

Revisión y optimización metodológica para extraer clorofila-*a* fitoplanctónica en ambientes acuáticos

AMALIA L. BURSZTYN FUENTES^{1,2,*}; MARÍA GRANITTO¹; MARÍA C. MALUENDEZ TESTONI¹;
MARÍA V. CASTRO¹ & PATRICIA RODRÍGUEZ^{1,2}

¹Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET). Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. ²Universidad Nacional de Tierra del Fuego, Instituto de Ciencias Polares, Ambiente y Recursos Naturales (ICPA).

RESUMEN. La cuantificación de la concentración de clorofila-*a* fitoplanctónica (Chl-*a*) es una determinación de rutina en estudios limnológicos, ecológicos y ambientales. En este trabajo se realizó un relevamiento bibliográfico acerca de los métodos utilizados con mayor frecuencia en la actualidad para determinar Chl-*a*, con el objetivo de encontrar el método más eficiente y económico para ambientes acuáticos continentales. Para ello, se estudiaron tres ambientes lénticos urbanos de Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina). Se pusieron a prueba 11 métodos diferentes de extracción, en dos ensayos independientes que difirieron en las estrategias de almacenamiento de la muestra (con y sin congelar), en el solvente utilizado (etanol absoluto frío, etanol absoluto caliente, acetona pura y acetona 90%), en el corte de filtro y en la centrifugación. Se observó que la capacidad de evidenciar diferencias significativas de la técnica depende del cuerpo de agua bajo estudio. En todos los casos en los que se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, el etanol caliente (60-70 °C) fue el solvente que permitió la mayor extracción de Chl-*a*. A pesar de que el método más usado según nuestro relevamiento bibliográfico es el que involucra la extracción con acetona 90%, los tratamientos más eficientes en nuestro experimento resultaron ser aquellos con etanol caliente (con una eficiencia de extracción entre el 14 y 98% superior, según el tratamiento y el cuerpo de agua).

[Palabras clave: fitoplancton, etanol, acetona, extracción, estimación de pigmentos, eutrofia]

ABSTRACT. Review and optimization of the method to extract phytoplankton chlorophyll-*a* in aquatic environments. The quantification of phytoplankton chlorophyll-*a* concentration (Chl-*a*) is a routine determination in limnological, ecological and environmental studies. The aim of this study was to experimentally compare the most frequently used methodologies to determine Chl-*a* in order to find the most efficient and affordable method for aquatic environments. In three urban water bodies of Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina), we compared 11 methods, in 2 independent essays, which included different sample storage strategies, different solvents, filter cut-off and centrifugation. We observed that the ability to show significant differences in the technique depended on the water body under study. In all cases where significant differences were detected between treatments, hot ethanol (60-70 °C) was the solvent that allowed the best Chl-*a* extraction. Although the most commonly used method according to our literature survey is the one involving extraction with 90% acetone, the most efficient treatments in our experiment turned out to be those with hot ethanol (with an extraction efficiency between 14 and 98% higher, depending on the treatment and the water body).

[Keywords: phytoplankton, ethanol, acetone, extraction, pigment estimation, eutrophic conditions]

INTRODUCCIÓN

La estimación de la concentración de la clorofila-*a* fitoplanctónica (Chl-*a*) es una determinación de rutina en los estudios limnológicos, ecológicos y ambientales en general. Este pigmento fotosintético es común a todos los grupos algales y es clave para una existencia autotrófica, ya sea estricta, facultativa o mixotrófica (Wetzel and Likens 2000). A través de su cuantificación se puede estimar la biomasa algal presente, y mediante mediciones sucesivas, la productividad en un ecosistema (Falkowski and Raven 2007). Su valoración es relevante en cualquier estudio de ecología acuática y ha sido ampliamente

aceptado como un indicador de calidad del agua (Párista et al. 2002; APHA 2017).

La clorofila se puede medir por medio de técnicas como la espectrofotometría, la fluorimetría y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (APHA 2017). La espectrofotometría es el método clásico y más accesible para determinar la cantidad de clorofila en cuerpos de agua superficiales (Su et al. 2010). Involucra recolectar una muestra de agua, filtrarla para concentrar los organismos que contienen clorofila, romper mecánicamente las células recolectadas y extraer la clorofila de las células rotas empleando un solvente

orgánico. A continuación, el extracto se analiza con un método espectrofotométrico, utilizando las conocidas propiedades ópticas de la clorofila: dos bandas de absorción en el espectro visible, una en el entorno a la región del rojo (600-700 nm) y otra en la región del azul (400-500 nm) (Kirk 2011).

El método de cuantificación de Chl-*a* consta de varios pasos, por lo que en la bibliografía son frecuentes las variaciones y las optimizaciones desde hace varias décadas (Hosikian et al. 2010) (Tabla 1). Se han estudiado factores como el tiempo de extracción, la temperatura del solvente, los métodos de ruptura celular

Tabla 1. Resultados obtenidos en investigaciones previas que buscaron optimizar algún parámetro del método de extracción de clorofila-*a*.

Table 1. Results obtained in other studies that sought to optimize some parameters of the chlorophyll-*a* extraction method.

Referencia	Agente de extracción	Otros factores estudiados	Resultados principales
Nusch (1980)	Metanol, etanol y acetona		1) El metanol y etanol fueron igualmente eficientes y ambos más eficientes que la acetona
Arvola (1981)	Metanol (100%), etanol y acetona (100%)	Temperatura del solvente, temperatura de extracción, tiempo de extracción y concentración de etanol	1) La temperatura del solvente no tuvo efecto, aunque el solvente caliente extrajo más rápido que el frío 2) La temperatura de la extracción sí tuvo efecto. Fue mejor a temperatura ambiente que refrigerada
Sartory and Grobbelaar (1984)	Metanol, etanol, acetona y acetona con dimetilsulfóxido (DMSO)	Temperatura de ebullición, homogeneización, sonicación, concentración de los solventes	1) El metanol y etanol fueron mejores que la acetona 2) La homogeneización y sonicación no tuvieron efectos significativos 3) La extracción fue máxima a la temperatura de ebullición del solvente con reposo de 24 h en oscuridad
Jespersen and Christoffersen (1987)	Metanol y etanol	Tiempo de extracción, temperatura del solvente, concentración del etanol	1) El etanol fue igualmente eficiente que metanol 2) El etanol bajó su eficiencia a mayor contenido de agua
Webb et al. (1992)	Etanol y acetona con DMSO	Concentración del solvente, técnica de cuantificación	1) El etanol y la acetona/DMSO son igualmente adecuados para poblaciones dominadas por algas verde azuladas y diatomeas 2) Si se quiere información de pigmentos accesorios, la cuantificación por HPLC es más apropiada que la espectrometría
Wellburn (1994)	Acetona (80%), cloroformo, dietiléter, dimetilformamida (DMF), DMSO y metanol	Tipo de espectrómetro (con diferente resolución)	1) Siempre que se utilice el set de ecuaciones correcto para un dado solvente, se puede utilizar una amplia gama de espectrómetros con diferentes resoluciones
Wright et al. (1997)	Metanol (90%), etanol (90%), etanol (100%) y DMF	Disrupción celular	1) El DMF es superior a todos los demás solventes 2) La ruptura celular mejora la extracción en todos los casos
Simon and Helliwell (1998)	Metanol y acetona	Disrupción celular (tipo de sonicación, molienda, mortero)	1) Con sonicación, el metanol removió 3 veces más que la acetona. Con molienda, el metanol removió 20% más que la acetona
Pápista et al. (2002)	Etanol, metanol (100%) y acetona (90%)	Concentración del solvente, tipo de filtración	1) El etanol 90% tuvo menor eficiencia de extracción que el metanol 100% 2) Sugieren modificaciones a la norma ISO 10260 (1992)
Schumann et al. (2005)	Acetona y DMF	Disrupción celular (molienda, ultrasonido)	1) El DMF fue el solvente más eficiente 2) La homogeneización mecánica mejoró la eficiencia en un 20% 3) La acetona extrajo 56-100% de lo extraído por DMF 4) El DMF no requiere ruptura celular. 5) La liofilización antes del análisis ayuda a la extracción

Ritchie (2006)	Metanol (100), etanol (100%) y acetona (90%)		1) Establece un set de ecuaciones para cada solvente 2) Recomienda el uso de etanol, por ser más seguro y eficiente que los otros
Macías-Sánchez et al. (2009)	Metanol y DMF	Disrupción celular (ultrasonido y fluidos supercríticos)	1) La extracción con DMF, asistida con ultrasonido, fue mayor que con metanol 2) La extracción con fluidos supercríticos es más selectiva que la extracción asistida con ultrasonido.
Wasmund et al. (2006)	Etanol y acetona	Estrategia de almacenamiento, (con/sin, temperatura y tiempo), homogenización, volumen filtrado, tiempo de extracción	1) La eficiencia de extracción fue mayor con etanol 96% que con acetona 90% 2) El tiempo de extracción no tuvo impacto significativo entre las 3 y 24h, con etanol 96%
Su et al. (2010)	Acetona (80% y 90%) y etanol (95%)	Disrupción celular	1) No hubo diferencia en la extracción de clorofila con los distintos métodos de disrupción celular 2) La acetona 90% logró una mayor extracción de clorofila
Qin et al. (2013)	Acetona, etanol, DMF, DMSO	Tipo de filtración (filtros, floculantes poliméricos, arcilla), homogeneización, temperatura y tiempo de extracción	1) Recomiendan la floculación y centrifugación en vez de la filtración con membranas de fibra de vidrio 2) El etanol 95% sin homogeneización ni calentamiento fue el tratamiento más efectivo 1) Recomiendan la espectrofotometría para cuantificar la concentración de clorofila a

(Sartory and Grobbelaar 1984; Su et al. 2010) y la filtración de las muestras (Qin et al. 2013). Sin embargo, la identificación del solvente más apropiado para extraer la clorofila fue el principal tema de discusión durante mucho tiempo (Wasmund et al. 2006). A lo largo de la historia, la acetona y el metanol fueron los solventes más usados para extraer clorofila fitoplanctónica (Arvola 1981; Párista et al. 2002). Mientras que el metanol cayó en desuso por su toxicidad (Ritchie 2008), la acetona al 90% se utiliza tradicionalmente en la investigación marina (Wright and Mantoura 1997; Aminot and Rey 2001), y en agua dulce, la norma ISO 10260 (1992) prescribe el uso de etanol al 90%. La acetona, sin embargo, tiene algunas propiedades poco deseables dado que es muy volátil e inflamable, causa dolores de cabeza y puede irritar la piel, lo que limita su aplicación en actividades de enseñanza y salidas al campo (Ritchie 2006). El etanol es un solvente menos tóxico; si bien es inflamable, es más adecuado por razones prácticas, de seguridad y económicas (Ritchie 2006, 2008).

Si bien la efectividad superior del etanol ya fue demostrada (e.g., Nusch [1980] y Sartory and Grobbelaar [1984]) (Tabla 1), en la actualidad, la acetona 90% sigue siendo el solvente propuesto por la APHA (2017) para extraer clorofila, tanto para ambientes

marinos como dulceacuícolas. De hecho, es el solvente más utilizado en trabajos limnológicos de los últimos años, de acuerdo con un relevamiento bibliográfico realizado a través de Google Académico, incluyendo los términos “chlorophyll” + “phytoplankton” + “freshwater” + “limnology”. De 200 trabajos relevados entre los años 2018 a 2021, el 56% utilizaban acetona 90% como el solvente extracción, mientras que el 30% usaba etanol (frío o caliente) con concentraciones que variaban entre 80% y 100%.

En este contexto, el objetivo del trabajo fue optimizar la determinación de clorofila-*a* fitoplanctónica en muestras de agua provenientes de cuerpos de agua naturales mediante el análisis de distintos métodos utilizados en la estimación de dicho pigmento. Para el trabajo experimental se tomaron muestras de agua en tres cuerpos de agua de la ciudad de Ushuaia y se ensayaron distintos métodos de extracción de clorofila que difirieron en la estrategia de procesamiento del filtro (congelados a -20 °C, análisis directo, corte del filtro, centrifugación) y el tipo de solvente de extracción (acetona 90%, acetona 100% o etanol 100%, a temperatura ambiente o caliente). No se siguió un diseño factorial estricto ni se ensayaron todas las combinaciones posibles de factores sino que

se compararon protocolos completos que se emplean en la actualidad en laboratorios de distintas partes del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo con muestras de agua tomadas en ambientes lénticos de la ciudad de Ushuaia, ubicada en la provincia de Tierra del Fuego ($52^{\circ}39' - 55^{\circ}03' S$ y $65^{\circ}06' - 68^{\circ}36' O$). Los tres cuerpos de agua muestreados, con características contrastantes, fueron la Bahía Encerrada, una laguna somera sin nombre que llamaremos aquí 'Los Patos' (nombre no oficial) y la Laguna del Diablo (Figura 1). La Bahía Encerrada (Sitio 1) es un sistema semicerrado a la vera de la ciudad de Ushuaia, conectado a la Bahía Ushuaia, lo que permite el intercambio con agua de mar y genera un ambiente mixohalino. Posee una superficie aproximada de 0.27 km^2 , un perímetro de 2.34 km , una profundidad media de 0.8 m y máxima de 1.8 m . La Laguna 'Los Patos' (Sitio 2) se encuentra en la misma

Reserva Natural Urbana Bahía Encerrada, pero no posee influencia marina. Se formó entre 2012-2013 en una zona de relleno. Recibiría aportes indirectos (i.e., infiltración) del arroyo Buena Esperanza, situado a tan sólo unos metros y posee características eutróficas. La Laguna del Diablo (Sitio 3) es un cuerpo de agua urbano distrófico, con características húmicas.

Los muestreos, uno por sitio, se realizaron entre noviembre y diciembre de 2021. Las mediciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, conductividad eléctrica y sólidos totales disueltos se realizaron *in situ* con un sensor multiparamétrico portátil (HANNA 98129). La turbidez se midió con un turbidímetro portátil (Lutron TU2016). Para determinar la concentración de clorofila *a* fitoplanctónica (Chl-*a*) se colectaron muestras de agua en bidones de polipropileno previamente acondicionados (un enjuague con HCl 2%, 3 con agua destilada y varias veces con muestra en el campo). Las muestras se transportaron en frío y oscuridad y se filtraron ese mismo día para las determinaciones de



Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en la Ciudad de Ushuaia. 1: Bahía Encerrada, 2: Laguna 'Los Patos', 3: Laguna del Diablo.

Figure 1. Location of the sampling sites in Ushuaia City. 1: Bahía Encerrada, 2: Laguna 'Los Patos', 3: Laguna del Diablo.

Chl-*a* con filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm de tamaño de poro (Whatman GF/F). Adicionalmente, a las muestras de agua filtradas se les realizaron mediciones de absorbancia a 440 nm, alcalinidad, dureza y nutrientes disueltos. La alcalinidad total se determinó por titulación potenciométrica con HCl 0.02N (APHA 2017) y la dureza total con un kit (HA-71A, HACH). Las concentraciones de nutrientes disueltos (fosfatos, nitrito, nitrato y amonio) se midieron con un espectrofotómetro HACH y los reactivos en polvo correspondientes; se utilizó el método del ácido ascórbico para fosfatos, el método de diazotación para nitritos, el método de reducción con cadmio para nitratos y el método salicilato para amonio. Para calcular los sólidos en suspensión, se filtró un volumen conocido de muestra por un filtro (Whatman GF/C) previamente secado a 105 °C y pesado. Se llevó a estufa hasta peso constante y por diferencia de peso se calculó la concentración de sólidos suspendidos (APHA 2017).

Determinación de clorofila-a

El procedimiento estándar para la determinación espectrofotométrica de la Chl-*a* involucra, a grandes rasgos, cuatro pasos: recolección de la muestra, filtración de un volumen conocido de muestra, extracción del pigmento retenido en el filtro con el agregado de un solvente y cuantificación del pigmento. Según la bibliografía consultada o el laboratorio en cuestión, el método incorpora o elimina pasos. Entonces, se realizaron 2 ensayos independientes. Por un lado, en un primer ensayo se estudiaron 10 tratamientos, representativos de métodos que se suelen utilizar en distintos laboratorios limnológicos nacionales e internacionales para la extracción de Chl-*a* fitoplanctónica, de acuerdo con la bibliografía relevada. Por otro lado, en un segundo ensayo se estudió el efecto de la concentración de acetona siguiendo el protocolo estipulado en APHA (2017). En la Tabla 2 se presentan en detalle los tratamientos analizados en este trabajo. En este sentido, los tratamientos seleccionados no pretenden cubrir todas las combinaciones posibles de factores y niveles, sólo las de interés para un laboratorio con equipamiento estándar y teniendo en cuenta que algunas combinaciones no se utilizan (e.g., ningún método reportado usa acetona caliente).

En todos los casos, para una muestra dada, se filtraron 500 mL utilizando una bomba de vacío Millipore a 1 atmósfera de presión, con filtros

de fibra de vidrio Whatman GF/F de 47 mm de diámetro, de manera de tener triplicados para los tratamientos. Para el primer ensayo, según el tratamiento, el filtro con el material retenido se llevó a extracción con el solvente el mismo día de la filtración (análisis directo dentro de las 24 h) o se dobló y guardó en un sobre de papel aluminio en oscuridad a -20 °C hasta la determinación del pigmento (7 días desde la filtración). Los filtros, tanto los congelados como los que no, se colocaron en frascos de vidrio ámbar recubiertos con papel aluminio, haciendo 2 cortes (sobre el filtro doblado dos veces) únicamente en los tratamientos correspondientes. Para la extracción, se colocaron 8 mL del solvente y se dejó reposar por 24 h a 4 °C en heladera. Los solventes utilizados fueron etanol 100% a temperatura ambiente (20 °C), etanol 100% a 60-70 °C y acetona 100% a temperatura ambiente. Para llevar adelante el machacado en el tratamiento 10 (protocolo de APHA 2017) se empleó una varilla de vidrio con punta redondeada y se realizó la acción mecánica durante 30 segundos. En todos los casos, a las 24 h de realizada la extracción, el sobrenadante se trasvasó a tubos de centrifuga de 15 mL y se centrifugó (3000 rpm por 20 min; RCF: 1610 xg; centrifuga Rolco Modelo 2036) cuando correspondía. Se procedió a medir la absorbancia a 665 nm y 750 nm antes y después del agregado de HCl 1N (1 gota, tiempo de espera: 1 minuto), utilizando un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 25). En los tratamientos sin centrifugado, la medición se realizó directamente en el sobrenadante. La concentración de Chl-*a* total y activa ($\mu\text{g/L}$) se calculó según el método monocromático de Lorenzen (1967):

$$\text{Chl} - a = k * F * \frac{[(A_{665} - A_{750}) - (A_{665}^{\text{HCl}} - A_{750}^{\text{HCl}})] * V_{\text{ext}}}{V_m * Z}$$

donde A_{665} es la absorbancia a 665 nm antes de acidificar, A_{750} es la absorbancia a 750 nm antes de acidificar (corrección por turbidez), A_{665}^{HCl} es la absorbancia a 665 nm después de acidificar, A_{750}^{HCl} es la absorbancia a 750 nm después de acidificar (corrección por turbidez), V_{ext} es el volumen de solvente utilizado (8 mL), V_m es el volumen de muestra filtrado (500 mL), Z es el paso de la cubeta utilizada (1 cm), k es el coeficiente de absorción de la clorofila-*a* (11.0 para acetona y 12.2 para etanol) (Marker 1994) y F es un factor de corrección por acidificación (2.43).

Para calcular las eficiencias de extracción, para cada sitio se compararon las

Tabla 2. Tratamientos seleccionados.**Table 2.** Selected treatments.

Tratamiento	Procedimiento
Ensayo 1	
1	Preservación a -20 °C, etanol caliente (100%), corte de filtro, centrifugación
2	Preservación a -20 °C, etanol caliente (100%), corte de filtro, sin centrifugación
3	Preservación a -20 °C, etanol caliente (100%), sin corte de filtro, sin centrifugación
4	Análisis directo (24 h), etanol frío (100%), sin corte de filtro, sin centrifugación
5	Análisis directo (24 h), etanol frío (100%), corte de filtro, centrifugación
6	Análisis directo (24 h), etanol frío (100%), corte de filtro, sin centrifugación
7	Preservación a -20 °C, acetona fría (100%), corte de filtro, centrifugación
8	Preservación a -20 °C, acetona fría (100%), sin corte de filtro, centrifugación
9	Análisis directo (24 h), acetona fría (100%), sin corte de filtro, sin centrifugación
10	Análisis directo (24 h), acetona fría (100%), machacado del filtro, centrifugación
Ensayo 2	
A	Análisis directo (24 h), solvente: acetona fría (100%), machacado del filtro, centrifugación
B	Análisis directo (24 h), solvente: acetona fría (90%), machacado del filtro, centrifugación

concentraciones de clorofila extraídas entre tratamientos, asignando el valor de 100% a aquel con la extracción más baja (dentro del par comparado) y calculando el porcentaje correspondiente al tratamiento con la mayor concentración.

Se realizó un segundo ensayo para estudiar la eficiencia de extracción de la acetona 90% y 100%. Para ello, se tomaron las condiciones experimentales del tratamiento 10 (método propuesto por APHA 2017) y se replicó con acetona 90%. Este ensayo se realizó únicamente en la Laguna 'Los Patos' y la Laguna del Diablo, de acuerdo con los resultados obtenidos del primer ensayo.

Durante todo el proceso (filtración, extracción y cuantificación) se procuró trabajar con la mínima luz posible para reducir la formación de productos de degradación de la clorofila. Los solventes utilizados fueron de grado analítico, alcohol etílico anhidro absoluto (Anebra 99%) y acetona (Dorwill 99.5%), y se utilizaron sin dilución alguna, con excepción del segundo ensayo (acetona al 90%).

Análisis de datos

Los datos del trabajo experimental se presentan como la media \pm el desvío estándar (DS). Las diferencias significativas entre tratamientos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) acoplado a una prueba de comparación de medias DCG ($\alpha=0.05$). Cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Para comparar las medias del método APHA con 90% y 100% de acetona,

se utilizó una comparación de dos medias independientes (prueba t) para cada sitio. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

RESULTADOS

Caracterización de los sitios de muestreo

Los sitios de muestreo poseen características fisicoquímicas contrastantes. Mientras que la Bahía Encerrada tiene un pH alcalino (8.59), la Laguna 'Los Patos' tiene un pH tendiendo a neutro (6.54) y la Laguna del Diablo, un pH ácido (5.53). Los contenidos de nutrientes disueltos son sustancialmente diferentes. La Laguna 'Los Patos' presenta 0.14 mg/L y 0.16 mg/L de P-PO₄³⁻ y N-NH₃, respectivamente, duplicando las concentraciones de la Bahía Encerrada. La Laguna del Diablo posee las menores concentraciones de nutrientes disueltos. En material suplementario se presenta la caracterización fisicoquímica completa de los sitios muestreados (Tabla S1).

Determinación de clorofila-a

Para la Bahía Encerrada no hubo diferencias significativas en la concentración de clorofila-a entre tratamientos ($P=0.2369$), mientras que para Laguna del Diablo y Laguna 'Los Patos' sí las hubo ($P<0.0005$). Sobre la base de los valores promedios, en los tratamientos con etanol caliente (tratamientos 1-3) se obtuvieron valores superiores que con etanol frío. A su vez, en todos los casos, en los tratamientos con etanol caliente se extrajo mayor concentración de Chl-a que con acetona. Sin embargo, debido

a la dispersión de los datos, solo se detectaron diferencias significativas en algunos de los tratamientos, como se observa en la Figura 2. Para Laguna del Diablo, los tratamientos 1, 2 y 3 (con etanol caliente) fueron superiores al tratamiento 10 con acetona (protocolo APHA 2017) en un 14.8%, 20.7% y 35.4%, respectivamente. Para Laguna 'Los Patos', los tratamientos 1 y 3 fueron superiores al tratamiento 10 con acetona en un 19.8% y 30.7%, respectivamente. Si se comparan las eficiencias de extracción con respecto al tratamiento con acetona fría que extrajo la

menor concentración de pigmento (tratamiento 7), se obtienen porcentajes de extracción de los tratamientos con etanol caliente (1, 2 y 3) incluso superiores, de 63.4%, 71.7% y 92.7% en Laguna del Diablo y de 81.5%, 48.5% y 98% en Laguna 'Los Patos'.

Por otra parte, se procedió a comparar el efecto de la concentración de acetona en la extracción de Chl-*a*, teniendo en cuenta que la norma APHA (2017) y gran parte de la bibliografía precedente utiliza acetona 90% y no acetona 100%. El método APHA (2017) realizado con acetona al 100% y acetona al 90% arrojó diferencias de concentración de clorofila estadísticamente significativas para Laguna del Diablo ($P=0.0285$) pero no para Laguna 'Los Patos' ($P=0.3168$). En el primer caso, las mayores concentraciones de clorofila se determinaron con acetona al 100% (Figura 3).

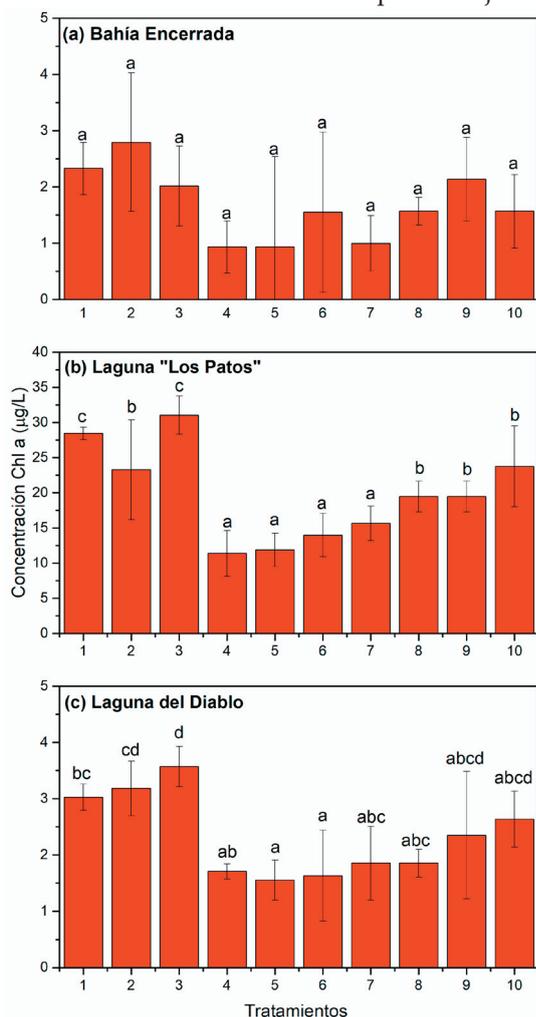


Figura 2. Concentración de clorofila-*a* medida utilizando los diez tratamientos para (a) Bahía Encerrada, (b) Laguna 'Los Patos' y (c) Laguna del Diablo. Las barras indican el desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada sitio (ver Tabla 1 para asociar los rótulos de los tratamientos).

Figure 2. Chlorophyll-*a* concentration measured using the ten treatments for (a) Bahía Encerrada, (b) Laguna 'Los Patos' and (c) Laguna del Diablo. Bars indicate standard deviation. Different letters indicate significant differences between treatments within each site (see Table 1 for treatment labels).

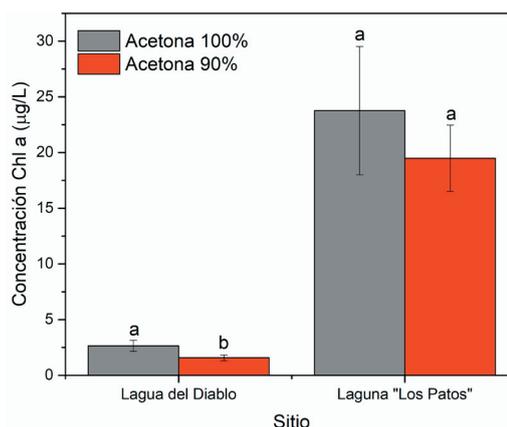


Figura 3. Concentración de clorofila-*a* medida con el método propuesto por la APHA (2017), con acetona al 90% y 100% (directo del envase). Las barras indican el desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada sitio de estudio.

Figure 3. Chlorophyll-*a* concentration measured according to the APHA (2017) method, with 90% or 100% acetone (directly from the bottle). Bars indicate standard deviation. Different letters indicate significant differences between treatments for each site.

DISCUSIÓN

En este trabajo se revisó el estado del arte de la determinación de la concentración de clorofila-*a* del fitoplancton y se compararon las eficiencias de extracción de algunas metodologías ampliamente utilizadas. Al contrario de lo esperado, el método que resultó más efectivo para la extracción de Chl-*a* en este trabajo no es el más utilizado en la bibliografía relevada de los últimos 4 años. Si bien nuestros resultados son estadísticamente

significativos en dos de los tres cuerpos de agua analizados, la tendencia general es hacia una mayor efectividad de los tratamientos que utilizan etanol caliente como solvente, lo que se ve representado en la Figura 2 como mayor concentración de pigmento extraído. El mismo resultado ya ha sido referido con anterioridad (Ritchie 2006; Wasmund et al. 2006) (Tabla 2), por lo cual resulta llamativo que la acetona aún siga siendo el solvente elegido en la mayoría de los trabajos y el recomendado por APHA (2017).

Los factores que influyen en la eficiencia de la técnica de determinación de Chl-*a* son muchos, entre ellos, las condiciones de almacenamiento de las muestras antes del análisis, los solventes orgánicos utilizados, la duración y temperatura de la extracción, la presencia y el tipo de disrupción celular empleada y el número de pasos de extracción totales empleados en el análisis (Hosikian et al. 2010).

A partir de los resultados experimentales obtenidos en este estudio, queda en evidencia que los valores de Chl-*a* extraída varían, principalmente, con el solvente utilizado. Arvola (1981), Sartory y Grobbelaar (1984) y Jespersen y Christoffersen (1987) también estudiaron la eficiencia de distintos solventes en la extracción de clorofila (Tabla 1). Mientras que Jespersen y Christoffersen (1987) observaron que el etanol era igualmente eficiente que el metanol en la extracción de Chl-*a* de cultivos y poblaciones naturales de fitoplancton, Sartory y Grobbelaar (1984) observaron que ambos solventes eran más eficientes que la acetona. En lo que respecta a la temperatura del solvente, Jespersen y Christoffersen (1987) identificaron que, en presencia de algas verdes dominantes, era necesario tiempos más largos de extracción (mayores a 6 h) y calentar el etanol a 70 °C. Sin embargo, se sigue usando la acetona 90% en la mayoría de los trabajos limnológicos.

Este estudio pone en evidencia que la eficiencia del método de extracción depende, por otro lado, de las características del cuerpo de agua. Es decir, no en todos los sitios la técnica permite detectar diferencias significativas entre tratamientos. Por ejemplo, en la Bahía Encerrada, con características eutróficas y con componente salino, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, aunque los valores de etanol caliente arrojaron medias más elevadas. En los otros dos cuerpos de agua, sí hubo diferencias

significativas. Esto no estuvo necesariamente relacionado con la concentración total de Chl-*a*, ya que, si bien en la Laguna 'Los Patos' esta fue sustancialmente mayor, en la Laguna del Diablo los valores de Chl-*a* estuvieron en el mismo orden de magnitud que la Bahía Encerrada. De todas maneras, la tendencia de los agentes de extracción en los tres sitios estudiados es la misma.

Algunos autores han remarcado que la composición de la comunidad fitoplanctónica responde de manera diferencial a los agentes de extracción. Por ejemplo, Schumann et al. (2005) reportaron que mientras que la clorofila de *Chlorella* sp. fue relativamente fácil de extraer, incluso en acetona, las células de *Stichococcus* sp. fueron generalmente mucho más difíciles de romper. Estas diferencias pueden explicarse por las propiedades intrínsecas del córtex y pared celular de cada especie en particular, así como su habilidad de generar estructuras de resistencia como pueden ser las vainas de mucílago. En este trabajo, no se realizó una caracterización de la estructura del fitoplancton en los cuerpos de agua, ya que no estaba entre los objetivos del mismo. Sin embargo, *a priori*, se sabe que la composición de estos cuerpos de agua, al menos en las dos lagunas, es diferente, con dominancia de *Peridinium* sp. y otros mixótrofos en la Laguna del Diablo y de *Scenedesmus* sp. y *Euglena* sp. en la Laguna 'Los Patos' (observación personal). Aun así, las eficiencias de extracción fueron mayores en los tratamientos con etanol caliente en los tres sitios, por lo que la composición no parecería ser un factor relevante al momento de comparar estos cuerpos de agua.

La concentración de clorofila supone una métrica de rápido análisis a diferencia del estudio estructural de la comunidad planctónica, que es más complejo en cuanto al tiempo y conocimiento previo que conlleva. Estandarizar la técnica empleada en la estimación del pigmento debiera poder hacerse independientemente de la taxonomía, y nuestros resultados sustentan la idea: en cuerpos de agua con distinta composición algal, los tratamientos con etanol caliente como solvente tienen mayores eficiencias de extracción.

Resulta interesante destacar que, a diferencia de otros autores que identificaron que la disrupción celular (homogeneización, sonicación, molienda, etc.) es un factor clave en la extracción de clorofila (Sartory and

Grobbelaar 1984; Wright et al. 1997; Simon and Helliwell 1998; Macías-Sánchez et al. 2009), en este trabajo el proceso de machacado no mejoró la extracción en acetona. Schumann et al. (2005) trabajaron con dos microalgas verdes, *Stichococcus* sp. y *Chlorella* sp., e identificaron que para la dimetilformamida (DMF) no era necesaria la disrupción celular ya que se lograba la extracción completa del pigmento luego de unos pasos sucesivos de extracción. Su et al. (2010), quienes trabajaron con plantas acuáticas, identificaron diferencias en la extracción de clorofila con sólo uno de los métodos de ruptura celular (machacado +sedimentación) usando acetona 80%. Otros estudios mostraron que el almacenamiento a temperaturas bajas luego de la filtración (-18 o -20 °C) asistía la ruptura celular y la extracción de la clorofila (Wright et al. 1997). En este sentido, es congruente que los tratamientos con almacenamiento a -20 °C acoplado a la extracción con etanol caliente (tratamientos 1, 2 y 3) sean los más efectivos en este trabajo, en concordancia con los trabajos mencionados.

El uso de acetona 90% y 100% tuvo efectos dispares según el cuerpo de agua bajo análisis. Mientras que en la Laguna 'Los Patos' no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos, en la Laguna del Diablo sí las hubo, siendo mayor la extracción con acetona 100%. De acuerdo con Sartory (1982), la acetona con 10-20% de agua se ha utilizado preferentemente debido a que elimina la necesidad de secar las muestras y la bibliografía precedente indicaba que la acetona 100% no permitía extraer fácilmente la Chl-*a* (Marker 1972, citado por Sartory 1982). Wright et al. (1997) encontraron que, si bien la acetona 100% no era el solvente que extraía la mayor cantidad de clorofila frente a otros solventes, su uso inhibía la formación de productos de degradación. Cabe recordar que la clorofila es un pigmento altamente reactivo y cuando está expuesta a luz en exceso, oxígeno/aire, altas temperaturas o condiciones ácidas o básicas da lugar a productos de degradación (Hosikian et al. 2010). Entonces, el rendimiento

de un determinado método de extracción se ve afectado por la formación de dichos productos.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, no resulta evidente por qué está tan difundido el uso de acetona 90% en los trabajos limnológicos. En nuestros resultados, los tratamientos con etanol caliente lograron una extracción promedio 41%, 50% y 52% superior a la acetona en Laguna 'Los Patos', Laguna del Diablo y la Bahía Encerrada, respectivamente. En términos de costos, el litro de acetona y etanol grado analítico son muy similares (US\$12 y US\$13, respectivamente). Una justificación posible puede estar relacionada con que no es necesario calentar la acetona. Otra opción es la disponibilidad de datos y ecuaciones para calcular la concentración de clorofila extraída con acetona, ya sea por el método monocromático como por el tricromático, además que es la metodología recomendada por APHA (2017).

En conclusión, en este estudio revisamos los métodos de estimación de clorofila-*a* fitoplanctónica más usados en el último tiempo y realizamos nuestro propio ensayo para determinar cuál es el más conveniente para cuerpos de agua naturales. A pesar de que el método que involucra acetona es el más citado, los tratamientos con etanol caliente resultaron más efectivos en la extracción de clorofila. Se espera que este trabajo se utilice como guía local para optimizar la determinación en cuerpos de agua típicos de la región patagónica.

AGRADECIMIENTOS. Las autoras agradecen a la Dra. Soledad Diodato por el asesoramiento brindado durante la ejecución de este experimento y el acceso al espectrofotómetro. Además, se agradece el financiamiento otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del PICT 2017-0164 y el subsidio de CONICET por el Proyecto de Investigación de Unidad Ejecutora PUE 2016 a nombre de CADIC.

REFERENCIAS

- Aminot, A., and F. Rey. 2001. Chlorophyll a: determination by spectroscopic methods, ICES Tech. Mar Environ Sci 30: 1-18. <https://doi.org/10.25607/OBP-278>.
- APHA. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA; Washington DC, USA.
- Arvola, L. 1981. Spectrophotometry determination of chlorophyll-a and phaeopigments in ethanol extractions. Ann Bot Fennici 18:221-227. URL: jstor.org/stable/23725236.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada, and C. W. Robledo. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: infostat.com.ar.
- Falkowski, P. G., and J. A. Raven. 2007. Aquatic photosynthesis. Second edition. Princeton University Press, New Jersey, USA. <https://doi.org/10.1515/9781400849727>.

- Hosikian, A., S. Lim, R. Halim, and M. K. Danquah. 2010. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering* 2010:391632. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>.
- International Organization for Standardization. 1992. ISO 10260: Water quality – Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration. First Edition. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jeffrey, S. W., and G. F. Humphrey. 1975. New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen* 167:191-194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3).
- Jespersen, A. M., and K. Christoffersen. 1987. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Archiv für Hydrobiologie* 109:445-454.
- Kirk, J. T. O. 2011. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623370>.
- Lorenzen, C. J. 1967. Determination of Chlorophyll and Pheopigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography* 12:343-346. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>.
- Nusch, E. A. 1980. Comparison of methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch Hydrobiol Limnol* 14:14-36.
- Macías-Sánchez, M. D., C. Mantell, M. Rodríguez, E. M. de la Ossa, L. M. Lubian, and O. Montero. 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* 77(3):948-952. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.032>.
- Marker, A. F. H. 1994. Chlorophyll a SCA Method Revision. Institute of Freshwater Ecology. National Rivers Authority, Bristol, UK. URL: tinyurl.com/mv69vka4.
- Pápista, É., É. Ács, and B. Böddi. 2002. Chlorophyll-a determination with ethanol – a critical test. *Hydrobiologia* 485: 191-198. <https://doi.org/10.1023/A:1021329602685>.
- Qin, H., S. Li, and D. Li. 2013. An improved method for determining phytoplankton chlorophyll a concentration without filtration. *Hydrobiologia* 707:81-95. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1412-6>.
- Ritchie, R. J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 89:27-41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>.
- Ritchie, R. J. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46(1):115-126. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>.
- Sartory, D. P. 1982. Spectrophotometric analysis of chlorophyll a in freshwater phytoplankton. Technical Report TR 115. Department of Water Affairs, Hydrological Research Institute, South Africa.
- Sartory, D. P., and J. U. Grobbelaar. 1984. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia* 114:177-187. <https://doi.org/10.1007/BF00031869>.
- Schumann, R., N. Haubner, S. Klausch, and U. Karsten. 2005. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55(3):213-222. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.12.002>.
- Simon, D., and S. Helliwell. 1998. Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Research* 32(7):2220-2223. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00452-1).
- Su, S., Y. Zhou, J. G. Qin, W. Yao, and Z. Ma. 2010. Optimization of the Method for Chlorophyll Extraction in Aquatic Plants. *Journal of Freshwater Ecology* 25(4):531-538. <https://doi.org/10.1080/02705060.2010.9664402>.
- Wasmund, N., I. Topp, and D. Schories. 2006. Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia* 48(1):125-144.
- Webb, D. J., B. K. Burnison, A. M. Trimbee, and E. E. Prepas. 1992. Comparison of Chlorophyll a Extractions with Ethanol and Dimethyl Sulfoxide/Acetone, and a Concern about Spectrophotometric Phaeopigment correction. *Can J Fish Aquat Sci* 49:2331-2336. <https://doi.org/10.1139/f92-256>.
- Wellburn, A. R. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* 144(3):307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- Wetzel, R. G., and G. E. Likens. 2000. Composition and Biomass of Phytoplankton. Pp. 147-174 *in* R. G. Wetzel and G. E. Likens (eds.). *Limnological Analyses*. Third edition. Springer, New York, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3250-4_10.
- Wright, S. W., and R. F. C. Mantoura. 1997. Guidelines for collection and pigment analysis of field samples. Pp. 429-445 *in* S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura and S. W. Wright (eds.). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO Publishing, Paris, France.
- Wright, S. W., S. W. Jeffrey, and R. F. C. Mantoura. 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. Pp. 261-282 *in* S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura and S. W. Wright (eds.). *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing, Paris, France.