

# Pracovní protokol II.

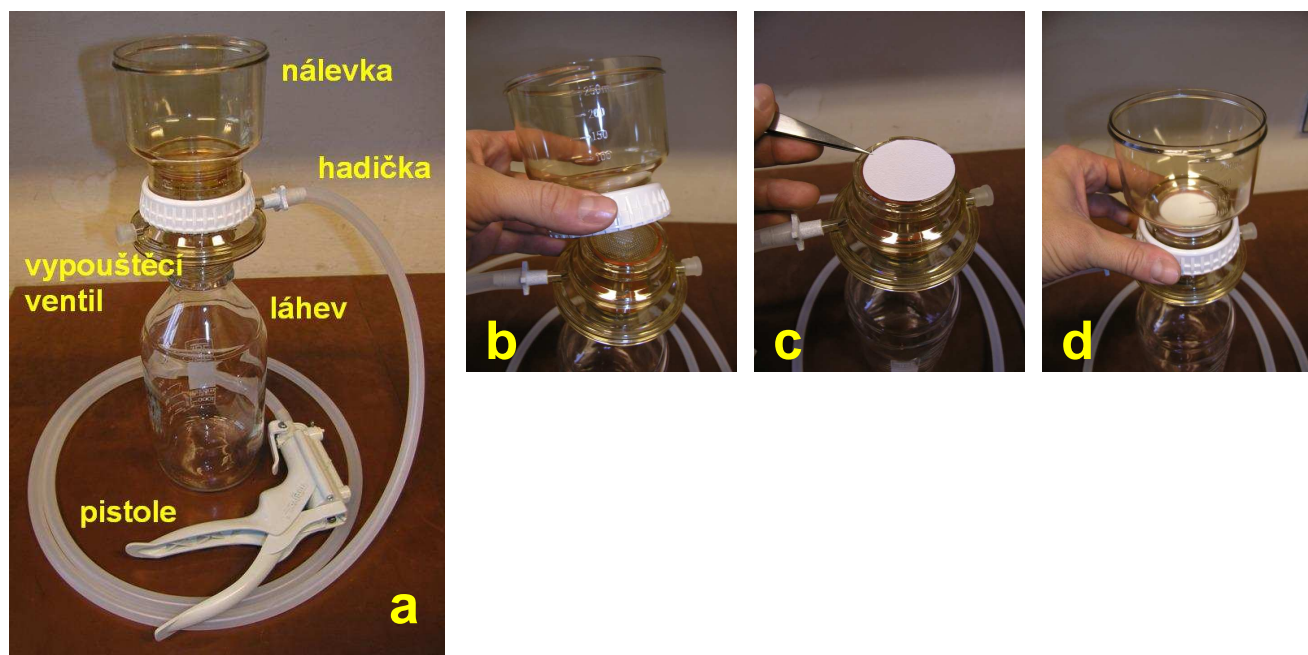
## Stanovení TOC a chlorofylua

### Úkol č.1: Příprava vzorků

**Potřeby :** kompresor nebo podtlaková pistole, tlaková filtrační aparatura NALGENE, filtry ze skelných vláken (velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a 2,7  $\mu\text{m}$ ), skleněné šroubovací láhve (0,5l - 2l), plastové epruvety, pinzeta, lihový popisovač, destilovaná voda



**Postup :** Připravíme si filtrační aparaturu. Připojíme tlakovou hadičku ke kompresoru (případně ruční pistoli) a aparaturu našroubojeme na 0,5 - 2 litrovou šroubovací láhev (a). Mezi dva díly aparatury vložíme pinzetou filtrační vrstvu ze skelných vláken o průměru pórů 2,7  $\mu\text{m}$  a oba díly sešroubojeme, tím filtr upevníme v aparatuře (b, c, d). Připravený filtr nejprve prolijeme 0,5l destilované vody (dvakrát naplníme nálevku filtrační aparatury o objemu 250ml) abychom se zbavili případných uhlíkatých látek ve filtru.



Mezi tím si připravíme plastové epruvety, do kterých budeme odebírat jednotlivé frakce. Pro každou frakci potřebujeme tři opakování, takže na 1 vzorek vody (jedna terénní litrová láhev) budeme potřebovat 9 epruvet + 2 epruvety na filtry. Popis epruvet provedeme podle vzoru :

**datum / označení lokality / velikostní frakce / typ analýzy**

Tedy například : **11. 3. 09 P > 2,7 TOC**  
 [ tzn. odebráno 11. března 2009, lokalita Poděbrady, frakce větší než 2,7  $\mu\text{m}$  (tedy nefiltrovaný vzorek), analýza celkového uhlíku (total carbon) ]

Epruveta na filtr : **11. 3. 09 P 0,45 chl a**  
 [ tzn. odebráno 11. března 2009, lokalita Poděbrady, filtr velikosti 0,45  $\mu\text{m}$ , analýza chlorofylu ]

**Zkratky používané pro popis epruvet (možný příklad)**

<u>Lokalita</u>	<u>velikostní frakce [<math>\mu\text{m}</math>]</u>	<u>typ analýzy</u>
<b>P</b> (Poděbrady)	<b>&gt; 2,7</b>	<b>TOC</b> (pro > 2,7 $\mu\text{m}$ a 0,45-2,7) $\mu\text{m}$ )
<b>V</b> (Výkleky)	<b>0,45 - 2,7</b>	<b>DOC</b> (pro < 0,45 $\mu\text{m}$ )
<b>T</b> (Troubky)	<b>&lt; 0,45</b>	<b>chl a</b> (pro filtry)

Připravený, pročištěný filtr naplníme analyzovaným vzorkem vody (filtrujeme 1l vody, nádobka filtru má objem 250 ml, takže 4 x doplníme) a spustíme sací kompresor (nebo natlakujeme mačkáním pistole). Po přefiltrování 1l vody odšroubujeme láhev s přefiltrovanou frakcí menší než 2,7  $\mu\text{m}$  (pokud je aparatura natlakovaná, musíme nejdřív povolit vypouštěcí ventil, jinak nálevku neodšroubujeme !). Do příslušných tří epruvet (frakce 0,45  $\mu\text{m}$  - 2,7  $\mu\text{m}$ ) odebereme cca. 10 ml

přefiltrovaného vzorku a epruvety uložíme (před odebráním vzorku epruvetu několikrát vzorkem promyjeme). Rozšroubujeme tlakový filtr a filtrační vrstvu (velikost pórů 2,7  $\mu\text{m}$ ) uložíme pinzetou do příslušné epruvety (filtrů se nedotýkáme prsty !). Mezi díly filtrační aparatury vložíme jemnější filtrační vrstvu (0,45  $\mu\text{m}$ ), znovu sešroubujeme a opět pročistíme filtr 0,5l destilované vody. Do znovu připravené aparatury lijeme filtrát z předchozí filtrace (1l - cca. 30 ml odebraných dřívě). Z výsledného filtrátu opět odebereme tři opakování (frakce < 0,45  $\mu\text{m}$ ) a filtrační vrstvu (0,45  $\mu\text{m}$ ). Frakce > 2,7  $\mu\text{m}$  odebíráme z nefiltrovaného vzorku vody ještě před filtrací.

**Pozn.** Pokud nestanovujeme TOC a Chla okamžitě, všechny epruvety se vzorky velikostních frakcí a epruvety s filtry pro stanovení chlorofylu musíme uložit v mrazáku při -80°C.

**Výsledek :** Výsledkem filtrace jsou :

**3 epruvety s frakcí > 2,7  $\mu\text{m}$**  (nefiltrovaná voda)

**3 epruvety s frakcí 0,45  $\mu\text{m}$  - 2,7  $\mu\text{m}$**  (první filtrace přes filtr 2,7  $\mu\text{m}$ )

**3 epruvety s frakcí < 0,45  $\mu\text{m}$**  (druhá filtrace přes filtr 0,45  $\mu\text{m}$ )

připravené pro pozdější stanovení TOC, respektive DOC (rozpuštěný uhlík) u poslední frakce (< 0,45  $\mu\text{m}$ ), na TOC analyzáru

**+ 2 epruvety s filtry 0,45  $\mu\text{m}$  a 2,7  $\mu\text{m}$**

připravené pro pozdější standardní stanovení chlorofylu v jednotlivých frakcích

## Úkol č.2: Stanovení chlorofylu a (metodou výpočtu koncentrace korigovaného chlorofylu)

**Potřeby :** pinzeta, nůžky, centrifugační zkumavky, vodní lázeň, centrifuga, spektrofotometr HACH DR 2000, měřící kyvety, extrakční směs (aceton-methanol), 10% HCl, destilovaná voda

### **Postup :**

*(pokud jsme vzorky připravili podle předcházejícího Úkolu č. 1, přejdeme přímo k bodu 3.)*

1. čerstvý vzorek vody protřepeme a přelijeme přes jemné síto
2. dostatečné množství vzorku vody (podle předpokládaného množství fytoplanktonu) přefiltrujeme přes skleněný filtr (WHATMAN GF/F nebo GF/C) ve fritě nebo pomocí membránové filtrace
3. filtr složíme pinzetou a rozstříháme do centrifugační zkumavky
4. do zkumavky přidáme 7,2 ml extrakční směsi (90% aceton : methanol v objemovém poměru 5:1)
5. obsah zkumavky zhomogenizujeme
6. zkumavky dáme ve stojánek na 2 minuty do vodní lázně o teplotě 65 °C
7. ochladíme zkumavky proudem studené vody
8. zkumavky odstředíme při 3000 otáč./min. po dobu 15 minut (pokud má centrifuga chlazení, chladíme při 5 °C)
9. na spektrofotometru změříme absorbanci supernatantu při vlnové délce 664 nm
10. do kyvety přidáme jednu kapku 10% HCl a opět změříme absorbanci

### **Výsledek :**

K výpočtu koncentrace korigovaného chlorofylu a použijeme tento vzorec:

$$c = 28,9 \cdot (A_o - A_a) \cdot 7,2 / V \cdot d$$

c ... koncentrace chlorofylu a v  $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

$A_o$  ... absorbance před okyselením

$A_a$  ... absorbance po okyselení

V ... objem vzorku v l

d ... délka kyvety v cm

### Úkol č.3: Stanovení obsahu TOC na TOC Analyseru Formacs<sup>HT</sup>

**Postup :** Vzhledem k náročnosti stanovení a obsluhy přístroje, budeme postupovat podle pokynů vedoucího cvičení. Vlastní postup analýzy je názorně popsán v metodickém návodu „**Stanovení obsahu organického uhlíku (TOC) a chlorofylu a**“

**Výsledek :** Získaná data vyhodnotíme podle výše uvedeného návodu. Spolu s předchozím úkolem provedeme také grafické vyhodnocení dat.