

CUARTA PARTE

BIOMASA FOTOTROFOS: CLOROFILAS

LA BIOMASA DE FITOPLANCTON puede ser estimada determinando la concentración de pigmentos fotosintéticos en una muestra de agua. Midiendo la concentración de la clorofila-a podemos estimar la biomasa de la mayor parte del fitoplancton presente en un cuerpo de agua (algas, cianobacterias), con la excepción de las bacterias fotosintéticas, las cuales carecen de dicho pigmento. La Asociación Americana de Salud Pública presenta tres métodos para la determinación de la concentración de clorofila-a, en su publicación "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters" (18va. edición, 1992). Estos métodos son: el espectrofotométrico, el fluorométrico y el de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Aquí describiremos el método espectrofotométrico. Este es un procedimiento sencillo y el equipo y materiales requeridos son fáciles de adquirir.

Equipo y materiales:

- Espectrofotómetro de banda estrecha (0.5nm a 2.0 nm)
- Celdas de cristal para espectrofotómetro (longitud paso de luz -1 cm, volumen mínimo 3 ml)
- Centrífuga clínica
- Tubos de centrífuga en cristal con tapa de rosca
- Homogenizador de tejido con pistón de vidrio esmerilado y surcos en la punta
- Sistema de filtración (matraces de filtración, bomba de vacío)

- Membranas Millipore (tipo HA, 0.45 μm , 47 mm diámetro, no-cuadrículadas)
- Papel de aluminio
- Solución saturada de MgCO_3 (1.0g/100 H_2O destilada)
- Acetona alcalinizada (90 partes acetona "reagent grade"/10 partes solución saturada de MgCO_3) * [es importante la proporción 90:10]
- HCl 0.1N
- Pipetas (0.1 ml y 5.0 ml)
- Botellas ámbar de 1.0 L (plásticas o de cristal, limpias y *libres de ácido*)
- cilindros graduados de 100 ml



METODOLOGIA

A. Colección de muestras de agua:

1. Tome las muestras de agua evitando exponerlas a la luz (una exposición breve a la luz solar puede alterar los valores de clorofila-a). Utilice botellas ámbar de cristal o plásticas, para evitar fotooxidación de los pigmentos. Para aguas costeras o aguas oceánicas tome muestras de por lo menos 1 litro (para aguas oceánicas se podrían requerir volúmenes de hasta 1 galón para poder obtener medidas significativas de clorofila-a). Para aguas interiores oligotróficas tome muestras de 1 litro, mientras que para cuerpos eutróficos puede utilizar botellas de 500 ml. Proceda con la fase de extracción de pigmentos a la brevedad posible. En el caso de que esto no sea posible coloque las botellas en hielo o a 4°C, protegidas de la luz.

B. Extracción de pigmentos:

1. Concentre el fitoplancton presente en cada muestra de agua por filtración, utilizando membranas Millipore tipo HA (poros de 0.45 μm , 47 mm de diámetro y no-cuadrículadas). **[Asegúrese de utilizar las membranas finas de color blanco para la filtración y no las almohadillas ("pads") gruesas de celulosa que se incluyen con el paquete de membranas. De igual forma asegúrese de que ha removido la cubierta protectora inferior de color azul que acompaña a cada membrana antes de colocar esta última en el vaso de filtración.]** Es deseable filtrar el contenido total de su botella. Si su muestra fuera una con una alta densidad de fitoplancton o de material particulado, es muy probable que la membrana se obstruya. Si la membrana se obstruye por una alta densidad de plancton (la membrana presentará un color verdoso en su superficie), complete la filtración del volumen de agua que haya depositado en el vaso de filtración y anote el volumen total de agua filtrada en su libreta de

laboratorio. En el caso de que la membrana se obstruya por una alta concentración de material particulado (debris o sedimentos), puede utilizar más de una membrana para concentrar su muestra. **SIEMPRE ANOTE EL VOLUMEN DE MUESTRA FILTRADA.** Previo a la filtración forre la porción superior de su equipo de filtración con papel de aluminio, para prevenir la exposición de la muestra de agua a la luz. Trabaje en un área donde puede reducir la iluminación lo más posible.

*Como método alternativo, puede concentrar el fitoplancton en su muestra por centrifugación (10,000 rpm, 10 min, 2°C - centrífuga refrigerada de alta velocidad).

2. Después de la filtración coloque la membrana en un homogenizador de tejido. Añada 2 ml de acetona alcalinizada al tubo de homogenización y macere la muestra utilizando un pistón de vidrio esmerilado (500 rpm, por 1 minuto). Cubra el tubo de homogenización con papel de aluminio durante el periodo de trituración de la muestra. Transfiera el material resuspendido al tubo de homogenización y proceda a macerar la muestra utilizando el procedimiento antes descrito. [En el caso de que haya utilizado el método de centrifugación, decante el sobrenadante y añada 2 ml de acetona alcalinizada al tubo de centrífuga para resuspender el pellet].
3. Transfiera la muestra macerada a un tubo de centrífuga de cristal, con tapa de rosca y forrado con papel de aluminio. Lave el pistón y el tubo de homogenización con 3 ml de acetona alcalinizada y añádalo al extracto. Ajuste el volumen total del extracto a un nivel constante entre 5 y 10 ml, utilizando la acetona alcalinizada. Use el solvente (acetona alcalinizada) moderadamente, evitando la dilución excesiva del extracto. Recuerde rotular adecuadamente cada muestra. Coloque el extracto a 4°C por lo menos durante 2 horas, en oscuridad (puede guardarlo de un día para otro).
4. Para clarificar su extracto centrifugue las muestras en una centrífuga clínica por 20 minutos, a 500 g ó utilizando un filtro desechable (0.45 μ), acoplado a una hipodérmica (ambos resistentes al solvente: acetona alcalinizada). Transfiera el extracto clarificado a tubos de cristal de 15 ml, limpios, calibrados y con tapa de rosca. Mida el volumen total del extracto y anótelos en su libreta de laboratorio.

C. Determinación espectrofotométrica de la clorofila-a en presencia de feofitina:

1. La concentración de clorofila-a puede ser sobreestimada cuando en el análisis espectrofotométrico no discriminamos entre la clorofila-a y sus productos de

degradación. La feofitina-a es un producto de degradación de la clorofila-a cuya región de absorción máxima coincide con la del pigmento parental. Podemos determinar la concentración de clorofila-a y de feofitina-a en una muestra de agua acidificando el extracto. La adición de ácido al extracto causa que la clorofila-a presente pierda su átomo de magnesio convirtiéndose en feofitina-a. La acidificación del extracto también evita que algunos pigmentos accesorios absorban al mismo largo de onda de la feofitina-a. Cuando una solución de clorofila-a pura es convertida a feofitina-a mediante acidificación la razón **(DO_{664nm} antes de la acidificación)/(DO_{665nm} después de la acidificación) = 1.70** [DO = densidad óptica]. Dicho valor es utilizado para corregir la concentración de clorofila-a por la feofitina-a presente.

2. Se considera que los extractos con una razón: **(DO_{664nm}-antes de la acidificación)/(DO_{665nm}-después de la acidificación) = 1.70** no contienen feofitina-a. Esto implica que los fototrofos 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 665nm luego de la acidificación, presentando entonces una razón: **(DO_{664nm}-antes de la acidificación)/(DO_{665nm}-después de la acidificación) = 1.0**. Por ende, las muestras de agua donde tenemos mezclas de clorofila-a y feofitina-a presentarán una razón de absorción 664nm/665nm que variará entre 1.0 y 1.7.

Procedimiento:

1. Transfiera 3 ml del extracto clarificado a una celda del espectrofotómetro (1 cm) y lea la densidad óptica (DO) A 750nm y 664nm.
2. Acidifique el extracto en la celda añadiendo 0.1 ml de HCl 0.1 N. Agite con cuidado el extracto acidificado y lea la absorbancia (DO) a 750nm y 665nm, 90 segundos después de la acidificación. La densidad óptica (DO) del extracto a 664nm, antes de la acidificación, debe estar entre 0.1 y 1.0 unidades.
3. Reste las absorbancias que obtuvo a 750nm (no-acidificada y acidificada) a las correspondientes lecturas que obtuvo a 664nm *antes de acidificar* y a 665nm *después de acidificar* (la absorbancia registrada a 750 nm es una medida de la turbidez en el extracto). Utilizando los valores corregidos (**DO_{664nm}** y **DO_{665nm}**) calcule la concentración de clorofila-a y feofitina-a utilizando las siguientes expresiones:

$$\text{Clorofila-a (mg/m}^3\text{)} = \frac{26.7 \times (\text{DO}_{664:\text{antes}} - \text{DO}_{665:\text{despu\acute{e}s}}) \times V_1}{V_2 \times L}$$

$$\text{Feofitina-a (mg/m}^3\text{)} = \frac{26.7 \times 1.7 \times (\text{DO}_{665:\text{antes}} - \text{DO}_{664:\text{despu\acute{e}s}}) \times V_1}{V_2 \times L}$$

...donde:

V₁ = volumen del extracto, expresado en litros (L)

V₂ = volumen de la muestra, expresado en metros cúbicos (m³)

L = longitud paso de luz o ancho de la celda espectrofotométrica, expresado en centímetros (cm)

DO 664nm: antes = densidad óptica del extracto a 664nm antes de la acidificación

DO 665nm: después = densidad óptica del extracto a 665nm después de la acidificación

El valor 26.7 es un factor de corrección de la absorbancia igual a **A x K**, ...donde:

A = 11.0 (coeficiente de absorbancia de la clorofila-a, a 664nm)

K = 2.43 (factor de corrección por la acidificación)

$$K = \frac{\frac{664_a}{665_d} \text{ clorofila-a (pura)}}{\frac{664_a}{665_d} \text{ clorofila-a (pura)} - \frac{664_a}{665_d} \text{ feofitina-a (pura)}}$$

$$K = \frac{1.7}{1.7 - 1.0} = 2.43$$

Determinación espectrofotométrica de la clorofila-a (método tricromático aplicable a muestras donde no encontramos feofitina-a):

1. Transfiera el extracto a una celda del espectrofotómetro de 1 cm y lea la densidad óptica (DO) a 750, 664, 647 y 630nm. La densidad óptica del extracto a 664 nm, debe estar entre 0.1 y 1.0 unidades.
2. Corrija los valores de absorbancia de 664, 647 y 630nm por la turbidez del extracto, restándole a cada uno de ellos la lectura obtenida a 750nm.
3. Calcule las concentraciones de clorofila a, b y c en el extracto utilizando las siguientes expresiones:

$$C_a = 11.85 (DO_{664}) - 1.54(DO_{647}) - 0.08(DO_{630})$$

$$C_b = 21.03 (DO_{647}) - 5.43(DO_{664}) - 2.66(DO_{630})$$

$$C_c = 24.52 (DO_{630}) - 7.60(DO_{647}) - 1.67(DO_{664})$$

...donde:

C_a , C_b y C_c = concentraciones respectivas de clorofila a, b y c.

4. Luego de determinar la concentración del pigmento en el extracto, calcule la cantidad de pigmento por unidad de volumen utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Clorofila-a (mg/m}^3\text{)} = \frac{C_a \times \text{Vol Extracto (L)}}{\text{Vol Muestra Filtrada (m}^3\text{)}}$$

Datos & Análisis:

Observaciones:

Hábitat: _____

Fecha colección de muestras: _____

Volumen Filtrado, (m³): _____

Volumen Extracción, (L) [acetona]: _____

Muestra	Abs. Extracto				Abs. Extracto Acidificado		Clorofila-a mg/m ³	Feofitina-a mg/m ³	Clorofila a,b,c, mg/m ³
	750	665	647	630	750	665			



PREGUNTAS...

1. Indique qué función tiene la solución saturada de MgCO₃ en la determinación de clorofilas.