

Determinación espectrofotométrica de la clorofila en el análisis del agua

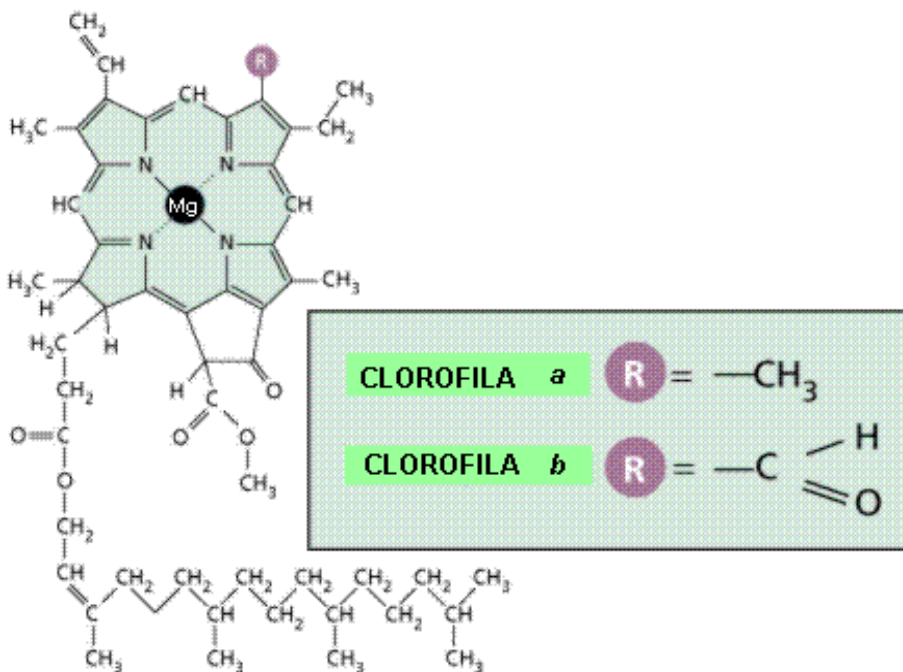
Introducción

La determinación de la clorofila es un parámetro que nos puede indicar la calidad del agua en cuanto a la concentración de fitoplancton (algas microscópicas). Este parámetro aporta informaciones sobre la cantidad de biomasa presente en el medio acuático analizado, y a su vez nos puede suministrar una

Las tres clorofilas generalmente encontradas en el fitoplancton son clorofila a, b y c. La clorofila viene a ser del orden del 1 al 2 % del peso seco de las algas planctónicas

La clorofila es una molécula compleja que posee un átomo de magnesio en el centro, mantenido por un anillo de porfirinas

Una molécula de clorofila se compone de una cabeza y una cola. La cabeza contiene cuatro anillos de carbono \ nitrógeno unidos formando un anillo mayor en el centro de este anillo hay un átomo de magnesio y tiene un pigmento color verde con estructuras policíclicas planas. La cola es una cadena de carbonos enlazados unidos a la cabeza.



La clorofila puede detectarse fácilmente gracias a su comportamiento frente a la luz. La medición óptica de la concentración de clorofila en una muestra de agua permite una estimación suficiente de la concentración de fitoplancton (algas microscópicas) e, indirectamente, de la actividad biológica; de esta manera la medición de clorofila es un instrumento importante de vigilancia de los procesos de eutrofización.

Para su determinación, una vez concentrado el plancton mediante filtración, se extraen los pigmentos con acetona acuosa o metanol y se determina la densidad óptica

(absorbancia) del extracto en un espectrofotómetro a 664, 647 y 630 nm. Por otra parte se hace una corrección de la turbidez haciendo una lectura de absorbancia a 750 nm.

Procedimiento

1. Recoger una muestra de agua y colocarla en un frasco de polietileno de un litro sin llenarlo. El frasco debe estar limpio y si es posible esteril.
2. Filtrar 250 mL de agua usando filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F).
3. Una vez filtrada la muestra, tomar el filtro con mucho cuidado, utilizando pinzas se dobla y se coloca en un tubo de ensayo con tapa/rosca.
4. Se añaden 5 mL de acetona al 90 %
5. Se cierra el tubo con el filtro y la acetona, y en caso de ser necesario se cubre con papel aluminio.
6. Se agita con mucho cuidado el tubo durante 1 minuto
7. Se guarda el tubo con el extracto en el refrigerador durante 24 horas y en oscuridad
8. Después de las 24 horas, con una pipeta se extrae la acetona del tubo, y se coloca en un tubo limpio.
9. La acetona en el tubo limpio se centrifuga por 10 minutos a 3000 RPM.
10. Se extrae del tubo entre 1–3 mL los cuales se ponen en la celda del espectrofotómetro.
11. Elegir el tamaño (longitud) de la celda que proporcione un absorbancia a 664nm mayor de 0,2 y menor de 1,0 (Normalmente varía entre 1-2 cm).

Medir las absorbancias de la muestra a **664 nm, 647 nm. Y 630 nm** en el espectrofotómetro:

Con los datos de absorbancia que se obtienen en el espectrofotómetro se calcula la cantidad de clorofila *a*, *b* y *c* en la muestra, usando las ecuaciones propuestas por Jeffrey & Humphrey (1975):

La lectura a **750nm** se utiliza como corrección de la turbidez, y habrá que restar esta lectura de cada uno de los valores de absorbancia de las otras longitudes de onda (absorbancias corregidas). Las absorbancias corregidas son las que se sustituyen en las siguientes ecuaciones de Humphrey(1975)

$$Ca = (11.85 \times A664) - (1.54 \times A647) - (0.08 \times A630)$$

$$Cb = (-5.47 \times A664) + (21.03 \times A647) - (2.66 \times A630)$$

$$Cc = (-1.67 \times A664) - (7.60 \times A647) + (24.52 \times A630)$$

Los valores obtenidos en estas ecuaciones se substituyen en las siguientes ecuaciones para obtener la concentración final de clorofila *a*, *b* y *c*:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg / L)} = [\text{Ca} \times v] / [l \times V]$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg / L)} = [\text{Cb} \times v] / [l \times V]$$

$$\text{Clorofila } c \text{ (mg / L)} = [\text{Cc} \times v] / [l \times V]$$

Donde Ca ,Cb y Cc es el resultado de las ecuaciones de Jeffrey & Humphrey (1975) para cada tipo de clorofila (*a*, *b*, *c*), *v* es el volumen de acetona usado para extraer los pigmentos (mL), *l* es la longitud de la celda del espectrofotómetro (cm) y *V* es el volumen de agua filtrada (L).