

**TCVN 6662 : 2000
ISO10260 : 1992**

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – ĐO THÔNG SỐ SINH HOÁ –
PHƯƠNG PHÁP ĐO PHỔ XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ
CLOROPHYL-A**

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

HÀ NỘI -2000

Lời nói đầu

TCVN 6662 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 10260 : 1992 .

TCVN 6662 : 2000 do Ban Kỹ thuật Tiêu chuẩn TCVN/TC 147
Chất lượng nước biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất
lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Chất lượng nước – Đo thông số sinh hóa – Phương pháp đo phổ xác định nồng độ chlorophyll-a

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

1 Phạm vi áp dụng

1.1 Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định nồng độ chlorophyll-a. Phương pháp này có thể áp dụng cho thực vật phù du trong nước mặt tự nhiên và để thử sự tăng trưởng của tảo trong thử nghiệm sinh học. Dùng cách lấy mẫu thích hợp, phương pháp có thể áp dụng cho các thực vật đáy (phụ lục A).

1.2 Các pigment tảo khác như chlorophyll-b, chlorophyll-c và một vài chất chuyển hoá chlorophyll không được xác định. Các pigment nâu (phaeopigment) có thể được xác định bán định lượng để hiệu chỉnh cản trở khi xác định chlorophyll-a và để chỉ ra phần sinh khối tảo không hoạt hóa.

1.3 Chlorophyll nhạy với ánh sáng và oxi, nhất là khi bị chiết. Để tránh phân hủy do oxi hóa và quang hóa, không được để mẫu ra không khí hoặc ánh sáng mạnh. Đồng nhất mẫu trong một số trường hợp có thể làm tăng hiệu suất chiết.

1.4 Phương pháp chiết bằng etanol gồm việc đun nóng 75 °C trong 5 min để ức chế men chlorophyllaza và để thúc đẩy sự phân giải pigment. Bảo quản phần chiết (không lọc) trước khi đo phổ trong thời gian ngắn, có thể đến ba ngày trong tủ lạnh ở 4 °C. Bảo quản phần chiết dưới – 25 °C có thể đến ba mươi ngày.

1.5 Mặc dầu suốt quy trình có sử dụng lọc hoặc ly tâm để làm cho phần chiết cuối cùng trong nhưng nó vẫn có thể bị đục nhẹ. Sự axit hóa có thể cũng gây đục. Do đó độ hấp thụ đo ở 665 nm cần được hiệu chỉnh độ đục bằng cách trừ độ hấp thụ đo ở 750 nm.

TCVN 6662 :2000

1.6 Picment của một vài khuẩn ưa sáng (thí dụ *Clorobium*) cản trở xác định nồng độ clorophyl-a [1]. Độ hấp thụ của clorophyl-b và clorophyl-c ở 665 nm rất nhỏ, có thể bỏ qua [2].

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 5667-1:1980, Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu.

TCVN 5992: 1995 (ISO 5667-2:1991), Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn kĩ thuật lấy mẫu.

3 Nguyên tắc

Lấy tảo và chất lơ lửng trong mẫu nước bằng lọc. Chiết picment tảo từ phần còn lại của quá trình lọc vào etanol nóng. Đo phổ xác định nồng độ clorophyl-a trong phần chiết. Đánh giá nồng độ clorophyl-a và picment nâu từ sự khác nhau của độ hấp thụ ở 665 nm trước và sau khi axit hóa phần chiết [3] [4].

4 Thuốc thử

Chỉ dùng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước đã loại ion hoặc nước tinh khiết tương đương.

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

4.2 Etanol, ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), dung dịch nước 90 % (V/V).

Chú thích 1 – Phần bị biến chất trong etanol không cản trở phép xác định. Tuy nhiên, nên xác định so sánh bằng etanol tinh khiết (90 %) làm nền với mỗi lô mẫu mới [4].

5 Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm và:

5.1 Máy đo phổ, dùng ở vùng khả kiến đến 750 nm, với độ phân giải 1 nm, chiều rộng dải nhỏ hơn 2 nm, độ nhạy nhỏ hơn hoặc bằng 0,001 đơn vị độ hấp thụ, có các cuvet nằm trong khoảng 1 cm đến 5 cm.

5.2 Thiết bị lọc chân không, có giá và kẹp.

5.3 Cái lọc bằng sợi thủy tinh không có chất hữu cơ, để lọc mẫu nước và giữ lại hơn 99 % các hạt lớn hơn 1 μm . Dải đường kính cái lọc thích hợp từ 25 mm đến 50 mm.

5.4 Cái lọc phân chiết, mô tả như 5.3 nhưng đường kính nhỏ hơn, thí dụ 25 mm.

Cách khác: ly tâm, gia tốc 6 000 g và mâm quay phù hợp cho các ống nghiệm chiết.

5.5 Nồi cách thủy, điều chỉnh được ở $75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ có chỗ vừa cho bình chiết.

5.6 Bình chiết, thí dụ các lọ nhỏ màu nâu, miệng rộng, có nút vặn bằng polytetrafloetylen (PTFE), dung tích từ 30 ml đến 50 ml, thích hợp cho việc ly tâm ở 6000 g.

6 Lấy mẫu và bảo quản mẫu

Lấy mẫu theo ISO 5667-1 và TCVN 5992: 1995 (ISO 5667-2). Có thể bảo quản mẫu trong tủ lạnh, không quá 8 h, nhưng nên tránh. Nếu có thể, thực hiện 7.1 đến 7.3 ngay sau khi lấy mẫu. Nếu cần, giữ phần chiết thô trong bình chiết thủy tinh màu nâu kín khí (5.6) ở dưới $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì được ba mươi ngày. Không giữ lại mẫu nước đông lạnh hoặc cái lọc có chất rắn.

7 Cách tiến hành

7.1 Lọc

Lắc để trộn kỹ mẫu. Lọc một thể tích mẫu V_s (thường khoảng 0,1 đến 2 lit, phụ thuộc vào chiết tảo) qua cái lọc bằng sợi thủy tinh (5.3) gắn trên giá. Làm khô cái lọc trong chân không, và khi vừa khô thì lấy khỏi giá đỡ và đặt vào bình chiết. Nếu cái lọc không vừa bình chiết thì cắt cái lọc thành từng mảnh nhỏ.

Tránh chạm ngón tay vào mẫu.

7.2 Phương án chiết A

Đun nóng một thể tích etanol (4.2) đến $75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rót một thể tích nhỏ etanol nóng (30 ml đến 40 ml) vào bình chứa cái lọc hoặc mảnh của nó. Để nguội vài phút, nghiền cái lọc để dễ chiết, nên dùng máy làm đồng nhất có con khuấy dạng que. Rửa que khuấy bằng một ít etanol (4.2) để loại mảnh vụn bám vào đó. Chiết phần huyền phù trong ít nhất 3 min.

Chú thích 2 – Việc chiết thường được thực hiện ở nhiệt độ phòng nhiều giờ hoặc qua đêm. Nếu chiết kéo dài hoặc phần chiết được lưu giữ nhiều ngày (thí dụ qua cuối tuần) thì bình chiết cần để trong tủ lạnh.

Lọc dung dịch qua cái lọc dày (5.4) vào bình định mức (dung tích 50 ml hoặc 100 ml) có nút. Rửa bình chiết bằng etanol (4.2) và chuyển định lượng vào bình định mức. Định mức đến vạch, đậy kín và lắc đều. Đó là thể tích phần chiết V_e .

TCVN 6662 :2000

Làm tiếp với bước 7.4.

7.3 Phương án chiết B

Lấy chính xác một thể tích V_E (20 ml hoặc 25 ml) etanol (4.2) vào bình chiết (5.6) để ngập hết cái lọc. Đóng nắp chặt để tránh phần chiết bay hơi. Lắc nhẹ để ổn định phân cặn. Đặt vào nồi cách thủy để phần chiết trong bình ngang mức với nước trong nồi. Đun 5 min, lắc nhẹ nếu cần. Lấy bình chiết ra khỏi nồi và để nguội đến nhiệt độ phòng trong 15 min.

Thời gian giữa chiết và đo phải là tối thiểu.

Chú thích 3 – Phần chiết ở giai đoạn này có thể giữ trong tủ lạnh qua đêm trước khi đo (xem 7.4). Không lưu giữ quá ba ngày.

Lọc phần trong của phần chiết qua cái lọc (5.4), hứng vào bình phản ứng sạch (5.6), bình này không được tráng bằng dung môi (xem chú thích 4).

Có thể ly tâm bình phản ứng để thu được phần trong.

Dùng phần chiết trong để đo quang.

Chú thích 4 – Khi dùng phương pháp này, chỉ cần thu lấy một phần thể tích chiết vì thể tích V_0 đã biết chính xác và không mất do bay hơi do đã nút kín. Ngoài ra, nước ở trong cái lọc có thể bỏ qua (xem 7.1) vì nó chỉ nhỏ hơn 5 % thể tích chiết.

7.4 Đo quang

7.4.1 Dùng pipét chuyển một phần chiết trong vào cuvet của máy đo phổ, để lại một ít đủ cho bước axit hóa (xem 7.4.2).

Đo độ hấp thụ ở 665 nm (A_{665}) và 750 nm (A_{750}) so với etanol (4.2).

Chú thích 5 – Độ hấp thụ ở 665 nm phải nằm trong khoảng 0,01 đến 0,8 đơn vị. Điều đó có thể đạt được nhờ lấy phần thể tích đã lọc, thể tích chiết, pha loãng, cu vet ... phù hợp. Để bắt đầu, lấy 0,5 lit mẫu, cái lọc đường kính 50 mm, 20 ml etanol và cuvet 5 cm.

7.4.2 Axit hóa phần chiết (thường là 5 ml đến 10 ml) bằng 0,01 ml axit clohydric (4.1) cho 10 ml phần chiết, lắc và đo độ hấp thụ ở 665 nm và 750 nm sau 5 min đến 30 min.

8 Tính toán và biểu thị kết quả

8.1 Nồng độ ρ_c của chlorophyl-a, được tính bằng microgam trên lit, theo công thức:

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

trong đó

$A = A_{665} - A_{750}$ là độ hấp thụ của phần chiết trước khi axit hóa (xem 7.4.1);

$A_a = A_{665} - A_{750}$ là độ hấp thụ của phần chiết sau khi axit hóa;

V_e là thể tích phần chiết, tính bằng mililit;

V_s là thể tích mẫu đã lọc, tính bằng lit;

$K_c = 82 \text{ l}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}$ là hệ số hấp thụ phổ đặc trưng cho chlorophyl-a, giá trị này được lấy từ [2];

$R = 1,7$ là tỷ số A/A_a cho dung dịch chlorophyl-a tinh khiết bị chuyển thành phaeophytin do axit hóa (xem 7.4.2) (giá trị này được lấy từ [2]);

d là chiều dài quang của cuvet, tính bằng centimet;

10^3 là hệ thập phân số của V_e .

8.2 Nồng độ ρ_p của phaeopigment, tính bằng microgam trên lit, được tính theo công thức:

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

8.3 Khi giá trị 82 được lấy cho hệ số hấp thụ phổ đặc trưng của chlorophyl-a trong etanol 90 %, và 1,7 được lấy cho hệ số axit cực đại (R) của chlorophyl-a tinh khiết thì nồng độ chlorophyl-a trong mẫu nước được đơn giản hóa thành

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

và nồng độ phaeopigment từ công thức (2) được đơn giản hóa thành công thức (4):

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

Chú thích

6 Giá trị tính toán của phaeopigment không ổn định như nồng độ chlorophyl-a. Một phép thử liên phòng thí nghiệm đã chỉ rõ độ lệch 5 % đến 11 % đối với chlorophyl-a và 6 % đến 46 % đối với phaeopigment.

7 Tỷ số A/A_a là 1,7 nếu chỉ có chlorophyl-a tồn tại trong mẫu, và là 1 nếu sản phẩm phân hủy của chlorophyl-a tồn tại trong mẫu.

TCVN 6662 :2000

Hệ số hấp thụ (82) cho chlorophyl-a trong etanol (4.2) được lấy ở [5] ở 665 nm. Giá trị (84) cho ở đây là cho chlorophyl-b và chlorophyl-c. Độ hấp thụ của chlorophyl-a ở cùng nồng độ trong axeton cao hơn 2 % đến 3 % trong etanol ở 665 nm [2] [4].

8.4 Ghi kết quả bằng microgam trên lit (hoặc miligam trên mét khối) với hai số có nghĩa hoặc một số sau dấu phẩy, thí dụ:

Nồng độ chlorophyl-a 5,5 µg/l
Nồng độ phaeopigment < 0,1 µg/l

9 Độ chính xác

Một phép thử liên phòng thí nghiệm thực hiện 1983 cho kết quả [6] ghi trong bảng 1.

Bảng 1 – Độ chính xác

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

<i>l</i>	là số phòng thí nghiệm	σ_r	là độ lệch chuẩn lặp lại
<i>n</i>	là số giá trị	VC _r	là hệ số độ lệch lặp lại
<i>n_a</i>	là phần trăm loại bỏ	σ_R	là độ lệch chuẩn tái lập
\bar{x}	là trung bình tổng	VC _R	là hệ số độ lệch tái lập.

10 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả cần gồm những thông tin sau:

- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- nhận biết mẫu nước;
- biểu diễn kết quả, theo điều 8;
- xử lý mẫu trước, nếu có;
- những sai khác so với phương pháp này hoặc mọi tình huống có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Xác định hàm lượng thực vật đáy

A.1 Xác định thực vật đáy

Lấy mẫu thực vật phù du theo ISO 5667-1 và TCVN 5992: 1995 (ISO 5667-2).

Lấy mẫu thực vật đáy (tảo bám vào) phụ thuộc vào chất nền. Một vùng diện tích bề mặt xác định trên đá hoặc trên vật liệu khác chìm trong nước có thể được nạo ra bằng dao hoặc lưỡi dao cạo râu. Sỏi và đá nhỏ lấy trực tiếp vào dung môi. Vật liệu nhân tạo đặt xuống nước như một miếng thủy tinh làm cho việc lấy mẫu trở nên dễ dàng. Cả miếng thủy tinh hoặc tảo được lấy ra và vận chuyển từ nơi lấy mẫu cùng với nước. Tảo đáy hoặc chất nền với khối lượng đã biết sẽ được xử lý tương tự như với thực vật phù du theo phương pháp mô tả ở tiêu chuẩn này.

A.2 Dung môi chiết

Axeton được dùng nhiều vì nó được UNESCO-SCOR đề nghị vào năm 1966 để chiết tảo. Tuy nhiên, trong một số trường hợp axeton tỏ ra không được tốt nên được thay bằng cồn. Thực nghiệm đã chỉ ra rằng etanol và metanol nóng là tương tự nhau và chiết tốt hơn axeton lạnh [4]. Nhưng nếu axit hóa phần chiết để hiệu chỉnh ảnh hưởng của phaeopigment thì sinh ra vấn đề. Sự lệch của độ hấp thụ cực đại về phía các sóng ngắn hơn có thể dẫn đến sự thay đổi tỷ số axit, thí dụ nồng độ axit, hàm lượng nước trong dung môi và cái lọc, thời gian từ lúc axit hóa đến lúc đo. Những vấn đề này chỉ có thể khắc phục bằng cách thêm các bước trong phương pháp, thí dụ trung hòa bằng bazơ hữu cơ (dimetyl anilin hoặc diphenyl anilin). Ngoài ra, metanol rất độc. Vì thế, khuyến nghị dùng etanol làm chất chiết để xác định clophyl-a trong mẫu nước ngọt và nước biển.

Phụ lục B

(tham khảo)

Tài liệu tham khảo

[1] TOLSTOY, A. và TOTH, I., Bacterio chlorophyl-d và ảnh hưởng của nó đến xác định chlorophyl-a, Arch. Hydro biol.89 (1980), tr 160 - 170.

Bacterio chlorophyl-d and its interference on determination of chlorophyll-a Arch. Hydro biol. 89 (1980),pp.160-170

[2] NUSCH, E.A., So sánh các phương pháp khác nhau để xác định chlorophyl và phaeopigment, Arch. Hydrobiol.Ergebn.Limnol.14 (1980). tr 14-36.

Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination, Arch. Hydrobiol.Ergebn.Limnol.14 (1980), pp. 14-36

[3] LORENZEN, C. J., Xác định chlorophyll và phaeopigment, phương trình trắc quang, Limnol. oceanogr.12 (1967), tr. 343-346.

Determination of chlorophyll and phaeopigments; spectrophotometric equations, Limnol. oceanogr.12 (1967), pp. 343-346.

[4] MARKER, A.F.H., NUSCH, E.A, RAI, H. và RIEMANN, B. Đo các pigment quang hợp trong nước ngọt và những phương pháp tiêu chuẩn hóa: kết luận và đề nghị, Arch. Hydrobiol Beich. Ergebn.Limnol, 14 (1980) tr. 91-106.

The mesurement of photosynthetic pigments in frestwaters and standardization of methods: Conclusions and recommentdations. Arch. Hydrobiol Beich. Ergebn.Limnol, 14 (1980) pp. 91-106.

[5] VOLLENWEIDER, R.A, Những phương pháp đo dự phát triển trong môi trường nước. IBP Handbook N°12, xuất bản lần thứ hai (1971) Blackwell Scient Publ.Oxford. Edinburgh.

A manual on methods of measuring primary production in aquatic environments, IBP Handbook No 12, 2nd ed. (1971) Blackwell Scient Publ.Oxford. Edinburgh.

[6] NISCH, E.A., những kết quả thử liên phòng thí nghiệm . Xác định chlorophyl-a.Z. Wasser Abw.Forsch.17, (1984), tr 189-194.

Results from an interlaboratory ring test concerning the determination of chlorophyll a. Z. Wasser Abw.Forsch.17, (1984), pp. 189-194.