

DIN EN 17899

ICS 13.060.70; 71.040.50

Einsprüche bis 2022-11-09

Entwurf**Wasserbeschaffenheit –
Spektrophotometrische Bestimmung des Gehalts an Chlorophyll-a;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17899:2022**

Water quality –

Spectrophotometric determination of chlorophyll-a content by ethanol extraction for the routine monitoring of water quality;

German and English version prEN 17899:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-09-09 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 43 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17899:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-11 AK „Chlorophyll“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 5667-3	siehe	DIN EN ISO 5667-3
ISO 5667-6	siehe	DIN EN ISO 5667-6
ISO 5725-2:1994*	siehe	DIN ISO 5725-2:2002-12

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden

* Die zitierte ISO 5725-2:1994 wurde zurückgezogen. Die aktuelle Ausgabe ist die ISO 5725-2:2019 (deutsches Dokument: DIN ISO 5725-2:2022).

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 5667-3, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Konservierung und Handhabung von Wasserproben*

DIN EN ISO 5667-6, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Probenahme aus Fließgewässern*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725-2:2002-12; *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

– *Entwurf* –

E DIN EN 17899:2022-10

– Leerseite –

Wasserbeschaffenheit – Spektrophotometrische Bestimmung des Gehalts an Chlorophyll-a

Water quality – Spectrophotometric determination of chlorophyll-a content by ethanol extraction for the routine monitoring of water quality

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Grundlage des Verfahrens	7
5 Störungen	7
6 Reagenzien	7
7 Geräte	8
8 Durchführung	9
8.1 Allgemeines	9
8.2 Probenvorbehandlung	9
8.3 Filtration	9
8.4 Extraktion	9
8.5 Messung	10
9 Qualitätssicherung	10
9.1 Blindwerte	10
9.2 pH-Wert nach Ansäuerung	10
9.3 Einstellung der Wellenlänge	11
9.4 Verhältnis E_n/E_z	11
10 Berechnungen	11
11 Angabe des Ergebnisses	12
12 Analysenbericht	12
Anhang A (informativ) Leistungskennndaten	13
A.1 Validierungsstudie in den Niederlanden	13
A.2 Validierungsstudie in Deutschland	13
Anhang B (informativ) Theoretische Grundlagen	16
B.1 Bedeutung der Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehalts in Wasser	16
B.2 Ansäuernde Extrakte	16
B.3 Berechnung der Phaeopigmentkonzentration	16
Anhang C (informativ) Kontrollproben	17
C.1 Einleitung	17
C.2 Oberflächenwasser	17
C.3 Tiefkühlspinat	17
C.4 Gefriergetrockneter Grünkohl oder sonstiges	17
C.5 Algenkultur	17
Anhang D (informativ) SCOR-UNESCO ‚Bestimmung der photosynthetischen Pigmente im Meerwasser‘	18
D.1 Das Verfahren SCOR-UNESCO unter Verwendung chromatischer Gleichungen	18
D.2 Leistungskennndaten und Vergleich der Verfahren	19
D.2.1 Validierungsstudie in Frankreich	19
Literaturhinweise	20

Tabellen

Tabelle A.1 — Leistungskennndaten zur Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration in Wasser	13
Tabelle A.2 — Verfahrenskennndaten für Chlorophyll-a nach DIN ISO 5725-2	14
Tabelle A.3 — Verfahrenskennndaten für Phaeopigment nach ISO 5725-2	14
Tabelle A.4 — Verfahrenskennndaten für unkorrigiertes Chlorophyll-a nach ISO 5725-2	14

Tabelle D.1 — Absorptionskoeffizienten für spektrophotometrische Gleichungen in Ethanol. Der Absorptionskoeffizient hat die Dimension $\text{g m}^{-3} \text{ cm A}^{-1}$	18
Tabelle D.2 — Leistungskenndaten zur Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration in Wasser	19

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17899:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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.

Der Chlorophyll-a-Gehalt hängt von der Artenzusammensetzung des Phytoplanktons, der Zeit, dem Zeitraum, dem Ort und der Tiefe der Probenahme ab. Es ist auch geeignet zur Quantifizierung der veränderten Algenbiomasse (Zellvermehrung) in biologischen Tests zur Prüfung der Toxizität oder Produktivität von Wasser bzw. von in Wasser gelösten Stoffen.

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 diesem Dokument beschriebene extraktive, spektrophotometrische Verfahren einen operational definierten Wert.

WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument 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.

WICHTIG — Es ist unerlässlich, dass nach diesem Dokument durchgeführte Untersuchungen von entsprechend qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein spektrophotometrisches Verfahren zur Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehalts als Maß für die Menge an Phytoplankton für alle Arten von Wasser fest. Bei einem angenommenen größten Probenvolumen von 2 l können Chlorophyll-a-Gehalte von 5 µg/l oder mehr bestimmt werden. Die Bestimmungsgrenze kann von jedem Labor individuell berechnet werden und kann bis zu 0,5 µg/l bei Verwendung einer Probe von 2 l (oder mehr) und einer 50-mm-Küvette betragen.

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).

ISO 5667-4, *Water quality — Sampling — Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made*

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696)*

EN ISO 5667-3, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Konservierung und Handhabung von Wasserproben (ISO 5667-3)*

EN ISO 5667-6, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Probenahme aus Fließgewässern (ISO 5667-6)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Chlorophyll-a

natürlicher Pflanzenfarbstoff, der im Phytoplankton vorkommt, wichtigstes Photosynthesepigment photoautotropher Organismen

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

3.2

Phaeopigmente

Sammelbegriff für Chlorophyll-Abbauprodukte, die kein Magnesium enthalten

BEISPIEL Phaeophytin ist ein Phaeopigment.

3.3

Phytoplankton

Gemeinschaft von freilebenden, schwebenden, hauptsächlich photosynthetischen Organismen in einem aquatischen System, bestehend aus Cyanobakterien und Algen

3.4

akzessorische Pigmente

die Photosynthese unterstützende Hilfspigmente

BEISPIEL Carotinoide, Phycobiline, Chlorophyll-b und Chlorophyll -c

4 Grundlage des Verfahrens

Die Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration nach diesem Dokument 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 müssen aus der Wasserprobe entfernt werden, wenn sie nicht ausdrücklich miterfasst werden sollen.

Bei Wasserproben mit einem pH-Wert < 5 kommt es im Filtrerrückstand zu surebedingtem Chlorophyllabbau. Um dies zu verhindern, muss der pH-Wert durch Spülen des Filters mit etwa 50 ml einer 0,1-molaren Ammoniumacetatlösung neutralisiert werden (siehe Literaturhinweise [7]). 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 Extraktionsgefen gearbeitet wird.

Bei der Extraktion und Homogenisierung der Filter treten Trübungen auf, die die Präzision der photometrischen Messung verschlechtern; diese müssen durch Filtration (siehe 8.1) oder Zentrifugation (siehe 8.1) 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 unter Umständen die Chlorophyll-a-Bestimmung beeinflussen.

6 Reagenzien

Es sind nur Reagenzien von analytisch reiner Qualität und Wasser der Klasse 2 der EN ISO 3696 zu verwenden.

6.1 Ethanol, C₂H₅OH, 96 % Volumenanteil.

ANMERKUNG 1 Reines Ethanol wird bevorzugt. Die Verwendung von 96 %igem Ethanol mit 5 % Methanolzusatz ist zulässig. Auch das Vergällungsmittel Methylethylketon (MEK) im Ethanol stört die Bestimmung nicht.

ANMERKUNG 2 In der Literatur werden verschiedene andere Extraktionsmittel (z. B. Aceton oder Methanol) beschrieben, die jedoch eine geringere Extraktionseffektivitt aufweisen können oder toxikologisch problematisch sind. Dies schreibt deshalb als Extraktionsmittel Ethanol vor.

6.1.1 Ethanol, C₂H₅OH, 90 % Volumenanteil.

Zu 900 ml Ethanol (6.1) werden 60 ml Wasser zugegeben.

6.2 Salzsäure, HCl, 12 mol/l, $\rho = 1,19$ g/ml.

6.2.1 Salzsäure, HCl, 0,4 mol/l.

Zu 10 ml der konzentrierten Salzsäure (6.2) werden 290 ml Wasser zugegeben.

6.3 Ammoniumacetatlösung, C₂H₇NO₂, 0,1 mol/l.

7 Geräte

Alle Arbeiten sollten vorzugsweise in einem UV-freien Raum durchgeführt werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollten die Tätigkeiten mit einer Laborausrüstung und Geräten durchgeführt werden, die kein UV-Licht durchlassen.

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

7.2 Filtrationseinrichtung für Wasserproben mit dicht schließendem Aufsatztrichter, vorzugsweise für Filterdurchmesser 45 mm bis 55 mm.

7.3 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).

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

7.4 Glasfaserfilter aus Borosilicatglas, ohne Bindemittel, Abscheideleistung > 98 % für Partikel > 0,7 µm, empfohlener Durchmesser 45 mm bis 55 mm.

7.5 Filter zur Klärung von Extrakten, aschefreie, langsam filtrierende Papierfilter hoher Abscheideleistung oder Celluloseacetat-Membranfilter mit einer Porenweite von 0,45 µm.

ANMERKUNG Zellulosenitratfilter können aufgrund von Chlorophyll-a-Verlusten nicht verwendet werden.

7.6 Extraktionsgefäß, lichtgeschützt, dicht verschließbar, z. B. Weithalsflaschen oder Fläschchen aus Braunglas mit Schraubverschluss, Nennvolumen etwa 30 ml bis 100 ml, vorzugsweise zur Zentrifugation geeignet.

7.7 Zentrifuge, mit einer Beschleunigung von 3 000 *g*, geeignet für Glasfläschchen mit festsitzen dem Schraubdeckel, Zentrifugenröhrchen mit dicht schließenden Schraubdeckeln, Nennvolumen 15 ml bis 50 ml; lichtgeschützt (z. B. aus braunem Polypropylen), bei Arbeiten in abgedunkelten Räumen auch durchsichtig.

7.8 Schüttel-Wasserbad eingestellt auf (75 ± 1) °C.

7.9 Spektralphotometer, geeignet für Absorptionsmessungen bei 665 nm und 750 nm, mit folgenden empfohlenen Leistungskennndaten: spektrale Bandbreite ≤ 2 nm, photometrische Richtigkeit ≤ ± 0,005 bei 1 Abs. (dekadisches Absorptionsmaß), Wellenlängenrichtigkeit ≤ ± 1 nm.

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

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

7.10 Rechteckküvette, mit einer Schichtdicke von 10 mm bis 50 mm (es können auch 100 mm verwendet werden).

ANMERKUNG In den meisten Fällen ist die Verwendung von 50-mm-Küvetten geeignet.

7.11 Gefrierschrank, mit einer Temperatur unter $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.12 Gefrierschrank, mit einer Temperatur unter $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.13 pH-Messgerät mit Elektrode, geeignet für pH-Messungen in Alkohol.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Bei allen Arbeitsschritten muss direktes Sonnenlicht oder helles Kunstlicht vermieden werden. Die Filtration der Wasserprobe muss, die Extraktion und Photometrie sollten 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. Die Ausführung in einem Raum mit UV-freien Lampen wird empfohlen.

8.2 Probenvorbereitung

Es wird mit einer nach EN ISO 5667-6 oder ISO 5667-4 entnommenen Probe und nach EN ISO 5667-3 konservierten Probe begonnen. Der Transport der Wasserproben erfolgt bei $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln. Pflanzenmaterial und/oder Wasserflöhe können zum Chlorophyllgehalt beitragen. Falls vorhanden, muss die Vorfiltration über Planktongewebe mit einer Maschenweite von 1 mm erfolgen. Die Filtration der Wasserproben sollte so schnell wie möglich, spätestens 24 h nach Probenahme erfolgen. Ein Einfrieren der Wasserprobe ist nicht zulässig.

8.3 Filtration

Nach ausreichender Homogenisierung der Wasserprobe durch Schütteln wird ein Volumen, das dem gewünschten Extinktionsbereich bei 665 nm zwischen 0,01 und 0,90 entspricht, durch ein Glasfaserfilter (7.4) filtriert. Bei hohen Konzentrationen sind 100 ml ausreichend, während bei niedrigen Konzentrationen das maximal bis zur Filterverstopfung mögliche Probenvolumen erforderlich ist (z. B. 2 l bis 5 l oder mehr).

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, muss ein Vakuum von 30 kPa bis 50 kPa angelegt werden. Das Vakuum ist sofort abzustellen, wenn die Wasserprobe vollständig filtriert wurde. Ein Trockensaugen der Filter ist zu vermeiden.

Nach der Filtration wird die Extraktion nach 8.4 gestartet. Es wird empfohlen, sofort mit der Extraktion zu beginnen. Ist dies jedoch nicht möglich, müssen die mit Algen bedeckten Filter bis zu zwei Wochen in einem Gefrierschrank unter $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7.11) oder bis zu einem Monat in einem Gefrierschrank unter $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7.12) gelagert werden.

8.4 Extraktion

Das mit Algen bedeckte Filter wird quantitativ in das Extraktionsgefäß (7.6) überführt. Es werden 25 ml (= V1) Ethanol 90 % (6.1.1) zugegeben. Das Extraktionsgefäß wird sorgfältig mit dem Schraubverschluss abgedichtet und in ein Schüttelwasserbad (7.8) bei einer Temperatur von $(75 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ gestellt. Dann wird 7 min lang (2 min Aufwärmen und 5 min Extraktion) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 bis 200 Umdrehungen pro Minute erhitzt. Das Extraktionsgefäß mit dem Extrakt wird in einem mit Eis gefüllten Behälter oder unter kaltem fließendem Wasser schnell auf Raumtemperatur abgekühlt.

Im Falle einer Trübung können die Extrakte durch Filtration oder Zentrifugation geklärt werden: