

Mediciones acuáticas de importancia ambiental: producción de material para comparaciones interlaboratorios en Clorofila a

M. S. Barbelli⁽¹⁾, M. Papa⁽¹⁾, M. Jordán⁽¹⁾

barbelli@inti.gov.ar

⁽¹⁾ Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas - SOQyA- INTI

Palabras Clave: Clorofila, eutrofización, comparaciones interlaboratorios, aguas superficiales.

INTRODUCCIÓN

La concentración de clorofila a en aguas superficiales es utilizada como un indicador de biomasa algal, ya que es el único pigmento fotosintético presente en todas las clases de algas. Junto con la concentración de fósforo y de oxígeno disuelto, se utilizan para evaluar procesos de eutrofización de cuerpos de agua^[1]. La eutrofización consiste en el incremento de nutrientes que lleva al deterioro de las condiciones para la conservación de la biodiversidad, que puede derivar eventualmente en su senescencia o colmatación^[2]. El método más frecuentemente utilizado para la determinación de la clorofila a en aguas superficiales es el espectrofotométrico (ISO 10260:1992)^[3]. El mismo abarca diferentes etapas: sub-muestreo, extracción de pigmentos, clarificación y medición espectrofotométrica. Desde el punto de vista metrológico presenta varios desafíos, como la ausencia de MRC, la inestabilidad del analito de interés y las interferencias causadas por la presencia de productos de degradación de la clorofila a.

El presente trabajo se realizó en el marco del sub proyecto "*Mediciones precisas de oxígeno disuelto, fósforo y clorofila en ambientes acuáticos para el correcto monitoreo de la biodiversidad*" del Fondo Regional de Infraestructura de la Calidad para la Protección de la Biodiversidad y el Clima en América Latina y el Caribe, coordinado por LATU e integrado por INTI, IBMETRO, INEN e INACAL. El objetivo principal de este proyecto era el desarrollo de herramientas metrológicas como la producción de MRC o la organización de ensayos interlaboratorios para garantizar la calidad de las mediciones. Se realizaron actividades, en primer lugar, para la implementación y validación del método. En una segunda instancia, se desarrollaron actividades con el objetivo de producir un candidato a MRC, mediante la purificación de clorofila a. Esa estrategia se encontró con numerosos obstáculos técnicos, principalmente vinculados a la inestabilidad de la molécula y la dificultad de lograr la separación de impurezas estructuralmente relacionadas. Finalmente, se optó por trabajar en el desarrollo

de un ítem de ensayo para ser utilizado en comparaciones interlaboratorios, que nos permita demostrar competencia en la medición dentro del marco de sub-proyecto, incorporar un control interno de calidad (MR) dentro los INM y otorgar la posibilidad de organizar ensayos de aptitud dentro de cada país.

OBJETIVOS

Obtención de un material con contenido de clorofila a para la producción de un lote de ítems de ensayo para desarrollar comparaciones interlaboratorios y candidato a material de referencia (MR) para la determinación de clorofila a por el método espectrofotométrico^[3].

DESARROLLO

El material seleccionado para la producción de los ítems fue un cultivo axénico de algas liofilizado. Esta decisión responde a dos necesidades fundamentales para lograr un buen ítem de ensayo. 1- La matriz es similar a la de las muestras reales, ya que se mantiene el entorno de la clorofila (su ubicación subcelular). 2- Partir de un cultivo axénico reduce la heterogeneidad del material. El plan de trabajo tuvo dos fases, *Etapa 1* (piloto) y *Etapa 2* (escalado).

Los objetivos de la *Etapa 1* fueron la selección de la cepa más adecuada para la producción del lote, la evaluación de distintas estrategias de concentración, congelamiento y parámetros de liofilización), la puesta a punto del protocolo de reconstitución, la caracterización del material obtenido (concentración de clorofila e integridad celular), y la determinación del rendimiento del proceso para su escalado.

Se trabajó con tres cultivos provistos por la Colección de Cultivos de Microalgas – FAUBA, (A) *Chroococciopsis* spp. (Cyanophyceae), (B) *Chlorella* spp. y (C) *Chlorococcum* sp. (ambas Chlorophyceae). Para cada cultivo se evaluaron, en placas de Petri de 50ml por quintuplicado, tres tratamientos previos al congelamiento en ultrafreezer (-80°C): sin concentración (TC), concentración (5:1) por centrifugado a 3000 rpm por 1 (CE1) o 5 (CE5) minutos. Se sometieron a

un ciclo de liofilización de 23 horas con una temperatura máxima de 35°C. El material obtenido fue pesado, reconstituido, observado a microscopio óptico y cuantificado su contenido de clorofila [3].



Figura 1: Etapa 2 - Cultivo concentrado de *Chlorella sp.* en ultrafreezer (a), material después de la liofilización (b)

En la Etapa 2, se procedió al escalado del proceso. Se partió de un cultivo de 25 litros de la cepa seleccionada (*Chlorella spp.*). El mismo fue concentrado por centrifugación hasta obtener dos fracciones que fueron dispensadas y congeladas (-80°C) en tres bandejas para su liofilización en dos ciclos de 23 horas (figura 1), junto con dos bandejas de cultivo complementario. El material liofilizado fue colectado en tres frascos de 125 ml (lote A). Además, se produjo el lote (B), con el cultivo complementario, para la puesta a punto del fraccionamiento. El material fue enviado al LATU, Uruguay, para su fraccionamiento y evaluación (homogeneidad y estabilidad) para el parámetro de interés.

RESULTADOS

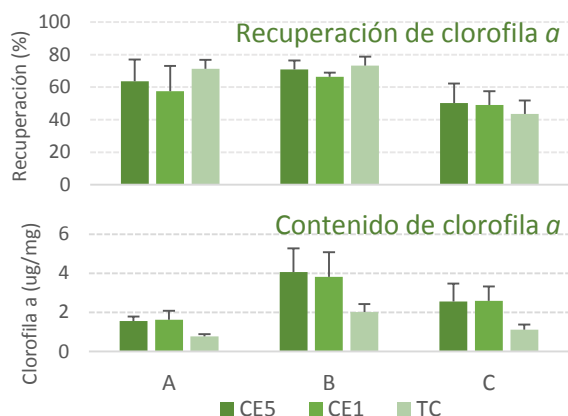


Figura 2: Etapa 1 - Recuperación de clorofila (a) y concentración de clorofila en el liofilizado (b) para cada cepa (A: *Chroococcidiopsis spp.*, B: *Chlorella spp.* y C: *Chlorococcum sp.*) y pre-tratamiento (CE5: 5 min centrifugación, CE1: 1 min centrifugación, TC: sin centrifugación). Media \pm desviación estándar.

Etapa 1. La estrategia de reconstitución del material obtenido resultó satisfactoria y las muestras producidas se fraccionaron para cuantificar el contenido de clorofila por duplicado. No fue necesario modificar parámetros del proceso de liofilización ni evaluar otras temperaturas de congelamiento.

En función de los resultados obtenidos (figura 2), se tomó la decisión de utilizar la cepa B (*Chlorella spp.*) para la producción del lote, ya que presentó una menor variabilidad en la recuperación y un mayor contenido de clorofila en el liofilizado. La concentración por centrifugación (CE5 y CE1) no produjo pérdidas significativas de la recuperación y contribuyó a incrementar la concentración de clorofila en el liofilizado (por reducción del contenido de sales).

Etapa 2. Se tomaron muestras de cada frasco de material liofilizado para su caracterización (tabla 1). Se observó la conservación de la integridad celular al microscopio óptico.

Tabla 1: Caracterización del cultivo concentrado (pre liofilización) y del material liofilizado.

		Bandeja/Frasco		
		1	2	3
Cultivo concentrado	Vol. (l)	1,0	1,0	1,1
	Clorofila total (mg)	58,2	79,0	122,2
Liofilizado	Masa (g)	5,1	6,5	8,3
	Clorofila (mg/g) *	8,8	8,8	12,2
Recuperación (%) *		76,8	72,9	82,6

(*) Estimado a partir de muestras reconstituidas.

La recuperación obtenida fue superior a la utilizada para la proyección del escalado (50%), con lo cual se obtuvo más material del requerido y se decidió elaborar el lote a partir de una única unidad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las características del material obtenido resultaron adecuadas en cuanto a contenido de clorofila, granulometría y factibilidad de la reconstitución para ensayar bajo el método ISO 10260. Los próximos pasos, de fraccionamiento y estudio de la homogeneidad y estabilidad, serán cruciales para producción del lote y el desarrollo de la comparación interlaboratorios.

AGRADECIMIENTOS

Regina Gauna Peter – Dpto. de Tecnologías en Nuevas Formulaciones – SOIYS.

Marcela Álvarez – Dpto. de Microbiología – SOA.

Ernesto Gramajo Harguindeguy y Carolina Giannavola - Dpto. de Tecnología de Procesos Industriales – SOA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Wetzel, R. "Limnology, lake and river ecosystems", Elsevier Academic Press, San Diego, 2001.
- [2] OECD, "Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control", OECD, Paris, 1982.
- [3] ISO 10620:1992. Water quality - Measurement of biochemical parameters- Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration.