

## DIN 38409-60



ICS 13.060.10

Ersatz für  
DIN 38412-16:1985-12

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und  
Schlammuntersuchung –  
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) –  
Teil 60: Photometrische Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration in  
Wasser (H 60)**

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge –  
Parameters characterizing effects and substances (group H) –  
Part 60: Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration in water (H 60)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des  
boues –

Caractéristiques générales des effets et des substances (groupe H) –

Partie 60: Dosage spectrométrique de la concentration en chlorophylle-a dans l'eau (H 60)

Gesamtumfang 29 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

# Inhalt

|                                                                                                                                                                                   | Seite     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort</b> .....                                                                                                                                                              | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung</b> .....                                                                                                                                                           | <b>5</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich</b> .....                                                                                                                                                  | <b>6</b>  |
| <b>2 Normative Verweisungen</b> .....                                                                                                                                             | <b>6</b>  |
| <b>3 Begriffe</b> .....                                                                                                                                                           | <b>6</b>  |
| <b>4 Grundlage des Verfahrens</b> .....                                                                                                                                           | <b>7</b>  |
| <b>5 Störungen</b> .....                                                                                                                                                          | <b>7</b>  |
| <b>6 Bezeichnung</b> .....                                                                                                                                                        | <b>7</b>  |
| <b>7 Reagenzien</b> .....                                                                                                                                                         | <b>8</b>  |
| <b>8 Geräte</b> .....                                                                                                                                                             | <b>8</b>  |
| <b>9 Durchführung</b> .....                                                                                                                                                       | <b>9</b>  |
| <b>9.1 Allgemeines</b> .....                                                                                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>9.2 Probenvorbehandlung</b> .....                                                                                                                                              | <b>9</b>  |
| <b>9.3 Filtration</b> .....                                                                                                                                                       | <b>9</b>  |
| <b>9.4 Extraktion</b> .....                                                                                                                                                       | <b>10</b> |
| <b>9.5 Klärung der Extrakte</b> .....                                                                                                                                             | <b>11</b> |
| <b>9.5.1 Allgemeines</b> .....                                                                                                                                                    | <b>11</b> |
| <b>9.5.2 Klärung der Extrakte durch Filtration</b> .....                                                                                                                          | <b>11</b> |
| <b>9.5.3 Klärung der Extrakte durch Zentrifugation</b> .....                                                                                                                      | <b>11</b> |
| <b>9.6 Photometrie</b> .....                                                                                                                                                      | <b>11</b> |
| <b>10 Berechnung</b> .....                                                                                                                                                        | <b>12</b> |
| <b>11 Gültigkeitskriterium</b> .....                                                                                                                                              | <b>12</b> |
| <b>12 Qualitätssicherung</b> .....                                                                                                                                                | <b>12</b> |
| <b>12.1 Blindwerte</b> .....                                                                                                                                                      | <b>12</b> |
| <b>12.2 Mehrfachbestimmungen</b> .....                                                                                                                                            | <b>12</b> |
| <b>12.3 Prüfung des Absorptionsspektrums</b> .....                                                                                                                                | <b>12</b> |
| <b>12.4 Ermittlung der Bestimmungsgrenze</b> .....                                                                                                                                | <b>13</b> |
| <b>13 Angabe des Ergebnisses</b> .....                                                                                                                                            | <b>13</b> |
| <b>14 Analysenbericht</b> .....                                                                                                                                                   | <b>13</b> |
| <b>15 Verfahrenskenndaten</b> .....                                                                                                                                               | <b>13</b> |
| <b>Anhang A (informativ) Herleitung der Berechnungsformel für Chlorophyll-a, Formeln zur Abschätzung der Phaeopigmentkonzentration und des unkorrigierten Chlorophyll-a</b> ..... | <b>14</b> |
| <b>Anhang B (informativ) Absorptionsspektrum</b> .....                                                                                                                            | <b>16</b> |
| <b>Anhang C (informativ) Beispiel zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze</b> .....                                                                                                  | <b>22</b> |
| <b>Anhang D (informativ) Beispiel zur Berechnung der Konzentration von Chlorophyll-a und Phaeopigment</b> .....                                                                   | <b>25</b> |
| <b>Anhang E (informativ) Verfahrenskenndaten</b> .....                                                                                                                            | <b>26</b> |
| <b>Literaturhinweise</b> .....                                                                                                                                                    | <b>29</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitskreis NA 119-01-03-05-11 AK „Chlorophyll“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) — gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Photometrische Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration in Wasser (H 60).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

## **Änderungen**

Gegenüber DIN 38412-16:1985-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Norm-Nummer und der Norm-Bezeichnung (Begründung: es handelt sich nicht um ein Testverfahren mit Wasserorganismen der Reihe DIN 38412 in der Gruppe L);
- b) Überarbeitung von Einleitung und Begriffsdefinitionen;
- c) erweiterte Angaben zu Störungen;
- d) Präzisierung der Anforderungen für Geräte und Materialien;
- e) Präzisierung der Verfahrensdurchführung, Streichung von Alternativ-Varianten;
- f) Aufnahme von Anforderungen zu Gültigkeit und Qualitätssicherung;
- g) Erweiterung um informative Anhänge;
- h) Aufnahme neuer Verfahrenskenndaten;
- i) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

## **Frühere Ausgaben**

DIN 38412-16: 1985-12

## Einleitung

Chlorophyll-a ist das häufigste bei photoautotrophen Planktonorganismen vorhandene essentielle Photosynthesepigment. Es ist Hauptbestandteil des dynamisch geregelten Photosystems dieser Organismen, an dem weitere, teilweise dem Chlorophyll-a chemisch sehr ähnliche, akzessorische Pigmente beteiligt sind. Aus dem Photosystem isolierte Chlorophyllmoleküle können durch Licht- und Säureeinfluss sowie Chlorophyllasen abgebaut werden.

Die Chlorophyllkonzentration einer Wasserprobe kann Aufschluss über den Trophiegrad eines Gewässers geben. Sie wird als leicht bestimmbares Maß für die Phytoplanktonbiomasse verwendet und ist eine Schlüsselgröße vieler Trophie-Bewertungssysteme. Wenn dieser Wert auch nicht als absolutes Maß für die Phytoplanktonbiomasse gelten kann, gibt die Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration gemeinsam mit anderen Biomasse- und Bioaktivitätsparametern Auskunft über das mengenmäßige Vorkommen und die potentielle Stoffwechselleistung des Phytoplanktons in Gewässern.

Wegen der Empfindlichkeit des Chlorophylls gegenüber Licht, Säure und Enzymen gibt es derzeit kein universell einsetzbares, routinetaugliches Analysenverfahren, das eine genaue, artefaktfreie und gleichzeitig auch einfache Bestimmung des in phytoplanktonhaltigen Wasserproben enthaltenen Chlorophyll-a ermöglicht. Deshalb liefert das in dieser Norm beschriebene extraktive, spektralphotometrische Verfahren einen operational definierten Wert.

**WARNUNG — Anwender dieser Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen.**

## 1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration fest.

Das Verfahren kann auf alle Wässer angewandt werden. Es ist auch geeignet, bei biologischen Tests zur Prüfung der Toxizität oder Produktivität von Wässern bzw. von in Wasser gelösten Stoffen die Änderung der Algenbiomasse (Zellvermehrung) zu quantifizieren.

Akzessorische Pigmente (z. B. Chlorophyll-b und -c) sowie verschiedene Chlorophyllabbauprodukte lassen sich mit diesem Verfahren nicht quantifizieren. Eine Abschätzung der Phaeopigmentkonzentration ist möglich (siehe Anhang A).

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN 32645, *Chemische Analytik — Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen — Begriffe, Verfahren, Auswertung*

DIN 58963-2, *Küvetten für photometrische Messungen — Präzisions-Rechteckküvetten — Maße, Anforderungen*

DIN EN ISO 1042, *Laborgeräte aus Glas — Meßkolben*

DIN EN ISO 6556, *Laborgeräte aus Glas — Saugflaschen*

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term>
- DKE-IEV: verfügbar unter <http://www.dke.de/DKE-IEV>

### 3.1

#### **akzessorische Pigmente**

die Photosynthese unterstützende Hilfspigmente

BEISPIEL Carotinoide, Phycobiline, Chlorophyll-b und -c

### 3.2

#### **Chlorophyll-a**

natürlicher Pflanzenfarbstoff, wichtigstes Photosynthesepigment photoautotropher Organismen

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sinne dieser Norm der Farbstoff, dessen Konzentration durch Absorptionsmessung bei 665 nm in ethanolischer Lösung bestimmt werden kann (ohne Phaeopigmente).

### 3.3

#### Phaeopigmente

Sammelbegriff für Chlorophyllabbauprodukte

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Sinne dieser Norm die Chlorophyllabbauprodukte, deren Konzentration nach Anhang A dieser Norm abgeschätzt werden kann.

### 3.4

#### unkorrigiertes Chlorophyll-a

im Sinne dieser Norm der Farbstoff, dessen Konzentration durch Absorptionsmessung bei 665 nm in ethanolischer Lösung bestimmt werden kann, ohne Säurekorrektur, das heißt einschließlich der Phaeopigmente

## 4 Grundlage des Verfahrens

Die Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration nach dieser Norm beruht auf der ethanolischen Heißextraktion aus dem Filtrerrückstand einer Wasserprobe und der anschließenden Absorptionsmessung bei 665 nm, wobei auch Phaeopigmente mit erfasst werden. Nach quantitativer Überführung des Chlorophyll-a in Phaeopigmente mittels Ansäuern und erneuter Messung bei 665 nm wird rechnerisch auf die ursprüngliche Chlorophyll-a-Konzentration der Wasserprobe rückgeschlossen.

## 5 Störungen

Makroskopische Pflanzenteile in der Wasserprobe (z. B. Wasserlinsen, verdriftete benthische Fadenalgen, abgerissene Makrophytenteile) sowie große Zooplankter können das Messergebnis verfälschen. Sie sind aus der Wasserprobe z. B. durch Siebung (Maschenweite etwa 0,5 mm) zu entfernen, wenn sie nicht ausdrücklich mit erfasst werden sollen.

Bei Wasserproben mit einem pH-Wert  $< 5$  kommt es im Filtrerrückstand zu säurebedingtem Chlorophyllabbau. Um dies zu verhindern, muss der pH-Wert durch Spülen des Filters mit etwa 50 ml einer 0,1-molaren Ammoniumacetatlösung (7.3) neutralisiert werden (siehe [1]). Dies sollte kurz vor Ende der Filtration geschehen, wenn sich nur noch wenige Milliliter Probe im Filtertrichter befinden.

Chlorophyll ist, besonders in extrahierter Lösung, sehr lichtempfindlich. Wenn der Extrakt direktem Sonnenlicht oder hellem Kunstlicht ausgesetzt wird, wird das Pigment photochemisch zerstört.

Konzentrationsänderungen des Extraktionsmittels durch Verdunsten sind zu vermeiden, indem mit fest verschließbaren Extraktionsgefäßen gearbeitet wird.

Bei der Extraktion und Homogenisierung der Filter treten Trübungen auf, die die Präzision der photometrischen Messung verschlechtern; diese müssen durch Filtration (siehe 9.5.2) oder Zentrifugation (siehe 9.5.3) beseitigt werden. Ebenso ist mit Trübungen zu verfahren, die durch andere Gründe (z. B. nach dem Ansäuern) im Extrakt entstehen.

Pigmente (selten vorkommender) autotropher Bakterien (z. B. Chlorobium-Chlorophyll, „Bacterioviridin“) können die Chlorophyll-a-Bestimmung beeinflussen.

## 6 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zur photometrischen Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration in Wasser (H 60):

Verfahren DIN 38409 — H 60.

## 7 Reagenzien

### 7.1 Ethanol, $C_2H_5OH$ , 90 % Volumenanteil.

ANMERKUNG 1 Das Vergällungsmittel Methylethylketon (MEK) im Ethanol stört die Bestimmung nicht. Bei Verwendung anderer Vergällungsmittel wird eine Kontrollbestimmung im Vergleich mit unvergälltem Ethanol (90 % Volumenanteil) empfohlen.

ANMERKUNG 2 In der Literatur werden verschiedene andere Extraktionsmittel (z. B. Aceton oder Methanol) beschrieben, die jedoch eine geringere Extraktionseffektivität aufweisen können (siehe [2]) oder toxikologisch problematisch sind. Diese Norm schreibt deshalb als Extraktionsmittel Ethanol vor.

### 7.2 Salzsäure, $c(HCl) = 2 \text{ mol/l}$ .

### 7.3 Ammoniumacetatlösung, $c(C_2H_7NO_2) = 0,1 \text{ mol/l}$ .

## 8 Geräte

**8.1 Vakuumpumpe**, vorzugsweise Membranvakuumpumpe mit Barometer, mit Saugflasche nach DIN EN ISO 6556, Nennvolumen 2 l bis 5 l, mit Silikon- oder Gummistopfen.

**8.2 Filtrationseinrichtung** für Wasserproben mit dicht schließendem Aufsatztrichter, vorzugsweise für Filterdurchmesser 45 mm bis 50 mm.

**8.3 Filtrierapparat für Extrakte**, z. B. Wittscher Topf zur Aufnahme eines Messkolbens, 200 mm Höhe, lichte Weite 150 mm mit seitlichem Rohr für Schlauchansatz, Planschliffdeckel mit Mitteltubus, raugeschliffen für Gummistopfenverbindung, und Filteraufsatz für Rundfilter mit geringem Totvolumen (z. B. Lochblech-Filterunterstützung).

Der Filtrierapparat kann mithilfe einer lichtundurchlässigen Folie oder durch Lackierung — mit Ausnahme eines Sichtfensters — vor übermäßigem Lichteinfall geschützt werden.

**8.4 Homogenisator**, vorzugsweise stabförmig mit Rotor zur Erzeugung starker Scherkräfte (z. B. Zelmühle, Dispergierer, Stabhomogenisator).

**8.5 Extraktionsgefäß**, lichtgeschützt, dicht verschließbar, z. B. Weithalsflaschen aus Braunglas mit Schraubverschluss, Nennvolumen etwa 50 ml bis 100 ml.

**8.6 Glasfaserfilter** aus Borosilicatglas, ohne Bindemittel, Abscheideleistung  $> 98 \%$  für Partikel  $> 0,7 \mu\text{m}$ , empfohlener Durchmesser 45 mm bis 50 mm.

ANMERKUNG Z. B. Whatman Sorte GF/F<sup>1</sup>.

**8.7 Messkolben**, Braunglas, Nennvolumen 25 ml, 50 ml oder 100 ml, z. B. Meßkolben ISO 1042 — A50 — C.

**8.8 Messzylinder**, Nennvolumen 50 ml bis 2 000 ml, Genauigkeitsklasse A.

**8.9 Einrichtung zum Erhitzen des Ethanols**, Wasserbad, einstellbar auf  $(78 \pm 2) ^\circ\text{C}$  oder Heizeinrichtung für Kolben mit Rückflusskühler.

1 Whatman Sorte GF/F ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch DIN.

**8.10** Aschefreie, langsam filtrierende **Papierfilter** hoher Abscheideleistung oder **Celluloseacetat-Membranfilter** mit einer Porenweite von 0,45 µm.

**8.11 Spektralphotometer**, geeignet für Absorptionsmessungen bei 665 nm und 750 nm, mit folgenden empfohlenen Leistungsdaten: spektrale Bandbreite  $\leq 2$  nm, photometrische Richtigkeit  $\leq \pm 0,005$  bei 1 Abs. (dekadisches Absorptionsmaß), Wellenlängenrichtigkeit  $\leq \pm 1$  nm.

ANMERKUNG 1 Geeignete Geräte sind insbesondere Split-Beam-, Zweistrahl- bzw. Referenz-Strahlengang-Spektralphotometer.

ANMERKUNG 2 Empfohlen werden Geräte mit integriertem Selbsttest zur Kontrolle der korrekten Funktion.

**8.12 Rechteckküvetten** nach DIN 58963-2 oder **Halbmikroküvetten**, Schichtdicke 10 mm, 50 mm oder 100 mm.

ANMERKUNG In den meisten Fällen empfiehlt sich die Verwendung einer 50-mm-Küvette.

**8.13** Alternativ zu 8.3: **Zentrifuge** mit Umdrehungsgeschwindigkeit von 3 500 min<sup>-1</sup> bis 4 500 min<sup>-1</sup>.

**8.14** Alternativ zu 8.5: **Zentrifugenröhrchen** mit dicht schließendem Schraubdeckel, Nennvolumen 15 ml bis 50 ml; lichtgeschützt (z. B. aus braunem Polypropylen), bei Arbeiten in abgedunkelten Räumen auch durchsichtig.

## 9 Durchführung

### 9.1 Allgemeines

Bei allen Arbeitsschritten ist direktes Sonnenlicht oder helles Kunstlicht zu vermeiden.

Die Filtration der Wasserprobe sollte, die Extraktion und Photometrie müssen bei gedämpftem Licht im Labor stattfinden. Die Ausführung in einem abgedunkelten Raum bei Schwachlicht wird empfohlen. Dabei sollte die Beleuchtungsstärke das zum sicheren Arbeiten mit dunkeladaptierten Augen nötige Maß nicht überschreiten.

### 9.2 Probenvorbehandlung

Der Transport der Wasserproben erfolgt gekühlt und im Dunkeln, die Aufbewahrung bei  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Die Filtration der Wasserproben sollte so schnell wie möglich, spätestens 24 h nach Probenahme erfolgen. Ein Einfrieren der Wasserprobe ist nicht zulässig.

### 9.3 Filtration

Nach ausreichender Homogenisierung der Wasserprobe durch Schütteln ist ein dem Trophiegrad und der zu erwartenden Algenkonzentration angemessenes Volumen mit einem Messzylinder (8.8) abzumessen und über ein Glasfaserfilter (8.6) zu filtrieren. Bei hypertrophen Gewässern sind 100 ml oft ausreichend, während bei ultraoligotrophen Gewässern in der Regel das maximal bis zur Filterverstopfung mögliche Probenvolumen erforderlich ist (2 l bis 5 l sind meist möglich).

Große Mengen nicht chlorophyllhaltiger Partikel können die verwendeten Glasfaserfilter schnell verstopfen. In diesem Fall sollte weder die Filtrationsdauer stark verlängert noch der Filtrationsdruck erhöht werden, da dies Verluste durch Schädigung der Phytoplanktonzellen verursachen kann. Stattdessen sollte, wenn möglich, ein geringeres Probenvolumen eingesetzt bzw. das Probenvolumen auf mehrere Filter aufgeteilt werden.

Um Verluste durch Zerstörung von Algenzellen zu minimieren, ist ein Vakuum von 30 kPa bis 50 kPa anzulegen. Das Vakuum ist sofort abzustellen, wenn die Wasserprobe vollständig filtriert wurde.