

YTÜ ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ
ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ 1 LABORATUARI



SULARDA KLOROFİL_a TAYİNİ

Genel Bilgi

Fosfor sınırlayıcı maddelerden olan klorofil, fitoplanktonların (alg) yapısında bulunan bir pigmenttir. Sularda fosfor miktarı ile klorofil arasında bir orantı olup fosfor arttıkça klorofil a değeri düşmektedir. Sularda klorofil ve fosfor miktarı birlikte yüksek çıkması durumunda diğer besin maddelerinde (N, S, Ca vb.) eksiklik olduğu düşünülmektedir (denge yasası). Ham su kaynağındaki azot ve fosfor konsantrasyonunun belirli bir düzeyin üzerine (0.3 mg/L amonyak veya nitrat azotu ve 0.02 mg/L ortofosfat fosforudur) çıktığında suda alg oluşmaya başlar. Suda alg oluşumunun artmasına paralel olarak suda tabakalaşma dediğimiz oluşumda gerçekleşir. Tabakalaşma özellikle yaz aylarında güneş enerjisinden faydalanarak fotosentez yapmak ve gelişmelerini sürdürmek için alglerin suyun belirli bir derinliğinde yoğunlaşmasıdır. Yüksek alg konsantrasyonu ile oluşan tabakalaşma gölü yatay yönde iki parçaya ayırır. Gölün bu iki parçası farklı özellikler gösterirler. Üst kısımda sıcak, alg içeren, çok yüksek çözülmüş oksijen (15-20 mg/L) konsantrasyonu ve yüksek pH'lı bir su vardır. Alt kısımda soğuk, çok yüksek mangan ve demir içeren, düşük pH'lı bir su bulunur.

Algler, ilk yani primer üreticiler olup canlıların besin kaynağını oluşturmaktadır. Fotosentezi etkileyen tüm çevresel faktörler (ısı, ışık şiddeti, derinlik vb.) bunları da etkilemektedirler. 100-110 m'ye kadar etkili olabilen su derinliklerin yanı sıra derin olmayan bentik bölgelerdeki (su ortamı) taban bitkileri de fotosentez yapabilmektedir. Algler, mavi-yeşil algler ve yeşil algler olarak ikiye ayrılır. Mavi-yeşil algler, prokaryotik özellikte olup Siyanobakter türünde bir hücredir. Bu hücre ile çeşitli tipteki atıksular hem arıtılabilmekte hem de besin maddesi olarak kullanılabilir. Ayrıca gelecek yıllarda uzaya yolculukta bu canlı türünden faydalanacağı bildirilmektedir. Diğer alg türü olan yeşil algler ise daha gelişmiş yapıda olup ökaryotik özellikte hücrelerdir.

Yüzeysel sularda zamanla oluşacak besi maddesi konsantrasyonundaki yükselmeyi yavaşlatmak için ham su kaynağı korunmalıdır. Su ortamındaki üretkenliği, biyo-kütleyi tayin etmek amacıyla klorofil analizleri yapılmaktadır. Stabilizasyon havuzlarında klorofil tayini yapılarak, arıtmada alglerden faydalanabilmekteyiz. Ayrıca içme suyu tesislerinde yüksek alg içeren su, filtrelerin tıkanmasına ve tesisin düşük kapasite ile çalışmasına neden olur.

Çözünmüş manganın suda tam olarak giderilememesi sonucunda ise, oksidasyon işleminin tesis çıkışında devam etmesi sonucu (renkli, tortulu) su oluşabilmektedir.

Klorofil_a yanı sıra, Klorofil_b ve Klorofil_c değerleri de hesaplanabilmekte olup aradaki fark klorofillerin aralarındaki yapısal farklılıklardır örneğin birinde Mg atomu tek iken diğerinde fazla olması gibi.

Klorofil Tayin Yöntemleri

1. Spektrofotometrik Yöntem (Çevre Müh. Mikro. Lab'ında kullandığımız)
2. Florometrik Yöntem
3. Likitkromotografik Yöntem

Deneyde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

1. 10 ml aseton (çözücü madde)
2. 0.45 µm selüloz asetatlı filtre kağıdı (çözücü madde aseton olup selüloz asetat asetonunda eriyebilmektedir)
3. Distile su
4. Piset
5. Alüminyum folyo
6. Etil alkol
7. Vakum filtresi takımı
8. Kapalı KOI tüpleri
9. Santrifüj
10. Spektrofotometre
11. Buzdolabı

Deney Yapılışı (Suda Klorofil Tayini)

1. 1 litre su numunesi hazırlanır (alg konsantrasyonu yoğun bir numune ise 100 ml ya da 50 ml numune alınabilir)
2. Vakum filtresine selüloz asetatlı filtre kağıdı yerleştirilir
3. Numune süzülür
4. 10 ml aseton KOI tüpüne konur

5. KOI tüpü içerisine, numune süzdüğümüz filtre kağıdı katlayarak yerleştirilir
6. KOI tüpü iyice çalkalanır (filtre kağıdı asetonda iyice çözülmelidir)
7. Tüp, alüminyum folyo ile iyice sarılır (karanlık ortam şartları sağlanarak alg üremesi engellenir-girişim engellenir)
8. +4 derecede 2 saat buzdolabında bekletilir
9. 15 dk santrifüj yapılır (3000 rpm'ye gelinceye kadar 1-2 dk santrifüj cihazı çalıştırılır, KOI tüpü yerleştirilir ve tam karşısına su konmuş bir KOI tüpü yerleştirilir (denge için))
10. Santrifüjleme sonrası KOI tüpünün üst kısmındaki duru faz alınarak spektroda okumaları yapılır (hücre duvarına kadar parçalanmış algler)
11. Spektrofotometre'de okuma yapılır (duru fazdan alınarak). Şahit olarak aseton kullanılır. Okuma yapılacak dalgaboyları (nm);
 - 630
 - 647
 - 664
 - 750

olup burada dikkat edilmesi gereken şudur: 750 nm'deki abs okuma değeri diğer değerlerden çıkarılarak bulanıklıktan gelen girişim (hata) engellenmelidir. Diğer bir ifadeyle su numunesinde 750 nm'de bulanıklık ölçülür ve bulanıklık tespit edilirse aşağıdaki diğer absorban değerlerinden tek tek çıkarılarak hesaplama kısmında (Ca) formülde işleme alınmalıdır;

$$\begin{aligned} & \text{abs}_{750} - \text{abs}_{630} \\ & \text{abs}_{750} - \text{abs}_{647} \\ & \text{abs}_{750} - \text{abs}_{664} \end{aligned}$$

Hesaplama

$$\text{Ca} = (11.85 * \text{OD}_{664}) - (1.54 * \text{OD}_{647}) - (0.08 * \text{OD}_{630})$$

$$\text{Klorofil}_a \text{ (mg/m}^3\text{)} = (\text{Ca} * \text{aseton hacmi (lt)}) / \text{numune hacmi (m}^3\text{)}$$

Klorofil_a denklemi amprik bir ifadedir yani birimler birbirinden farklıdır buna göre aşağıdaki birimlere dikkat edilmelidir:

Ca; a'ya tekabül eden klorofil katsayısı (birimsiz)

Cb; b'ye tekabül eden klorofil katsayısı (birimsiz)

Cc; c'ye tekabül eden klorofil katsayısı (birimsiz)

Aseton hacmi = 10 ml = 0.01 litre alınır

Numune hacmi = 1 litre = 0.001 m³ alınır ya da

Numune hacmi = 50 ml = 0.05 lt = 0.00005 m³ alınır

NOT: Yapılan bir çalışmada, su ortamından alınan bir numunede tespit edilen klorofil miktarının %2'si, aynı su ortamındaki fitoplankton kuru ağırlığına tekabül etmektedir. Böylece sulak alandaki primer üretim kapasitesi bulunabilmektedir.

Deney Yapılışı (Karada Klorofil Tayini)

1. Numune olarak Ağaç Yaprağı alınır
2. Çeşme suyunda iyice yıkanır
3. Üzerindeki su iyice kurularak ağırlık esasına göre 1 gram tartılır
4. Hacimce; %80 aseton (16 ml aseton) + %20 saf su (4 ml saf su) = 20 ml'lik çözelti hazırlanır
5. Yapraklar, bir havana yerleştirilir ve üzerine hazırlanan çözelti eklenerek bitki materyalleri iyice ezilip klorofil özütleri çıkarılmıştır
6. Daha sonra bir tülbentten süzülür
7. Süzüntü suyu santrifüj tüpüne aktarılır (20 ml hacim için 2 tüp kullanılabilir)
8. Tüpler, 3000 rpm devirde 15 dk santrifüjlenerek özüt içerisindeki katı partiküller çöktürülmek suretiyle sıvı faza ayrılır
9. Sıvı fazdan alınarak, 645 ve 663 nm dalgaboylarında spektrofotometrik okuma yapılarak klorofil özütünün optikal yoğunluğu (OD) belirlenir
10. OD değerleri formüle yerleştirilerek klorofil_a değeri hesaplanır

Hesaplama

1 gram taze yapraktaki, mg olarak klorofil miktarı:

$$\text{Klorofil}_a \text{ (mg/gr)} = (12.3 * \text{OD}_{663} - 0.86 * \text{OD}_{645}) * v / (d * 1000 * w)$$

OD : Spektrofotometrede okunan optik yoğunluk değeri (abs cinsinden)

d : Spektrofotometrede küvetin uzunluğu (1 cm)

w : Taze yaprağın ağırlığı (1 gr)

v : Kullanılan aseton + su karışımının hacmi (20 ml)

ÖDEV:

Klorofil ile alg konsantrasyonu arasında nasıl bir ilişki vardır?