

7004UY

Determinación de Clorofila-a y Feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina

Método espectrofotométrico de extracción con acetona



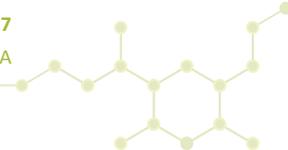
Elaborado - M. Menéndez

Modificado - G. Pistone

Revisado - G. Pistone, Jefe Sección Microbiología y Ecotoxicidad

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de clorofila-a y feofitina-a encontrados en fitoplancton de agua dulce y marina.
- 1.2. La clorofila es el pigmento fotosintético esencial presente en todas las plantas verdes. La determinación de la concentración de clorofila-a provee información acerca de la cantidad (biomasa) y actividad fotosintética potencial de la mayor parte del fitoplancton presente en un cuerpo de agua (algas y cianobacterias), con la excepción de las bacterias fotosintéticas, las cuales carecen de dicho pigmento. El metabolito más importante de la clorofila es la feofitina. La relación entre clorofila y feofitina es indicativa del estado fisiológico de las algas.
- 1.3. El límite de detección es de 0,023 mg/L y el límite de cuantificación de 0,07 mg/L.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Instructivo de uso de bomba de vacío (INE 02)
- 2.6. Instructivo de uso de centrífuga (INE 49)
- 2.7. Instructivo de uso de analizador de pH (INE 98)
- 2.8. Instructivo de uso de desionizador Thermo Scientific (INE 28)
- 2.9. Instructivo de uso de espectrofotómetro (INE 99)
- 2.10. Ruta de análisis (RMB 13)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Se concentra, por filtración en vacío y a través de un filtro de fibra de vidrio, un volumen de muestra de agua conocido que contiene fitoplancton.
- 3.2. Los pigmentos se extraen del fitoplancton en acetona al 90 % con la ayuda de un mortero mecánico, dejando reposar entre 2 y 24 h.
- 3.3. El extracto se centrifuga a 675 g durante 15 minutos (o 1000 g durante 5 min) para clarificar la solución. Una alícuota del sobrenadante se transfiere a una celda de vidrio y se mide la absorbancia a tres longitudes de onda (664, 665 y 750 nm) para determinar clorofila-a, feofitina-a y turbidez respectivamente.
- 3.4. Se mide la absorbancia de la muestra a 750 y 664 nm antes de acidificar, y a 750 y 665 nm después de la acidificación con HCl 0,1 N.
- 3.5. Para calcular las concentraciones de los pigmentos se insertan los valores en una serie de ecuaciones que utilizan los coeficientes de extinción de los pigmentos puros en acetona al 90 %. Las concentraciones se expresan en mg/L. No es necesaria la calibración del método ni del instrumento con soluciones estándar, cada vez que se realice el procedimiento al utilizar dichas ecuaciones.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Utilizar implementos de seguridad: túnica, guantes, lentes, según la naturaleza de las muestras en estudio.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Cualquier compuesto que absorba luz entre 664 y 665 nm puede interferir en la exactitud de las medidas de absorbancia de la muestra.
- 5.2. Se realiza una medida a 750 nm para determinar la **turbidez**, la cual se resta de las medidas de las otras absorbancias a 664 y 665 nm. Una medida mayor a 0,005 U.A. indica una solución poco clara, lo cual se soluciona centrifugando o filtrando la muestra previo a la lectura.
- 5.3. La cantidad relativa de clorofila a, b y c1+c2 varía con la **composición taxonómica** del fitoplancton y en soluciones que contienen todos los pigmentos es inevitable la sobre o subestimación de los pigmentos debido a la superposición espectral de las clorofilas y la feofitinas.

El valor de feofitina-a queda sobrestimado en presencia de ciertos carotenoides y al acidificar la muestra, cuando la clorofila-b también se convierte en feofitina-b. El grado de conversión de clorofila-b a feofitina-b es más lento que el de clorofila-a. Por lo tanto es importante dejar transcurrir el mínimo tiempo necesario para convertir clorofila-a a feofitina-a, antes de medir la absorbancia a 665 nm, el cual se recomienda que sea de 90 segundos.

- 5.4. Todos los pigmentos fotosintéticos son sensibles a **la luz**. El trabajo se debe realizar con luz tenue y todos los estándares materiales de control de calidad y muestras filtradas se deben almacenar en la oscuridad entre -20 °C y -70 °C para prevenir la rápida degradación.
- 5.5. Las muestras de agua con **pH < 6** deben ser analizadas lo antes posible luego de filtradas, de forma de evitar la posible degradación de la clorofila como consecuencia del agua residual que queda retenida en el filtro.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

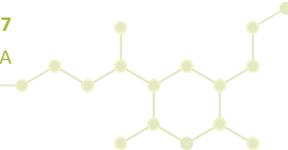
- 6.1. El volumen de muestra a recolectar depende de la densidad del fitoplancton en el agua.
- 6.2. En aguas oceánicas se requieren 4 L, mientras que en lagos y estuarios 1 L es suficiente. Recolectar la muestra en frasco de vidrio o plástico (polietileno o equivalente), color ámbar.
- 6.3. Todos los instrumentos usados para la recolección deben estar limpios y libres de ácido.
- 6.4. Realizar el análisis lo antes posible luego de recolectada la muestra. Si la muestra presenta un pH mayor o igual a 6 y no se va a realizar el análisis inmediatamente, filtrar la muestra dentro de las 24 h y almacenar los filtros cubiertos con papel de aluminio entre - 20 °C y - 70 °C por un máximo de 28 días. Mientras no es filtrada, la muestra debe ser refrigerada a ≤ 6 °C (> 0 °C), en oscuridad.

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Espectrofotómetro: visible, múltiple longitud de onda y resolución de 2 nm.
- 7.2. Centrifuga: capacidad de centrifugación a 675 g o a 1000 g.
- 7.3. Mortero mecánico para tejidos: mano de mortero de teflón 50 mm x 20 mm, varilla de acero inoxidable ¼", tubo de vidrio de 30 mL de capacidad.
- 7.4. Filtros de fibra de vidrio: 47 mm, tamaño nominal de poro de 0,7 μ m.
- 7.5. Hojas de aluminio.
- 7.6. Timer.
- 7.7. Pinzas con punta chata.
- 7.8. Bomba de vacío: capacidad para filtrar a 6 inHg (20 kPa).
- 7.9. Pipetas automáticas de rango variable 40-100 μ L, 100-1000 μ L, y 1-10 mL con los tips correspondientes.
- 7.10. Probetas graduadas, capacidad 100 mL y 500 mL .
- 7.11. Celdas de vidrio para espectrofotómetro.
- 7.12. Equipo de filtración, consistente de un matraz de 1 L de polipropileno con un portafiltro de base de 47 mm de diámetro.
- 7.13. Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL de capacidad, con tapa rosca.
- 7.14. Pissetas de polietileno.
- 7.15. Filtro de jeringa no estéril; membrana de nylon, politetrafluoroetileno (PTFE), polipropileno, celulosa regenerada; 25 mm de diámetro; tamaño de poro 0,45 μ m.
- 7.16. Heladera a ≤ 6 °C (> 0 °C)
- 7.17. Jeringa de 10 mL.
- 7.18. pHímetro (analizador de iones Thermo Scientific Orion StarVersa o similar)

8. REACTIVOS

- 8.1. Acetona UltimAR®, grado espectrofotométrico.
- 8.2. Ácido clorhídrico (HCl Nro. CAS 7647-01-0) concentrado. Solución de HCl 0,1 N. Agregar 8,5 mL de HCl concentrado a 500 mL de agua y llevar a 1 L.
- 8.3. Agua desionizada (grado 2, según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.4. Solución acuosa de acetona (CH₃COCH₃ Nro. CAS 67-64-1): 90 % acetona / 10 % agua desionizada.



8.5. Estándar de clorofila-a from Spinach: C-5753, Sigma. Ampolla de vidrio de color ámbar de 1 mg. Almacenar en oscuridad a -20 °C. (Opcional)

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

9.1. No aplica.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

10.1. No aplica.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Filtrar a vacío, a través de un filtro de vidrio, al menos 1 L de muestra en un ambiente con luz tenue tomando en cuenta los siguientes requerimientos: el vacío no debe exceder las 6 inHg y el tiempo de filtración debe ser menor a 10 min para evitar la rotura de células y en consecuencia la pérdida de clorofila. Enjuagar el recipiente de la muestra con 20 mL de agua y pasarla por el filtro para asegurarse que se colecten todas las células. En caso de taparse el filtro antes de filtrar 1 L considerar lo filtrado y anotar volumen.

11.2. Retirar el filtro con una pinza y si no se va a realizar la extracción inmediatamente cubrirla con una hoja de aluminio, doblándolo para no colocar la superficie filtrada en contacto con el papel de aluminio. Guardarlo en freezer a -20 °C hasta un máximo de 28 días.

11.3. El filtro con muestra recién obtenida, o el proveniente del freezer, se trata de la siguiente manera: romper con la pinza el filtro en trozos pequeños y empujarlos hasta el fondo del tubo de centrifuga de 50 mL.

11.4. Agregar 4 mL de solución acuosa de acetona al 90 % con una pipeta (el volumen final de la extracción será de 10 mL).

11.5. Moler con mortero mecánico 1 min a 500 r/min.

11.6. Enjuagar el mortero con la solución de extracción (acetona 90 %), completando el tubo hasta llegar a los 10 mL.

11.7. Dejar reposar en la oscuridad y en heladera por un mínimo de 2 h pero no más de 24 h. Agitar 2 o 3 veces durante el período de reposo y tratar a todas las muestras de la corrida igual con respecto al tiempo de reposo.

Antes de continuar con el procedimiento, encender el espectrofotómetro y dejar calentar durante aproximadamente 30 min. Cerar el equipo con acetona al 90 % a todas las longitudes de onda (664 nm, 665 nm y 750 nm). Usar celda de vidrio de 1 cm de paso óptico.

11.8. Centrifugar las muestras durante 15 min a 675 xg o 5 min a 1000 xg.

11.9. Colocar la muestra en un lugar oscuro antes de obtener las medidas de absorbancia en el espectrofotómetro.

11.10. Cerar el espectrofotómetro con acetona al 90 % a 664 nm, 665 nm y 750 nm.

11.11. Pipetear 3 mL del sobrenadante del extracto en una celda de vidrio del espectrofotómetro.

11.12. Medir la absorbancia a 664 y a 750 nm. Si la medida de absorbancia de la muestra a 750 nm excede las 0,0050 UA, la muestra debe ser filtrada a través de filtro de jeringa y se debe medir nuevamente. Por otro lado, si la señal a la longitud de onda seleccionada es mayor a 0,9000 UA (unidades de absorbancia), diluir y medir nuevamente.

11.13. Acidificar la muestra en la celda del espectrofotómetro con HCl 0,1 N hasta obtener una concentración no mayor a HCl 0,003 N. Por ejemplo, una celda con 3 mL de muestra requiere 90 µL de HCl 0,1 N para obtener una concentración de ácido 0,003 N.

11.14. Mezclar bien la muestra utilizando una pipeta de 1000 µL, aspirando y expulsando la muestra dentro de la cubeta pero sin airearla demasiado (para esto no se debe sacar la punta del tip de la solución). Esperar 90 segundos y medir la absorbancia a 750 nm y 665 nm. Es crítico el mezclado apropiado de la muestra con el ácido para obtener resultados precisos y exactos.

11.15. Si se va a utilizar el mismo material para muestras diferentes realizar un lavado con acetona al 90 % entre cada muestra.

12. ANALISIS DE DATOS

12.1. ECUACIÓN DE LORENZEN para la determinación de clorofila-a y feofitina-a en el extracto.

- Restar los valores de absorbancia a 750 nm de los valores de absorbancia a 664 nm y 665 nm.
- Calcular las concentraciones de clorofila-a y feofitina-a en el extracto insertando los valores de absorbancia corregidos a las siguientes ecuaciones:

$$C_{E,a} = 26,7 \times (A_{664a} - A_{665d})$$

$$P_{E,a} = 26,7 \times (1,7 \times A_{665d} - A_{664a})$$

donde:

$C_{E,a}$: corresponde a la concentración en mg/L de Clorofila-a en el extracto.

$P_{E,a}$: corresponde a la concentración en mg/L de Feofitina-a en el extracto.

A_{664a} : corresponde a la absorbancia del extracto a 664 nm, corregida por turbidez y medida antes de acidificar.

A_{665d} : corresponde a la absorbancia del extracto a 665 nm, corregida por turbidez y medida después de acidificar.

12.2. ECUACIÓN GENERAL para la determinación de clorofila-a y feofitina-a en la muestra.

- Calcular las concentraciones de los pigmentos en toda la muestra de agua usando la siguiente ecuación general:

$$C_s = \frac{C_{E(s)} \times \text{volumen de extracto (L)} \times \text{DF}}{\text{volumen de muestra (L)} \times \text{longitud de celda (cm)}}$$

donde:

C_s : corresponde a la concentración en mg/L de pigmento en toda la muestra de agua.

$C_{E(s)}$: corresponde a la concentración en mg/L del pigmento en el extracto medido en la celda.

Volumen de extracto: corresponde al volumen en L de extracto antes de diluir (típicamente 0,010 L; 10 mL).

DF: corresponde al factor de dilución (en el caso que haya sido necesario diluir la muestra).

Volumen de muestra: corresponde al volumen en L de toda la muestra de agua que se filtró.

Longitud de celda: corresponde al camino óptico en cm de la cubeta usada (típicamente 1 cm).

12.3. Las muestras de agua con una razón: (664 antes de acidificar)/(665 después acidificar) = 1,70 no contienen feofitina-a. Esto implica que los fotótrofos atrapados en la muestra se encontraban en un excelente estado fisiológico al momento de realizarse el muestreo. Soluciones puras de feofitina-a no registran reducción en la absorbancia a 665 nm luego de la acidificación, presentando entonces una razón: (664 antes de acidificar)/(665 después acidificar) = 1,0. Por ende, las muestras de agua donde tenemos mezclas de clorofila-a y feofitina-a presentarán una razón de absorción 664 nm/665 nm que variará entre 1,0 y 1,7.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. Se debe analizar un reactivo blanco por cada corrida de muestras. Este reactivo es un filtro blanco que se extrae y analiza como cualquier otra muestra. Se utiliza para determinar la posible contaminación de reactivos o materiales. Los valores de absorbancia del mismo deben ser < 0,005 U.A.
- 13.2. Analizar cada cinco muestras, una por duplicado (o al menos 1 duplicado por bach). Verificar que la dispersión de los duplicados esté dentro de los límites de control de rangos correspondiente.
- 13.3. Dado que no es necesaria la calibración del método ni del instrumento con soluciones estándar cada vez que se realice este procedimiento es necesario realizar por lo menos un vez al año una curva de calibración a partir de una solución estándar de clorofila-a utilizando como mínimo 5 puntos con concentraciones entre 1 y 15 mg/L.

La solución estándar de Clorofila-a se debe preparar en ausencia de luz. Se transfiere el contenido de la ampolla (1 mg) a un matraz conteniendo 25 mL de acetona al 90 %. Se logra así una concentración de 40 mg/L. Recubrir el matraz con papel de aluminio para protegerlo de la luz. En la siguiente tabla se muestran



las posibles diluciones para realizar la curva de calibración a partir de la solución estándar de clorofila-a, éstas se llevan a un volumen final de 10 mL.

Los resultados obtenidos deben ser contrastados con los resultados obtenidos en la validación inicial.

Concentración de la solución a preparar (mg/L)	Toma de la solución estándar (mL)
1	0,25
3	0,75
6	1,5
9	2,2
12	3
15	3,8

14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1 American Public Health Association (APHA) (2012) Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd edition. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC.
- 14.2 U.S EPA (setiembre 1997). Method 446.0. In Vitro determination of Chlorophylls a, b, c1+c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. Revisión 1.2. National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development. Cincinnati, Ohio.