



INIDEP

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO PESQUERO

INFORME DE ASESORAMIENTO Y TRANSFERENCIA

Número

006

Páginas

15

Fecha de aprobación

05 FEB 2016

Dirección

DIRECCIÓN DE PESQUERIAS PELAGICAS Y MEDIO AMBIENTE

Programa / Gabinete

Medio Ambiente - Dinámica del Plancton Marino y Cambio Climático

Actividad

Estudio de la variación anual de la clorofila a (EPEA)- Estudio de la variación estacional de la clorofila a en una sección en la plataforma bonaerense (COS-TAL).

PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN DEL FLUORÓMETRO TURNER DESIGNS 10-AU PARA CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA-a

La concentración de clorofila-a (C_{la}) se emplea para estimar en forma indirecta la biomasa fitoplanctónica. La fluorometría es una de las técnicas utilizadas para cuantificar la concentración de C_{la} en una muestra. Debido a que la lectura del fluorómetro es relativa es por tanto indispensable su calibración mediante una referencia estándar de C_{la} pura de concentración conocida, realizando luego una serie de diluciones de la misma. El objetivo de la construcción de una curva de calibración es el cálculo del factor de calibración, propio del fluorómetro.

En el presente informe se describe el procedimiento de calibración para la cuantificación fluorométrica de la C_{la} para el caso particular del fluorómetro Turner Designs 10-AU, usando el equipamiento disponible en el laboratorio de "Producción Primaria y Biotoxicidad" del INIDEP.

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

SOLICITADO POR

Institución

Cargo

PREPARADO POR

Firma:


Nombre: BERGHOFF, CARLA
Nombre: FLORENCIA

Firma:


Nombre: LOBO, YAMILA

Firma:

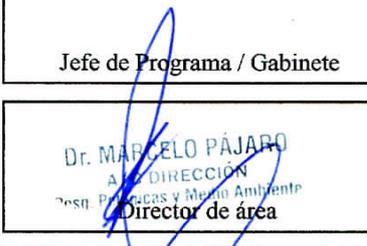

Nombre: RETA, RAUL

Firma:


Nombre: LUTZ, VIVIAN ALICIA

APROBADO POR

Jefe de Programa / Gabinete


Dr. MARCELO PÁJARO
A/C DIRECCIÓN
Pesq. Pelágicas y Medio Ambiente
Director de área


Dr. OTTO C. WÖHLER
DIRECTOR
Director Nacional de Investigación
INIDEP

Director del INIDEP

PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN DEL FLUORÓMETRO TURNER DESIGNS 10-AU PARA CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA-*a*

Berghoff, Carla F.¹; Lobo, Yamila; Reta, Raul¹; Lutz, Vivian A.^{1,2}

¹Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP); ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Introducción

La concentración de clorofila-*a* (Cla) se emplea para estimar en forma indirecta la biomasa fitoplanctónica. La fluorimetría es una de las técnicas utilizadas para cuantificar la concentración de Cla en una muestra. Si bien tiene ventajas interesantes sobre otros métodos especialmente por el corto tiempo de análisis, y su gran sensibilidad, la fluorimetría es un método indirecto debido a que la lectura del fluorómetro es relativa. Por tanto es indispensable su calibración mediante una referencia estándar de Cla pura de concentración conocida, realizando luego una serie de diluciones de la misma. El objetivo de la construcción de una curva de calibración es el cálculo del factor de calibración, propio del fluorómetro.

El primer paso para realizar una calibración es la adquisición de un estándar de excelente calidad, comercialmente disponible, de Cla de cianobacteria, ya que sólo posee clorofila del tipo *a* (ej. Sigma-Aldrich catálogo nro. C-6144).

El procedimiento de calibración para la cuantificación fluorométrica de la Cla será explicada en este informe para el caso particular del fluorómetro Turner Designs 10-AU, usando el equipamiento disponible en el laboratorio de "Producción Primaria y Biotoxicidad" del INIDEP, en las siguientes cuatro secciones:

- Preparación de la solución estándar y la solución de trabajo de Cla.
- Ajuste del nivel básico de operación del fluorómetro.
- Realización de una curva de calibración.
- Cálculo del factor de calibración.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE CLOROFILA-*a* ESTÁNDAR Y LA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE CLOROFILA-*a*

Materiales

- Dos recipientes con boca ancha, de vidrio de 25 ml, con buena tapa donde se prepararán la solución stock y la solución de trabajo.
- Pipetas de vidrio aforadas de 1, 3, 5 y 10 ml.
- Propipetas.
- Papel aluminio para cubrir los recipientes con la solución stock y la solución de trabajo.
- Parafilm M para cerrar los recipientes con la solución stock y la solución de trabajo.
- Tubos de vidrio con tapa con volumen de 10 ml para realizar las diluciones.
- Gradilla para tubos de 10 ml.
- Pipeta automática monocanal de volumen variable 10-100 µl.
- Pipeta automática monocanal de volumen variable de 100-1000 µl.
- Tips para las pipetas automáticas.
- Guantes de vinilo.

Reactivos

- Estándar primario de clorofila: vial de 1 mg Cla pura de cianobacteria *Anacystis nidulans* (Sigma-Aldrich catálogo nro. C-6144).



- Acetona 100% grado espectroscópico.
- Metanol 100% grado espectroscópico (o al menos PA).

Equipos

- Espectrofotómetro UV (Shimadzu 2450).
- Agitador orbital tipo "vortex".

Precauciones

- Lavar todo el material de vidrio (celdas, pipetas, etc.) con agua destilada y secar. Lavar cualquier otro material que no sea de vidrio con detergente, agua corriente y finalmente con agua destilada.
- Todo el material volumétrico debe estar calibrado, limpio, seco y sin residuos de ácido.
- Los reactivos deben ser de la mejor calidad posible. La acetona 100% debe ser al menos de grado espectroscópico. El metanol 100% es recomendable también de grado espectroscópico y en su defecto como mínimo grado PA; asimismo debe permanecer libre de residuos de ácido.
- La luz intensa (sobre todo la solar) puede degradar con rapidez la Cla. La manipulación del estándar y la preparación de las soluciones del estándar deben realizarse en un ambiente con luz tenue.
- Es recomendable el uso de guantes.

Preparación de una solución stock de clorofila-a estándar

- a. El estándar primario de Cla pura de cianobacteria comercialmente disponible se encuentra en un vial color caramelo que la protege de la luz, y debe verterse todo su contenido directamente en el recipiente en el cual se preparará la solución stock. Para ello se recomienda colocar un pequeño embudo en la boca del recipiente. Seguidamente invertir el vial con 1 mg de Cla pura en el embudo y golpear suavemente el vial para trasvasar los cristales de Cla desde el vial al recipiente.
- b. Utilizando una pipeta de pequeño volumen adicionar una pequeña cantidad de acetona 100% al vial de clorofila, tratando de enjuagar las paredes del vial en el proceso. Luego, tomar esa solución del vial y agregarla al recipiente. Repetirlo aproximadamente 3 veces o hasta que todo el estándar haya sido transferido al recipiente.
- c. Utilizar una nueva pipeta y agregar en el recipiente un volumen necesario de acetona 100% hasta alcanzar un volumen de 25 ml.
- d. Tapar bien el recipiente, y cubrirlo con papel de aluminio para reducir al mínimo la exposición de luz. e. Vortear el recipiente durante unos 2 minutos hasta que la solución quede homogénea.
- f. Colocar la solución stock en el ultrafreezer por 24 hs.
- g. Retirar del ultrafreezer y aguardar (no más de 30 minutos y en la oscuridad) a que llegue a temperatura ambiente.
- h. Vortear el recipiente durante unos 2 minutos hasta que la solución se homogenice totalmente.



- i. Fraccionar colocando 6 ml en 4 crioviales rotularlos (Ej.: Stock Cla-a estándar-100% acetona-fecha).
- j. Inmediatamente gasear con nitrógeno y guardar en el ultrafreezer los crioviales que no se usaran.

Preparación de una solución de trabajo 6:25 de la solución stock

- a. Trasvasar la alícuota de 6 ml de uno de los crioviales a un recipiente de 25 ml.
- b. Utilizar una nueva pipeta aforada y agregar el volumen necesario de acetona 100% hasta llegar a 25 ml.
- c. Tapar el recipiente, rotularlo y cubrirlo con papel aluminio.
- d. Vortear 2 minutos para homogeneizar la solución.

Nota: La solución de trabajo preparada de esta manera rinde una concentración aproximada (ya que si bien la stock se preparó volumétricamente a partir del estándar de 1 mg original, esta concentración NO es exacta); los volúmenes sugeridos aquí han sido testeados previamente en el Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad del INIDEP para facilitar la preparación de las diluciones en el siguiente paso. La concentración exacta de la solución de trabajo debe ser determinada por espectrofotometría. Parte de la solución de trabajo se utilizará para esta determinación, y el resto del volumen se utilizará para preparar las diluciones con las cuales se realizará la curva de calibración.

Determinación espectrofotométrica de concentración de la solución de trabajo

De acuerdo con la Ley de Beer-Lambert la concentración de Cla de la solución de trabajo se determina de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Cla } [\mu\text{g/L}] = (A_{663} - A_{750}) / (L \cdot E) \quad (1)$$

Donde:

A663 corresponde a la lectura de absorbancia a la longitud de onda de 663 nm. Este valor debe estar en un rango confiable para la sensibilidad del equipo; siendo aproximadamente entre 0,2-0,8 de densidad óptica (Marker *et al.*, 1980).

A750 corresponde a la lectura de la densidad óptica a 750 nm. Este valor se usa para corregir la dispersión de la luz.

E es el coeficiente de extinción específico de Cla pura en acetona 100%, 88,15 L g⁻¹cm⁻¹ (Jeffrey & Humprey, 1975).

Nota: Los coeficientes de extinción recomendados para varios de los pigmentos fitoplanctónicos en distintos solventes se pueden encontrar en el apéndice E de Jeffrey *et al.*, 1997.

L es el camino óptico de la cubeta en cm.

Es recomendable realizar un espectro de absorción de la solución de trabajo de Cla entre 750 y 350 nm a fin de confirmar la pureza de la misma mediante comparación de los máximos y forma del espectro con los provistos en la literatura (Jeffrey *et al.* 1997, pág. 458). Especialmente constatar el cociente entre los picos a 430 y 663 nm, el cual debe ser cercano a 1,23.



Preparación de la serie de diluciones de la solución de trabajo

Se realizan diluciones de la solución de trabajo en metanol 100% para llegar a una serie de concentraciones deseadas entre 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Cla de modo que se encuentren dentro del rango analítico de trabajo del fluorómetro Turner 10-AU. Según Turner Designs en su manual de usuario y EPA en su Método 445.0, usando la cubeta de 13 mm, el límite superior en el cual la respuesta es lineal es de 250 $\mu\text{g/L}$.

En nuestro laboratorio, dado que se utiliza metanol 100% para la cuantificación de las muestras de Cla, y el estándar se prepara en acetona 100% (ya que es el recomendado para su preservación), se busca realizar diluciones tal que el volumen de la alícuota de la solución de trabajo no supere el 5% del volumen total (a fin de considerar que las mismas se hallaban en metanol).

a. Establecer una tabla con las diluciones deseadas (Tabla 1); es recomendable preparar un mínimo de 5 diluciones, idealmente por triplicado, y calcular el volumen de la solución de trabajo requerido para hacer cada dilución según la siguiente expresión:

$$V_t = C_d \cdot V_d / C_t \quad (2)$$

Donde:

C_d : concentración de la dilución deseada [$\mu\text{g/ml}$]

C_t : concentración de la solución de trabajo [$\mu\text{g/ml}$]

V_t : volumen de la alícuota de la solución de trabajo [ml]

V_s : volumen de solvente (metanol 100%) [ml]

V_d : volumen de la dilución [ml], siendo $V_d = V_t + V_s$

Dilución	Conc. dilución ($\mu\text{g/L}$)	Vol. metanol 100% (ml)	Vol. de la sol. trabajo (ml)
1	17	10	0.050
2	34	10	0.100
3	67	10	0.200
4	99	10	0.300
5	132	10	0.400
6	163	10	0.500
7	194	10	0.600
8	209	10	0.650

Tabla 1. Ejemplo con las diluciones utilizadas en una calibración a partir de volúmenes crecientes de una solución de trabajo de concentración 3426 $\mu\text{g/L}$, más un volumen constante de metanol 100%.

b. Adicionar en los tubos de vidrio con tapa, debidamente rotulados, los volúmenes de la solución de trabajo mediante pipeta automática.

c. Adicionar los 10 ml del metanol 100% con pipeta aforada.

d. Vortear cada una de las diluciones con el fin de homogeneizarlas.

Nota: Es importante que la solución de trabajo y las diluciones correspondientes se preparen en el momento de la calibración.



SETEO DEL NIVEL BÁSICO DE OPERACIÓN DEL FLUORÓMETRO TURNER 10-AU

En primer lugar, deben configurarse ciertos parámetros de funcionamiento del instrumento y resetearse los valores de calibración a su posición inicial. Posteriormente se setea el nivel de operación básico del 10-AU para ajustar la sensibilidad del instrumento al rango de concentraciones de Cla a medir. Luego de este primer seteo, **el nivel de operación básico no debe ser alterado a menos que haya habido un cambio significativo en la sensibilidad del instrumento que afecte las mediciones.**

Tanto la configuración de funcionamiento como el ajuste del nivel básico de operación del fluorómetro se realizan siguiendo las instrucciones que figuran en el apéndice 6 del manual de usuario (versión 1.4) provisto por Turner Designs. Es recomendable que el operador lea este procedimiento cuidadosamente antes de comenzar el proceso. La información a continuación puede ser breve y se tendrá que consultar el manual provisto por el fabricante para más detalles. Asimismo se encuentra información adicional en el manual de inicio rápido y en las distintas notas de aplicación de Turner Designs (www.turnerdesigns.com).

Para mayor claridad se explica el procedimiento paso a paso de las etapas a seguir en dos secciones: (1) configuración de los parámetros de funcionamiento y (2) ajuste del nivel de operación básico.

Configuración de los parámetros de funcionamiento

a. Enchufar el Fluorómetro 10-AU y encenderlo 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, tal como se indica en la Figura 1.



Figura 1. Vista general del fluorómetro Turner Designs 10-AU.

b. Una vez encendido el equipo, se observa la pantalla de lectura "HOME". 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, indicados con números (Figura 2). 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. En la pantalla del menú principal "MAIN MENU" oprima el número <1> para acceder a la pantalla 1.0.: "Operational Parameters" que corresponde a la pantalla de seteo de los parámetros de funcionamiento (Figura 3). 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". 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.

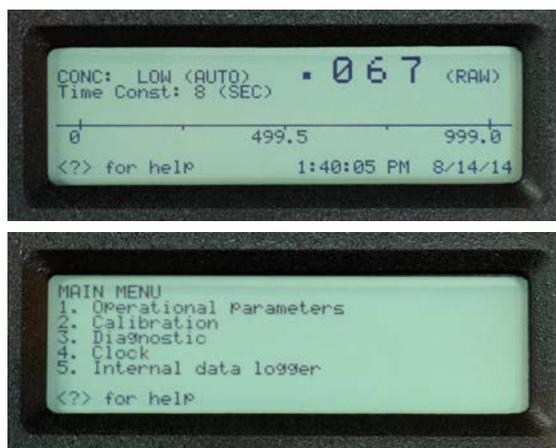


Figura 2. Vistas de la pantalla de lectura “HOME” (arriba) y del menú principal “MAIN MENU” (abajo) del fluorómetro Turner Designs 10-AU.

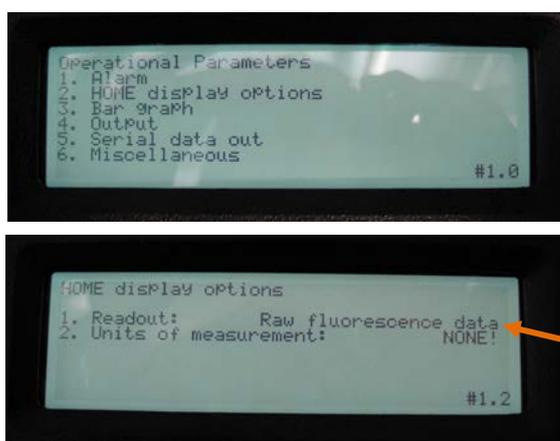


Figura 3. Vista de pantalla 1.0.: seteo de los parámetros operacionales (arriba) y 1.2.: menú de opciones iniciales de visualización (abajo) del fluorómetro Turner Designs 10-AU, donde se puede observar el modo de lectura de fluorescencia en “RAW FLUORESCENCE”.

d. Presione el botón <ESC> dos veces para retornar al menú principal “MAIN MENU” y desde ahí oprima el número <2> para acceder a la pantalla de calibración 2.0.: “Calibration”. Desde la pantalla 2.0. pulsar el <1> para acceder a la pantalla 2.1. de blanqueado: “Blanking”. A continuación oprima <2> y acceda a la pantalla 2.1.2. para setear el instrumental de modo que NO substraiga el blanco (Figura 4).

e. Pulse el botón <ESC> una vez para volver a la pantalla de 2.4. para el establecimiento del intervalo de concentración “Set Concentration Range”. Desde la pantalla de 2.4. presione <3> para acceder a la pantalla 2.4.3.: “Set range control”; presione <ENT> para llevar a MAN para que el ajuste del rango de concentración se realice en forma manual (Figura 5).

f. Pulse el botón <ESC> dos veces para volver a la pantalla de 2.0. Desde la pantalla de 2.0. presione <4>, para acceder a la pantalla de 2.4., luego presione <2>, para acceder a la pantalla 2.4.2. “Set range”. Presione <ENT> para alternar entre “LOW”, “MED” o “HIGH” y cuando llegue al rango de concentración apropiada para el estándar de Cla con el que se va a setear el nivel de operación básica del instrumento, éste quedará automáticamente seteado. En nuestro caso debe



setearse en “HIGH” tal como lo expresado en conversación personal con el fabricante, dado que se utilizará una concentración de 100 µg/L.

Nota: El modelo 10-AU permite mediciones de las muestras con tres rangos de concentración: alto (“HIGH”), medio (“MED”) y bajo (“LOW”). El rango alto lee muestras 10 veces más concentradas que el rango medio y el medio lee muestras 10 veces más concentradas que el rango bajo.

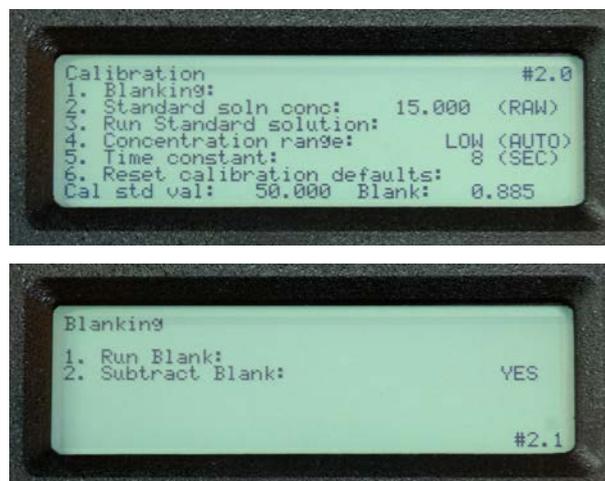


Figura 4. Vista de las pantallas 2.0.: menú de calibración (arriba) y 2.1.: menú de blanqueo (abajo) del fluorómetro Turner Designs 10-AU.

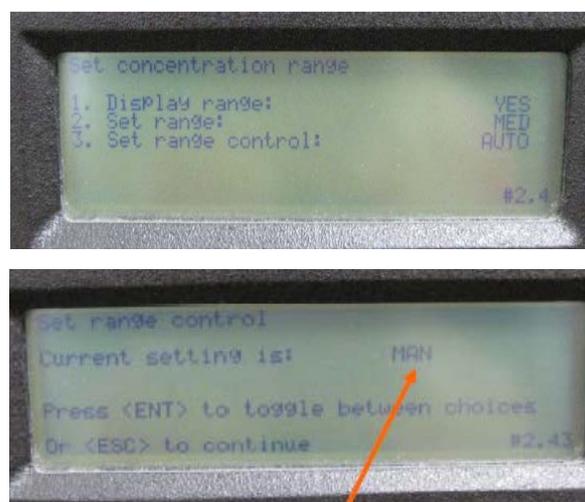


Figura 5. Vista de las pantallas 2.4.: menú principal de seteo del rango de concentración (arriba) y 2.4.3.: menú de seteo del control del rango de concentración del fluorómetro Turner Designs 10-AU (abajo), donde se encuentra indicado el modo de seteo manual (“MAN”) del rango de concentración.

g. Pulse el botón <ESC> dos veces para volver a la pantalla de 2.0. Desde la pantalla 2.0. presione <5> para acceder a la pantalla 2.5. “Time Constant” y luego <2> para acceder a la pantalla 2.5.2. En la pantalla 2.5.2. oprimir <ENT> para setear el tiempo de promedio de las lecturas en 8 segundos. Nota: Un tiempo de 1 segundo permite ver cambios rápidos en la lectura, mientras que 8 segundos genera lecturas más estables.

h. Pulse el botón <ESC> dos veces para volver a la pantalla de 2.0. Desde la pantalla 2.0. presione <6> para acceder a la pantalla 2.6., donde se restablecerán los valores de calibración a su



posición inicial. Esto se realiza presionando el número <9> cinco veces. Una vez realizado este procedimiento se leerá la siguiente información en la pantalla 3.2.: "FS HIGH=900; FS MED=90; FS LOW=9; Span=48%; Blank=0.000; Cal Std Val=50.000; standard soln conc=15.000".

Seteo del nivel de operación básico

Para realizar esta etapa se requiere tener preparada una dilución de la solución de trabajo de Cla pura en metanol 100% de concentración aproximadamente el 50% de la concentración más alta que se desea leer, siempre y cuando la misma se encuentre dentro del rango lineal de lectura. Puede utilizarse una de las diluciones medias de la serie de diluciones para la curva de calibración. Para mayor detalles véase el Apéndice 6A "linealidad" del manual de usuario. Así, por recomendación expresa del fabricante, se seleccionó una concentración de 100 µg/L de Cla en metanol 100%.

Asimismo se necesitan tener alistados los siguientes materiales: una llave Allen de 5/32", una moneda y paños para tareas delicadas tipo "Kimwipes".

a. Desde el menú principal ("MAIN MENU") oprima el número <3> para acceder a la pantalla 3.0 de diagnóstico "Diagnostic", luego oprimir <2> y luego oprimir <ENT> para acceder a la pantalla 3.2., desde donde se setea el nivel de operación básico.

b. Encuentre el tornillo hexagonal de bloqueo de la sensibilidad situado en el panel frontal del instrumento, justo a la izquierda del teclado. Afloje el tornillo de bloqueo (sin quitarlo) girando ligeramente en sentido antihorario con la llave Allen de 5/32" (Figura 6). Deje la llave Allen colocada.



Figura 6. Vista general del fluorómetro Turner Designs 10-AU en el que se indica la posición y dirección de giro para desajustar el tornillo de bloqueo de la sensibilidad.

c. Llenar una cubeta de 13 mm con el estándar de Cla de concentración de 100 µg/L de clorofila en 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.

d. Hallar la "perilla de ajuste de sensibilidad", justo a la izquierda del botón de encendido (Figura 7), la cual permite ajustar el "FULL SCALE" (FS%) al valor apropiado de la concentración del estándar.

Nota: El FS% es un valor (en unidades arbitrarias) que representa el porcentaje de la concentración máxima que puede ser leído en cada rango de concentración. Al girar la perilla, en sentido horario se incrementa el FS%, mientras que girándola en sentido antihorario el FS% disminuye.

Precaución: La perilla de ajuste de sensibilidad es muy sensible, por lo que debe girarse lentamente y un poco a la vez y permitir que la FS% se estabilice antes de hacer otro ajuste.



e. Girar con una moneda la perilla de ajuste de sensibilidad hasta visualizar que el FS en la tercera línea desde abajo de la pantalla 3.2 lea “50% of 900.000 in HIGH” (Figura 8). No es necesario ser exactos en el FS%, una desviación de $\pm 5\%$ es aceptable. Esto establece la concentración máxima que puede ser leída en el rango alto (“HIGH”) alrededor de 200 $\mu\text{g/L}$, tal como lo recomendado por Turner Designs. De esta forma los rangos de concentración (en $\mu\text{g/L}$) quedan ajustados de la siguiente manera: 0-2 $\mu\text{g/L}$ en bajo (LOW), 2-20 $\mu\text{g/L}$ en medio (MED) y 20-200 $\mu\text{g/L}$ en alto (HIGH).



Figura 7. Detalle del fluorómetro Turner Designs 10-AU en el que se indica la posición de la perilla de ajuste de sensibilidad.

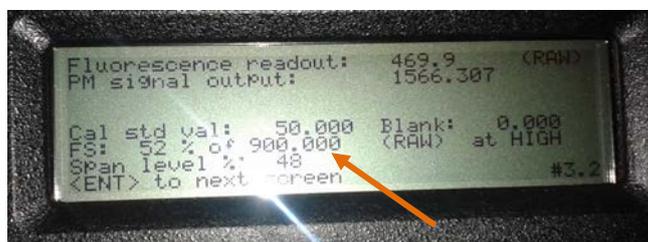


Figura 8. Vista de la pantalla 3.2. donde se observa el correcto seteo de la sensibilidad del fluorómetro Turner Designs 10-AU para Cla.

f. Cuando el FS% alcanza el valor de lectura designado, ajustar el tornillo de bloqueo de la sensibilidad girando el mismo en sentido horario con la llave Allen (Figura 9). Pulse <ESC> para salir de la pantalla 3.2. y retire cuidadosamente la llave Allen. El nivel de operación básico se encuentra ahora seteado y se puede retirar el estándar del fluorómetro 10-AU.



Figura 9. Vista general del fluorómetro Turner Designs 10-AU en el que se indica la dirección de giro para ajustar el tornillo de ajuste de bloqueo de la sensibilidad.



CURVA DE CALIBRACIÓN MEDIANTE LECTURA DE UNA SERIE DE DILUCIONES DE CLOROFILA-a PURA EN METANOL 100%

Materiales

- Paños para tareas delicadas tipo “Kimwipes”
- Vaso grande (2 litros) para descarte.

Reactivos

- Diluciones preparadas de la solución de trabajo de Cla pura en metanol 100% (de acuerdo a lo explicado previamente).
- Metanol (CH₃OH) 100% (al menos grado PA), libre de ácidos.

Equipo

- Fluorómetro 10-AU Turner Designs.

Precauciones

- La lectura de las diluciones debe realizarse en un ambiente con luz tenue para evitar la degradación de las mismas.
- La fluorescencia depende de la temperatura. Por lo tanto, realizar la calibración del equipo a una temperatura ambiente constante entre 20-25 °C.
- Mantener las celdas del fluorómetro boca abajo para evitar que penetren partículas de polvo.

Seteado del Blanco del fluorómetro Turner 10-AU

Antes de la medición de una dilución o una muestra, debe utilizarse un blanco para configurar el cero del instrumento. El blanco es el solvente en el cual se va a medir la Cla.

- Llenar una cubeta de 13 mm con metanol 100%. Secar el exterior de la cubeta con un paño para tareas delicadas e insertar la cubeta en la abertura del compartimiento de muestra. Luego colocar el cobertor de luz.
- El blanco se corre en la pantalla 2.1.1. Desde la pantalla 2.0 oprima <1> para acceder a la pantalla 2.1 del menú de seteado del Blanco “Blanking” y luego oprima <1> para acceder a la pantalla 2.1.1. “Run Blank”.
- Permitir que el porcentaje de lectura del blanco se estabilice; 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 (se espera que sea un porcentaje bajo) (Figura 10).
- Presionar <0> y esperar 15 segundos. Cuando aparece la palabra “FINISHED” en la pantalla (Figura 10) significa que se completó el proceso y que se ha registrado valor del blanco.
Nota: Si uno quisiera conocer el valor del blanco, la señal de fluorescencia para el blanco se almacena como “blank” y se puede acceder a la misma en la pantalla 3.2.
- Una vez que el seteado del blanco se ha completado, presionar <ESC> cuatro veces para salir del menú y volver a la pantalla “HOME” de lectura.
- Con el blanco todavía en el fluorómetro, observar en la pantalla “HOME” la lectura del blanco, la cual debe ser un valor cercano a cero.



g. Ir a la pantalla de sustracción del blanco 2.12: “subtract blank” y seleccionar “YES” o “NO” dependiendo si desea o no que se reste el blanco automáticamente. Un ajuste de “NO” significa que el blanco no se restará. En nuestro caso setear en “YES”.

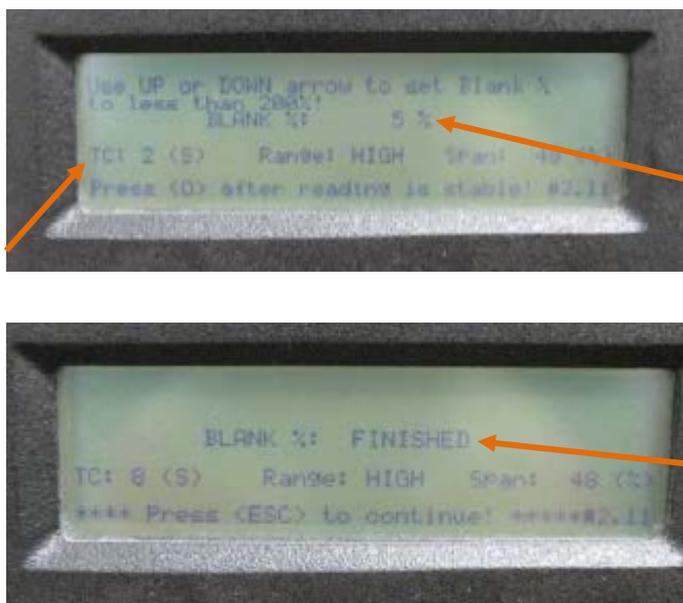


Figura 10. Vistas de la pantalla 2.11. de blanqueado del fluorómetro para Cla previo al seteo del blanco (arriba) y una vez finalizado el seteo del blanco (abajo). Observar el % de seteo del blanco y el TC en la figura superior y el vocablo inglés “FINISHED” al final el proceso de seteo del blanco.

Lectura de la referencia sólida secundaria

Es conveniente verificar la estabilidad del equipo antes del análisis utilizando una referencia sólida secundaria suministrada por Turner Designs. La referencia “L & H” de Turner Designs tiene una sustancia con características fluorescentes similares a la de la Cla y viene sellada en un soporte sólido que se ajusta directamente en el adaptador de la cubeta de 13 mm. El soporte contiene dos concentraciones diferentes que deben leerse en los intervalos de concentración bajo (“LOW”) y alto (“HIGH”) respectivamente.

Nota: La referencia sólida puede ser almacenada a temperatura ambiente ya que no requiere de condiciones especiales de almacenamiento; asimismo se supone que es estable durante largos períodos de tiempo (garantizado durante 2 años, idealmente muchos años más). Si la lectura de la referencia varía en más de un 5% a partir del día de la primera calibración es aconsejable realizar una nueva calibración del instrumento, tal como comenta Turner Designs en su newsletter (Vol. 20, 2010). Si las lecturas de fluorescencia de la referencia siguen siendo variables por encima del 5%, la referencia debe ser reemplazada por una nueva y realizar una nueva calibración del instrumento para comprobar la estabilidad (si la variabilidad persiste comunicarse con el personal técnico de Turner Designs).

a. Acceder a la pantalla de 2.4 y establecer el control de rango de concentración en la posición automática “AUTO”. En este modo 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. Presione el botón <HOME> para retornar al menú de lectura (“HOME”).



b. 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 (Figura 11, izquierda). 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 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").

c. Retirar el cobertor, levantar ligeramente la referencia y rotarla 180 grados de modo tal que la letra "H" (grabada en la parte superior del soporte) se encuentre hacia el lado izquierdo (Figura 11, derecha). Realizar la misma operatoria que en el inciso anterior y anotar el valor en "HIGH" ("H").

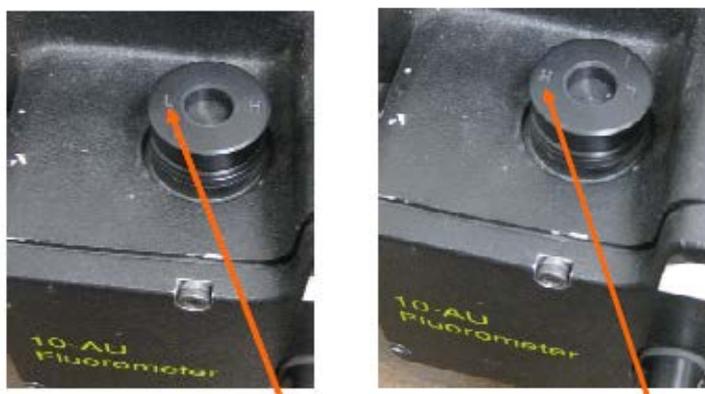


Figura 11. Vistas del compartimento de medición en el que muestra la posición correcta de la referencia sólida secundaria del fluorómetro Turner Designs 10-AU. Izquierda: posición para lectura en "LOW"; derecha: posición para lectura en "HIGH".

Lectura de la serie de diluciones de clorofila-a para construir la curva de calibración

El procedimiento aquí descrito es similar a la operación de rutina para la medición de muestras naturales (para más información, ver la Sección 3C "operación de rutina" del Manual del usuario). Se recomienda iniciar las lecturas de las diluciones desde la más diluida hacia la más concentrada.

a. Invertir suavemente el tubo con la dilución para mezclar, verter aproximadamente 0.5 ml de la dilución en la cubeta, enjuagarla y vaciarla. Llenar la cubeta entre dos tercios y tres cuartos de su capacidad. Limpiar las paredes de los tubos con un paño para tareas delicadas.

Nota: El volumen de medición mínimo que se requiere utilizar con las cubetas de 13 mm para medir con precisión una solución sin interferencia es de 5 ml.

b. Colocar la cubeta en el fluorómetro, colocar el cobertor de luz y esperar entre 5 a 10 segundos, mientras que el instrumento encuentra el rango correcto. Desde la pantalla de lectura "HOME" oprima la tecla <*> para iniciar la 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 dilución sea leída en un mismo período de tiempo.

Cuando la palabra la palabra "done" aparece en la esquina superior derecha de la pantalla, se ha completado la lectura. La lectura se mostrará durante 10 segundos. Anotar el valor de lectura de fluorescencia de la dilución.



Nota: Si el fluorómetro lee “OVER” en el rango “HIGH” significa que la dilución es demasiado concentrada para ser leída en la calibración actual y probablemente este fuera del rango lineal.

- c. Retirar la cubeta. Remover la dilución y enjuagar la cubeta con metanol 100%. Enjuagar al menos 2 veces. Voltear la cubeta sobre un papel absorbente limpio para retirar el excedente de metanol.
- d. Colocar la siguiente dilución tal como lo indicado en el paso ‘a’. Repetir las instrucciones indicadas en los pasos ‘a-c’ hasta que todas las diluciones hayan sido leídas.
- e. Una vez finalizada la calibración, medir la referencia secundaria tal como se indicó previamente, y utilizar esta lectura para verificar la estabilidad del equipo. Comparar la lectura con aquella realizada al principio para asegurarse que el instrumento no ha derivado.
- f. Oprimir el botón rojo para apagar el fluorómetro.

CÁLCULO DEL FACTOR DE CALIBRACIÓN

El factor de calibración (k) es la pendiente de la ecuación de la recta resultante de la regresión lineal simple de la totalidad de las lecturas de fluorescencia versus las concentraciones de Cla de las diluciones.

Nota: Si bien el valor esperado de R^2 para dicha regresión debe ser ≥ 0.95 ($p < 0,05$), se requiere de un análisis de los residuales en cada punto de calibración, para hallar el error relativo porcentual (ERP) como medida de la precisión y para detectar la presencia de valores atípicos o “outliers”. El error relativo porcentual, expresa la diferencia entre los valores observados (y) respecto de los predichos por el modelo (\hat{y}) según la siguiente expresión:

$$ERP = \frac{y - \hat{y}}{\hat{y}} \cdot 100 \quad (3)$$

Idealmente el ERP debería ser inferior al 2% (Thomas, com. pers.)¹, en caso contrario se deben eliminar los “outliers”.

Bibliografía

ARAR, E. J., COLLINS, G. B., & UNITED STATES. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. OFFICE OF WATER. U.S. 1997. Environmental Protection Agency Method 445.0: In vitro determination of chlorophyll a and pheophytin a in marine and freshwater algae by fluorescence, revision 1.2. National Exposure Research Laboratory, Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency, Cincinnati: Ohio, 22 pp.

JEFFREY, S.W.& WELSCHMEYER, N.A. 1997. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. En: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (Eds.) Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods. Monographs on Oceanographic Methodology, 10. UNESCO Publishing: Paris: 597 – 615.

¹Crystal S. Thomas, Science Systems and Applications, Inc., NASA Goddard Space Flight Center, Greenbelt, 20771-Maryland, Estados Unidos.



LORENZONI, L. & BENWAY, H. M. (Eds.), 2013. Report of Global Intercomparability in a changing ocean: An International time-series methods workshop, November 28-30, 2012, Ocean Carbon and Biogeochemistry Program and International Ocean Carbon Coordination Project, 61 pp.

LUTZ, V.A., BARLOW, R., TILSTONE, G., SATHYENDRANATH, S., PLATT, T. & HARDMAN-MOUNTFORD, N. 2007. 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. GOOS Report No. 171 UNESCO Publishing: Paris, 18 pp.

MARKER, A.F.H., NUSCH, E.A., RAI, H. & RIEMANN, B. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardisation of methods: conclusions and recommendations. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 14, 91-106.

TREES, C.C., BIDIGARE, R.R., KARL, D., VAN HEUKELEM, L. & DORE, J. 2003. Chapter 3. Fluorometric chlorophyll a: sampling, laboratory methods, and data analysis protocols. En: Mueller, J.L., Fargion, G.S. & MacClain, C.R (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, 15-25.

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. 2010. Turner Designs Newsletter Vol. 20. [web en línea] <<http://www.turnerdesigns.com/february-2010>> [Consulta: 19 agosto 2014].

TURNER DESIGNS. 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. Sunnyvale, California: Turner Designs Inc. 6 pp.

TURNER DESIGNS. Turner Designs Technical Note: 10-AU Solid Secondary Standard Use with Discrete Sampling S-0138 Revision A Sunnyvale, California: Turner Designs Inc. 6 pp.

TURNER DESIGNS. Turner Designs Quick Start Operating Instructions: 10-AU Field Fluorometer. Revision 1.2. 998-0014. Sunnyvale, California: Turner Designs Inc. 13 pp.

VARELA, R. 2011. Método 13. Determinación de Clorofila-a y Feopigmentos. En: Astor, Y. M.; Fanning, K.; Guzman, L.; Li, X.; Lorenzoni, L.; Masserini, R.; Muller-Karger F.; Tappa, E. & Varela, R. (Eds.). Manual de Métodos para el Análisis de Parámetros Oceanográficos en la Estación Serie de Tiempo CARIACO, 79-85.

WELSCHMEYER, N. A. 1994. Fluorometric analysis of Chlorophyll a in the presence of Chlorophyll b and phaeopigments. Limnol. Oceanogr., 39 (8):1985-1992.