

Pomiar pigmentów z osadów jeziornych: metoda spektrofotometryczna

Materiały eksploatacyjne i urządzenia

Odczynniki chemiczne

- Aceton **100%** (klasa czystości **HPLC**): rozpuszczalnik.
- Aceton **techniczny**: czyszczenie naczyń i urządzeń.
- Woda **redestylowana** (*MilliQ*).
- Azot techniczny.
- Neodisher Laboclean.

Neodisher LaboClean FLA: płynny, wysoko-alkaliczny środek o wysokim działaniu dyspergującym.

Urządzenia

- Wyciąg laboratoryjny.

Stężony aceton (C_3H_6O) to rozpuszczalnik organiczny, który wymaga pracy pod włączonym **wyciągiem laboratoryjnym**. Aceton jest wysoce **łatwopalny**. Aceton ma silne działanie **drażniące**.

- Myjka ultradźwiękowa.
- Wirówka laboratoryjna.
- Wytrząsarka typu *Vortex*.
- Piec laboratoryjny do wypiekania szkła laboratoryjnego.
- Suszarka laboratoryjna.
- Szklane zlewki do pipetowania acetonu.
- Pipeta do acetonu **100–1000 µl** i końcówki (odpowiednie do acetonu).
- Pipeta do acetonu **50–250 µl** i końcówki (odpowiednie do acetonu).
- Statywy na próbki.
- Kolby wolumetryczne (cechowane).

1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml.

Pozostałe

- Mikrokuwety **400 µl** z zatyczkami.
Kuwety łapać tylko za rogi. Upewnić się, że kuweta nie jest zanieczyszczona.
- Długie, szklane pipety Pasteura.
Jednorazowe.
- Smoczek silikonowy do pipet.

Czyszczenie

- Wymyć ręcznie szkło laboratoryjne szczotką.
- Umyć w zmywarce laboratoryjnej.
Program do mycia szkła i Neodisher Laboclean.
- Wyplukać wodą **redestylowaną (MilliQ)** i **Nanowater 3 razy**.
- Wyczyścić acetonem technicznym.
- Zamknąć folię aluminiową, która uprzednio została wyczyszczona acetonem
- Wypiec w piecu w temperaturze **292 °C**.

Minimum **12 h**.

Utylizacja

- Aceton zgodnie z wymogami.
- Falkony i szklane pipety Pasteura muszą zostać dokładnie umyte i wyrzucone do recyklingu.

Przygotowanie urządzenia

Spektrofotometr

- Włączyć spektrofotometr i komputer.
- Odczekać minimum **1 h** przed pomiarami.
- Włączyć oprogramowanie **UVProbe**.
- Wcisnąć F4 i kliknąć **Connect**.
- Ustawić parametry:
 - Zakres: **350 do 900 nm**.
 - Żółty guzik ??.
 - Method: spectrum.
 - Scan speed: fast.

- Sampling interval: 0.1 nm.
- Scan mode: Single
- Ok.

Próbki ślepe i linia bazowa

Próbka ślepa (Blank)

- Dodać za pomocą pipety **400 µl** acetonu (**100%**, **HPLC**) do kuwety.

Sprawdzić czy próbka nie jest zanieczyszczona.

Upewnić się, że w końcówce pipety nie ma pęcherzyków powietrza.

- Zamknąć kuwetę zatyczką

Utrudnia odparowanie próbki oraz korozję urządzenia.

- Umieścić kuwetę w przedniej celi (cela pomiarowa).

Oznaczenie V na kuwecie powinno znajdować się z boku.

Autozero (próbka referencyjna)

- Dodać za pomocą pipety **400 µl** acetonu (**100%**, **HPLC**) do kuwety.

Sprawdzić czy próbka nie jest zanieczyszczona.

Upewnić się, że w końcówce pipety nie ma pęcherzyków powietrza.

- Zamknąć kuwetę zatyczką

Utrudnia odparowanie próbki oraz korozję urządzenia.

- Umieścić kuwetę w tylnej celi (cela referencyjna).

Oznaczenie V na kuwecie powinno znajdować się z boku.

- Kliknąć **Baseline**

Po tym etapie wartość absorpcji powinna wskazywać zero.

Próbka referencyjna pozostaje w celi na czas wszystkich pomiarów.

- Wykonywać procedurę *autozero* przed pomiarem nowego ekstraktu.

Pomiar próbek

- Ekstrakty są rozcieńczone tak, aby ogólna absorpcja mieściła się między **0.2** i **1.0 abs**.

W tym zakresie oznaczenie koncentracji ma charakter liniowy i nie wymaga wykorzystania krzywych kalibracyjnych.

Rozcieńczanie

Do rozcieńczania ekstraktów można wykorzystać małą kolbę miarową lub probówki Eppendorfa. Pozwala to na ponowy pomiar próbki przy wyższym rozcieńczeniu po pipetowaniu bezpośrednio z kolby lub probówki.

Przykład 1:10

- Wymieszać brązową fiolet z ekstraktem na *vortexie*.
- Za pomocą pipety przenieść **2 × 250 µl** ekstraktu do **kolby 5 ml**.
- Dodać aceton za pomocą szklanej pipety Pasteura do osiągnięcia **5 ml**.

Uwaga: menisk jest **wklęsły**.

- Wymieszać roztwór szklaną pipetą.

Pomiar

- Za pomocą pipety przenieść **400 µl** roztworu do kuwety.
- Zamknąć kuwetę zatyczką.
- Umieścić kuwetę w przedniej celi (cela pomiarowa).

Oznaczenie *V* na kuwecie powinno znajdować się z boku.

- Kliknąć **Start**.

Zapis i eksport danych

Przy rozpoczęciu analizy pojawi się okno, w którym można wprowadzić nazwę pliku. Jednak po zakończeniu analizy każdej z próbek **trzeba zapisać plik ręcznie**. Inaczej dane zostaną utracone.

Zapis danych

File > Save as > nazwa_pliku

Eksport danych

Data Print

Pojawi się tabela z danymi, które należy skopiować i wkleić do arkusza kalkulacyjnego.

Należy **ręcznie rozszerzyć kolumny**, tak aby widoczne były pełne nazwy. W innym wypadku dane nie skopiują się odpowiednio.

Evaluacja danych

Naturalne pigmenty to mieszanina barwników chlorofilowych i karotenoidów, jednak spektrum uzyskane z próbki pozwala na ocenę tego, jakie pigmenty są obecne w próbce.

Możliwe jest porównanie spektrum standardów z otrzymanymi w trakcie analizy.

Przykłady

- Chl-a (absorption max. 430 and 663 nm)
- Chl-b (absorption max. 463 and 648 nm)
- Pheophytin-a (absorption max. 408 and 664nm)
- Carotenoids (420–450 nm)
- Bacteriochlorophyll-a (absorption max. 364 and 770 nm)
 - Bacteriopheophytin-a (absorption max. 357 and 746 nm)
- Bacteriochlorophyll-b (absorption max. 373 and 795 nm)
 - Bacteriopheophytin-b (absorption max. 367 and 776 nm)
- Bacteriochlorophyll-c, -d, -e (absorption max. 434, 427, 469 and 666, 655, 654 nm)
 - Bacteriopheophytin-c, -d, -e (absorption max. 412, 406, 435 and 666, 657, 665 nm)

Obliczenia fotometryczne

Obliczenia na potrzeby kalibracji typu proxy-proxy dla danych hiperspektralnych.

Korekta wartości absorpcji

Należy dokonać korekty wartości absorpcji jeśli absorpcja wynosi więcej lub mniej niż **0** pomiędzy **720 nm** i **900 nm**. Wartości przeskalować tak aby uzyskać **0** w zakresie **720 nm** i **900 nm**.

- Do określenia zawartości całkowitych karotenoidów i chloropigmentów, przy absencji bakteriochloropigmentów w próbce, można wykorzystać wartości absorpcji odpowiadające długości fali **750 nm**.
- W przypadku obecności bakteriochloropigmentów w próbce, należy znaleźć odpowiednią wartość dla wybranej długości fali powyżej **750 nm** i wykorzystać do przeskalowania wyników.

Procedura opisana w artykule Sanchini i Grosjean (2020).

Obliczenia całkowitych chloropigmentów-a oraz bakteriofeofityny-a ze spektrów absorpcji

Koncentracje oblicza się z wykorzystaniem wzoru

$$c = A_{\lambda} / (\alpha_{\lambda} \times l)$$

gdzie:

l: szerokość kuwety (cm);

A: zmierzona absorbcja odpowiadająca wybranej długości fali;

: molowy współczynnik ekstynkcji wynoszący $88.77 \times 10^{-3} \times L \times cm^{-1} \times mg^{-1}$ dla chloropigmentów-a przy długości fali **666 nm** (Jeffrey and Humphrey, 1975) oraz $52.855 \times 10^{-3} \times L \times cm^{-1} \times mg^{-1}$ dla bakteriofeofityny-a przy długości fali **750 nm** (Fiedor et al., 2002).

Wynik to koncentracja zmierzona w kuwecie (**mg/l**), który należy skorygować odpowiednio do rozcieńczenia oraz wagi próbki.

Przykładowe obliczenia zebrane zostały w arkuszu `Spectrophotometer_calculator.xlsx`

$$(absorbujapiku)/k \times (wspczynnikrozciezczenia) \times (wagaprbki)/(objtoektraktu)$$

gdzie:

k: stała, **0.080770** dla chloropigmentów przy pikie o długości fali **666 nm** (Jeffrey and Humphrey, 1975) i **0.052855** dla bakteriofeofityny przy pikie dla długości fali **750 nm** (Fiedor et al., 2002).

Obliczenia chloroflu a, b i c ze spektrów absorpcji

Obliczenia całkowitych karotenoidów ze spektrów absorpcji

Za Lichtenthaler and Buschmann (2001)

W ekstrakcie materiału roślinnego zawierającym karotenoidy (**x + c = xanatofile i karoten**) w dodatku do chlorofili, **A₄₇₀** (region karotenoidów) oznacza się jako sumę absorbcji dla chloroflu-a, chloroflu-b oraz karotenoidów:

- Aceton (czysty, 100%):

$$c_{(x+c)} = (1000 \times A_{470} - 1.90_{C_a} - 63.14_{C_b}) / 214$$

Aceton (20% wody):

$$c_{(x+c)} = (1000 \times A_{470} - 1.82_{C_a} - 85.02_{C_b}) / 198$$

gdzie:

A₄₇₀: absorbcja dla długości fali **470 nm**;

C_a: xxx

C_b: xxx

Za Guilizzoni et al. (2011); na podstawie Züllig et al. (1981)

Całkowite karotenoidy wyrażone są jako **mg TC** (total carotenoids) na gram suchej materii organicznej (**g_{LOI}**).

$$TC = ((E_{450} - 0.8 \times E_{665}) \times V \times 10) / E_{1cm}^{1\%} \times g_{LOI}$$

gdzie:

E_{xxx}: gęstość optyczna w kuwecie o ścieżce optycznej **1 cm** (szerokość) dla długości fali **450 nm** i **665 nm**, skorygowanych o gęstość optyczną dla długości fali **750 nm**;

V: objętość ekstraktu;

E_{1cm}^{1%}: średni współczynnik ekstynkcji dla **1%** roztworu ekstraktu z osadów (wagowo) dla karotenoidów przy ścieżce optycznej (szerokość) **1 cm**. Równe **2.250** (Züllig 1981; Leavitt and Hodgson 2001);

E₄₅₀: główne pasmo absorpcji dla karotenoidów w zakresie widzialnym;

E₆₆₅: korekta na przybliżone pasmo absorpcji chlorofili i pochodnych chlorofili odpowiadające długości fali **665 nm**;

g_{LOI}: równoważnik strat na prażeniu dla mokrego osadu, obliczony na podstawie zawartości osadów i suchej masy po LOI.

Funkcja transferu dla fosforu całkowitego

Rejestr zmian

09.12.2022, MZ – wersja inicjalna Quarto, procedura za: Paul Zander, Andrea Sanchini i Giulia Wienhues (Uniwersytet w Bernie).

09.02.2023, MZ – pełna wersja.

Maurycy Żarczyński r Sys.Date()