

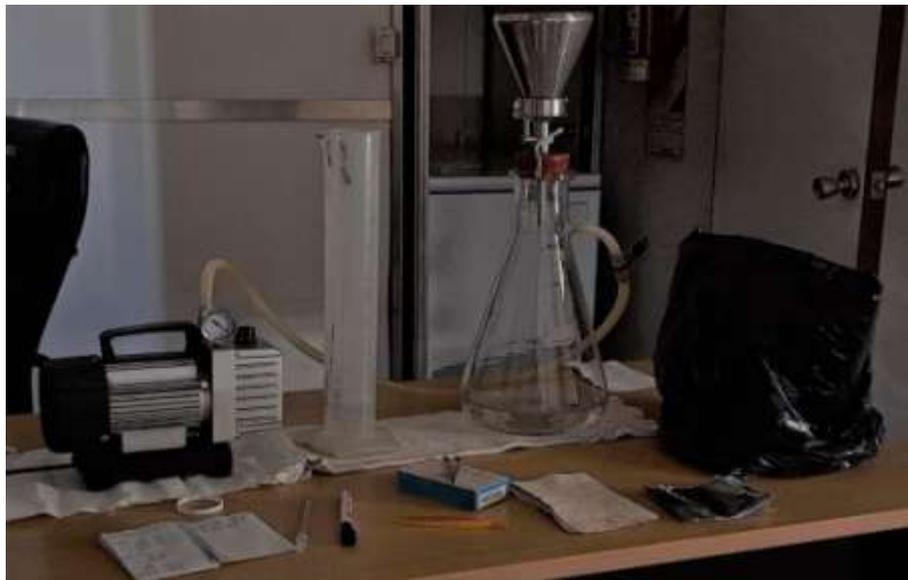
ANEXO VII. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA a Y FEOPIGMENTOS.



***Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas
de los Ríos Limay, Neuquén y Negro***

SECRETARÍA DE GESTIÓN AMBIENTAL

**Protocolo para la Determinación de la Concentración de
Clorofila a y Feopigmentos en Muestras de Agua**



CIPOLLETTI, Julio 2023

CONTENIDO

1. Objetivo	3
2. Requisitos de colección, conservación y transporte de la muestra	3
3. Procesamiento de la muestra	5
3.1. Filtración de la muestra	5
3.2. Determinación espectrofotométrica de clorofila <i>a</i>	8
4. Bibliografía	11
5. Anexo	12

Protocolo para la Determinación de la Concentración de Clorofila a y Feopigmentos en Muestras de Agua

APLICABLE A MUESTRAS OBTENIDAS EN MONITOREOS DE AMBIENTES LÉNTICOS Y LÓTICOS DE LAS CUENCAS DE LOS RÍOS LIMAY, NEUQUÉN Y NEGRO

Las determinaciones de clorofila a (Cl a) pueden realizarse por tres técnicas principales: espectrofotometría, fluorimetría, y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por su sigla en inglés). El presente protocolo se basa en la técnica espectrofotométrica (método 10200 H del Standard Methods, APHA 2017).

1. OBJETIVO

Describir y estandarizar el procedimiento de colección, preservación y filtración de muestras de agua destinadas a cuantificar en laboratorio Clorofila a y Feopigmentos. Asimismo, se realiza una descripción de la extracción de pigmentos para determinar por espectrofotometría la concentración de clorofila a en agua.

2. REQUISITOS DE COLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

El muestreo es el primer paso en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua, por ello, las personas que colectan la muestra y la entregan en el laboratorio son corresponsables de la validez de los resultados obtenidos. Deben asegurar que la muestra colectada es representativa de la composición real y calidad del cuerpo de agua a evaluar, debiendo conservarla de forma adecuada hasta su arribo al laboratorio evitando su deterioro o contaminación. La calidad y exactitud del resultado analítico obtenido depende en gran medida de la integridad de la muestra que ingresa al laboratorio.

Para la determinación analítica de pigmentos fotosintéticos en el estrato superficial de cuerpos de agua lénticos, la muestra debe ser colectada a una profundidad entre 0.50 y 1.00 m desde el pelo de agua. Utilizar una botella muestreadora tipo Van Dorn o similar en posición vertical (Figura 1), recolectando un volumen mínimo de muestra de 5 litros. En cuerpos de agua lóticos, emplear la botella de forma horizontal en posición

longitudinal al sentido de la corriente, y coleccionar la muestra a una profundidad entre 0.20 y 0.30 m desde el pelo de agua (Figura 1), evitando remover el fondo.

Se sugiere utilizar envases plásticos de polietileno de alta densidad (PEAD o HDPE) tipo bidón (Figura 2) o similar, con una capacidad de 5 litros.

Enjuagar el envase tres veces con agua del sitio a muestrear antes de coleccionar la muestra, y una vez coleccionada mantenerla en condiciones de oscuridad, cubriéndola con bolsa negra o manta (Figura 2), y refrigeración (entre 4 – 6 °C) desde su colección hasta su filtrado. El filtrado debe realizarse idealmente dentro de las primeras 8 h. En caso de no ser posible, deberá procesarse dentro de las 24 h de ser coleccionada.

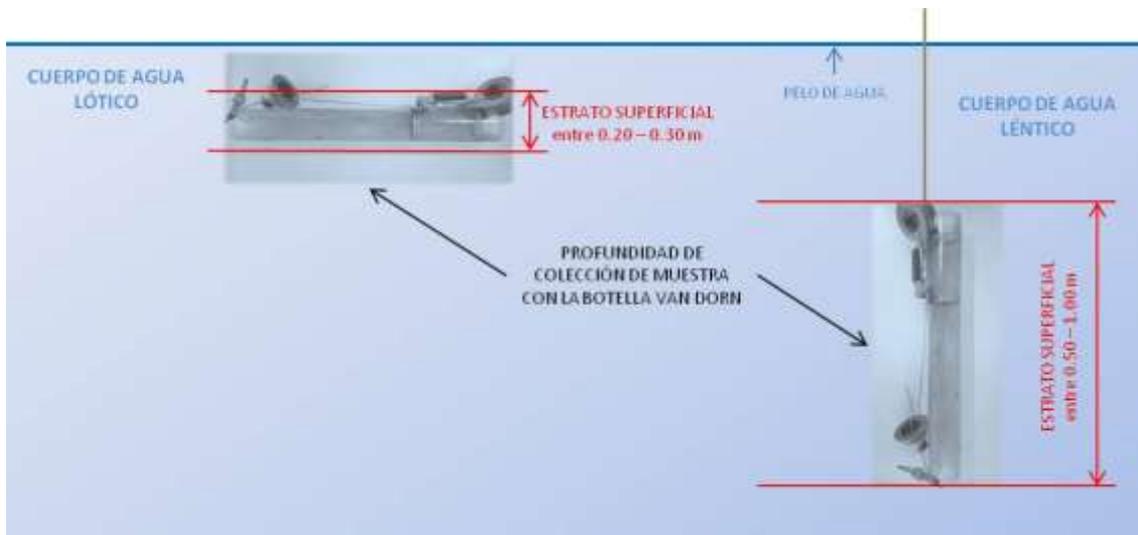


Figura 1: posición y profundidad requerida para la colección de muestra del estrato superficial en un cuerpo de agua léntico y lóticico con botella muestreadora Van Dorn.



Figura 2: A- envase sugerido de plástico (PEAD) tipo bidón de 5 L. B- condiciones de conservación de muestras, cubiertas (oscuridad) y refrigeradas.

3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.1. Filtración de la muestra

Durante el procedimiento de filtración es importante contar con los elementos detallados a continuación y mantener condiciones ambientales adecuadas, una iluminación tenue en el lugar destinado a la filtración, evitando la luz solar incidente o luz directa fuerte. Es indispensable dedicar TIEMPO y tener PACIENCIA durante el filtrado de la muestra, de ello depende en gran medida la exactitud y precisión del resultado del análisis.

3.1.1. Elementos necesarios del sistema de filtración (Figura 3).

- Filtros de fibra de vidrio (FV), de apertura nominal de $1\mu\text{m}$, con diámetro de 47 mm (éste último dependerá del sistema de filtración usado). Las marcas de filtros FV sugeridas son Millipore, Sartorius, Whatman GF/C, GF/F y GFB.
- Embudo para filtración, soporte para la placa filtrante y placa filtrante portafiltro.
- Matraz Kitasato grande (capacidad mínima 4 litros) de material resistente (vidrio o plástico de alta densidad) para utilizar de recipiente del agua filtrada.
- Tapón de goma o silicona para el matraz Kitasato, con orificio para pasar el vástago del soporte de la placa filtrante.
- Bomba de vacío
- Manguera de silicona larga para conectar el kitasato a la bomba de vacío.
- Probeta graduada de 1 L.
- Pinzas para manipular los filtros
- Papeles de aluminio cortados en cuadrados de 10x10 cm (medida sugerida) para envolver los filtros con el material filtrado.
- Papel absorbente.
- Marcador indeleble, lápiz, anotador/cuaderno.
- TIEMPO Y PACIENCIA



Figura 3: elementos necesarios para filtración de muestras para determinación de clorofila α .

3.1.2. Procedimiento de filtración

En el anexo se presenta un registro fotográfico de los elementos y montaje del sistema de filtración de muestras que acompaña el siguiente procedimiento.

1. Montar el sistema de filtración como se detalla y muestra en las imágenes de A – I del anexo fotográfico. Ubicando el filtro FV sobre la placa portafiltro filtrante con ayuda de una pinza. Verificar que el embudo se encuentre bien ajustado y que todo el sistema de filtración esté conectado correctamente.
2. Homogeneizar la muestra e ir colocando en la probeta de 1 L la alícuota de muestra que se irá agregando por el embudo del sistema de filtración. El agua se debe verter sobre la pared del embudo, evitando agregar directamente sobre el filtro (imágenes de J – M).
3. Iniciar el filtrado por gravedad, SIN APLICAR VACÍO (imagen N) para evitar succionar células pequeñas y perder material de la comunidad nanoplanctónica (1-10 μm). El material que se va depositando y es retenido en la superficie del filtro, sirve de contención del material de menor tamaño. Es primordial dedicar tiempo y paciencia.

4. Aplicar, cuando el filtrado por gravedad deja de producirse, vacío en baja intensidad que no supere los 0.2 bar para evitar dañar el filtro y las células (imágenes Ñ y O).
5. Filtrar al menos entre 3 y 4 L de muestra y apagar la bomba de vacío inmediatamente al acabarse el agua en el embudo (no dejarlo succionando en seco para evitar daños en el filtro y en el material retenido) (imágenes P, Q y R). Si bien APHA menciona la incorporación de carbonado de magnesio durante la filtración del volumen final de muestra para evitar la degradación de la clorofila presente, la experiencia ha demostrado que no es necesario. Por ello, el agregado de carbonato de magnesio puede omitirse, aunque no se desaconseja su uso.
6. Utilizando una pinza, doblar el filtro sobre sí mismo por la mitad (con el material retenido adentro) y retirarlo cuidadosamente (imágenes S y T).
7. Secar el filtro tres veces con papel absorbente (imagen U).
8. Envolver el filtro en papel de aluminio en forma de sobre, 2 veces (imagen V y W).
9. Etiquetar el sobre indicando: nombre del sitio, fecha de muestreo y el volumen filtrado de muestra, éste último es un dato necesario para aplicar en la fórmula de cálculo (imagen X).
10. Registrar en el anotador la misma información etiquetada en el sobre de papel de aluminio, y agregar cualquier observación que se considere relevante (imagen Y).
11. Colocar el sobre (filtro) en un recipiente con tapa (por ejemplo, vaso colector de orina) y guardarlo lo antes posible en el freezer. Evitar dejar la muestra esperando en la mesada, ya que el momento crucial de degradación es durante e inmediatamente después de la filtración (imagen Z). Se sugiere un tiempo máximo de seis meses para la conservación del filtro “frizado”.

NOTA 1: en muestras de agua con ALTA CARGA de sólidos suspendidos totales (SST), puede ocurrir la obturación del filtro antes de alcanzar el volumen de muestra requerido. En estos casos, se deberá: a) retirar el filtro y proceder según lo indicado a partir del punto 6; b) continuar la filtración utilizando un segundo filtro a fin de lograr el volumen máximo posible; c) repetir la operación indicada en a); d) registrar claramente el volumen total filtrado (dato fundamental para el cálculo posterior).

3.2. Determinación espectrofotométrica de clorofila a

3.2.1. Elementos necesarios

- Centrifuga
- Viales de centrífuga de 15 mL con tapa roscada
- Probeta graduada (20 – 25 mL)
- Pipeta o micropipeta (10 mL aprox.)
- Acetona 90 %
- Espectrofotómetro UV – VIS
- Celdas de vidrio para espectrofotómetro de 5 cm longitud (si es de 1 cm, requiere incrementar el volumen filtrado)
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N
- Gotero o pipeta de 1 mL
- Mortero*
- TIEMPO Y PACIENCIA

* sólo en caso de proceder a la extracción inmediata de clorofila luego de la filtración

3.2.2. Procedimiento para extracción y cuantificación de pigmentos

1. Retirar el filtro del freezer, dejarlo sobre la mesada unos minutos para tomar temperatura ambiente (no mayor a 25 °C), colocarlo en un tubo o vial de centrífuga y agregar con pipeta (o probeta graduada) 12 o 13 mL de acetona al 90 %. Este volumen se corresponde con el V_1 expresado en L en las ecuaciones de cálculo.
2. Tapar herméticamente y almacenar el vial con la muestra durante 8 horas en refrigeración (4°C) y oscuridad para que se produzca la extracción. El tiempo mínimo requerido es de 2 horas y el máximo recomendado es de 24 horas.
3. Centrifugar la muestra durante 20 minutos a 3000 rpm.
4. Mantener en la oscuridad el extracto obtenido y proceder lo antes posible a su medición, según lo indicado en 5.
5. Medir la absorbancia de acetona al 90% para obtener el “cero” del espectrofotómetro previo a efectuar las mediciones de absorbancia del extracto de la muestra.
6. Tomar una alícuota del extracto y transferir a la cubeta o celda para efectuar la medición de absorbancia.

7. Medir las absorbancias a 750 y 664 nm y verificar que la absorbancia a 750 nm sea menor a 0.010, lo cual indicará que no hay interferencias por turbidez (el valor obtenido a 750 nm se resta al valor de 664 nm para descontar las interferencias).
8. Adicionar ácido clorhídrico 0.1 N a la cubeta que contiene la alícuota, en una relación de 0.1 mL (100 microlitros≈2 gotas) de HCl en 3 mL de extracto. La acidificación de la muestra convierte la clorofila *a* presente a feofitina *a*, a fin de realizar la corrección por feofitina.
9. Esperar 90 segundos desde la acidificación y medir las absorbancias a 750 y 665 nm, restar el valor obtenido a 750 nm al valor obtenido a 665 nm. IMPORTANTE: los volúmenes de extracto y ácido, y el tiempo transcurrido después de la acidificación, son críticos para la precisión y consistencia del resultado obtenido.
10. Descartar el extracto según el procedimiento interno del laboratorio para la disposición de residuos.
11. Enjuagar varias veces la cubeta con agua desionizada para eliminar restos de muestra y ácido, a fin de evitar la contaminación de las restantes muestras.
12. Determinar la concentración de clorofila *a* y feopigmentos utilizando las ecuaciones establecidas por el método y presentadas a continuación.

$$\text{Chlorophyll } a, \text{ mg/m}^3 = \frac{26.7 (664_b - 665_a) \times V_1}{V_2 \times L}$$

$$\text{Pheophytin } a, \text{ mg/m}^3 = \frac{26.7 [1.7(665_a) - 664_b] \times V_1}{V_2 \times L}$$

where:

$664_b, 665_a$ = absorbance of 90% acetone extract before and after acidification, respectively,

V_1 = volume of extract, L,

V_2 = volume of sample, m³, and

L = light path length or width of cuvette, cm.

The value 26.7 is the absorbance correction and equals

$$A \times K$$

where:

A = absorbance coefficient for chlorophyll a at 664 nm = 11.0,
and
 K = ratio expressing correction for acidification.

$$= \frac{\left(\frac{664_b}{665_a}\right) \text{ pure chlorophyll } a}{\left(\frac{664_b}{665_a}\right) \text{ pure chlorophyll } a - \left(\frac{664_b}{665_a}\right) \text{ pure pheophytin } a}$$

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

NOTA 2: en caso de proceder a la extracción de clorofila inmediatamente después de finalizada la filtración, y habiéndose registrado todos los datos necesarios para la identificación de la muestra y posterior cálculo, a partir del paso 7 indicado en 3.1.2. se puede continuar según se indica a continuación:

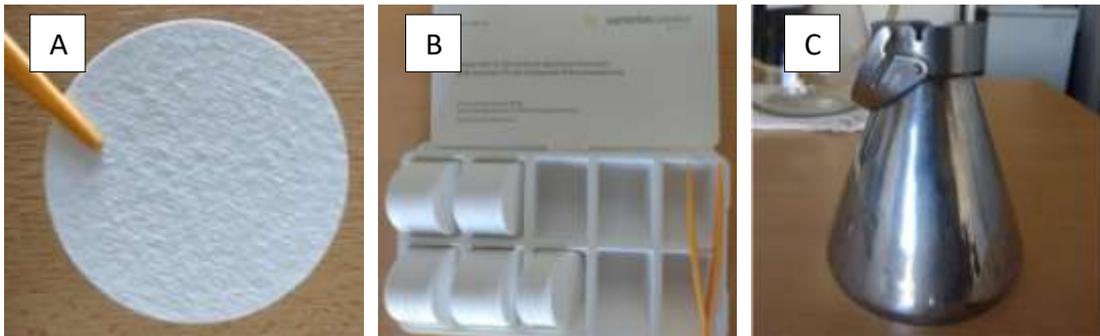
- a. Colocar el filtro dentro del mortero, agregar 2 ó 3 mL de acetona al 90 % y macerar de forma manual y suavemente, hasta desmembrar totalmente el filtro, con el propósito de lograr la mayor lisis posible de las células y facilitar la extracción de los pigmentos que éstas contienen. Este resultado se obtiene en la primera alternativa planteada para la extracción, por el congelamiento que produce el frizado de los filtros.
- b. Transferir cuidadosamente la muestra al vial de centrifuga, enjuagar dos o tres veces el mortero con pocos mililitros de acetona e incorporar el líquido al tubo de centrifuga, asegurando que no queden residuos de extracción en el mortero.
- c. Ajustar con acetona el volumen total a 10 mL en el vial y tapar herméticamente; la idea es unificar el peso de todos los tubos de centrifuga y evitar su rotura.
- d. Seguir el procedimiento según se indica a partir del paso 2 de 3.2.2.

4. BIBLIOGRAFÍA

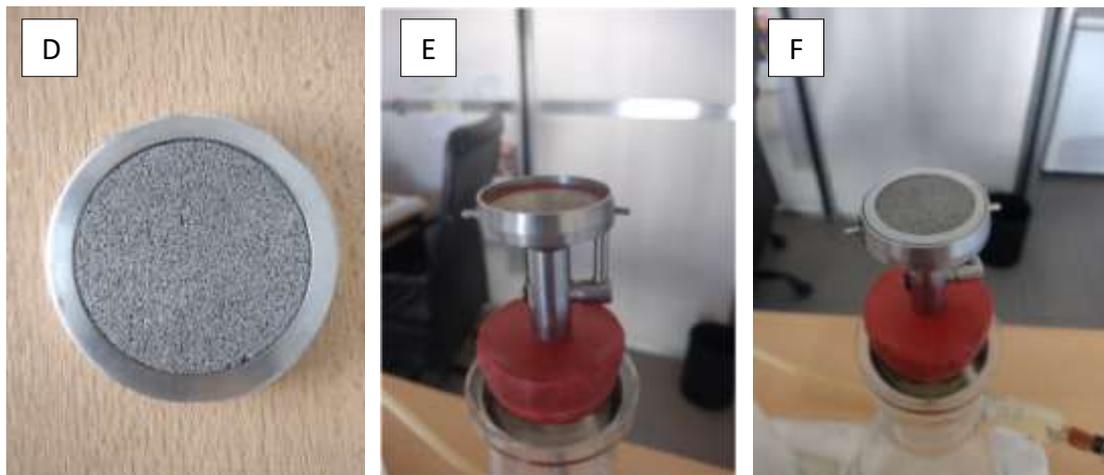
APHA; AWWA, WEF (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23° edition.

5. ANEXO FOTOGRÁFICO

A continuación se detalla el procedimiento de filtración de muestras de agua para la determinación de clorofila a , utilizando para ello fotografías, a fin de proporcionar una idea más acabada, y destacando comentarios en los puntos críticos del procedimiento.



A- filtros de fibra de vidrio apertura nominal de $1\mu\text{m}$ y diámetro de 47 mm, B- marca Sartorius. C- embudo metálico para filtración.



D- placa filtrante portafiltro, E- soporte de placa filtrante montado sobre el tapón de goma del matraz Kitasato, F- placa filtrante montada sobre el soporte.



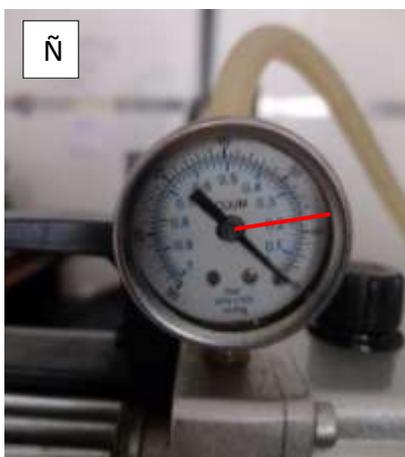
G- colocación del filtro sobre la placa filtrante. H- montaje del embudo sobre el soporte. I- montaje completo del sistema de filtrado, conectado a la bomba de vacío.



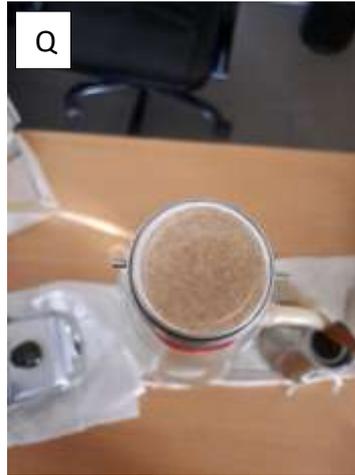
J- homogenización de la muestra antes de iniciar la filtración. K- medición del volumen de muestra a filtrar. L- resguardo de la muestra, tapada y en lugar fresco, durante su filtración.



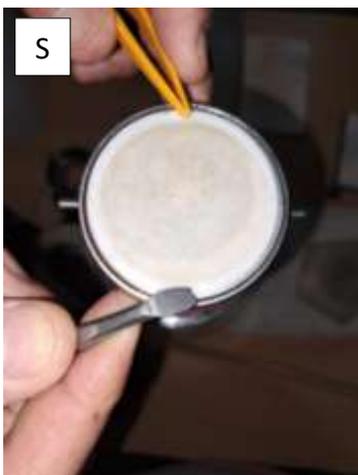
LL- iniciar a verter la alícuota de la muestra contenida en la probeta sobre la pared del embudo. M- continuar el trasvase de la alícuota hasta completar la capacidad del embudo. N- iniciar la filtración por gravedad, es indispensable NO APLICAR VACÍO en tanto la filtración se pueda continuar por gravedad.



Ñ- cuando sea necesario, iniciar a aplicar vacío de baja intensidad para evitar succionar células pequeñas. O- durante la filtración NO superar los 0.2 bar para evitar dañar el filtro y las células.



P- aspecto del filtro al finalizar la filtración de más de 4 L de muestra proveniente de un sitio con baja carga de material en suspensión (orgánico e inorgánico). Q y R- aspecto de filtros luego de filtrar muestras provenientes de sitios con alta carga de material en suspensión (volumen filtrado = 4200 mL y 4300 mL, respectivamente).



S- utilizar pinzas para manipular cuidadosamente el filtro. T- doblar el filtro por la mitad con el material adentro. U- secar el filtro dos veces con papel absorbente.



V- colocar el filtro en el cuadrado de papel de aluminio. W- envolverlo en forma de sobre, plegando los laterales. X- etiquetar el sobre con: nombre del sitio, fecha de muestreo y el volumen filtrado de muestra.



Y- registrar en el anotador la información etiquetada en el papel de aluminio del filtro, y agregar cualquier observación considerada relevante. Z- colocar el sobre de aluminio (filtro) en un recipiente con tapa (ej. vaso colector de orina), y guardarlo inmediatamente en el freezer.