

# Protocolo para la Determinación de la Concentración de la Clorofila *a* en Agua de Mar

Valeria Segura, Carla F. Berghoff, Vivian A. Lutz

*El presente trabajo ha sido aprobado para su publicación el 28-04-2022 por NOTA GDE Nro. NO-2022-41983358-APN-DNI#INIDEP*

Citar como:

Valeria Segura, Carla F. Berghoff, Vivian A. Lutz. 2022. Protocolo para la Determinación de la Concentración de la Clorofila *a* en Agua de Mar.. Inf Procedim Operac INIDEP N° 002/22, 19 pp.





# Protocolo para la Determinación de la Concentración de la Clorofila *a*

Valeria Segura<sup>1</sup>, Carla F. Berghoff<sup>1</sup>, Vivian A. Lutz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP).

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

## Resumen

En el presente informe se describe el procedimiento de la toma de muestras y preservación de las mismas, así como la extracción del pigmento y cuantificación fluorométrica de clorofila *a* en agua de mar. También se detallan los pasos y los cálculos matemáticos necesarios para determinar la concentración de clorofila *a* que se llevan a cabo en el marco de las series de tiempo del Programa “Dinámica del Plancton Marino y Cambio Climático” del INIDEP.

## Palabras Clave

Clorofila *a*, biomasa fitoplanctónica, método fluorométrico.

## Introducción

La mejor representación de la biomasa fitoplanctónica es la estimada por bio-volúmenes celulares, normalmente expresados en unidades de masa de carbono. Sin embargo, una de las medidas más prácticas y ampliamente utilizadas como *proxy* de la biomasa fitoplanctónica es la concentración de clorofila *a* (*Cla*), el principal pigmento fotosintético. Las determinaciones de *Cla* se pueden realizar por tres técnicas principales: espectrofotometría, fluorimetría, y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por su sigla en inglés). De los métodos mencionados, el que provee una mejor separación, identificación y cuantificación de los pigmentos fitoplanctónicos es el de HPLC (Jeffrey et al. 1997). A pesar de ello, esta técnica sofisticada tiene las desventajas de los elevados costos del equipamiento (y su mantenimiento), así como de los estándares y solventes; por lo tanto, el método fluorométrico *in vitro* de Holm-Hansen et al. (1965), continúa siendo el más utilizado en los estudios oceanográficos, y en la validación de las estimaciones de clorofila *a* por medio satelital.

En el Programa “Dinámica del Plancton Marino y Cambio Climático (DiPlaMCC)” del INIDEP, se ha utilizado para la determinación de *Cla* desde un comienzo (año 2000) el método fluorométrico de Holm-Hansen et al (1965), y desde 2005 una modificación del mismo (ver detalles en el reporte de Lutz et al. 2006 y en Lutz et al. 2010). Como se menciona en el reporte de Lutz et al. (2006) la determinación fluorométrica *in vitro* de *Cla* depende de las calibraciones individuales de cada fluorómetro en particular (ver Berghoff et al. 2016). En el presente informe se describen las consideraciones teóricas, y los aspectos prácticos para la determinación de *Cla* en las muestras naturales de agua de mar. Para facilitar la comprensión del procedimiento el mismo se detalla en secciones sucesivas en las cuales se describen los fundamentos, y los pasos principales a seguir de: 1) la recolecta de la muestra, 2) la preservación de la misma hasta su análisis, 3) la extracción del pigmento clorofila *a* y 4) la cuantificación fluorométrica de la concentración de clorofila *a*.



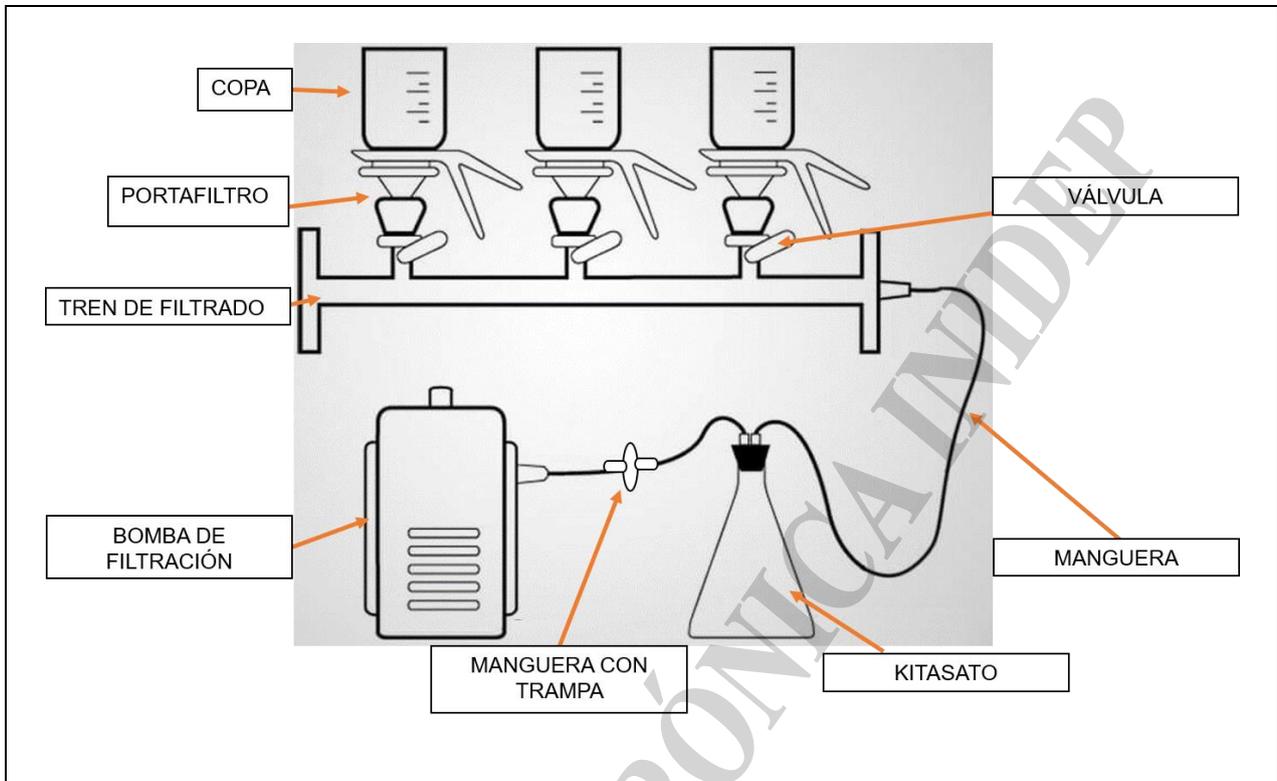
## Colección, procesamiento y preservación de las muestras de agua de mar

- Materiales:

- Balde con cabo (muestras de superficie)
- Jarra plástica o embudo (para coleccionar el agua desde el balde)
- Botellas Niskin para colecta de las muestras en profundidades seleccionadas de la columna de agua.
- Mangueras de silicona cortas (para coleccionar el agua desde la espita de la Niskin).
- Botellas plásticas de volumen conocido (medido al tope por pesada y anotado en el rótulo).  
Nota: en caso de no poseer botellas oscuras, pueden utilizarse botellas claras cubiertas en su totalidad con vinilo oscuro. Se debe tener tantas botellas como profundidades de colecta se requieran. El volumen de las mismas varía dependiendo de la fracción de *Cl* que será posteriormente determinada, por ejemplo, en la EPEA normalmente se utilizan 4 botellas de capacidad de ~ 250 ml para la determinación de la *Cl* Total y 4 botellas de volumen ~500 ml para la determinación de la *Cl* correspondiente a la fracción < 5 µm. Estas botellas se usan para tomar la muestra directamente de las Niskin en cada profundidad. Verificar previamente que las botellas se encuentren en buen estado, limpias y tengan sus correspondientes tapas.
- Canasta contenedora de botellas de muestreo.
- 1 Bomba de vacío (idealmente una de repuesto) (Fig.1)
- Trampa de vacío (Fig.1).
- 1 Tren de filtración con capacidad, en lo posible, no menor a la cantidad de profundidades a muestrear (Fig.1)
- 4 Sistemas completos de filtración (porta-filtros, embudos de filtración, pinzas, tapones) en lo posible de material polisulfona (Fig. 1). En las series de tiempo EPEA y COSTAL del DiPlaMCC se utilizan los sistemas de 25 mm diámetro, pero pueden usarse otros sistemas de filtración de mayor diámetro (para filtros de 47 mm).
- 1 Kitasato grande (de al menos 4 litros) de material fuerte (vidrio o plástico de alta densidad) para utilizar de reservorio del agua filtrada.
- 2 Mangueras de silicona largas: una para conectar el tren de filtración al kitasato, y otra para conectar el kitasato a la bomba de vacío.
- 1 Tapón de goma o silicona de tamaño adecuado para el Kitasato, con una perforación por la que se pasa un cañito rígido que permita conectar la manguera al tren de filtrado.
- 1 Kitasato de 1 litro de material fuerte (vidrio o plástico de alta densidad) para la muestra de *Cl* < 5 µm.
- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F o similar (~ 0.7 µm de poro) de 25 mm diámetro (o de 47 mm de diámetro dependiendo de los sistemas de filtración usado).
- Filtros de membrana nucleopore de 5 µm de poro.
- Probetas plásticas de 500 ml y de 200 ml (por si es requerido ajustar el volumen a filtrar – explicación más adelante).
- Pinzas para manipular los filtros.
- Papeles de aluminio cortados en cuadraditos (de ~ 8 cm de lado) para envolver las muestras y otros cuadrados para tapar todos los embudos de filtración.
- Un rollo de papel de aluminio extra.
- Marcadores indelebles, etiquetas, lápices, tijera y otros elementos de librería.



- Piseta con agua destilada o en su defecto agua de mar filtrada para enjuague del sistema de filtración una vez finalizado el filtrado y retirado el filtro.
- Termo de nitrógeno líquido o ultra freezer a bordo.
- Planillas de registro del muestreo (ver anexo 1).



**Figura 1.** Esquema del sistema de filtración armado.

**Consideraciones:** Todo el material que se utilizará para la toma de muestras de clorofila debe estar limpio, seco y sin residuos de ácido. Los residuos de ácido pueden conducir a la conversión de *Cla* en feopigmentos, dando como resultado una subestimación de la concentración de *Cla*.

#### Procedimiento:

1. Montaje del sistema de filtración: Previo al inicio del filtrado se debe tener alistado el sistema de filtración, incluyendo una trampa de vacío, para evitar dañar la bomba por ingreso de agua salada (Fig. 1).
2. Recolecta de la muestra: enjuagar la botella tres veces con un pequeño volumen de la muestra de agua de mar de la profundidad a muestrear (Fig. 2).
3. Llenar las botellas al tope (que rebalse y luego se tapan), ya sea directamente de las Niskin (profundidades seleccionadas) o usando la manguerita corta anexada a la espita de la Niskin para mayor facilidad. Es importante registrar que botella corresponde a que profundidad recolectada (Fig. 2). En el caso de la recolecta de la muestra sea de agua de superficie, desde el balde (enjuagar el balde al menos una vez), puede utilizarse una jarra plástica para facilitar el trasvase.



4. Colocar en la copa de filtración un filtro con ayuda de una pinza. Luego verificar que la copa se encuentre bien colocada y que todo el sistema de filtración esté conectado correctamente.
5. Filtrar las muestras inmediatamente después de ser colectadas en el sistema de filtración previamente montado (paso 1), a baja luminosidad y utilizando baja presión ( $< 35$  kPa, i.e.,  $< 5$  PSI para evitar succionar células pequeñas). En el caso de las muestras de *Cla* de toda la comunidad fitoplanctónica (*ClaT*), verter la muestra en la copa de filtración y prender la bomba de filtrado. No prolongar el tiempo de filtrado por más de  $\sim 45$  minutos (para evitar deterioro de la muestra).  
En el caso de las muestras para *Cla* correspondiente a la fracción de tamaño celular  $< 5 \mu\text{m}$  (*Cla* $_{<5 \mu\text{m}}$ ) filtrar individualmente, utilizando el kitasato de 1 litro, primero a través de un filtro de membrana nuclepore de  $5 \mu\text{m}$  de poro; el agua recogida en el kitasato se filtra nuevamente a través de un filtro de fibra de vidrio GF/F con tamaño de poro  $\sim 0,7 \mu\text{m}$ .
6. Mientras las muestras se están filtrando preparar dos etiquetas idénticas para cada muestra (con el rótulo acordado; e.g., código de campaña, n° estación, profundidad, la variable (*ClaT* o *Cla* $_{<5 \mu\text{m}}$ )).
7. Cerrar la válvula de filtración inmediatamente cuando se acaba el agua en el embudo (no dejarlo succionando en seco para evitar dañar el filtro y las células).
8. Doblar los filtros por la mitad (con el material adentro), y secarlos 2 veces con papel absorbente (Fig. 3).
9. Envolver los filtros en los cuadraditos de papel de aluminio, colocar 2 etiquetas (una que quede adentro del doblado y otra del lado externo) (Fig. 3).
10. Anotar en las planillas de registro la siguiente información: Estación general (EG), Fecha, hora (Local y GMT), número de estación del proyecto (si tuviera una nomenclatura particular; ej. EPEA), profundidad de la muestra, volumen filtrado, tipo de muestra (*ClaT* o *Cla* $_{<5 \mu\text{m}}$ ) y, cualquier observación que consideremos relevante.
11. Guardar las muestras en el termo de nitrógeno líquido (o ultra-freezer) a bordo inmediatamente (no dejar las muestras esperando en la mesada; el momento más crucial de degradación es durante e inmediatamente después de la filtración) (Fig. 3).
12. Antes de filtrar una nueva muestra, vaciar el kitasato y enjuagar el set de filtración con agua destilada o agua de mar filtrada.
13. Al final de la campaña enjuagar bien todo el material utilizado con agua de canilla (para arrastrar cualquier residuo adherido en las paredes) y luego con abundante agua destilada.



Figura 2. Colección de las muestras de agua de mar.

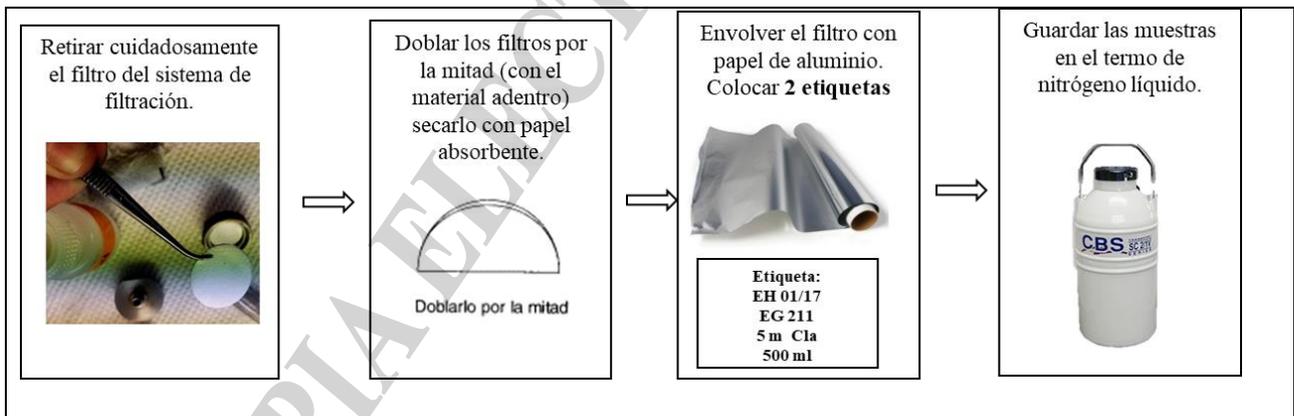


Figura 3. Manipulación de los filtros luego del filtrado y conservación hasta su procesamiento en tierra.

**Consideraciones:** a) verificar antes de cada campaña el correcto funcionamiento de la bomba de vacío y de los diferentes componentes del sistema de filtración, b) manipular las muestras desde su toma, filtración, hasta ser guardadas bajo luz tenue (evitar exponerlas al sol o luz fuerte). c) el volumen de agua a filtrar depende de la cantidad de fitoplancton presente en el agua, debe ser suficiente para permitir lecturas dentro del rango de la calibración del fluorómetro, pero no demasiado alto como para requerir dilución. Esto último tiene como desventaja que aumenta la



incertidumbre del método. Por tanto, es recomendable filtrar no más de 500 ml en aguas oligotróficas, y en aguas eutróficas no más de 100 ml de agua. En caso que el filtro comience a taparse rápidamente (porque hay mucho material en la muestra) no agregar más volumen a la copa de filtrado, con una probeta medir el volumen remanente en la botella oscura con la muestra; este volumen se resta al que corresponde al rótulo de esa botella.

## **Almacenamiento de las muestras en tierra**

Las muestras pueden preservarse en nitrógeno líquido (controlando que no se acabe) y/o en ultra- freezer (-84°C). Las muestras deben analizarse dentro de un período no mayor a 12 meses.

## **Extracción del pigmento fotosintético de las células**

El procedimiento que se describe a continuación sigue los lineamientos propuestos por Holm-Hansen (1965) y Welschmeyer (1994) con algunas modificaciones (ver detalles en el reporte de Lutz et al. (2006) y Lutz et al. (2010)). Entre las modificaciones se encuentran el uso de metanol como solvente de extracción debido a su mayor eficiencia especialmente en el caso de células pequeñas con paredes celulares gruesas (Holm-Hansen y Riemann, 1978) y se emplea ultrasonido para ayudar a la ruptura de las células, y facilitar la extracción de sus pigmentos (Wright et al. 1997).

- Materiales y equipamiento

- Tubos de vidrio con tapa a rosca con capacidad de volumen de 10 ml.
- Etiquetas para rotular los tubos.
- Lápiz para rotular las etiquetas.
- Cinta adhesiva del tipo “mágica” para proteger los rótulos de los tubos.
- Gradilla para colocar los tubos.
- Pinzas y varilla de vidrio o espátula para manipular los filtros.
- Metanol 100% Pro-análisis (PA).
- Dispensador de volumen variable con recipiente contenedor tipo “Repipette” que permita dispensar un volumen de 8 ml. En su defecto se puede utilizar: a) pipetas de vidrio aforadas de diferentes volúmenes o b) pipetas automáticas de diferentes volúmenes.
- Recipiente con agua y hielo.
- Ultra-sonicador de punta.
- Agitador orbital tipo “vortex”.
- Centrífuga



- Freezer común para conservar las muestras durante la extracción del pigmento.
- Fluorómetro o Espectrofluorómetro.
- . Planillas de análisis de muestras.

**Consideraciones:** a) en todos los pasos, recuerde evitar la exposición de los pigmentos a la luz y el calor. El procedimiento debe realizarse en un ambiente con luz tenue y temperatura ambiente que no supere los 25°C. b) todo el material debe estar limpio, seco y sin residuos de ácido. c) todo el material volumétrico debe estar previamente calibrado. d) los solventes deben ser de la mejor calidad posible (grado espectroscópico). La mínima calidad aceptable para el metanol 100% es grado PA.

### Procedimiento

1. Rotular los tubos de vidrio de 10 ml del número 1 al  $n$  de acuerdo a la cantidad de muestras que se desea procesar. Sobre el rótulo escrito con lápiz (la fibra se puede borrar con el solvente), colocar por encima cinta adhesiva (teniendo precaución de dar una vuelta y media; i.e. pegar cinta sobre cinta).
2. Conectar a la toma eléctrica el ultra-sonicador, el vortex y tener alistado la repipette en la botella de metanol.
3. Encender el ultra-sonicador y configurarlo en: Amplitud: 30, Pulsos: 2.5 y Tiempo: 30 segundos.
4. Extraer del ultra-freezer un “set” no superior a 20 muestras de *Cl*a a procesar.
5. Colocar el set de muestras en una pequeña bandeja con algunos “gel pack” o refrigerantes hasta terminar de colocarlas en los tubos.
6. Registrar en la planilla de análisis los datos de procedencia de las muestras (e.g. código. de campaña, fecha de análisis, etc (ver modelo de planilla anexo). Para ello, despegar las etiquetas del papel de aluminio y pegarlas en la planilla de análisis junto al número de tubo que corresponde a dicha muestra.
7. Retirar el filtro del envoltorio de papel de aluminio con una pinza y colocarlo en el interior del tubo de vidrio rotulado.
8. Agregar al tubo 8 ml de metanol 100% con un dispensador tipo “repipette”. Asegurarse que el filtro quede completamente sumergido en el metanol. Los filtros se encuentran plegados por lo tanto puede ocurrir que al colocarlos en el tubo no se abran completamente, especialmente los filtros de tamaño 47 mm, en ese caso, se puede utilizar la varilla de vidrio para expandirlos y que quede toda la superficie donde está la muestra expuesta para ayudar a la extracción de los pigmentos por el metanol 100%.
9. Colocar el tubo en un baño de hielo y colocarlo en el ultra-sonicador de modo que la sonda de ultrasonido quede sumergida en el tubo. Nota: es importante que la sonda este lo más perpendicular posible y que no toque las paredes del tubo. Una vez finalizado el tiempo de sonicado, retirar con cuidado el tubo, colocarlo en una gradilla y mantener la misma en un sitio a baja exposición de luz (luz tenue). Recordar, entre una muestra y la siguiente, enjuagar la varilla de vidrio con metanol 100% y limpiar la punta del sonicador (con un paño tipo Kimwipe).
10. Vortear el tubo durante 10 segundos para homogeneizar el contenido.



11. Colocar los tubos con las muestras en un freezer común (-20 °C) y dejarlos durante un período de 12 a 14 hs. [En el INIDEP se procesan las muestras un día y al siguiente día se realizan las lecturas de fluorescencia, dejando así, que la extracción de los pigmentos se realice durante toda la noche].
12. Repetir los pasos 4 al 11 con todas las muestras.
13. Encender el equipo que se va a utilizar para realizar las lecturas de fluorescencia (fluorómetro Turner Designs 10AU005CE o espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-3) y establecer la configuración necesaria para las lecturas de la fluorescencia de *Cl<sub>a</sub>*.
14. Retirar los tubos del freezer y repetir el procedimiento de sonicación explicado en el ítem 9.
15. Posteriormente agitar en el vorteador los tubos durante 10 segundos para homogeneizar el contenido.
16. Encender la centrífuga 10 minutos antes de usarla y establecer la temperatura en 20°C. Colocar los tubos con las muestras en la centrífuga. Asegurarse de que los tubos estén bien cerrados y que sean del tipo correcto para el cabezal del rotor que está utilizando. Verificar que la centrífuga esté balanceada. Centrifugar las muestras durante un tiempo de 20 minutos a una velocidad de 6000 rpm.
17. Retirar los tubos cuidadosamente de la centrífuga evitando que se agite su contenido.

## Lecturas de los valores de fluorescencia

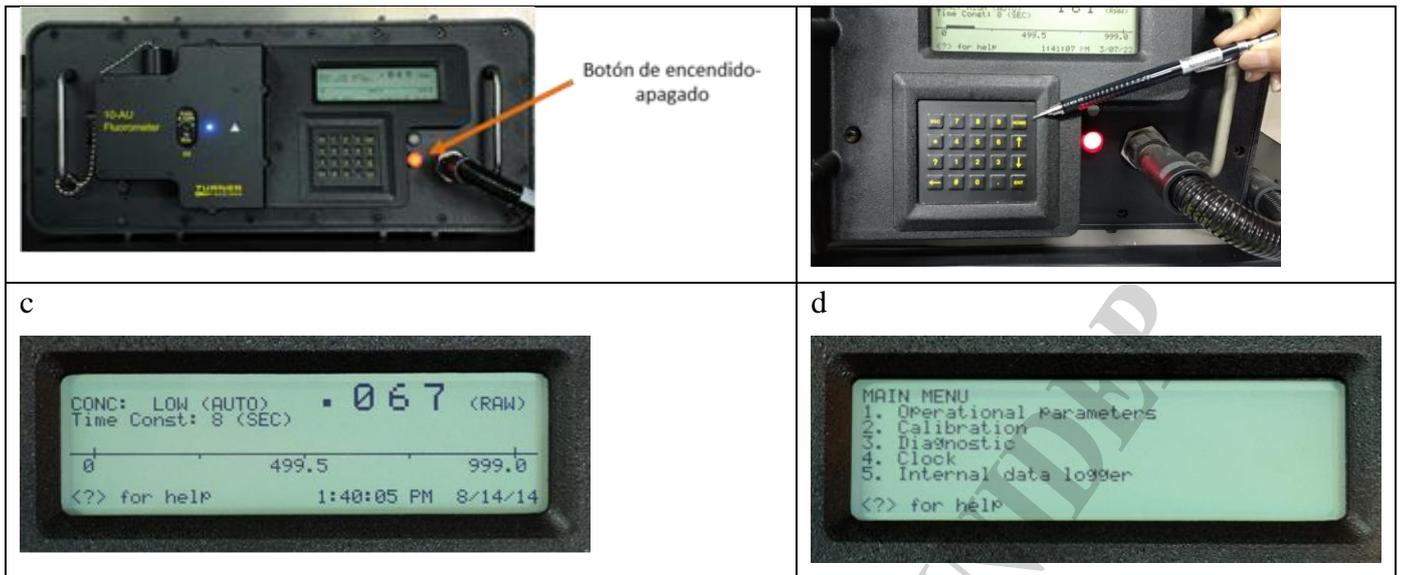
- Materiales y equipamiento:

- Fluorómetro 10-AU Turner Designs / espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-3.
- Celdas de 13 mm específicas para el fluorómetro *Turner 10-AU* / Celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico para el espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-3.
- Referencia sólida secundaria “L & H” Turner Desings (fluorómetro *Turner 10-AU*) / Referencia solida de pigmento para el espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-3.
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) 100% grado espectroscópico o PA.
- Paños para tareas delicadas tipo “Kimwipes”
- Tubos de 10 ml con tapa para realizar diluciones.
- Pipeta automática monocanal de volumen variable de 100-1000 µl.
- Recipiente (~ 2 litros) para descartar las muestras una vez leídas.

### a) Mediciones con el fluorómetro *Turner 10-AU* del INIDEP

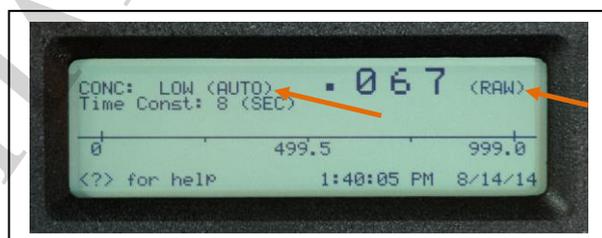
1. Establecer en el equipo los parámetros de funcionamiento del fluorómetro *Turner 10-AU*.
  - a. Enchufar el fluorómetro 10-AU y encender el instrumento al menos 30 minutos antes de su uso. El botón de encendido-apagado es rojo y se encuentra en el lado inferior derecho, cercano a la toma de conexión eléctrica (Fig. 4).

a	b
---	---



**Figura 4.** Vista general del fluorómetro Turner Designs 10-AU: a) botón de encendido, b) botón Home, c) pantalla de lectura “HOME” y d) pantalla del menú principal “MAIN MENU”.

- b. Una vez encendido el equipo, se observa la pantalla de lectura “HOME” (Fig. 4 c y d). Desde la pantalla "HOME" presione <ENT> usando el teclado. Esto conduce a la pantalla del menú principal "MAIN MENU", que posee diferentes opciones de configuración del instrumental, indicados con números (Fig. 4 d). El acceso a la pantalla de interés se da oprimiendo los números correspondientes en el teclado. El número de la pantalla aparece en la esquina derecha de la pantalla con el símbolo “#” antepuesto.
- c. Verificar que el modo de lectura se encuentre en fluorescencia relativa. Para ello se debe leer en la pantalla “HOME” de lectura lo siguiente: (RAW) (Fig. 5). En caso contrario, desde el menú principal “MAIN MENU” oprima el número <1> para acceder a la pantalla 1.0.: “Operational Parameters” que corresponde a la pantalla de configuración de los parámetros operacionales (Fig 5.a). Desde la pantalla 1.0. pulsar el <2> para acceder a la pantalla: 1.2. “Home display options” (Opciones de Visualización de Inicio) y a continuación pulsar el <1> para acceder a la pantalla 1.2.1: “Readout” y seleccionar “RAW FLUORESCENCE DATA” (Fig. 5.b). En este modo de funcionamiento las lecturas corresponden a una fluorescencia relativa (proporcional a la concentración de la muestra) y no se mostrarán unidades de medida. Presione el botón <ESC> dos veces para retornar al menú principal “MAIN MENU”.



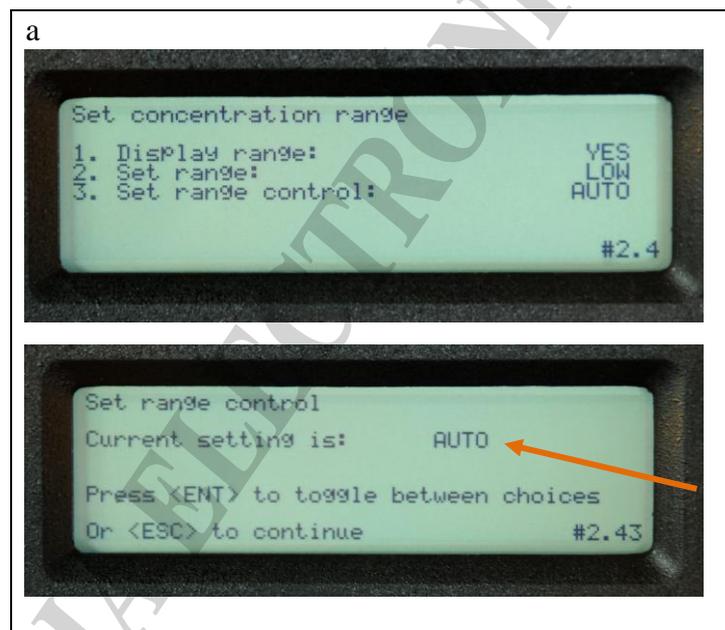
**Figura 5.** Vista de la pantalla de lectura (“HOME”) en la que se muestra indicado el modo de lectura de fluorescencia relativo (“RAW”) y el modo de automático (“AUTO”) de ajuste del rango de concentración.

a	b
---	---



**Figura 6.** Vista de las pantallas: a) 1.0.: menú principal con con los parámetros de operacionales y b) 1.2: menú de opciones de visualización de Inicio del fluorómetro Turner Designs 10-AU, con el “Readout” del modo de fluorescencia relativa.

- d. Verificar que el control del rango de concentración se encuentre en selección automática (“AUTO”), para ello se debe leer en la pantalla “HOME” de lectura lo siguiente: CONC: LOW (AUTO) (Fig. 7). En caso contrario, desde el menú principal “MAIN MENU” oprima <2> para acceder a la pantalla de calibración 2.0: “Calibration”. A continuación, oprima <4> para acceder a la pantalla de 2.4. de establecimiento del intervalo de concentración “Set Concentration Range”. Presione <3> para acceder a la pantalla 2.4.3: “Set range control” y presione <ENT> para llevar a “AUTO”<sup>1</sup> y ajustar el control de rango de concentración en selección automática (Fig. 7). Presione el botón <ESC> dos veces para retornar al menú principal “MAIN MENU”.

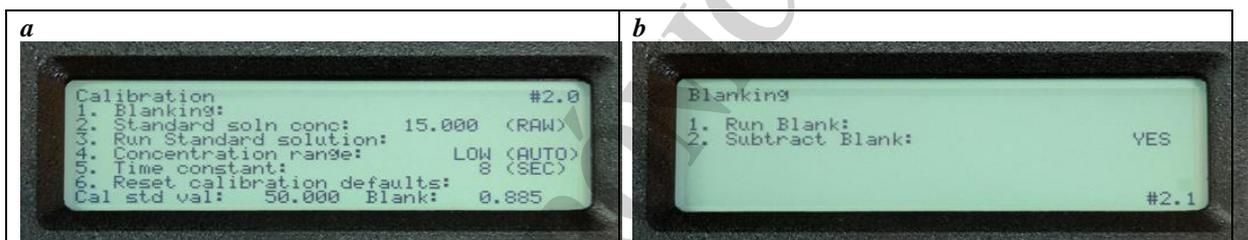


**Figura 7.** Vista de las pantalla 2.4 del fluorómetro Turner Designs 10-AU: menú principal de ajuste del rango de concentración (panel superior) y 2.4.3.: menú de ajuste del control del rango de concentración indicado el modo de ajuste automático (“AUTO”) del rango de concentración panel inferior).

<sup>1</sup> Cuando se establece el modo de rango automático “AUTO”, el instrumento selecciona automáticamente los rangos en respuesta a las diferentes concentraciones de la muestra para así proporcionar la mejor resolución a cada muestra que se está leyendo.



2. Blanqueo del fluorómetro Turner 10-AU. Antes de la medición de una muestra, debe utilizarse un blanco para configurar el cero del instrumento. Un blanco es el mismo solvente en el cual se extrajo la clorofila-a. El blanco se corre en la pantalla 2.1.1.
  - a. Desde el menú principal "MAIN MENU" oprima el número <2> para acceder a la pantalla de calibración 2.0.: "Calibration". A continuación, oprima <1> y acceda a la pantalla 2.1.1 "Blanking"; y a continuación oprima <2> y acceda a la pantalla 2.1.2: "Subtract Blank". y seleccione "YES" para ajustar el instrumental de modo que substraiga el blanco (Fig. 8 a).
  - b. Llenar una cubeta de 13 mm con metanol 100%. Secar el exterior de la cubeta con un papel para tareas delicadas e insertar la cubeta en la abertura del compartimiento de muestra. Luego colocar el cobertor de luz.
  - c. . Pulse el botón <ESC> una vez para volver a la pantalla de calibración de 2.0. Desde la pantalla 2.0 oprima <1> para acceder a la pantalla 2.1 del menú de blanqueo "Blanking" y luego oprima <1> para acceder a la pantalla 2.1.1. "Run Blank" (Fig. 8 b).



**Figura 8.** Vista de las pantallas 2.0.: menú de calibración (a) y 2.1.: menú de blanqueo (b) del fluorómetro Turner Designs 10-AU.

- d. Permitir que el porcentaje de lectura del blanco se establezca; ello se comprueba cuando el "TC" en la pantalla 2.1.1. cambia de 1 a 8 segundos. Asimismo, comprobar que el porcentaje de lectura del blanco sea inferior a 200% de FS. Es preferible sea un número de porcentaje bajo (Fig. 9).
- e. Presionar <0> y esperar 15 segundos. Cuando aparece la palabra "FINISHED" en la pantalla (Fig. 9) significa que se completó el proceso y que se ha registrado valor del blanco<sup>2</sup>.

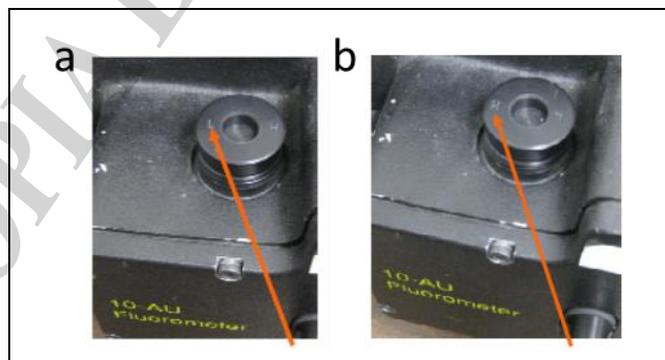


<sup>2</sup> Si uno quisiera conocer el valor del blanco puede acceder a la misma en la pantalla 2.1.1.

se almacena como "blank" y se

**Figura 9.** Vistas de la pantalla 2.11. de blanqueo del fluorómetro para clorofila-a: previo al blanqueo (imagen superior) y una vez finalizado el blanqueo (imagen inferior).

- f. Una vez que el blanqueo se ha completado, presionar <ESC> cuatro veces para salir del menú y volver a la pantalla “HOME” de lectura.
  - g. Con el blanco todavía en el fluorómetro, observar en la pantalla “HOME” la lectura del blanco, la cual debe ser cercana a 0,000. Registrar este valor y retirar el blanco.
3. Lectura de la referencia sólida secundaria. Es conveniente verificar la estabilidad del equipo antes del análisis utilizando la referencia sólida secundaria “L & H” suministrada por Turner Designs. La referencia de Turner Designs viene sellada y se encuentra en un soporte sólido que se ajusta directamente en el adaptador de la cubeta de 13 mm. No requiere ninguna manipulación o condiciones especiales de almacenamiento. El soporte contiene dos concentraciones diferentes que deben leerse en los intervalos de concentración bajo (“LOW”) y alto (“HIGH”) respectivamente.
- a. Enfrentando el instrumento, colocar la referencia sólida secundaria en el compartimento de medición de modo que la letra "L" (grabada en la parte superior del soporte) se encuentre hacia el lado izquierdo (Fig. 10 a). Asegurarse de que el perno de metal esté completamente asentado en la muesca del adaptador de cubeta de 13 mm. Esperar durante 5 a 10 segundos, mientras que el instrumento encuentra el rango de concentración adecuado, que en este caso debe ser “LOW”. Desde la pantalla de lectura “HOME” oprima la tecla <\*> para leer el valor. Cuando la palabra "DONE" aparece en la esquina superior derecha de la pantalla significa que la lectura se ha completado y se puede tomar nota del valor en “LOW” ("L").
  - b. Abrir la tapa de la cubeta, levantar ligeramente la referencia y rotar la referencia 180 grados de modo tal que la letra "H" (grabada en la parte superior del soporte) se encuentre hacia el lado izquierdo (Fig 10 b). Realizar la misma operatoria que en el inciso anterior y tomar nota del valor en “HIGH” ("H").



**Figura 10.** Vistas del compartimiento de medición en el que muestra la posición correcta de la referencia sólida secundaria del fluorómetro Turner Designs 10-AU: a) posición para lectura en “LOW” y b) posición para lectura en “HIGH”.



4. Lectura de las muestras naturales<sup>3</sup>.
  - a. Verter la muestra en la cubeta, teniendo cuidado de no perturbar el filtro en la parte inferior del tubo; llenar la cubeta con la muestra entre dos tercios y tres cuartos de su capacidad<sup>4</sup>. Limpiar las paredes de los tubos con un paño para tareas delicadas. Verificar que no se encuentren partículas dentro de la cubeta<sup>5</sup>.
  - b. Las muestras se leen desde la pantalla "HOME". Colocar la cubeta en el fluorómetro, colocar la tapa de luz y esperar entre 5 a 10 segundos, mientras que el instrumento encuentra el rango correcto. Si en la pantalla de lectura "HOME" se lee un valor menor a 999, oprima la tecla <\*> para iniciar la secuencia discreta de promedio del valor de lectura de fluorescencia<sup>6</sup>. Cuando la palabra "DONE" aparece en la esquina superior derecha de la pantalla, se ha completado la lectura. El valor en pantalla se mostrará durante 10 segundos. Tomar nota del valor de lectura de fluorescencia como F0 y el rango de concentración (Anexos). Si el fluorómetro lee "OVER" en el rango "HIGH" significa que la muestra es demasiado concentrada para ser leída en la calibración actual y probablemente en el rango lineal. En este caso, la muestra debe ser diluida y re-analizada.

NOTA: La forma correcta de proceder para realizar las diluciones es tomar con una pipeta automática un volumen directamente de la cubeta y trasvasarlo a otra cubeta. Luego con otra pipeta agregar un volumen dado de metanol. Por último, agitar la cubeta para mezclar el contenido. Asegurarse de registrar el volumen de la muestra y el volumen de metanol utilizados para la dilución. Anotar el factor de dilución que se utilizó para esa muestra en la planilla de lectura

- c. Retirar la cubeta. Remover la muestra y enjuagar la cubeta con metanol 100% al menos 2 veces. Voltar la cubeta sobre un papel absorbente para retirar el excedente de metanol.
- d. Repetir las instrucciones indicadas en los pasos a-c hasta que todas las muestras hayan sido leídas.
- e. Una vez finalizada la lectura de las muestras, medir la referencia secundaria tal como se indicó previamente, y utilizar esta lectura para verificar la estabilidad del equipo. Si se tiene una gran cantidad de muestras se recomienda leer la referencia sólida secundaria cada 20-30 muestras. Comparar la/s lectura/s con aquella realizada al principio para asegurarse que el instrumento no ha derivado<sup>7</sup>.
- f. Oprimir el botón rojo para apagar el fluorómetro.

- b) Fluorescencia medida usando el espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-3 del INIDEP

<sup>3</sup> Para mayor detalle véase la Section 3C: "Routine operation" del manual de usuario de Turner Desings.

<sup>4</sup> El volumen de medición mínimo que se requiere utilizar con las cubetas de 13 mm para medir con precisión es de 4,5 ml.

<sup>5</sup> Si se observan partículas en la cubeta debe volver a centrifugar la muestra.

<sup>6</sup> Cuando se presiona la tecla asterisco se inicia una secuencia discreta de promedio de la muestra, donde el instrumento realiza un período de retardo ("delay") de 15 segundos permitiendo que la lectura se estabilice, y luego promedia las lecturas ("average") durante un período de 10 segundos, permitiendo que cada muestra sea leída en un mismo período de tiempo.

<sup>7</sup> Turner Designs comenta en su newsletter (Vol. 20, 2010) que una deriva mayor de un 5% indica la necesidad de una nueva calibración.



1. Ajustar la configuración del equipo previo a las lecturas:
  - tiempo respuesta: 2
  - $\lambda$  excitación: 430 nm
  - $\lambda$  emisión: 666 nm
2. Cargar la celda de cuarzo con 3 ml de metanol 100% y proceder hacer la lectura como un blanco y llevar a cero el equipo apretando el botón autozero.
3. Desechar el metanol de la celda y colocar boca abajo sobre un papel absorbente la misma para que se seque.
4. Leer la referencia sólida que llamaremos “inicial” y anotar en la planilla de lecturas el valor de la referencia. Nota: mantener la misma posición de la referencia sólida cada vez que se mide dentro del equipo. Su posición está indicada con un símbolo flecha “(  $\uparrow$  )”
5. Enjuagar la cubeta cuidadosamente, para evitar re-suspensión de material, un pequeño volumen de la muestra del tubo.
6. Cargar la cubeta cuidadosamente, para evitar re-suspensión de material, con la muestra del tubo.
7. Esperar a que el valor de fluorescencia se estabilice, presionar “integ” (el equipo promediará un cierto número de lecturas) y anotar el valor que muestra en el visor.
8. Enjuagar la cubeta (2 o 3 veces) con pequeños volúmenes de metanol al 100%.
9. Dejar secar y limpiar las caras de la misma externamente con paños para tareas delicadas tipo “kimwipes”. Evitar en todo momento tocar las caras de la misma con los dedos, tomar cuidadosamente por las aristas superiores y el fondo de la misma.
10. Repetir los pasos del 5 al 9 con cada muestra, pero cada 10 lecturas se recomienda realizar una medición de la referencia sólida manteniendo su posición de lectura y anotar en la planilla.
11. Finalmente, leer la referencia sólida llamada referencia “final” manteniendo siempre la misma posición y registrar en la planilla.
12. Apagar el equipo.

**Consideraciones:** Las lecturas de los valores de fluorescencia tienen que estar dentro del rango de la curva de calibración, para garantizar que la relación fluorescencia respecto a la concentración de clorofila sea lineal. En caso que los valores de lectura de las muestras estén por encima de ese rango se deben hacer diluciones utilizando las pipetas automáticas y anotar el factor de dilución que se utilizó para esa muestra en la planilla de lectura.

## Cálculo de la concentración de clorofila *a*

La concentración de *Cl<sub>a</sub>* se calcula de acuerdo a la ecuación:

$$Cl_a [mg\ m^{-3}] = k * V_e * F_o * d / V_f \quad Ec. 1$$



$$d = (V_m + V_s) / V_m \quad \text{Ec. 2}$$

Siendo:

$F_o$  la lectura del valor de fluorescencia de la muestra,  $k$  el factor de calibración del fluorómetro (ver sección calibración) que relaciona la concentración de  $Cl_a$  con la intensidad de fluorescencia  $V_e$  el volumen de solvente metanol utilizado para la extracción (ml),  $V_f$  el volumen de agua de mar filtrada a bordo (litros) y  $d$  el factor de dilución ( Ec. 2).  $V_m$  y  $V_s$  representan los volúmenes de la muestra y del metanol utilizados en la dilución (ml)

Recordar que el factor de calibración  $k$  es específico para cada fluorómetro, y cambia con el tiempo. Este factor debe ser determinado a intervalos regulares (mínimo una vez por año) por calibración con clorofila  $a$ .

## Calibración del fluorómetro

El método de calibración de un fluorómetro para la determinación de  $Cl_a$  ha sido descrito en detalle en numerosas publicaciones (e.g. Trees et al. 2003). Detalles del método de calibración que se sigue en el INIDEP pueden leerse en Berghoff et al. (2016). Las mediciones fluorométricas deben ser calibradas con un estándar de clorofila  $a$  “pura” de cianobacterias (evitar el de espinaca que puede contener trazas de clorofila  $b$ ) basado en la medición de concentración espectrofotométrica. Esto es debido a que la emisión de fluorescencia,  $Fl$ , medida en un fluorómetro puede variar de acuerdo a la eficiencia de la lámpara usada, el tipo de excitación y de emisión de los filtros usados, y la configuración geométrica el instrumento particular. Por lo tanto, no hay un factor de eficiencia de fluorescencia exacto (fluorescencia emitida por unidad de concentración de clorofila). El factor se determina mediante mediciones de la concentración de la clorofila  $a$  estándar “pura” disuelta en un solvente particular, en un espectrofotómetro y luego se mide la fluorescencia emitida por la misma solución. Así se obtiene el factor:

$$\text{Factor } k = Cl_a / Fl$$

Debe confirmarse la respuesta lineal entre la concentración de  $Cl_a$  y la fluorescencia,  $Fl$ , a través de una curva de calibración; realizando diluciones de una concentración conocida, a partir del estándar de clorofila  $a$  “pura” y se mide la emisión de fluorescencia de las mismas en un fluorómetro o espectrofluorómetro. Se obtiene así el factor propio de un fluorómetro (o espectrofluorómetro). Por lo tanto, el factor “ $k$ ” de calibración será apropiado dentro del rango de concentraciones (y sus correspondientes valores de fluorescencia) utilizado en la curva de calibración; este rango debe respetarse cuando se leen las muestras, aquellas cuya fluorescencia sobrepase el mismo deben diluirse.

## Bibliografía

Berghoff, CF, Lobo, Y, Reta, R, Lutz, VA. 2016. Procedimiento de calibración del fluorómetro Turner Designs 10-AU para cuantificación de la concentración de clorofila- $a$ . Inf Ase Trans. INIDEP N° 006/2016, 15 pp.

Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holms, R.W., Strickland, J.D.H. (1965). Fluorometric Determination of Chlorophyll. J. Cons.perm.int Explor. Mer. 30: 3-15.



Holm-Hansen, O, Riemann, B. 1978. Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos*, 30: 438-447.

Jeffrey, SW, Welschmeyer, NA. 1997. "Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. En: *Phytoplankton Pigments in Oceanography. Monographs on Oceanographic Methodology*, 10: 597 - 615.

Lutz, VA., Barlow, R, Tilstone, G, Sathyendranath, S, Platt, T, Hardman-Mountford, N. 2006. Report of the *in situ* component of the 'Plymouth Chlorophyll Meeting and Workshops (Extended Antares Network)'. Sponsored by GOOS, GEO, PML and POGO. 18-22 September 2006, <http://www.antares.ws/publications>.

Lutz VA, Segura V, Dogliotti AI, Gagliardini DA, Bianchi A, Balestrini CE. 2010. Primary Production in the Argentine Sea during spring estimated by field and satellite models. *J Plankton Res* 32:181-195.

Trees, CC., Bidigare, RR., Karl, D, Van Heukelem, L, Dore, J. 2003. Fluorometric chlorophyll a: sampling, laboratory methods, and data analysis protocols. Chapter 3 in: Mueller, JL., Fargion, GS., MacClain, CR (eds.). *NASA/TM-2003- Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 5, Volume V: Biogeochemical and Bio-Optical Measurements and Data Analysis Protocols*'.

Turner Designs (1999). Model 10-AU-005-CE fluorometer user's manual. Raw P/N 998-0011 version 1.4. Sunnyvale, California: Turner Designs Inc. 162 pp.

Turner Designs Newsletter Vol. 20. 2010, <http://www.turnerdesigns.com/february-2010>.

Turner Designs. Application Note: A Procedure for Measuring Extracted Chlorophyll a Free from the Errors Associated with Chlorophyll b and Pheopigments: (Without Acidification - Using 13 mm Test Tubes) 998-9000. Revision A. 6 pp.

Turner Designs Technical Note: 10-AU Solid Secondary Standard Use with Discrete Sampling S-0138 Revision A 6 p. (<http://www.turnerdesigns.com/component/content/article/116-10au-faqs/418-10au-sold-secondary-standard>)

Turner Desings 10-AU Field Fluorometer. Quick Start Operating Instructions. Revision 1.2. 998-0014. 13pp.

Welschmeyer, N. 1994. Fluorometric analysis of Chlorophyll a in the presence of Chlorophyll b and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.* 39:1985-1992.

Wright, SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC. 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. En: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Jeffrey, SW, Mantoura, RFC., Wright, SW (eds.). *Monographs on Oceanographic Methodology*, UNESCO.: 261-282.



**Anexos**

*Anexo 1. Modelo de planilla de toma de datos a bordo para muestras de clorofila a.*

**Clorofila a**

CAMPAÑA	ESTAC. GRAL.	FECHA GMT	HORA GMT	LATITUD	LONGITUD	Hoja N°
PROFUNDIDAD	VOLUMEN FILTRADO (ml)	OBSERVACIONES				

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP



*Anexo 2. Modelo de planilla para determinación de la concentración de clorofila-a con el fluorómetro Turner Designs 10-AU y Perkin-Elmer LS-3F.*

<b>CUANTIFICACIÓN FLUOROMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA-a</b>				
Campaña: _____		Blanco: _____	Hoja: _____	
Operator: _____		Referencia Sólida INICIO: _____	Referencia Sólida INICIO: _____	
Fecha: _____		L: _____	H: _____	
		Referencia Sólida FINAL: _____	Referencia Sólida FINAL: _____	
		L: _____	H: _____	
NRO MUESTRA	ETIQUETA	F0 TURNER	Dilución (ml muestra: ml metanol)	OBSERVACIONES

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP