water zo goed mogelijk te beschrijven. Daartoe is het noodzakelijk om de vergelijkbaarheid van de resultaten, verkregen met verschillende methoden, vast te stellen.

In het Besluit Kwaliteitsdoelstellingen en Metingen Oppervlaktewateren van 3 november 1983 is een waterkwaliteitsdoelstelling opgenomen voor de parameter “algenbiomassa” uitgedrukt in de eenheid “ $\mu\text{g/l}$ chlorofyl-a”. Bijlage 5 van genoemd besluit schrijft NEN 6520:1981 voor als verplicht toe te passen standaardmeetmethode voor deze parameter. Het ligt dan ook voor de hand om bij de vergelijking van meetmethoden NEN 6520:1981 als aftelpunt te kiezen. De verschillen in de toegepaste meetmethoden hebben geleid tot verschillen in meetresultaten. Uit een evaluatie van de meetmethoden en van de resultaten van ringonderzoeken blijkt dat de resultaten van deze meetmethoden onderling correleren. Daarmee rijst de vraag: *Hoe zien de meetresultaten eruit indien vanaf 1974 tot heden NEN 6520:1981 zou zijn toegepast voor de bepaling van chlorofyl-a*

Vanuit deze optiek dienen de meetresultaten van het RIZA in de periode 1974 t/m 1984 te worden gecorrigeerd met een factor 0,67. Deze factor is opgebouwd uit een factor 0,81 voor de afwijkende wijze van kwantificering van chlorofyl-a en een factor van eveneens 0,81 voor het verschil in isolatie- en opwerkprocedure. De factor voor de afwijkende kwantificering is gebaseerd op theoretische afleidingen en vergelijking met literatuurwaarden; deze factor is “hard”. De factor voor het verschil in isolatie- en opwerkprocedure volgt daarna uit de vergelijking van de (herberekende) RIZA-resultaten met de resultaten van de ringonderzoeken die in 1982 en 1983 door het RIZA zijn georganiseerd; deze factor is “zacht” omdat hierbij slechts een beperkt aantal monsters zijn vergeleken.

Er blijft enige onzekerheid bestaan over de vergelijkbaarheid van de RIZA-resultaten in het jaar 1985. Er is onvoldoende vergelijkingsmateriaal beschikbaar om een toetsing te kunnen uitvoeren.

De correctie die door Stoks indertijd is berekend en doorgevoerd voor de resultaten van 1-1-1986 tot 1-4-1987 is nogmaals en op andere wijze getoetst. Er is geen reden gevonden om aan de juistheid van die correctie te twijfelen.

Evenmin is er een reden om te twijfelen aan de resultaten, die vanaf 1-4-1987 door het RIZA zijn geproduceerd.

Alles overziend heeft de staf van RIZA/IM op 7 januari 2003 besloten om de gerapporteerde en in DONAR opgeslagen gehalten van de periode 1974 tot en met 1984 te corrigeren met een factor 0,81 (conform aanbeveling 4). De aanvullende correctie wordt genoemd maar niet doorgevoerd in DONAR. De reden is dat DONAR alleen feitelijke meetgegevens dient te bevatten zodat de integriteit van de database gewaarborgd blijft.

INLEIDING

Historische chlorofyl-a (chlfa) gegevens zijn van cruciaal belang voor de evaluatie van de ontwikkeling van eutrofiëring in de rijkswateren. Daling of stijging van het chlfa- gehalte is in belangrijke mate sturend (geweest) voor het al dan niet uitvoeren van:

- kostbare ingrepen (doorspoeling, actief biologisch beheer etc.),
- normering en handhaving (normstelling voor bedrijven, RWZI's etc.),
- beheersadviezen,
- beleidskeuzes,
- onderzoek.

Voor een juiste interpretatie van een cruciale parameter als chlfa, is de mate van betrouwbaarheid en vergelijkbaarheid van de meetresultaten op verschillende lokaties en tijdstippen van groot belang.

Chlfa wordt door het RIZA al sinds 1971 bepaald; de routinematige bepaling in de rijkswateren is eerst in 1974 gestart. De periode 1974 tot 1987 kenmerkt zich door diverse veranderingen in de wijze waarop de uiteindelijke meetresultaten zijn bepaald. Deze veranderingen hebben onduidelijkheid over het gebruik van de chlfa-gegevens tot gevolg gehad.

De directe aanleiding voor het opstellen van dit werkdocument is een verzoek van de staf van WSE geweest met betrekking tot de vergelijkbaarheid van chlfa-gegevens van 1974 tot 1995 in een aantal rapportages over de waterkwaliteit van het IJsselmeer en de Randmeren.

In het verleden zijn reeds enige notities opgesteld over de problematiek van de bepaling van chlfa en de vergelijkbaarheid van chlfa-resultaten. Deze notities zijn als uitgangspunt genomen en aangevuld met o.a. resultaten van vergelijkende onderzoeken. Een deel van deze notities is opgenomen in de bijlagen van dit werkdocument ten einde een zo goed mogelijk (historisch) beeld van de problematiek te kunnen geven.

Dit werkdocument was in concept gereed in 1995 en ter commentaar toegezonden aan een groot aantal betrokkenen. Na verwerking van het commentaar is het document blijven liggen; enerzijds vanwege de verschillen van inzicht over het vervolgtraject, anderzijds vanwege veranderingen in de functies van de betrokken auteurs. Recent is echter besloten om het werkdocument toch af te ronden.

De richting waarin is gewerkt, is bepaald door het Besluit Kwaliteitsdoelstellingen en Metingen Oppervlaktewateren (1983). In dit Besluit is de parameter Algenbiomassa opgenomen met als eenheid $\mu\text{g/l}$ chlfa en als **verplicht toe te passen standaardmeetmethode** NEN 6520, 1^e druk 1981.

NEN 6520:1981 en de resultaten die daarmee zijn verkregen, vormen hierdoor het aftelpunt, ondanks dat in dit werkdocument op een aantal plaatsen kritische kanttekeningen bij NEN 6520:1981 worden geplaatst. Methoden die afwijken van NEN 6520:1981 worden niet als minder juist beschouwd. Zij wijken echter af van de standaardmeetmethode en voor resultaten die niet volgens de standaardmeetmethode zijn verkregen, moet worden gezocht naar een conversie(factor).

In dit werkdocument is gekozen voor een analytische benadering van het probleem. Daarbij is gekozen voor een twee sporen aanpak: het methodenspoor (hst. 2 en 3) en het resultaten spoor

(hst. 4).

Bij het methodenspoor is nagegaan:

- welke methoden zijn gebruikt voor de bepaling van chlfa,
- wat zijn de verschillen tussen de gebruikte methoden,
- welke invloed kunnen deze verschillen hebben gehad op de meetresultaten.

Hierbij zijn ook de resultaten van het RIZA in landelijke ringonderzoeken gebruikt.

Bij het resultatenspoor zijn de meetresultaten van het RIZA in het IJsselmeer vergeleken met soortgelijke meetresultaten van het Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland (PWN); de gevonden verschillen zijn vervolgens vergeleken met de verschillen tussen (de resultaten van) beide laboratoria in ringonderzoeken.

De auteurs zijn het Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland, in het bijzonder mw. ir. J. Willemsen-Zwaagstra en mw. S. Redeker erkentelijk voor het beschikbaar stellen van meetgegevens.

2 BEPALINGSMETHODEN VOOR CHLOROFYL-A

2.1 Algemeen

Sinds het gebruik van de parameter chlfa als maat voor de biomassa van het fytoplankton (Harvey, 1934) zijn er veel methoden ontwikkeld om chlfa te bepalen. Veel van deze methoden zijn gebaseerd op spectrofotometrie na extractie van het monster met een matig polair oplosmiddel. Deze methoden zijn geen van allen specifiek voor chlfa, afhankelijk van de gekozen golfenlge worden ook andere pigmenten meebepaald, zoals chlorofyl-b en -c, en/of afbraakproducten, zoals faeofytine en chlorofylide. Een aantal methoden past een vorm van correctie voor faeofytine toe; deze methoden zijn daardoor dus selectiever voor chlfa dan andere.

Door de beperkte selectiviteit en het ontbreken van goede referentiematerialen is de parameter chlfa een groepsparameter. Een kenmerk van groepsparameters is dat het toepassen van een bepalingvoorschrift leidt tot een resultaat zonder de mogelijkheid om vast te stellen in welke mate dit resultaat overeenkomt met de “werkelijke” waarde. Wijziging van de methode leidt veelal tot een ander resultaat, waarvan niet gezegd kan worden of dit de werkelijkheid beter of minder goed benadert. Om resultaten over langere perioden en van verschillende onderzoeken te kunnen vergelijken is het noodzakelijk om de methode te standaardiseren (zie bijlage 3 voor een overzicht van gestandaardiseerde bepalingsmethoden). In Nederland is in 1981 een genormaliseerde methode, NEN 6520:1981, uitgebracht.

Na 1980 verschijnen er selectievere methoden voor chlfa en andere pigmenten. Hierbij worden de pigmenten in het verkregen extract gescheiden met behulp van vloeistofchromatografie; de detectie en kwantificering worden daarbij met behulp van spectrofotometrie uitgevoerd.

Ook binnen het RIZA is een dergelijke methode ontwikkeld (Helmerhorst, 1989a). Het doel van deze methode was in de eerste plaats om soortspecifieke pigmenten te kunnen bepalen als mogelijk alternatief voor de microscopische algendeterminaties (Helmerhorst, 1989b en 1991; Zwart, 1993). Met betrekking tot de bepaling van chlfa is deze methode in de praktijk vergeleken met de gebruikelijke methode (Zwart, 1993). Incidenteel is daarbij gebleken dat het gehalte aan chlorofylide - een afbraakproduct van chlfa dat met NEN 6520 niet van chlfa te onderscheiden is - veel groter is dan het gehalte aan chlfa.

Ondanks de voordelen van deze HPLC-methode, wordt chlfa nog steeds volgens NEN 6520:1981 bepaald. De belangrijkste redenen hiervoor zijn:

- NEN 6520:1981 wordt in het Besluit Kwaliteitsdoelstellingen en Metingen Oppervlaktewateren genoemd als **verplicht toe te passen standaardmeetmethode** voor de parameter algenbiomassa; NEN 6520:1981 wordt in het waterbeheer dan ook algemeen toegepast,
- overgang naar de HPLC-methode veroorzaakt een trendbreuk in meetreeksen,
- de NEN-methode is eenvoudiger en goedkoper dan de HPLC-methode.

2.2 Extractie van chlorofyl-a

Bij elke extractieprocedure moet met drie aspecten rekening worden gehouden:

- **bereikbaarheid**: het extractiemiddel moet in het monster doordringen en de te extraheren stoffen kunnen bereiken,
- **oplosbaarheid**: de te extraheren stoffen moeten oplosbaar zijn in het extractiemiddel,
- **terugwinbaarheid**: het extractiemiddel moet uit het monster verwijderbaar zijn.

De extractieprocedure mag wel de structuur van het monster irreversibel veranderen - dit is

doorgaans zelfs noodzakelijk om een goede bereikbaarheid te realiseren - maar moet de gewenste stof(fen) intact laten. Dit aspect is zeker bij de bepaling van chlfa van belang; er wordt dan ook apart aandacht aan gewijd.

Met betrekking tot de extractie van chlfa uit fytoplankton betekenen deze stappen het volgende:

bereikbaarheid

Chlfa bevindt zich in het fytoplankton en dan nog in hoofdzaak in levende cellen. Filtratie van watermonsters is dan ook de eerste stap en het te extraheren monster bestaat derhalve uit filters van papier of glasvezel met daarop/daarin het fytoplankton, detritus en andere onopgeloste bestanddelen. Omdat dit monster water bevat is het noodzakelijk om een extractiemiddel te kiezen dat voldoende met water mengbaar is. De bereikbaarheid van chlfa wordt vergroot door destructie van de celwanden, bij voorbeeld door mechanische krachten (potterbuizen, celhomogenisator e.d.). Het verhogen van de temperatuur is een andere wijze om de celwanden te doordringen; dit wordt in NEN 6520:1981 voorgeschreven (monster met ethanol in een afgesloten buis gedurende 5 min. verwarmen in een schudwaterbad met een temperatuur van 75 °C).

oplosbaarheid

Chlfa is goed oplosbaar in koolwaterstoffen (petroleumether), ethers (diethylether), ketonen (aceton) en alcoholen (ethanol). Alleen ketonen en alcoholen zijn voldoende met water mengbaar om - met betrekking tot de bereikbaarheid - te worden toegepast. Het is niet noodzakelijk om de extracties met 100 % aceton of ethanol uit te voeren, mengsels met 10 - 20 % water voldoen eveneens. Omdat chlfa ook hierin goed oplost, kan met één of een beperkt aantal extracties worden volstaan. NEN 6520:1981 past een enkelvoudige extractie toe met 80 % ethanol.

terugwinbaarheid

Volledige terugwinning van het extract is wenselijk maar niet altijd strikt noodzakelijk. Bij gebruik van ketonen en alcoholen bevat het extract naast chlfa ook het water dat nog in het monster aanwezig was. Wanneer het extract wordt teruggewonnen door filtratie, blijft een deel van het extract achter in het monster (= filter(s) met fytoplankton) en in het filter dat voor terugwinning is gebruikt. De grootte hiervan wordt uitsluitend bepaald door de grootte van het monster en het gebruikte filter. Naspoelen van het filter en aanvullen van het extract tot een vast volume kunnen achterwege blijven indien het extract voldoende groot is, zodat het verlies niet meer dan enkele procenten bedraagt. Dit is onder meer het geval bij de werkwijze volgens NEN 6520:1981.

Het extract kan ook van het monstermateriaal worden gescheiden door centrifugeren. Het mengsel van monster en extractiemiddel wordt gedurende een (vaste) tijd al of niet onder koeling gecentrifugeerd. De meting wordt verricht aan een deel van de bovenstaande, nagenoeg heldere, vloeistof. Deze werkwijze wordt ook in NEN 6520:1981 genoemd als alternatief voor filtreren.

stabiliteit

Het extract van celmateriaal bevat naast chlfa en andere pigmenten ook het enzym chlorofylase. Onder invloed van dit enzym kan de fytolgroep, een lange koolwaterstofketen die het chlorofyl in de cellen fixeert in de chloroplasten, door hydrolyse worden afgesplitst. Hierbij ontstaat chlorofylide dat eveneens straling bij 665 nm absorbeert (zie bijlage 1).

Chlorofylase wordt afgebroken door hoge concentraties (90 - 100 %) aceton; dit is bij 80 % ethanol alleen het geval indien het extract voldoende wordt verwarmd, zoals bij NEN 6620:1981 (75 °C gedurende 5 min.). In 80 % ethanol is chlfa nog steeds gevoelig voor fotochemische afbraak (van Urk, 1990).

2.3 Meting van chlorofyl-a

Het gehalte aan chlfa in het verkregen extract wordt spectrofotometrisch bepaald bij een golflengte van 665 nm. Het absorptiespectrum van chlfa heeft bij deze golflengte een relatief maximum. Chlorofyl-b en -c vertonen bij 665 nm slechts een geringe absorptie; de maxima voor chlorofyl-b en -c liggen bij 647 resp. 630 nm.

De maximale absorptie van chlfa treedt op bij een golflengte van ca. 430 nm. Bij 430 nm absorberen echter veel meer andere pigmenten en organische verbindingen dan bij 665 nm. De selectiviteit van absorptie bij 665 nm weegt zwaarder dan de geringere gevoeligheid. Om deze selectiviteit ook in de praktijk te realiseren, is een nauwe bandbreedte vereist; NEN 6520:1981 schrijft een bandbreedte van ten hoogste 2 nm voor. Bij HPLC-methoden, waarbij chlfa wordt gescheiden van andere verbindingen, biedt het wel voordelen om de meting uit te voeren bij een golflengte van 430 nm.

De mate waarin straling wordt geabsorbeerd is een intrinsieke eigenschap van een stof; het toegepaste oplosmiddel is hierop wel van invloed. Het is dus mogelijk om de concentratie van een stof in een oplossing te berekenen uit de gemeten lichtabsorptie met behulp van de z.g. "specifieke extinctiecoëfficiënt"; dit is de (geëxtrapoleerde) absorptie van een oplossing met een concentratie van 1 g/l, gemeten in een cuvet met een optische weglengte van 1 mm en uitgedrukt als extinctie.

Het is echter bij spectrofotometrische bepalingen gebruikelijk om het verband tussen de gemeten lichtabsorptie en de concentratie van de te bepalen stof experimenteel vast te stellen met behulp van een reeks standaardoplossingen ("ijklijnmethode"). Op deze wijze worden eventuele spectrometrische en fotometrische afwijkingen nagenoeg geheel gecompenseerd.

Er wordt onderscheid gemaakt in spectrometrische en fotometrische afwijkingen. Spectrometrische afwijkingen betreffen onjuistheden van de golflengte-instelling en de spectrale bandbreedte. Fotometrische afwijkingen hebben betrekking op de onjuistheid van de meting van de lichtabsorptie (lineariteit, optische weglengte).

De "ijklijnmethode" wordt bij de bepaling van chlfa **niet** toegepast omdat chlfa moeilijk in zuivere vorm kan worden verkregen. De chemische stabiliteit van chlfa is beperkt doch oplossingen van chlfa in aceton kunnen bij - 70 °C enige jaren worden bewaard.

"Zuiver chlfa", door isolatie verkregen uit spinazie of reïncultures van chlorella, lijkt in de praktijk niet "zuiver" te zijn. De gemeten specifieke extinctiecoëfficiënt van standaarden van ingewogen "zuiver chlfa" is niet in overeenstemming met de literatuurwaarde. Bij de HPLC-bepaling van chlfa berekenen diverse auteurs de werkelijke concentratie uit de gemeten specifieke extinctiecoëfficiënt en de literatuurwaarde. Deze werkwijze moet worden beschouwd als een "noodgreep".

De gemeten extinctie van een extract wordt derhalve met behulp van een gegeven specifieke extinctiecoëfficiënt omgerekend in een concentratie. Deze extinctiecoëfficiënt is afhankelijk van het oplosmiddel waarin chlfa wordt gemeten. NEN 6520:1981 (ethanolextractie) hanteert een waarde van $8,16 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$; voor aceton wordt in de literatuur vaak de waarde 9,11

$\text{l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ gevonden.

Deze werkwijze brengt met zich mee dat spectrometrische en fotometrische afwijkingen in de spectrofotometer niet worden opgemerkt en zonder meer doorwerken in het resultaat. Controle van de goede werking van de spectrofotometer moet dus anderszins plaatsvinden.

NEN 6520:1981 schrijft met betrekking tot de controle van de goede werking van de spectrofotometer alleen voor dat regelmatig gecontroleerd moet worden of de golflengte-instelling juist is. Dit is nauwelijks relevant omdat de meting uitgevoerd moet worden bij de golflengte waarbij de extinctie maximaal is; of de daarbij afgelezen golflengte nu 664 of 666 nm is, doet niet ter zake. NPR 6400, de algemene richtlijnen voor moleculaire absorptiefotometrie waarnaar NEN 6520:1981 verwijst, geeft wel een algemene aanwijzing voor controle van de fotometrische afwijkingen.

Bij de landelijke ringonderzoeken van het RIZA is een standaardoplossing van nikkelchloride in water meegestuurd om een indicatie te krijgen van de **fotometrische** afwijkingen. Nikkelchloride is eveneens groen gekleurd en absorbeert dus ook straling bij 665 nm; bij deze golflengte ligt echter geen piekmaximum, zodat geen indicatie omtrent de spectrometrische afwijkingen kan worden verkregen.

2.4 Correctie voor faeofytine

Faeofytine is een van de afbraakproducten van chlorofyl (zie bijlage 1). Het bestaat uit het complete chlorofylmolecuul zonder het magnesiumion. Er zijn dus ook 3 verschillende faeofytines: a, b en c. Het afbraakproduct van chlfa, faeofytine-a, wordt in dit hoofdstuk afgekort als faeo.

Faeo is een groen pigment en absorbeert evenals chlfa straling met een golflengte van 665 nm.. De mate van absorptie door faeo is kleiner dan bij chlfa; de specifieke extinctie-coëfficiënt van faeo is een factor 1,7 kleiner dan die van chlfa.

Faeo komt alleen voor in afgestorven cellen. Indien bij de bepaling van chlfa niet voor de aanwezigheid van storende afbraakproducten zoals faeo kan worden gecorrigeerd, is de parameter chlfa geen zuivere schatter van de algenbiomassa. Tot de algenbiomassa worden uitsluitend levende cellen gerekend.

Afbraakproducten van chlfa kunnen ook tijdens de groei van algen in het zomerseizoen voorkomen doordat bepaalde soorten afsterven en worden "vervangen" door andere soorten. De bijdrage van faeo aan de totale lichtabsorptie door algen in de waterfase is waarschijnlijk gering; een correctie voor faeo zou om die reden wellicht achterwege kunnen blijven. In NEN 6520:1981 is de correctie voor faeo echter altijd voorgeschreven.

Chlfa kan geforceerd omgezet worden in faeo door het extract aan te zuren met zoutzuur. De omzetting van chlfa in faeo resulteert in een vermindering van de lichtabsorptie. Indien in het oorspronkelijke extract geen faeo aanwezig is, neemt de extinctie af met een factor 0,59 (= $1 : 1,7$). Deze afname van de extinctie wordt doorgaans gebruikt als maat voor het gehalte aan chlfa: het gehalte aan chlfa wordt berekend uit het verschil in extinctie van het extract vóór en na aanzuren.

De geforceerde omzetting van chlfa in faeo is een zeer kritische stap in de bepaling van chlfa. Indien de omzetting niet volledig is (te weinig zuur gebruikt, geen goede menging of te kort gewacht) wordt de resterende hoeveelheid chlfa ten onrechte als een 1,7 x grotere hoeveelheid faeo gemeten; het resultaat is dan een te laag berekend gehalte aan chlfa. Bij gebruik van teveel zuur ontstaan naast faeo ook andere omzettings- en afbraakproducten. Het is niet bekend of deze situatie altijd zal leiden tot onderschatting van het gehalte aan chlfa of dat er

ook overschatting kan optreden. NEN 6520:1981 schrijft voor dat af en toe de pH na het aanzuren moet worden gecontroleerd; de pH moet 2,6 - 2,8 bedragen. Het normvoorschrift vermeldt niet hoe deze controle moet worden uitgevoerd; het is niet eenvoudig om betrouwbaar de pH te meten van een oplossing die ca. 80 % ethanol bevat.

Naar de huidige inzichten zijn er zeker vraagtekens te plaatsen bij de correctie voor faeo zoals beschreven in NEN 6520:1981 (zie ook Van Urk et al., 1990):

- de geforceerde omzetting van chlfa in faeo moet altijd worden uitgevoerd, ook als de aanwezigheid van faeo onwaarschijnlijk is. De omzetting introduceert een extra foutenbron met kans op onderschatting van het gehalte aan chlfa,
- de extra handelingen verbonden aan de correctie voor faeo vergroten de spreiding van analyseresultaten,
- niet alle afbraak van chlfa leidt tot de vorming van faeo en faeo is geen stabiel eindproduct van de afbraak van chlfa.

Een andere reden waarom de correctie voor faeo in NEN 6520:1981 altijd moet worden uitgevoerd, is dat chlfa in (warme) ethanol niet stabiel is en mogelijk gedeeltelijk in faeo wordt omgezet.

Hiervoor zijn enkele argumenten aan te voeren:

- diverse onderzoekers (zie van Urk et al., 1990 en Deventer, 1990) geven aan dat chlfa niet stabiel is in ethanol,
- uit verschillende (ring)onderzoeken blijkt dat met aceton meer chlfa en (veel) minder faeo wordt gevonden dan met warme ethanol; de som van chlfa + faeo komt bij beide extractiemethoden beter met elkaar overeen,
- ook in het vergelijkend onderzoek van Zwarter (1993) is met HPLC (aceton extractie) nauwelijks faeo gevonden en bij de bepaling van chlfa volgens NEN 6520 wel,

Indien tijdens de extractie met warme ethanol inderdaad al afbraak van chlfa optreedt, betekent dit dat NEN 6520:1981 het werkelijke gehalte aan chlfa **onderschat**. Bij de lopende herziening van NEN 6520:1981 (het normvoorschrift is inmiddels ruim 20 jaar oud) zal hieraan zeker aandacht moeten worden gewijd. Dit hoeft echter niet te betekenen dat de bepalingsmethode ook daadwerkelijk wordt gewijzigd: chlfa is een groepsparameter en de daaraan gekoppelde waterkwaliteitsdoelstelling is gebaseerd op de huidige werkwijze inclusief beperkingen.

2.5 Toegepaste methoden bij het RIZA

De meetreeksen van chlfa die het RIZA heeft opgebouwd, zijn verkregen door verschillende bepalingsmethoden.

1974 t/m 1984

In deze periode heeft het RIZA een eigen voorschrift toegepast (zie bijlage 7). Dit voorschrift is in de periode 1971 tot 1973 ontwikkeld en toegepast voor niet-routinematig onderzoek. Het voorschrift van het RIZA is een combinatie van het bepalingsvoorschrift uit 1969 van het toenmalige Delta Instituut te Yerseke en de literatuur (Strickland en Parsons, 1968; Moss, 1967a en 1967b).

De extractie wordt onder koeling uitgevoerd met 90 % aceton; de celdestructie is zowel door wrijven in potterbuizen als door schudden met glasparels op een schudmachine verricht. Het gehalte aan chlfa wordt berekend uit het verschil in de gemeten extincties vóór en na aanzuren van het extract. Voor deze berekening wordt een "F-waardentabel" gebruikt. Het toepassen van deze tabel maakt de berekening minder doorzichtig in vergelijking met de berekeningswijze in de latere NEN 6520:1981 en andere methoden, die een vaste waarde voor de specifieke extinctiecoëfficiënt hanteren (zie bijlage 2). Naast de F-waardentabel is ook een

ijklijn gemaakt van “zuiver chlorofyl”. De resultaten hiervan waren in overeenstemming met de berekende resultaten.

De documentatie omtrent details van de in deze periode gevolgde werkwijze is beperkt. De bepalingen van chlfa in deze periode zijn echter steeds verricht door of onder directe verantwoordelijkheid van dezelfde medewerker; de details van de gevolgde werkwijze zijn derhalve wel bekend.

Opmerkelijk is dat de RIZA-methode ook werd toegepast bij het aan TAUW uitbestede onderzoek van de monsters uit de Noordzee. Uit de onderlinge vergelijking van resultaten bleek dat TAUW systematisch lagere gehalten vond t.o.v. het RIZA. Het onderzoek naar de oorzaak van deze verschillen heeft geen tastbaar resultaat opgeleverd. De resultaten van TAUW zijn daarom vermenigvuldigd met een factor om ze in lijn te brengen met de RIZA-cijfers.

Een van de argumenten om de hogere RIZA-resultaten te beschouwen als aftelpunt is de ijklijn van “zuiver chlorofyl” geweest. Juist omdat de chlorofyl zuiver was, werden hogere gehalten gemeten. Onzuiverheden die geen licht absorberen bij de golflengte waarbij gemeten wordt, leiden echter eveneens tot het berekenen van hogere gehalten; dit aspect is vermoedelijk onderbelicht gebleven.

1985 t/m 1-4-1987

In deze periode is een aantal wijzigingen doorgevoerd in de bepaling van chlfa en is de bepaling overgedragen van de afdeling biologie naar de afdeling chemie.

De eerste belangrijke wijziging was de vervanging van aceton door ethanol. De aanleiding hiervoor was o.a. de (permanent) slechte vergelijkbaarheid van RIZA-resultaten met die van anderen.

Het constateren van slechte vergelijkbaarheid met anderen in ringonderzoeken - de RIZA-resultaten zijn duidelijk hoger dan die van anderen - heeft niet onmiddellijk tot wijziging van de methode geleid. Redenen hiervoor zijn:

- het vaststellen en wegnemen van de oorzaak van de hogere gehalten vergt veel tijd, vooral omdat een objectief aftelpunt ontbreekt,
- wijziging van de methode betekent in dit geval een duidelijke trendbreuk

Ten aanzien van het zoeken naar de oorzaak van de hogere gehalten van het RIZA moet worden geconstateerd dat dit in het verleden slechts voor een beperkt deel en dan nog voor een korte periode is gelukt. In 1987 is geconstateerd dat de vanaf januari 1986 gebruikte spectrofotometer een defect vertoonde dat leidde tot te **lage** meetresultaten; het was niet te achterhalen hoe lang dit defect reeds bestond. Deze spectrofotometer is vervolgens vervangen en **de reeds gerapporteerde en in WAKWAL opgeslagen meetresultaten van de periode 01-01-1986 t/m 01-04-1987 zijn met een factor 1,8 gecorrigeerd en vervolgens "gevlagd"**. Alleen over deze periode was er voldoende zekerheid te verkrijgen om deze factor te mogen toepassen (zie ook 4.3). De factor is door Stoks berekend uit de meetresultaten van RIZA en WRK in de grote rivieren (zie bijlage 5).

2-4-1987 - heden

Vanaf 2-4-1987 heeft het RIZA NEN 6520:1981 onverkort toegepast voor de bepaling van chlfa.

2.6 Conclusies ten aanzien van de bepalingsmethoden

Hoewel chlfa een goed gedefinieerde verbinding is, waarbij dus gesproken kan worden over de "werkelijke waarde" van het gehalte aan chlfa in een monster, blijkt dat **de parameter chlfa** als gevolg van de toegepaste niet-specifieke bepalingsmethoden moet worden beschouwd als een **groepsparameter**. Bij groepsparameters is het begrip "werkelijke waarde" niet van toepassing; de gehele werkwijze is maatgevend voor het resultaat en de definitie van de parameter chlfa.

Zolang er geen sprake is van gemaakte fouten bij de uitvoering van de bepaling van chlfa, moeten de resultaten dan ook als "juist" worden aangemerkt. Dat neemt niet weg dat ten gevolge van het toepassen van verschillende bepalingsmethoden series van meetresultaten kunnen ontstaan die onderling onvergelijkbaar zijn.

Met betrekking tot de bepalingsmethoden die het RIZA heeft gehanteerd, worden 3 achtereenvolgende perioden onderscheiden waarbinnen de toegepaste bepalingsmethode leidt tot afzonderlijke, op zichzelf staande groepsparameters voor chlfa.

Deze perioden zijn:

1974 t/m 1984	: extractie met aceton (= chlfa-aceton)
1985 t/m 1-4-1987	: extractie met ethanol (= chlfa-ethanol)
2-4-1987 – heden	: extractie met warme ethanol conform NEN 6520:1981 (= chlfa-NEN)

Er zijn voldoende aanwijzingen dat de extractie met aceton hogere gehalten aan chlfa en lagere gehalten aan faeo oplevert dan de extractie met ethanol; de som van beide gehalten is bij gebruik van aceton nog steeds hoger dan bij het gebruik van ethanol.

In theorie is het niet mogelijk om het verschil in resultaat, dat ontstaat indien aceton wordt gebruikt in plaats van ethanol, uit te drukken in één factor; het verschil in resultaat is afhankelijk van de algeensamenstelling en overige verschillen in de werkwijzen.

Een indruk van de grootte van deze verschillen kan worden verkregen uit een vergelijkend onderzoek van TNO (Hoornsman et al., 1979) aan reinkultures van 4 verschillende algen. Hieruit blijkt dat de onderzochte acetonmethode (Derenberg, 1969; qua werkwijze min of meer gelijk aan de acetonmethode van het RIZA) gehalten aan chlfa oplevert die 1,12 - 1,38 x hoger zijn dan die volgens ontwerp-NEN 6520:1978.

Ook de wijze van berekening van het gehalte chlfa uit de gemeten extincties van het extract vóór en na aanzuren met zoutzuur levert verschillen op. Zoals vermeld is de oorspronkelijke berekeningsmethode niet alleen afwijkend van die in NEN 6520:1981 maar ook ondoorzichtig. Gezien het belang hiervan zijn de berekeningsmethoden van RIZA en NEN 6520:1981 nader toegelicht en vergeleken in bijlage 2. Hieruit blijkt dat het RIZA in de periode 1974 t/m 1984 **te hoge gehalten aan chlfa** heeft berekend; hierop wordt nader ingegaan in het volgende hoofdstuk.

Bij het vergelijken van meetresultaten van chlfa over langere periodes moet rekening worden gehouden met bovengenoemde indeling in drie periodes en met de gevolgen daarvan.

Een logisch vervolg hierop is het beslissen of de in DONAR opgeslagen chlfa-meetresultaten

moeten worden voorzien van een heldere aanduiding van de toegepaste methode, of dat verschillende parametercodes moeten worden gehanteerd. Dit is vooral een keuze tussen gebruikersgemak en het verkleinen van de kans op onjuiste conclusies; de auteurs spreken hierover geen voorkeur uit.

3 RINGONDERZOEKEN

Vergelijkende onderzoeken, waarbij een aantal laboratoria volgens hun eigen methode chlfa bepaalt in identieke monsters en/of in standaarden, zijn beschikbaar sinds 1982.

Dergelijke onderzoeken, in dit document kortheidshalve ringonderzoeken genoemd, geven uitsluitend informatie over de bepaling zoals deze binnen een laboratorium wordt verricht. Het ligt dan ook voor de hand om in eerste instantie de resultaten van ringonderzoeken te gebruiken om vast te stellen in hoeverre laboratoria overeenkomstige resultaten voor dezelfde monsters produceren (prestatievergelijking).

Bij het onderling vergelijken van resultaten van metingen door verschillende laboratoria in hetzelfde watersysteem speelt de wijze van bemonstering wel mee. Tijdstippen, plaatsen, dieptes en de wijze waarop het monster wordt getrokken kunnen een belangrijke invloed hebben op het resultaat. Met name bij dynamische watersystemen zoals b.v. het IJsselmeer dient hiermee terdege rekening te worden gehouden.

3.1 RIZA-ringonderzoek maart 1982

In dit onderzoek zijn 4 monsters (IJsselmeer, Markermeer, Veluwemeer en Eemmeer) elk in drievoud geanalyseerd door 33 laboratoria.

Over de gehele linie liggen de meetresultaten van het RIZA hoog. De waarde voor de nikkelchloride standaard ligt dicht bij het gemiddelde.

In ringonderzoeken wordt doorgaans gestreefd naar zowel een verscheidenheid in watermonsters als naar een verscheidenheid in gehalten. Dit betekent concreet dat het rondgezonden monster IJsselmeerwater een verdunning is van het oorspronkelijk bemonsterde water.

Uit de gerapporteerde ruwe meetgegevens blijkt dat het RIZA bij de berekening van het gehalte aan chlfa voor de specifieke extinctiecoëfficiënt van chlfa in aceton een waarde van $7,36 \pm 0,09 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ hanteert. Dit is een opmerkelijk lage waarde in vergelijking met de literatuur ($9,11 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$). Als de berekening wordt uitgevoerd met de literatuurwaarde van $9,11 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$, zijn de meetresultaten 19 % lager dan de gerapporteerde waarden. Deze resultaten zijn samengevat in tabel 1.

Tabel 1: Gehalten aan chlorofyl-a ($\mu\text{g/l}$) in het ringonderzoek 1982

monster	gemiddelde van alle deelnemers	RIZA oorspr.	RIZA herber.	RIZA _{herb.} : gemiddelde
IJsselmeer	2,5	4,3	3,4	1,36
Markermeer	22	30	24	1,09
Veluwemeer	62	90	72	1,16
Eemmeer	134	205	165	1,23
standaard	0,265	0,267	0,267	1,01

Opmerking: De waarden voor de standaard nikkelchloride zijn extincties; herberekening van de gehalten aan chlfa heeft dus geen invloed op deze waarde.

Uit de ruwe meetgegevens van de andere deelnemers die met aceton hebben geëxtraheerd - de laboratoria 2, 8 en 16 - zijn de gemiddelde waarden van de toegepaste specifieke extinctiecoëfficiënten berekend. Voor de laboratoria 2 en 8 bedragen deze 9,09 resp. 9,10 l.g⁻¹.mm⁻¹; deze waarden wijken nauwelijks af van de literatuurwaarde van 9,11 l.g⁻¹.mm⁻¹.

De op deze wijze berekende gemiddelde coëfficiënt voor laboratorium nr. 16 bedraagt 16,8 l.g⁻¹.mm⁻¹. Ondanks deze opmerkelijk hoge waarde wijken de gerapporteerde gehalten aan chlfa weinig af van de gemiddeld gevonden gehalten aan chlfa. Het vermoeden bestaat dat dit laboratorium de hoeveelheid in bewerking genomen monster een factor 2 te hoog (of het volume van het extract een factor 2 te laag) heeft ingevuld op de datasheet en de berekening heeft uitgevoerd met de in NEN 6520:1981 voor ethanol toegepaste waarde van 8,16 l.g⁻¹.mm⁻¹. Hiervoor bestaan twee aanwijzingen:

- het laboratorium geeft aan dat NEN 6520:1981 is gevolgd, behalve voor de extractie (met 90 % aceton); er is niet vermeld dat een andere waarde voor de specifieke extinctiecoëfficiënt is gebruikt,
- het laboratorium heeft met dezelfde methode deelgenomen aan het ringonderzoek in 1983. Uit de ruwe meetgegevens van dat ringonderzoek wordt een gemiddelde waarde van 8,4 l.g⁻¹.mm⁻¹ berekend; dit is de helft van de waarde die uit de resultaten van 1982 is berekend.

De herberekening van de gehalten aan chlfa op basis van de literatuurwaarde 9,11 l.g⁻¹.mm⁻¹ is in de eerste plaats gebaseerd op theoretische overwegingen. Uit de meetgegevens van de andere drie laboratoria die aceton toepassen, blijkt dat twee laboratoria eveneens de literatuurwaarde hanteren.

3.2 RIZA-ringonderzoek juni 1983

Dit ringonderzoek is beperkter van omvang dan het onderzoek in 1982. Er zijn 2 monsters in drievoud onderzocht door 30 laboratoria (1982: 4 monsters in drievoud) en een standaard nikkelchloride. Bij dit onderzoek wordt hetzelfde waargenomen als in 1982: de RIZA-resultaten van de monsters zijn veel hoger dan het gemiddelde en bij de berekening heeft het RIZA een waarde van $7,39 \pm 0,08$ l.g⁻¹.mm⁻¹ gebruikt.

De resultaten zijn daarom opnieuw berekend en samengevat in tabel 2.

Tabel 2: Gehalten aan chlorofyl-a (µg/l) in het ringonderzoek 1983

monster	gemiddelde van alle deelnemers	RIZA oorspr.	RIZA herber.	RIZA _{herber.} : gemiddelde
Maas	9,6	14,7	12,0	1,25
Eemmeer	236	303	244	1,03
standaard	0,219	0,220	0,220	1,00

Naast het RIZA zijn er bij dit ringonderzoek nog 2 deelnemers die met aceton extraheren; nr. 33 (= nr. 8 in 1982) en nr. 3 (= nr. 16 in 1982). De uit de ruwe meetresultaten van laboratoria 33 en 3 berekende gemiddelde waarden voor de specifieke extinctiecoëfficiënt bedragen 8,99 resp 8,4 l.g⁻¹.mm⁻¹.

Deze bevindingen sluiten aan bij die van het ringonderzoek 1982.

3.3 Conclusies ten aanzien van de ringonderzoeken 1982 en 1983

Uit de ruwe resultaten van het RIZA in de ringonderzoeken 1982 en 1983 blijkt dat bij de berekening van de gehalten aan chlfa voor de specifieke extinctiecoëfficiënt van chlfa in aceton impliciet een sterk van de literatuur afwijkende waarde (het gewogen gemiddelde bedraagt 7,37 i.p.v. 9,11 l.g⁻¹.mm⁻¹) is gebruikt. Toepassing van de literatuurwaarde betekent dat de oorspronkelijk berekende gehalten moeten worden vermenigvuldigd met een **factor 0,81**.

Ook de andere deelnemers die aceton hebben gebruikt, passen bij de berekening van de gehalten aan chlfa een waarde toe die gelijk is aan de literatuurwaarde, of iets lager (8,4 l.g⁻¹.mm⁻¹).

De gehalten aan chlfa die in de periode 1974 t/m 1984 door het RIZA zijn bepaald, wijken af van de resultaten die zouden zijn verkregen indien de in de literatuur meest voorkomende wijze van berekening zou zijn gevolgd. De minder doorzichtige wijze waarop in het RIZA-voorschrift het gehalte aan chlfa wordt berekend, is waarschijnlijk de belangrijkste reden dat dit niet eerder is opgemerkt.

Naar de mening van de auteurs is het gerechtvaardigd en verantwoord om deze afwijking te corrigeren door de individuele meetresultaten uit die periode te vermenigvuldigen met een factor 0,81.

Ook na deze correctie geldt echter nog steeds dat de parameter chlfa in de periode 1974 t/m 1984 onderscheiden moet worden van de parameter chlfa in de daarop volgende perioden en dat de RIZA-resultaten in de ringonderzoeken 1982 en 1983 nog steeds hoger zijn dan het landelijk gemiddelde.

De correctie van de resultaten uit de periode 1974 t/m 1984 is een stap in de goede richting; de gecorrigeerde resultaten zijn nog niet gelijkwaardig aan de resultaten die met NEN 6520:1981 zouden zijn verkregen.

4 KRITISCHE BESCHOUWING VAN DE CHLOROFYL-A GEHALTEN

In dit hoofdstuk wordt het in de inleiding genoemde "resultatenspoor" gevolgd.

De chlfa-resultaten van het RIZA en het PWN in ringonderzoeken worden vergeleken met meetreeksen van RIZA en PWN. Hierbij is nog geen rekening gehouden met de voorgestelde correctie van de RIZA-gegevens uit de periode 1974 t/m 1984. Onder de resultaten van het RIZA worden de resultaten verstaan zoals ze nu (oktober 1995) voorkomen in een aantal databestanden.

4.1 Gegevens tot 1985 (RIZA-methode met aceton extractie)

Uit de ringonderzoeken in 1982 en 1983, waarbij in totaal 18 monsters van 6 verschillende lokaties geanalyseerd zijn, blijkt dat het RIZA gemiddeld 47% en het PWN gemiddeld 24 % hogere waarden meten dan het gemiddelde van alle deelnemende laboratoria. De meeste laboratoria passen NEN 6520:1981 toe.

Uitgaande van hetgeen in het Besluit Kwaliteitsdoelstellingen en Metingen Opper-vlaktewateren ten aanzien van de parameter Algenbiomassa is vermeld, wordt het volgende aangenomen:

- de bepaling van chlfa volgens NEN 6520:1981 is het aftelpunt en levert dus "*juiste*" waarden voor chlfa op,
- de *gemiddelde chlfa-gehalten*, gevonden door alle deelnemers die NEN 6520:1981 (nagenoeg) geheel toepassen in de ringonderzoeken in 1982 en 1983, zijn de beste schatting van de *juiste* gehalten aan chlfa in de onderzochte monsters.

Op grond van deze aannames moeten de chlorofylgegevens van het RIZA in de jaren 1982 en 1983 worden gecorrigeerd met een factor 0,67 om deze te kunnen vergelijken met chlorofylgehalten die volgens NEN 6520:1981 (zouden) zijn verkregen.

Voor het bepalen van de factor 0,67 zijn de gemiddeld gevonden gehalten in de ringonderzoeken 1982 en 1983 opnieuw berekend, na verwijdering van de resultaten van alle deelnemers die aceton hebben toegepast. In principe zouden de toetsen op uitbijters volgens Cochran en Dixon pas ~~daarna~~ moeten zijn uitgevoerd; dit is niet gebeurd omdat daartoe alle data opnieuw ingevoerd moesten worden. De hierdoor eventueel ontstane afwijking in de factor 0,67 is echter verwaarloosbaar ten opzichte van de spreiding in deze factor (=9,7 %).

De methode die het RIZA heeft toegepast in 1982 en 1983 is zonder wezenlijke veranderingen vanaf 1974 in gebruik. Ten einde vast te stellen of de berekende correctiefactor ook mag worden toegepast op resultaten van vóór 1982, zijn de verschillen tussen RIZA en PWN in de jaargemiddelden van 1980, 1981, 1982 en 1984 van het IJsselmeer vergeleken met de verschillen tussen RIZA en PWN in de ringonderzoeken van 1982 en 1983.

De jaargemiddelden van het RIZA zijn een factor 1,17 hoger dan die van het PWN; voor de ringonderzoeken in 1982 en 1983 is deze factor 1,16. Voor de onderzochte resultaten bestaat er dus een constante verhouding tussen het RIZA en het PWN.

Het PWN heeft een belangrijke bijdrage geleverd aan de totstandkoming van ontwerp-NEN 6520:1978 en NEN 6520:1981. Aangenomen dat het PWN al vóór 1980 een methode heeft

toegepast die niet wezenlijk verschilt van NEN 6520:1981, volgt hieruit:

De jaargemiddeldes van chlfa in het IJsselmeer in de periode 1980 - 1985 moeten worden gecorrigeerd met een factor 0,67 om deze vergelijkbaar te maken met resultaten die volgens NEN 6520:1981 (zouden) zijn verkregen.

Bij het opstellen van dit werkdocument zijn geen jaargemiddeldes betrokken uit de periode 1974 - 1980 om te kunnen verifiëren of de RIZA-resultaten uit die periode op dezelfde wijze kunnen worden gecorrigeerd. Zoals vermeld in par. 2.5 heeft het RIZA in de periode 1974 t/m 1984 dezelfde methode gebruikt voor de bepaling van chlfa en is deze bepaling door dezelfde medewerker of onder diens directe verantwoordelijkheid uitgevoerd. Op grond hiervan wordt gepostuleerd:

Ook de jaargemiddeldes van chlfa in het IJsselmeer in de periode 1974 - 1980 moeten worden gecorrigeerd met een factor 0,67 om deze vergelijkbaar te maken met resultaten die volgens NEN 6520:1981 (zouden) zijn verkregen.

Bovenstaande conclusies dienen in het juiste licht te worden gezien. Er wordt niet beweerd dat de individuele meetwaarden van chlfa van alle meetpunten in de periode 1974 t/m 1984 met een factor 0,67 moeten/mogen worden gecorrigeerd. Deze factor is relatief "hard" voor de jaren 1982 en 1983 omdat de ringonderzoeken in die jaren betrekking hebben gehad op verschillende watertypes (IJsselmeer, Markermeer, Eemmeer, Veluwemeer en Maas).

Voor de periode 1980 - 1985 is de factor getoetst aan de vergelijking van **jaargemiddelden van het IJsselmeer**. Omdat de jaren 1982 en 1983 óók in deze periode liggen, is het toepassen van de correctiefactor op andere resultaten dan de jaargemiddeldes van het IJsselmeer redelijk te verantwoorden.

Voor de periode 1974 - 1980 is het gebruik van de correctiefactor voor andere resultaten dan de jaargemiddeldes van het IJsselmeer minder verantwoord naar mate de samenstelling van de algenpopulaties sterker afwijken van die in het IJsselmeer in 1980 -1985.

Dat neemt niet weg dat de correctiefactor 0,67 momenteel de beste schatter is om de waarde van de parameter algenbiomassa te berekenen voor de periode 1974 t/m 1985.

Er is onvoldoende reden om op grond van bovenstaande paragraaf de individuele gehalten aan chlfa uit de periode 1974 t/m 1984, zoals deze nu zijn opgeslagen in WORSRO c.q. DONAR te corrigeren met een factor 0,67. Deze metingen zijn verricht met een andere methode dan NEN 6520:1981 en er zijn geen feiten vastgesteld waaruit blijkt dat bij het toepassen van die methode "fouten" zijn gemaakt die overeenkomen met een factor 0,67.

Voor een correctie met een factor 0,81 zijn wel voldoende redenen aangevoerd in hoofdstuk 3.

4.2 Gegevens van 1985 (RIZA-methode met ethanol extractie)

In 1985 heeft het RIZA de bepalingmethode gewijzigd. De gewijzigde methode mag nog niet worden beschouwd als geheel conform aan NEN 6520:1981. Er zijn echter geen vergelijkende onderzoeken waaruit een eventuele correctie van de in 1985 geproduceerde gegevens afgeleid kan worden. Bij een vergelijking van RIZA-meetresultaten met gegevens van het PWN moet worden bedacht dat het PWN bij de ringonderzoeken tot en met 1986 steeds duidelijk hoger dan het gemiddelde en derhalve - op grond van de aannames in par. 4.1 - hoger dan de juiste waarde scoorde.

Het is naar de mening van de auteurs niet verantwoord om de gemiddeld een factor 1,24 hogere gehalten van het PWN in de ringonderzoeken 1982 en 1983 te gebruiken bij het berekenen van een correctiefactor uit de vergelijking van RIZA- en PWN-gegevens voor het IJsselmeer in 1985. Dit is mede gebaseerd op het gegeven dat het PWN in een ringonderzoek in 1986 een factor 1,58 hogere gehalten vond dan de gemiddelde.

Met betrekking tot de vergelijkbaarheid van chlfa-gegevens blijft 1985 een onzeker jaar.

4.3 Gegevens van 1986 tot 1-4-1987 (RIZA-methode met ethanol extractie)

In deze periode bleek uit gegevens van een ringonderzoek van het PWN dat het RIZA veel te lage waarden vond. Naar aanleiding hiervan is RIZA-notitie 87.077x verschenen waaruit bleek dat een belangrijke oorzaak voor de lage waarden het niet goed functioneren van een erg oude spectrofotometer was. De spectrofotometer was echter niet de enige oorzaak, ook de methode zoals gebruikt en overgenomen van de afdeling biologie was niet conform NEN 6520 en duidelijk voor verbetering vatbaar.

Er is voor deze periode een correctiefactor (1,8) vastgesteld (Stoks, zie bijlage 5) waarmee de gehalten aan chlfa in WORSRO zijn gecorrigeerd. Deze factor is berekend met behulp van gegevens van de WRK.

Een sterk punt bij het bepalen van de factor is geweest dat er gegevens zijn gebruikt van 3 verschillende watersystemen en 5 verschillende lokaties. Bovendien betreft het 4 lokaties in rivieren, hetgeen meestal verondersteld wordt een beter gemengd systeem te zijn dan een meer.

De juistheid van de factor 1,8 is getoetst aan de gegevens uit het ringonderzoek van 1986 door de RIZA-resultaten zonder en met correctie te vergelijken met de gemiddeld gevonden resultaten.

Tabel 3: Gehalten aan chlorofyl-a ($\mu\text{g/l}$) in het ringonderzoek 1986

monster	RIZA	RIZA x 1,8	Gemiddelde van alle deelnemers
1	13,33	24	27
2	14,33	26	28

Uit tabel 3 mag worden geconcludeerd dat de gecorrigeerde RIZA-waarden dicht bij het gemiddelde van alle laboratoria liggen. Het gebruik van de factor 1,8 levert misschien iets te

lage, maar zeker geen onbetrouwbare, waarden op.

Uit tabel 3 volgt een correctiefactor 2,0. Het - opnieuw - aanpassen van de reeds in DONAR gecorrigeerde gehalten wordt echter niet aanbevolen om de volgende redenen:

- het aantal monsters in het ringonderzoek van 1986 is veel minder dan het aantal monsters waaruit de factor 1,8 is berekend,
- het verschil tussen een factor 2,0 en 1,8 is slechts 10 %, dit is dezelfde orde van grootte als de spreiding in resultaten tussen laboratoria

Bij vergelijking van RIZA- en PWN-gegevens betreffende het gehalte aan chlfa in het IJsselmeer (bijlage 4) moet meegewogen worden dat de resultaten van het PWN in het ringonderzoek in 1986 ca. 58% hoger waren dan het gemiddelde. Bovendien kunnen verschillen in tijdstip en wijze van bemonstering grote invloed op het verkregen resultaat hebben.

Een duidelijk voorbeeld hiervan is het door het PWN bepaalde jaargemiddelde gehalte in het IJsselmeer in 1983 (zie bijlage 4). Gelukkig is men zo attent geweest om het vóórkomen van drijflagen van microcystis op te merken en vast te leggen.

4.4 Gegevens vanaf 1-4-1987 (NEN 6520:1981)

In 1987 heeft het RIZA gekozen om de bepaling van chlfa voortaan geheel volgens NEN 6520:1981 uit te voeren. Daarbij is ook veel aandacht geschonken aan zaken als "Goede Laboratorium Praktijk" (GLP) en "Goede Meet Praktijk" (GMP). Bovendien is daarbij steeds nauwlettend toegezien op de vergelijkbaarheid van de verkregen resultaten met die van anderen.

Een en ander is niet zonder resultaat gebleken. Een vergelijk met WBB-gegevens uit 1989 van Eysden en de uitslagen van diverse ringonderzoeken duiden op een duidelijk verbeterde vergelijkbaarheid van de chlorofylgegevens.

Overigens geldt dit niet alleen voor de gegevens van het RIZA. Uit ringonderzoeken van de laatste jaren blijkt duidelijk dat in zijn algemeenheid laboratoria beter vergelijkbare gegevens produceren. Waarschijnlijk het gevolg van het organiseren van meer ringonderzoeken maar ook door meer aandacht voor kwaliteitszorg.

Bij het RIZA heeft dit laatste ertoe geleid dat bv. voortaan bij elke serie monsters die op één dag verwerkt worden door één analist een controlemonster wordt meegenomen. Door de uitslagen van deze controlemonsters bij te houden op een controlekaart is het mogelijk te grote afwijkingen ten opzichte van het gemiddelde direct te signaleren.

Er is dan ook geen enkele aanleiding om vraagtekens te plaatsen bij de resultaten van het RIZA in de periode na 1-4-1987. Ter illustratie hiervan dient onderstaande samenvatting van het ringonderzoek chlfa 1994.

Tabel 4: Gehalten aan chlorofyl-a ($\mu\text{g/l}$) in het ringonderzoek 1994

Monster	Aantal deelnemers	gem. ($\mu\text{g/l}$)	s_r ($\mu\text{g/l}$)	s_R ($\mu\text{g/l}$)	RIZA ($\mu\text{g/l}$)	RIZA gem.
Wolderwijd	29	19,8	1,6	4,4	20,0	1,01
Wolderwijd	30	41,9	2,7	7,1	44,5	1,06
Ketelmeer	25	15,9	0,9	3,2	15,0	0,94
standaard	27	0,185		0,004	0,194	1,05

gem.: gemiddelde gehalten aan chlfa; **s_r :** standaarddeviatie van de herhaalbaarheid; **s_R :** standaarddeviatie van de reproduceerbaarheid; **RIZA:** gemiddelde gehalten aan chlfa, zoals door het RIZA gemeten; **standaard:** extinctie van een standaardoplossing van nikkelchloride in water.

5 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- 1 Het gehalte aan chlorofyl-a (chlfa) is nog steeds een bruikbare maat voor het schatten van de biomassa van het fytoplankton. Deze maat is verankerd in het Besluit Kwaliteitsdoelstellingen en Metingen Oppervlaktewateren waarbij NEN 6520 1^e druk 1981 als verplichte standaardmeetmethode is voorgeschreven.
- 2 Gebruikelijke bepalingsmethoden voor chlfa, gebaseerd op spectrofotometrie, zijn niet specifiek voor chlfa; isomeren van chlfa en afbraakproducten worden meebepaald.
Chlfa kan op verschillende manieren uit het fytoplankton wordt geëxtraheerd; dit leidt tot verschillende resultaten.
Voor de kwantificering van chlfa zijn geen gecertificeerde referentiematerialen (standaarden en/of monsters met bekende en "gegarandeerde" gehalten) beschikbaar. Dit zijn de belangrijkste redenen waarom chlfa moet worden beschouwd als een groepsparameter. Er is geen mogelijkheid om de "juistheid" van bepalingsmethoden voor chlfa vast te stellen.
- 3 Tot en met 1984 heeft het RIZA een bepalingsmethode voor chlfa toegepast die in een aantal opzichten afwijkt van NEN 6520:1981. De in deze periode gemeten gehalten aan chlfa zijn hoger dan de gehalten die zouden zijn verkregen door het toepassen van NEN 6520:1981. Dit blijkt o.a. uit de resultaten van interlaboratorium vergelijkend onderzoek in 1982 en 1983.
- 4 Uit een kritische beschouwing van de RIZA-methode blijkt dat bij de wijze van kwantificering van chlfa een waarde voor de specifieke extinctiecoëfficiënt van chlfa in aceton wordt gehanteerd ($7,36 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$) die niet in overeenstemming is met de in de literatuur gebruikelijke waarde van $9,11 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$.
Hierdoor worden te hoge gehalten aan chlfa berekend.
Aanbevolen wordt om de gerapporteerde en in DONAR opgeslagen gehalten van deze periode te corrigeren met een factor 0,81.
- 5 Ook na correctie met de factor 0,81 zijn de gehalten in deze periode nog steeds hoger dan de gehalten die zouden zijn verkregen door NEN 6520:1981 volledig toe te passen. Dit verschil wordt toegeschreven aan de extractieprocedure met aceton (RIZA) in plaats van 80 % ethanol (NEN).
- 6 Indien aangenomen wordt dat de gemiddelde resultaten van de deelnemers, die in de ringonderzoeken van 1982 en 1983 NEN 6520:1981 hebben toegepast, de beste schatting van de juiste waarden zijn, moeten de gecorrigeerde RIZA meetwaarden **nogmaals** gecorrigeerd worden met een factor 0,81.
- 7 Het wordt niet aanbevolen om deze tweede correctie met een factor 0,81 uit te voeren voor de als chlfa opgeslagen gehalten in DONAR. Deze gehalten zijn immers verkregen door het toepassen van een andere extractieprocedure en hebben derhalve betrekking op een andere groepsparameter dan chlfa volgens NEN 6520:1981.
- 8 Voor het beleid is het noodzakelijk om meetcijfers van chlfa vóór 1985 te kunnen

vergelijken met meetcijfers na 1985. Deze vergelijking moet de werkelijkheid zo goed mogelijk kunnen benaderen. Voor dit doel is een tweede correctie van de chlfa meetresultaten vóór 1985 noodzakelijk.

In overleg met de beheerder en gebruikers van DONAR moet hiervoor een goede oplossing worden gevonden die misverstanden zoveel mogelijk uitsluit.

- 9 Er zijn geen nieuwe gezichtspunten naar voren gekomen met betrekking tot de resultaten in het jaar 1985. Hiervoor wordt dan ook geen correctie voorgesteld. Aangezien in dit jaar er wel enige wijzigingen in de methode zijn geweest, blijft enige onzekerheid over de relatieve waarde van deze metingen bestaan.
- 10 De correctie van de gehalten aan chlfa in de periode 1986 tot 1-4-1987 die door Stoks is uitgevoerd, is getoetst aan de resultaten van het ringonderzoek in 1986. Dit heeft geen indicatie opgeleverd om aan de juistheid van deze correctie te twijfelen.
- 11 De bepaling van chlfa zoals deze door het RIZA wordt verricht sinds 1-4-1987 levert resultaten op die zich niet onderscheiden van de resultaten van andere laboratoria die NEN 6520:1981 toepassen. Dit wordt bevestigd door o.a. de resultaten van het ringonderzoek in 1994.
- 12 Er zijn bedenkingen tegen de werkwijze die is beschreven in NEN 6520:1981. Het wordt aanbevolen om dit normvoorschrift, uitgegeven in december 1981, te herzien en aan te passen aan de huidige inzichten.

6 LITERATUUR

Besluit van 3 november 1983, houdende regelen inzake kwaliteitsdoelstellingen en metingen oppervlaktewateren,

(i.h.b. Bijlage V, art. 4.3 - tweede volzin)

Staatsblad 606, november 1983

Boekholt, H. (1994)

Interlaboratory Performance Study.

Project 73 - Analysis of chlorophyll in freshwater - April 20, 1994

RIZA-werkdocument 94.126X, augustus 1994

Derenbach, J.B. (1969)

Zur Homogenisation des Phytoplanktons für die Chlorophyllbestimmung

Kieler Meeresforschung 25 166-171

Deutsches Institut für Normung e.V. (1985)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes von Oberflächenwasser

DIN 38 412 Teil 16, 1^e druk - december 1985

Deventer, B. (1993)

Der Einfluß von Aufbereitungsmethoden und Lagerungsbedingungen sowie Licht- und Nährstoffmangel auf die Pigmentzusammensetzung verschiedene Phytoplanktonarten

Diss. Universität Hamburg

Greenberg, A.E. et al. (1980)

Standard Methods for the Examination of Water and Waste water

APHA/AWWA/WPCF 15^e druk, 953

Harvey (1934)

Measurement of phytoplankton populations

J. Mar. Biol. Ass. U.K. 19 761-767

Hazenbergh, J. (1982)

Verslag van de resultaten van een vergelijkend onderzoek van chlorofyl-a en faeofytine-a in oppervlaktewater. Projekt 15, 25 maart 1982

RIZA - Lelystad, augustus 1982

Hazenbergh, J. (1983)

Laboratoriumevaluatie. Bepaling van chlorofyl-a en faeofytine-a in oppervlaktewater. Projekt 23, 27 juni 1983

RIZA - Lelystad, oktober 1983

Helmerhorst, T.H. (1989a)

Chlorofyl-a bepaling met behulp van hoge druk vloeistof chromatografie

DBW/RIZA-werkdocument 89.089X, september 1989

- Helmerhorst, T.H. (1989b)
 Identificering en kwantificering van groenwieren, cyanobacteria en diatomeeën met behulp van HPLC-pigmentanalyse
 DBW/RIZA-werkdocument 89.121X, november 1989
- Helmerhorst, T.H. (1991)
 Fytoplankton determinatie met HPLC pigmentanalyse
 DBW/RIZA-werkdocument 91.029X, februari 1991
- Hoornsman, G. en J. Kuiper (1979)
 Vergelijking van drie extractiemethoden voorafgaand aan de spectrofotometrische bepaling van chlorofyl
 TNO-rapport CL 79/45, mei 1979
- International Organization for Standardization (1992)
 Water quality - Measurement of biochemical parameters - Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration
 ISO 10260:1992(E)
- Lorenzen, C.J. (1967)
 Determination of chlorophyll and phaeopigments - Spectrophotometric equations
 Limnol. Oceanogr. 12 343-346
- Ministerie van Volksgezondheid en van het Gezin (1985)
 Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie
 Analysemethoden voor Water
 IHE D/1985/2505/1, 161
- Moss, B. (1967a)
 Spectrophotometric Method for the Determination of Percentage Degradation of Chlorophylls to Phaeo-Pigments in Extracts of Algae
 Limnol. Oceanogr. 12 335-340.
- Moss, B. (1967b)
 A Note on the Estimation of Chlorophyll a in Freshwater Algal Communities
 Limnol. Oceanogr. 12 340-342
- Nederlands Normalisatie Instituut (1981)
 Water - Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a
 NEN 6520, 1^e druk - december 1981
- Rowan, K.S. (1989)
 Photosynthetic Pigments of Algae
 Cambridge University Press
- Scheer, H. (1991)
 Chlorophylls
 CRC-Press

Strickland, J.D.H. en T.R. Parsons (1968)
A Practical Handbook of Sea Water Analysis
Bull. Fish. Res. Bd. Can. 167 185-194

Urk, G. van, T.H. Helmerhorst en H. Ruiter (1990)
De spectrofotometrische bepaling van chlorophyll-a in oppervlaktewater (NEN 6520) kritisch
bekeken
H₂O, 23 554-559

World Health Organization et al. (1987)
GEMS/Water - Operational Guide
WHO - Geneve, ETS/78.8/Rev. 1, 237-239

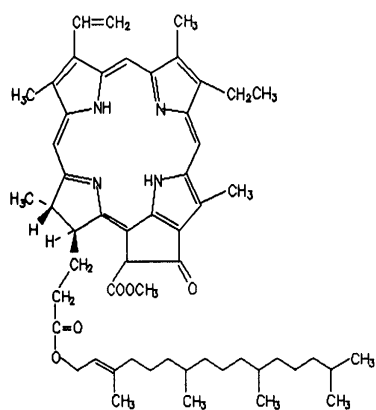
Zwarter, H. (1993)
Vergelijking van de HPLC-pigmentanalyse met de spectrofotometrische bepaling van
chlorofyl-a (NEN 6520) en met de microscopische algendeterminaties (abundantie)
RIZA-werkdocument 93.067X, mei 1993

7 BIJLAGEN

Bijlage 1	Structuurformule chlorofyl-a en afbraakschema
Bijlage 2	Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a
Bijlage 3	(Norm)voorschriften voor de bepaling van chlorofyl-a
Bijlage 4	Jaargemiddelde gehalten aan chlorofyl-a in het IJsselmeer
Bijlage 5	Berekening correctie meetwaarden 1-1-1986 - 1-4-1987 (Stoks)
Bijlage 6	Notitie Leo van Ballegooijen
Bijlage 7	RIZA-voorschrift voor de bepaling van chlorofyl-a
Bijlage 8	besluitvorming in de IM staf

Bijlage 1: Structuurformule en afbraakschema van chlorofyl-a

Fout! Ongeldige koppeling.
chlorofyl-a



faeofytine-a

Bijlage 2: Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a

In deze bijlage wordt de berekeningswijze van chlfa uit de gemeten extincties van een extract vóór en na aanzuren toegelicht. Eerst wordt de berekening volgens NEN 6520:1981 afgeleid, daarna wordt de relatie tussen de berekeningswijze van het RIZA en die van NEN 6520:1981 vastgesteld.

Het gehalte aan een stof y kan worden berekend uit de gemeten extinctie met behulp van de wet van Lambert-Beer:

$$A_y = \epsilon_y \times c_y \times l \quad (1)$$

hierin is:

- A_y : gemeten extinctie bij golflengte λ
- ϵ_y : specifieke extinctiecoëfficiënt van y bij golflengte λ , in $\text{l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$
- c_y : gehalte aan y, in g/l
- l : optische weglengte, in mm

Voor de bepaling van chlfa kan (1) als volgt worden geformuleerd:

$$c_c = 1000 \times \frac{A_c}{\epsilon_c} \times \frac{V_e}{V_m \times l} \quad (2)$$

hierin is:

- c_c : gehalte aan chlfa, in $\mu\text{g/l}$
- A_c : gemeten extinctie van chlfa bij 665 nm
- ϵ_c : specifieke extinctiecoëfficiënt van chlfa bij 665 nm, in $\text{l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$
- V_e : totale volume van het extract, in ml
- V_m : volume van het in bewerking genomen monster, in l
- l : optische weglengte van het gebruikte cuvet, in mm

A_c kan echter niet rechtstreeks worden gemeten omdat naast chlfa ook andere pigmenten aanwezig zijn die bij de golflengte λ licht absorberen. Zowel NEN 6520 als het RIZA-voorschrift gaan uit van het volgende model:

- de gemeten extinctie vóór het aanzuren van het extract ($= A_o$) wordt veroorzaakt door bijdragen van chlfa en faeo,
- door het aanzuren wordt het aanwezige chlfa omgezet in een **gelijke** hoeveelheid faeo,
- de gemeten extinctie na aanzuren van het extract ($= A_z$) wordt uitsluitend veroorzaakt door faeo; dit betreft de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid faeo en de uit het chlfa gevormde faeo,
- de specifieke extinctiecoëfficiënt van faeo ($= \epsilon_f$) is 1,7 x kleiner dan ϵ_c , (dit is de waarde volgens NEN 6520:1981; het RIZA-voorschrift past de waarde 1,753 toe).

Bijlage 2: Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a

In formules:

$$A_o = A_c + A_f \quad (3)$$

$$A_z = A_f + A_{fc} \quad (4)$$

hierin is:

A_o : gemeten extinctie bij 665 nm vóór aanzuren

A_z : gemeten extinctie bij 665 nm na aanzuren

A_c : extinctie bij 665 nm van chlfa vóór aanzuren

A_f : extinctie bij 665 nm van faeo vóór aanzuren

A_{fc} : extinctie bij 665 nm van de uit chlfa ontstane faeo na aanzuren

De berekening volgens NEN 6520:1981 gaat nu als volgt:

Uit (3) en (4) volgt:

$$A_o - A_z = A_c - A_{fc} \quad (5)$$

omdat de specifieke extinctiecoëfficiënt van faeo (ε_f) 1,7 x kleiner is dan ε_c geldt:

$$A_{fc} = \frac{A_c}{1,7} \quad (6)$$

invullen in (5) geeft:

$$A_o - A_z = A_c - \frac{A_c}{1,7} \quad (7)$$

$$A_c = \frac{1,7}{1,7 - 1} \times (A_o - A_z) \quad (8)$$

$$A_c = 2,43 \times (A_o - A_z) \quad (9)$$

gecombineerd met (2) levert dit de formule op om het gehalte aan chlfa te berekenen uit het verschil van de extincties vóór en na aanzuren:

$$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{\varepsilon_c} \times \frac{V_e}{V_m \times l} \quad (10)$$

Bijlage 2: Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a

Invullen van de waarde voor ε_c ($= 8,16 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ voor chlfa in 80 % ethanol bij 665 nm) levert ten slotte de berekeningsformule op die in NEN 6520:1981 wordt gebruikt:

$$c_c = 296 \times \frac{(A_o - A_z) \times V_e}{V_m \times l} \quad (11)$$

hierin is:

- c_c : gehalte aan chlfa in het monster, in $\mu\text{g/l}$
- A_o : gemeten extinctie bij 665 nm vóór aanzuren van het extract
- A_z : gemeten extinctie bij 665 nm na aanzuren van het extract
- V_e : totale volume van het extract, in ml
- V_m : volume van het in bewerking genomen monster, in l
- l : optische weglengte van het gebruikte cuvet, in mm

In deze afleiding is geen rekening gehouden met de correctie voor troebelheid, zoals deze wel in NEN 6520:1981 wordt toegepast. Formule (11) is equivalent aan de berekening volgens NEN 6520:1981 indien voor A_o en A_z de voor eventuele troebeling gecorrigeerde extincties worden gebruikt.

Het voorschrift van het RIZA, zoals dit is gebruikt in de periode 1974 - 1985 (zie bijlage 7), bevat een geheel andere wijze van berekening. De formule die het RIZA hanteert is:

$$c_c = \frac{F_c \times A_o \times V_e}{V_m \times l} \quad (12)$$

hierin is:

- F_c : F-waarde; de factor die behoort bij de waarde $A_o : A_z$ zoals afgelezen uit de F-waardentabel van het RIZA-voorschrift
 - l : optische weglengte van het gebruikte cuvet, in **cm**
- de overige symbolen zijn gelijk aan die in formule (11)

Uit vergelijking van (12) met (2) blijkt dat F_c moet worden beschouwd als de schijnbare reciproke extinctiecoëfficiënt van chlfa voor het mengsel van chlfa en faeo. Er is dus geen vaste waarde voor F_c te geven; de waarde van F_c is afhankelijk van de relatieve hoeveelheden chlfa en faeo in het onaangezuurde extract. Daarom wordt een tabel gehanteerd die voor waarden van de verhouding tussen A_o en A_z een bijbehorende waarde voor F_c geeft. De relatie tussen deze verhouding en F_c kan als volgt worden afgeleid:

Uit (10) en (12) volgt:

$$\frac{2430}{\varepsilon_c} \times (A_o - A_z) = 10 \times F_c \times A_o \quad (13)$$

De factor 10 is een gevolg van het verschil in dimensies van de optische weglengtes l in beide formules.

Bijlage 2: Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a

Stel:

$$R = \frac{A_o}{A_z} \quad (14)$$

dan is:

$$\frac{R-1}{R} \times A_o = A_o - A_z \quad (15)$$

en gaat (13) over in:

$$\frac{2430}{\epsilon_c} \times \frac{R-1}{R} \times A_o = 10 \times F_c \times A_o \quad (16)$$

$$F_c = \frac{243}{\epsilon_c} \times \frac{R-1}{R} \quad (17)$$

Deze formule geeft de relatie tussen F_c , ϵ_c en R .

Bedacht moet worden dat ϵ afhankelijk is van het oplosmiddel waarin chlfa is opgelost. In het RIZA-voorschrift is dit 90 % aceton.

Met behulp van (17) en de tabel in het RIZA-voorschrift is nu terug te rekenen welke waarde van ϵ_c het RIZA in feite heeft gehanteerd bij de berekening van het gehalte aan chlfa. Van de oorspronkelijke 41 waarden in de tabel zijn de 21 oneven waarden (nrs. 1, 3, 5 41) overgenomen en doorerekend.

Tabel 5: Berekende waarden voor ϵ_c uit R en F_c

R	F_c	ϵ_c	R	F_c	ϵ_c
1,000	0		1,419	9,7	7,40
1,038	1,1	8,08	1,458	10,3	7,41
1,075	2,3	7,37	1,490	10,9	7,33
1,113	3,3	7,48	1,531	11,5	7,33
1,150	4,3	7,37	1,569	12,0	7,34
1,188	5,3	7,26	1,604	12,5	7,32
1,227	6,1	7,37	1,641	12,9	7,36
1,266	6,9	7,40	1,680	13,4	7,34
1,305	7,7	7,38	1,716	13,9	7,29
1,342	8,5	7,29	1,753	14,3	7,29
1,381	9,1	7,37			

Bijlage 2: Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a

De berekende waarden voor ε_c behoren constant te zijn; uit de tabel blijkt dat dit ook redelijk het geval is. Hieruit wordt geconcludeerd dat de F-waardentabel die voorkomt in het RIZA-voorschrift gebaseerd is op de aannames daarover zoals deze aan het begin van de afleiding zijn geformuleerd.

De berekeningen in NEN 6520:1981 en in het RIZA-voorschrift zijn dus op dezelfde aannames zijn gebaseerd.

Het enigszins wispelturige verloop in de berekende waarden voor ε_c wordt toegeschreven aan een te grote mate van afronding van de waarden voor F_c in de oorspronkelijke tabel. Wanneer de waarden voor $R = 1,000$ en $R = 1,038$ (waarden die overeenkomen een relatief aandeel van chlfa in de totale hoeveelheid pigment van 0 resp. 5 %) worden weggelaten, bedraagt de gemiddelde waarde voor ε_c $7,35 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ met een standaardafwijking van 0,05 (relatieve standaardafwijking 0,7 %).

Uit verschillende bronnen in de literatuur blijkt dat de meest toegepaste waarde voor chlfa in 90 % aceton $9,11 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ is. Het RIZA heeft dus in zijn voorschrift impliciet een waarde voor ε_c gehanteerd die $0,809 \times$ de literatuurwaarde is. De RIZA-resultaten zijn derhalve $1 : 0,809 = 1,24 \times$ te hoog berekend. De oorzaak hiervan is niet achterhaald. De publikatie die in het RIZA-voorschrift wordt genoemd, gebruikt voor de berekening van de F-waarden bij 665 nm in 90 % aceton de volgende specifieke extinctiecoëfficiënten: chlfa = $9,08 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ en faeo = $5,52 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$.

Op grond van de afleidingen in deze bijlage moeten en kunnen de RIZA-resultaten worden gecorrigeerd met een factor 0,81.

De RIZA-resultaten moeten worden gecorrigeerd omdat de berekeningswijze impliciet van een hoogst ongebruikelijke waarde voor ε_c is uitgegaan; de resultaten kunnen worden gecorrigeerd omdat de spreiding in de toegepaste waarden voor ε_c slechts 0,7 % bedraagt. De correctiefactor heeft dus ook slechts een zeer geringe spreiding.

De factor 0,81 is geheel in overeenstemming met de factor 0,81 die uit de gerapporteerde ruwe data van de ringonderzoeken 1982 en 1983 is berekend. Dit behoort ook zo te zijn omdat de tabel met F-waarden is gebruikt voor het berekenen van de gerapporteerde gehalten aan chlfa in de ringonderzoeken 1982 en 1983 en de herberekening van deze gehalten is verricht met formule (10) en $\varepsilon_c = 9,11 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$.

In tabel 6 zijn alle gegevens van de RIZA-metingen in de ringonderzoeken 1982 en 1983 overgenomen. De monsters IJsselmeer 1 t/m Eemmeer 3 behoren bij het ringonderzoek 1982; Maas 1 t/m Eemmeer 6 bij 1983.

De opschriften van de kolommen hebben de volgende betekenis:

V_m :	volume van het in bewerking genomen monster, in l,
V_e :	totale volume van het verkregen extract, in ml,
A_o :	extinctie bij 665 nm vóór het aanzuren van het extract,
A_z :	extinctie bij 665 nm na aanzuren van het extract,

Bijlage 2: Berekening van het gehalte aan chlorofyl-a

$C_{rap.}$:	gerapporteerde gehalte aan chlfa, in $\mu\text{g/l}$,
$\varepsilon_{ber.}$:	specifieke extinctiecoëfficiënt van chlfa bij 665 nm, berekend met formule (10), uit V_m , V_e , A_o , A_z , $C_{rap.}$ en l ($l = 10 \text{ mm}$), in $\text{l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$
$C_{herber.}$:	gehalte aan chlfa, herberekend volgens formule (10) uit V_m , V_e , A_o , A_z , l en ε_c ($= 9,11 \text{ l.g}^{-1}.\text{mm}^{-1}$), in $\mu\text{g/l}$,
$C_{herber.} : C_{rap.}$:	verhouding tussen het opnieuw berekende en het gerapporteerde gehalte aan chlfa.

De laatste rij van tabel 6 bevat het berekende gemiddelde en de standaard deviatie voor $\varepsilon_{ber.}$ en $C_{herber.} : C_{rap.}$.

De optische weglengte van het gebruikte cuvet, l in formule (10), is niet opgenomen in tabel 6; alle meetresultaten zijn verkregen met $l = 10 \text{ mm}$.

Bij deze berekening zijn de waarden voor monster IJsselmeer 1 (in tabel 6 aangegeven met een *) niet meegenomen en als uitbijter beschouwd. De motivering hiervoor is:

- het verschil tussen de berekende gemiddeldes voor $\varepsilon_{ber.}$ en $C_{herber.} : C_{rap.}$ en de waarden voor monster IJsselmeer 1 bedraagt 4,9 x resp. 16 x de berekende standaarddeviatie, waardoor de waarden voor IJsselmeer 1 als uitbijter mogen worden beschouwd,
- de afronding van $C_{rap.}$ op gehele getallen (in dit geval 4) kan leiden tot relatief grote verschillen tussen de afgeronde en niet afgeronde waarden; dit werkt door in de waarden voor $\varepsilon_{ber.}$ en $C_{herber.} : C_{rap.}$. Dat afronding hier een dergelijke invloed heeft, blijkt uit de niet afgeronde waarden van $C_{herber.}$

Tabel 6: Herberekening van RIZA-resultaten in ringonderzoeken 1982 en 1983

Monster	V _m (l)	V _e (ml)	A ₀	A _z	C _{rap.} (µg/l)	ε _{ber.} (l.g ⁻¹ .mm ⁻¹)	C _{herber.} (µg/l)	C _{herber.} : C _{rap.}
IJsselmeer 1	1	13	0,031	0,020	4	6,950*	3,8	0,953*
IJsselmeer 2	1	12,5	0,033	0,023	4	7,594	3,3	0,833
IJsselmeer 3	1	13,5	0,031	0,022	4	7,381	3,2	0,810
Markermeer 1	1	19,5	0,140	0,092	31	7,337	25	0,805
Markermeer 2	1	18,5	0,149	0,100	30	7,343	24	0,806
Markermeer 3	1	19	0,147	0,101	29	7,324	23	0,803
Veluwemeer 1	0,5	21,5	0,155	0,093	88	7,362	71	0,808
Veluwemeer 2	0,5	22,5	0,153	0,093	89	7,372	72	0,809
Veluwemeer 3	0,5	18,5	0,181	0,107	92	7,232	73	0,793
Eemmeer 1	0,25	21	0,186	0,112	206	7,332	166	0,804
Eemmeer 2	0,25	22,5	0,178	0,109	207	7,290	166	0,800
Eemmeer 3	0,25	18,5	0,210	0,128	201	7,336	162	0,805
Maas 1	1	18,5	0,078	0,054	14,4	7,492	11,8	0,822
Maas 2	1	17,5	0,090	0,064	14,8	7,471	12,1	0,820
Maas 3	1	15	0,102	0,072	14,8	7,388	12,0	0,811
Eemmeer 4	0,15	17,5	0,189	0,112	295,5	7,387	239	0,810
Eemmeer 5	0,15	18	0,191	0,114	307,1	7,311	246	0,802
Eemmeer 6	0,15	17,5	0,192	0,113	306,9	7,298	246	0,801
gem. (n=17) st. dev.						7,368 0,085		0,808 0,009

Bijlage 3: (Norm)voorschriften voor de bepaling van chlorofyl-a

In deze bijlage wordt een tabellarisch overzicht gegeven van een aantal gestandaardiseerde bepalingsmethoden voor chlfa; ter vergelijking is ook het RIZA-voorschrift uit de periode 1974 - 1985 opgenomen.

Ten einde de vergelijking van methoden te vereenvoudigen, zijn de berekeningsformules van alle opgenomen voorschriften geconverteerd in het format van formule **(10)** in bijlage 2; dit betreft eveneens de betekenis van de symbolen en de daarbij behorende dimensies (eenheden). Ter vergelijk is NEN 6520 op elke bladzijde van de tabel als eerste opgenomen.

Het overzicht is beperkt tot methoden die gebaseerd zijn op spectrofotometrie bij een golflengte van ca. 665 nm en geforceerde omzetting van chlfa in faeo. De z.g. "trichromatische" methoden - waarbij door meting bij drie golflengten een onderscheid tussen chlorofyl-a, -b en -c gemaakt kan worden - blijven buiten beschouwing. Dergelijke methoden worden o.a. toegepast door het IHE (Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie - Brussel) en in het GEMS (Global Environmental Monitoring System - UNEP/WHO/UNESCO/WMO); ook in de Standard Methods wordt deze methode beschreven.

Tabel 7: Overzicht van (norm)voorschriften voor de bepaling van chlorofyl-a blad 1

Methode	Extractie	Meting	Berekening
NEN 6520 december 1981	Filtratie van monster over glasvezelfilter (retentie > 0,3 µm). Filter met 80 % ethanol in afgesloten buis 5 min. schudden in waterbad bij 75 °C. Extract filtreren of centrifugeren; extract wordt niet aangevuld.	Extinctiemeting bij 750 nm en bij het absorptiemaximum rond 665 nm. Extract aanzuren met 0,20 ml zoutzuur 0,4 mol/l per 20 ml extract (= 4 mMol/l). Na 5 - 30 min. extincties bij 750 nm en bij het absorptiemaximum rond 665 nm meten.	$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{8,16} \times \frac{V_e}{V_m \times l}$
DIN 38 412 Tl 16 december 1985	Filtratie van monster over glasvezelfilter (retentie > 1 µm). Filter in kokende 90 % ethanol (= 78 °C) brengen, na afkoelen het filter macereren in een potterbuis en daarna 6 - 24 h. laten staan in het donker bij kamertemperatuur. Extract filtreren en aanvullen.	Extinctiemeting bij 750 en 665 nm. Extract aanzuren met 0,3 ml zoutzuur 2 mol/l per 100 ml extract (= 6 mMol/l). Na 3 - 30 min. extincties bij 750 en 665 nm meten.	$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{8,2} \times \frac{V_e}{V_m \times l}$
ISO 10260 juli 1992	Filtratie van monster over glasvezelfilter (retentie > 1 µm). Methode A: 90 % ethanol van 75 °C toevoegen. Filter macereren in een potterbuis. Extraheren gedurende ten minste 3 min. Extract filtreren en aanvullen. Methode B: Filter met 90 % ethanol in afgesloten buis 5 min. verwarmen in waterbad bij 75 °C. Extract filtreren of centrifugeren; extract wordt niet aangevuld.	Extinctiemeting bij 750 en 665 nm. Extract aanzuren met 0,01 ml zoutzuur 3 mol/l per 10 ml extract (= 3 mMol/l). Na 5 - 30 min. extincties bij 750 en 665 nm meten.	$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{8,2} \times \frac{V_e}{V_m \times l}$

Tabel 7: Overzicht van (norm)voorschriften voor de bepaling van chlorofyl-a

blad 2

Methode	Extractie	Meting	Berekening
NEN 6520 december 1981	Filtratie van monster over glasvezelfilter (retentie > 0,3 µm). Filter met 80 % ethanol in afgesloten buis 5 min. schudden in waterbad bij 75 °C. Extract filtreren of centrifugeren; extract wordt niet aangevuld.	Extinctiemeting bij 750 nm en bij het absorptiemaximum rond 665 nm. Extract aanzuren met 0,20 ml zoutzuur 0,4 mol/l per 20 ml extract (= 4 mMol/l). Na 5 - 30 min. extincties bij 750 nm en bij het absorptiemaximum rond 665 nm meten.	$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{8,16} \times \frac{V_e}{V_m \times l}$
Standard Method 10200 H 1980	Filtratie van monster over glasvezel- of membraanfilter (retentie > 0,45 µm). Filter met 90 % aceton macereren, overbrengen in afgesloten buis, aanvullen tot vast volume en ten minste 2 h bij 4 °C in het donker laten staan. Extract filtreren of centrifugeren; extract wordt niet meer aangevuld.	Extinctiemeting bij 750 en 663^{*)} nm. Extract in cuvet aanzuren met 0,1 ml zoutzuur 0,1 mol/l per 3 ml extract (= 3 mMol/l). Na 90 sec. extincties bij 750 en 665 nm meten. ^{*)} in latere uitgaven 664 nm	$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{9,09} \times \frac{V_e}{V_m \times l}$
RIZA 1974 - 1985	Filtratie van monster over glasvezelfilter (retentie > 0,3 µm). Filter met 90 % aceton macereren in een potterbuis. Extract filtreren en aanvullen tot bepaald volume en 1 h in het donker laten staan. Extract filtreren over een wattenfilter.	Extinctiemeting bij 750 en 665 nm. Extract in cuvet aanzuren met 1 druppel zoutzuur 4 Mol/l (= ca. 20 mMol/l). Extinctiemeting bij 750 en 665 nm.	$c_c = 2430 \times \frac{A_o - A_z}{7,35} \times \frac{V_e}{V_m \times l}$

Bijlage 4: Jaargemiddelde gehalten aan chlorofyl-a in het IJsselmeer

Jaargemiddelden van het chlorofylgehalte van
het IJsselmeer, gemeten door PWN afdeling kbo psa .

CHLOROFYLGEHALTEN IN uG/L

	Chlorofyl a	faeofytine
1980	81	31
1981	82	30
1982	75	30
1983	173	41 * zeer veel drijflagen Microcystis aeruginosu
1984	76	30
1985	92	27
1986	101	32
1987	98	31
1988	81	38
1989	105	31
1990	89	28
1991	62	22
1992	81	29
1993	80	26

Bijlage 5: Berekening correctie meetwaarden 1-1-1986 - 1-4-1987 (Stoks)

rijkswaterstaat dienst binnenwateren/riza

datum: 30 september 1987

VAN afdeling: IOL
naam: Stoks

NAAR afdeling: WS AO Met verzoek tot verspreiding
naam: Sprong de Wit binnen de div. afdelingen

Onderwerp: Chlorofyl

Errare humanum est (q.e.d.)

Hierbij deel ik u mee dat vanaf heden alle door DBW/RIZA aangeleverde chlorofylgegevens van 1986 in WAKWAL zijn gewijzigd (vermenigvuldigd met een factor 1.8).

Deze zelfde wijziging geldt de gegevens van het 1^e kwartaal 1987 met inbegrip van alle locaties uit de navolgende bemonsteringstoetsen, bemonsterd op 1 april jl.

tocht nr. 30 Zuiderdiep

tocht nr. 13 Ketelmeer + Oostelijke Randmeren

tocht nr. 8 Oostvoornse meer

Alle latere chlorofylgegevens zijn/worden bepaald middels de nieuwe methode conform NEN 6520.

NB: Voor zover van toepassing kunnen projectmatige gegevens, opgeslagen in TOPLES, eveneens worden gewijzigd. Belanghebbende projectleiders kunnen zich hiertoe tot 1 december a.s. met mij in verbinding stellen.

Bijlage 5: Berekening correctie meetwaarden 1-1-1986 - 1-4-1987 (Stoks)

CHLOROFYL

Vergelijkbaarheid DBW/WRK

In het licht van de problematiek rond de chlorofylbepaling bij DBW is nagegaan in hoeverre de DBW-gegevens over 1986 overeenstemmen met die van WRK. Wellicht dat hieruit een correctiefactor af te leiden zou zijn waarmee DBW-gegevens over 1986 gecorrigeerd zou kunnen worden.

Van een vijftal locaties (Lobith, Eijsden, Keizersveer, Hagestein en IJsselmeer) waar zowel DBW als WRK chlorofyl bepalen, zijn daartoe de WRK-gegevens opgevraagd.

Een gedegen, statistisch onderbouwde aanpak van het beschikbare getallen-materiaal werd om verschillende redenen niet zinvol geacht.

- De juistheid van chlorofylbepalingen kan niet worden afgeleid uit het beschikbare materiaal. Bedacht dient te worden dat DBW als laagste en WRK als een-na-laagste scoorde in een in 1986 gehouden ringonderzoek.
- De gegevens lenen zich in principe niet voor methodenvergelijking: er is niet of nauwelijks op gelijke dagen bemonsterd, laat staan uit eenzelfde, goed gehomogeniseerde hoeveelheid water.
- Niet bekend is of en in hoeverre de gebruikte methoden onderling in verschillende mate gevoelig zijn voor verschillen in soorten samenstelling bij de diverse locaties,

Op grond van deze argumenten is voor een grofstoffelijke benadering gekozen.

- Per locaties is voor zowel de DBW- als de WRK-gegevens een zomer- en een wintergemiddelde berekend.
- Per locaties is hieruit een “zomerratio” en een “winterratio” berekend.
- Uit deze ratio's zijn een aantal gemiddelde ratio's berekend, op grond waarvan DBW-gegevens gecorrigeerd kunnen worden.

In de tabel is een en ander samengevat.

DBW/WRK	x winter		x zomer		winter	zomer	jaar
	DBW	WRK	DBW	WRK	DBW/WRK	DBW/WRK	
Lobith	2.6	5.5	15.5	25.2	0.47	0.62	0.55
Eijsden	5.3	6.6	13.9	38.7	0.80	0.36	0.58
Keizersveer	5.1	8.3	9.7	20.3	0.61	0.48	0.55
Hagestein	3.7	4.7	9.4	17.9	0.79	0.52	0.66
IJsselmeer*	18.6	92.5	52.9	89.4	0.20	0.59	0.40

*DBW: IJ23, WRK: Andijk

Bijlage 5: Berekening correctie meetwaarden 1-1-1986 - 1-4-1987 (Stoks)

Hierbij is niet gescreend op uitschieters, enerzijds vanwege het sterk fluctueren van de cijfers (wat is wel en wat is niet een uitschieter) en anderzijds daar het effect minder dan 10% bedroeg in het ene geval waar mogelijk van een uitschieter sprake was.

Met name bij de IJsselmeergegevens treden tussen DBW en WRK grote verschillen op in zomer- en wintergemiddelde. Bij DBW beloopt dit globaal een factor 3, bij WRK zijn beide gemiddelden nagenoeg gelijk. Mogelijk speelt hier het verschil in locatie een rol.

De “jaargemiddelde DBW/WRK-ratio” (over alle genoemde locaties) bedraagt 0.55 Deze waarde ligt dicht bij die, gevonden binnen DBW tussen de oude en de nieuwe chlorofylbepaling: oud/nieuw = 0.56. Deze verhouding is overigens bepaald aan monsters uit Lobith. Interessant is dan ook dat de “jaar-ratio” DBW/WRK voor Lobith apart, uitkomt op 0.55.

Uitgesplitst naar zomer- en winterratio over alle genoemde locaties is het gemiddelde 0,51 in de zomer en 0,57 in de winter.

De winterratio is echter beduidend onnauwkeuriger vast te stellen dan de zomerratio, gezien de spreiding in de aparte waarden in de tabel (van 0.20 tot 0.80, afhankelijk van de locatie).

Aangezien voor alle andere DBW-locaties vergelijking onmogelijk is wordt, mede gezien de eerder genoemde argumenten tegen een al te precieze omrekening, een correctie op basis van zomergemiddelde-ratio en wintergemiddelde-ratio apart, niet zinvol geacht.

Ter verbetering van de globale vergelijkbaarheid met WRK-gegevens dienen de DBW-gegevens over 1986 derhalve met een factor 0,55 te worden gecorrigeerd, dat wil zeggen: vermenigvuldigen met 1.8.

Voor zover nog met de oude methode bepaald, geldt deze correctie tevens voor de gegevens van 1987 (1^e kwartaal).

IOL zal voor deze correctie zorgdragen.

N.B. In een eerder stadium was reeds besloten om voor 1985 geen correctie uit te voeren (de analoog berekende “jaar-ratio” voor 1985 bedraagt 1.04).

Verzending aan AOB en aan de WS-afdelingen.

Bijlage 6: Memo van Leo van Ballegooijen

ministerie van verkeer en waterstaat

rijkswaterstaat

riza

MEMO

Lelystad, 9 november 1994

betreft : Chlorofylbepaling en conversiefactoren
van : Leo van Ballegooijen
aan :

Inleiding

Binnen de dienst is het nog steeds onduidelijk voor een hoop mensen hoe het nu eigenlijk zit met de bepaling van chlorofyl. In de loop der jaren is deze namelijk veranderd (qua werkwijze en uitvoerende afdeling c.q. persoon. Ook het omrekenen voor gegevens van de verschillende periode naar een redelijk betrouwbare (en realistische) waarde is daardoor een probleem.

De bepalingmethode

Tot en met 1985 is de chlorofyl-bepaling uitgevoerd door AOB en wel door Jan v.d. Hout.

De gebruikte methode tot en met 1984 was een soort RIZA-bepaling, waarbij voor de extractie aceton werd gebruikt. Vanaf 1985 is ethanol als extraheermiddel gebruikt, maar de rest van de bepaling bleef hetzelfde. Vanaf 1986 is de bepaling uitgevoerd door IO (nu IM). De bepalingwijze bleef conform 1985. Uit ringonderzoek bleek echter dat de chlorofylwaardes van het RIZA sterk afweken voor het jaar 1986 en het eerste kwartaal 1987. Daarom is vanaf het tweede kwartaal 1987 de bepalingwijze veranderd en wel conform NEN 6520.

De conversiefactoren

Aart Griffioen heeft veel gerekend aan de conversiefactoren voor de verschillende periodes.

Dit is veelal gedaan door relaties te leggen met beschikbare waarden voor TOT-P en/of doorzicht, of door de CUWVO-relatie te gebruiken en de afwijking ten opzichte van de verwachte waarde uit te rekenen. Vergelijken we het jaar 1985 (ander extractiemiddel) met de voorliggende periode, dan blijkt dat de waarden van vóór 1985 te hoog waren. Aart berekende dat de waarden van 1985 gedeeld dienden te worden door 1.3, (PWN gaf destijds als commentaar dat het verschil in extractiemiddel ongeveer 5-10% verschil in uitkomst zou opleveren). De periode 1986 t/m 1^e kwartaal 1987 wordt gekenmerkt door totaal verschillende waardes ten opzichte van het landelijk gemiddelde. Oorzaak was een destijds defecte fotometer. In het 2^e kwartaal van 1987 is daarom besloten om de bepaling conform de NEN-norm te gaan doen. Om de gegevens van deze periode te vergelijken met de periode vóór 1985 dienen de laatstgenoemde waarden gedeeld te worden door 1.59.

Samengevat in tabelvorm geeft dit:

Periode	Code	Methode	Wie	Conversiefactor
Tot 1985	X	RIZA+aceton	AOB-J. v.d. Hout	
1985	Y	RIZA+ethanol	AOB- J.v.d. Hout	X / 1.3
1986 t/m 1e kw. 1987	Z	RIZA+ethanol	IOL	X* (1.8/3.1)
Vanaf 2 ^e kw. 1987	N	NEN 6520	IOL	X / 1.59

Bijlage 7: RIZA-voorschrift voor de bepaling van chlorofyl-a

Bepaling van Chlorofyl-a en pheophytine-a

Een afgemeten hoeveelheid water filtreren over een glasvezelfilter waarop van tevoren 10 ml van een suspensie van magnesiumcarbonaat is gebracht (1 ml = 1 mg).
Filter fijnmaken in een potterbuis onder toevoeging van 3 ml aceton 90%. Daarna overbrengen in een maatkolfje van 50 of 100 ml, aanvullen tot streep.
Een uur wegzetten in het donker; daarna over in aceton gedrenkte watten affiltreren.
Filtraat opvangen in een cuvet en meten bij de volgende golflengten:

410 mμ, 430 mμ, 665 mμ en 750 mμ.

B e r e k e n i n g

$$\text{Chlorofyl-a in } \gamma/\text{l} : \frac{F_{\text{chl-a}} \times (E_{665} - E_{750}) \times V}{l \times v}$$

$$\text{Pheophytine-a in } \gamma/\text{l} : \frac{F_{\text{ph-a}} \times (E_{665} - E_{750}) \times V}{l \times v}$$

waarin:

$F_{\text{chl-a}}$ en $F_{\text{ph-a}}$ Factoren waarmee de op troebeling gecorrigeerde extinctie bij 665 mμ moet worden vermenigvuldigd, om als uitkomst respectievelijk de concentraties aan chlorofyl-a en pheophytine-a te verkrijgen.

Voor berekening zie: Moss. B-Limnology and oceanography, 12 (1967), p. 335-342.

E_{665} en E_{750} Extincties bij de genoemde golflengten.

v Volume van het extract (50 of 100 ml).

l Cuvetlengte.

V Volume van het monster in liters.

Bijlage 7: RIZA-voorschrift voor de bepaling van chlorofyl-a

Tabel III

F_{chl-a} , F_{ph-a} – waarden

% Chlorofyl	F_{chl-a}	% Pheophytine	F_{ph-a}	% Chlorofyl	F_{chl-a}	% Pheophytine	F_{ph-a}
0	0	100	25	72.5	11.8	27.5	4.4
2.5	0.5	97.5	23.9	75	12	25	4
5	1.1	95	22.9	77.5	12.3	22.5	3.5
7.5	1.7	92.5	21.9	80	12.5	20	3.1
10	2.3	90	20.9	82.5	12.7	17.5	2.7
12.5	2.8	87.5	20	85	12.9	15	2.3
15	3.3	85	19.1	87.5	13.2	12.5	1.9
17.5	3.8	82.5	18.2	90	13.4	10	1.5
20	4.3	80	17.4	92.5	13.7	7.5	1.1
22.5	4.8	77.5	16.6	95	13.9	5	0.7
25	5.3	75	15.8	97.5	14.1	2.5	0.3
27.5	5.7	72.5	14.9	100	14.3	0	0
30	6.1	70	14.3				
32.5	6.5	67.5	13.6				
35	6.9	65	12.9				
37.5	7.3	62.5	12.2				
40	7.7	60	11.5				
42.5	8.1	57.5	10.9				
45	8.5	55	10.3				
47.5	8.8	52.5	9.7				
50	9.1	50	9.1				
52.5	9.4	47.5	8.5				
55	9.7	45	8.0				
57.5	10	42.5	7.5				
60	10.3	40	6.9				
62.5	10.6	37.5	6.4				
65	10.9	35	5.9				
67.5	11.2	32.5	5.4				
70	11.5	30	4.9				

Bijlage 8 besluit staf najaar 2002.

Aan de staf IM is door een projectgroep het volgende beslisdocument aangeboden:

Discussie document voor laatste loodjes van het chlorofyldebat

Opstellers: Hans Ruiter, Jaap van Steenwijk

Inleiding.

De juistheid van chlorofyl gegevens over de periode 1974 - 1984 in DONAR staat al lange tijd ter discussie. Er is hierover een workshop geweest, een rapport geschreven en er is in een gebruikersgroep met DONAR beheerders over gediscussieerd. Daarbij is geconstateerd dat er een fout zit in de gegevens (grootte van de factor is 0,81 met spreiding > 1,5 %). Over deze factor is geen discussie. RIZA zal deze factor in DONAR doorvoeren en dit ook aan externe gebruikers van de gegevens melden.

Na 1984 is NEN 6250 gebruikt. Om de gegevens van voor 1984 overeen te laten komen met de gegevens van de NEN-methode is gekozen voor een factor 0,83. De spreiding die bij deze factor hoort (0,72-0,88) geeft aan dat de betrouwbaarheid redelijk is.

De vraag is of deze factor in DONAR moet worden opgenomen ?

Er zijn 2 visies mogelijk over hoe nu verder met de data in DONAR:

Visie 1.

De database DONAR dient de feitelijke meetgegevens weer te geven.

Feiten: De meetgegevens zijn de weerslag van 2 methoden en horen zo in DONAR herkenbaar te blijven.

De aanvullende factor van 0,83 (om die periode gelijk te trekken met NEN 6250) moet in DONAR aangeboden worden.

Voordeel: de integriteit van de database blijft op wetenschappelijk niveau gegarandeerd. De onderzoeker/rapporteur die de historie wil reconstrueren beschikt over authentieke data en kan zelf beslissen of hij verder corrigeert voor de factor 0,83.

Bezwaren: Een mogelijk bezwaar kan zijn dat de gemiddelde gebruiker de oude cijfers zondermeer plot/gebruikt met die van latere datum zonder zich te realiseren dat het om twee methodes gaat en dat er een staptrend in voorkomt die komt door het verschil in methode. (geldt overigens ook voor andere parameters).

Gevoel van het “chlorofyl-overleg” :

Fouten maken is niet erg maar ze moeten wel hersteld worden: er is geen discussie over de wetenschappelijke correctheid en de grootte van de factor. Iedereen voelt zich hier goed bij.

Visie 2.

De meetresultaten aanpassen in DONAR alsof NEN 6520 vanaf 1974 is toegepast.

Feiten: *Gevolg* voor DONAR: Chlorofyl cijfers aanpassen met een extra factor 0,83 en in DONAR administreren welke factor waarom is toegepast.

Betreft: periode 1974 – 1984

Bezwaren: - In DONAR zal de gemiddelde gebruiker niet merken hoe de cijfers tot stand gekomen zijn en moet moeite doen om in DONAR na te gaan wat de onderliggende methoden en gebruikte factoren zijn.

- Hoewel de factor 0,83 de best denkbare is (daar is geen discussie over), is de

betrouwbaarheid in wetenschappelijke zin aanvechtbaar (de factor zou per locatie, seizoen en algensamenstelling kunnen verschillen).

- Zou moeilijker uit te leggen zijn aan de buitenwacht zoals RIWA, WRK, PWN.

- Binnen een paar jaar kan de “waarheid” veranderd zijn door de ISO methode die ingevoerd gaat worden of door nieuwe inzichten.

Voordeel: de metingen lijken in elk geval als reeks consistent.

Gevoel van het “chlorofyl-overleg” : “Lijkt op datamassage, Geen bezwaar mits, Ambivalent, en mordicus tegen”.

De meeste gebruikers in het “chlorofyl overleg” vinden dat geen bezwaar omdat de best denkbare meetreeks is en de oorspronkelijke meetreeks in DONAR te reconstrueren is omdat de correctie factoren in DONAR onder “bewerkingen”.

Gevraagd wordt aan het management om te beslissen over de twee visies op het principiële abstractieniveau :

Vooraf : er is geen discussie over het aanpassen van de fout (factor 0,81). Dit moet in elk geval. Evenals het naar buiten brengen van deze aanpassing.

Het principe besluit gaat over:

A

Houden we de meetgegevens in DONAR in stand zoals ze werkelijk zijn gemeten.

Met de mogelijkheid een aanvullende factor in DONAR mee te geven zodat gebruikers de data kunnen aanpassen aan nieuwere methoden.

1

Corrigeren we meetgegevens met de best denkbare factor om meetreeksen op elkaar af te stemmen er van uitgaande dat de gebruiker een consistente meetreeks wil zien vanaf de historie als of met één methode (de huidige) is gemeten.

Met behoud van de mogelijkheid de oorspronkelijke datareeks te reconstrueren.

In beide gevallen wordt vastgelegd in DONAR hoe de cijfers geïnterpreteerd moeten worden.

Als tweede wordt gevraagd wordt aan het management om de status van het onderliggend rapport als volgt vast te leggen:

Het rapport waar in DONAR naar verwezen wordt zou een RIZA-rapport en geen werkdocument moeten zijn.

Besluit staf:

In de Staf IM van 7 januari 2003 is het chlorofyl vraagstuk aan de orde geweest en daar is het volgede besloten In cursief een copie van het verslag van 07-01-03:

- ***Chlorofyl IM-2002-111***

Het chlorofyl vraagstuk wordt aan de orde gesteld. Prins geeft een toelichting op versie 1 en visie A Visie 1, de database DONAR, heeft als functie de feitelijke meetgegevens weer te geven. Visie A. heeft als functie, de meetresultaten in DONAR aan te passen zodat de best denkbare meetreeks gepresenteerd wordt uitgaande van één meetmethode.

Afgesproken wordt dat:

- *Het document met de onderbouwing van factoren waarmee de chlorofylcijfers moeten worden aangepast de status krijgt van een RIZA nota.*
- *de gegevens in DONAR aan te passen, met de opmerking dat het om gecorrigeerde gegevens gaat.*
- *In Waterbase en [waterstat](#) moet bij opvragen van gegevens de beste denkbare gegevens worden gepresenteerd. Hiervoor moet met RIKZ afgestemd worden om DONAR niet voor willekeurigen te gebruiken*

De toelichting van Hero Prins aan betrokkenen:

- 1) Het document met de onderbouwing van factoren waarmee de chlorofylcijfers moeten worden aangepast moet de status krijgen van een RIZA Nota.
- 2) DONAR dient het bestand te zijn waar de oorspronkelijke meetgegevens in worden opgeslagen
- 3) In waterbase en waterstat moet bij opvragen van een trend (of welke data set ook) de best denkbare gegevens worden gepresenteerd.
- 4) Dit moet in overleg met en afgestemd op het RIKZ.

Dit bekend:

- a) Dat Paul Frintrop het rapport kan afronden en als RIZA nota (niet als werkdocument) kan uitbrengen.
- b) Dat in DONAR de correctiefactor van 0,81 (dus het herstellen van de destijds gemaakte fout voor de periode 1974 - 1984) wordt doorgevoerd en dat in DONAR in de metagegevens wordt opgenomen dat er nog een factor nodig is van 0,83 om een reeks te krijgen die consistent is met het idee: dat vanaf 1974 steeds dezelfde methode is gebruikt. Hiermee kan elke gebruiker desgewenst een consistente meetreeks verkrijgen. (in de metagegevens wordt verwezen naar de Nota).
- c) Punt 3 is feitelijk niet realiseerbaar omdat beide presentatiemethoden (waterbase en waterstat direct aan DONAR zijn gekoppeld (en is strijdig met punt 2). aanvullend: de correctie factor van Peter Stoks over 1985 moet vermeld worden in de metagegevens met verwijzing naar de Nota.

Uitvoering van het besluit.

Om praktische redenen is het besluit als volgt uitgevoerd:

- De chlorofylgegevens worden DONAR aangepast met een factor 0,81 onder verwijzing naar dit document.
- Dit document wordt als werkdocument uitgebracht om de gebruikers op de hoogte te stellen.