

# El problema de la determinación de clorofila a en el fitomicrobentos: discusión sobre la metodología \*

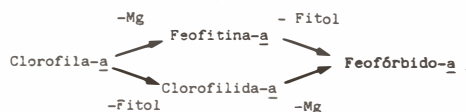
MANUEL VARELA

Instituto Español de Oceanografía. Muelle de Animas s/n. Apto. 130. La Coruña

## INTRODUCCIÓN

Está demostrado que los productos de degradación de la clorofila representan en el bentos una fracción importante del total de pigmentos verdes presentes. Estas formas degradadas o inactivas absorben luz en la parte roja del espectro y esta absorción no es distinguible de la de las formas activas. Las técnicas empleadas para la determinación de pigmentos deben por tanto tener en cuenta esta circunstancia, porque de lo contrario los resultados obtenidos serían poco fiables.

El esquema de la degradación de la clorofila-a es el siguiente (YENTSCH, 1967):



La pérdida del núcleo magnésico y de la cadena fitol degrada la clorofi-

la-a a feofórbido-a, a través de la feofitina-a o de la clorofilida-a, según el esquema señalado.

La clorofilida y sus formas oxidadas presentan un espectro de absorción idéntico al de la clorofila-a y, por tanto, en los análisis espectrofotométricos estas clorofilas degradadas se valorarán como clorofila activa. Por otra parte, feofitina y feofórbido (feopigmentos) presentan un espectro ligeramente diferente al de la clorofila activa. La absorción en la parte roja del espectro se desplaza de 665 a 667 nm y decrece aproximadamente en un 50 % (fig. 1). Sin embargo, esta diferencia es tan escasa que no permite una clara distinción entre los pigmentos, y por tanto los feopigmentos pueden interferir seriamente las determinaciones espectrofotométricas de clorofila-a, ya que estos productos se incluirán como si casi la mitad de la correspondiente cantidad de clorofila estuviese presente.

La clorofila-a puede ser transformada en feofitina-a y la clorofilida en feofórbido, acidificando los extractos de pigmentos con ácidos minerales diluidos. Partiendo de esta base, se

\* Este trabajo ha sido realizado con fondos del programa cooperativo hispano-americano "INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DE LAS RÍAS DE GALICIA", nº de proyecto 0020.

han desarrollado procedimientos espectrofotométricos con los factores de corrección adecuados para permitir discriminar entre clorofila-a (incluyendo clorofilida y formas oxidadas) y feopigmentos (suma de feofitina y feofórbito) (LORENZEN, 1967; TETT *et al.*, 1975). La cantidad de pigmentos puede así obtenerse indirectamente de la relación entre las absorbancias antes y después de la acidificación. Esta relación puede variar desde un mínimo de 1, en el caso de la existencia exclusiva de feopigmentos, hasta un valor máximo si éstos se encuentran ausentes.

### ELECCIÓN DEL SOLVENTE

Los criterios a tener en cuenta para la elección de un solvente están basados en la capacidad extractora, por

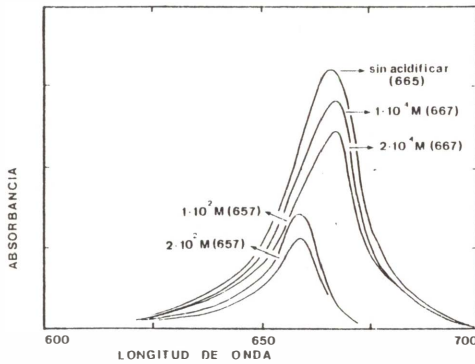


Fig. 1. Espectros de absorción de un extracto de acetona al 100 % procedente del alga verde *Scenedesmus dimorphus*, tratado con diferentes concentraciones de ClH (MOED & HALLEGRAEFF, 1978).

Fig. 1. Absorption spectra of 100 % acetone extract of the green alga *Scenedesmus dimorphus*, treated with a successively increasing molarity of ClH (MOED & HALLEGRAEFF, 1978).

Tabla I - Eficiencia del metanol absoluto y de la acetona al 90 % en la extracción de clorofila-a, en diatomeas y cianofíceas (de HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978).

GRUPO TAXONOMICO	TIEMPO (h) EXTRACCION	µg CLOROFILA-a/MUESTRA	
		ACETONA 90%	METANOL
Diatomeas	1	34,2±0,4	37,0 0,6
	6	35,1±0,8	-
	12	36,2±0,7	-
	20	36,8±0,6	-
Cianofíceas	1	28,6±0,2	34,1 0,4
	6	29,4±0,4	-
	12	29,8±0,8	-
	20	30,0±0,5	-

un lado, y la estabilidad de los pigmentos en él durante los procesos de extracción y acidificación, por otro.

### CAPACIDAD DE EXTRACCIÓN

Los solventes más ampliamente utilizados son, tanto en oceanografía como en limnología, el metanol absoluto y la acetona al 90 %. Como extractor, el metanol es mucho más rápido y eficaz que la acetona, como puede verse en la tabla I. Al cabo de una hora, la extracción fue completa en metanol, pero incompleta en el caso de la acetona. Después de 20 h las muestras de diatomeas se aproximan al 100 % de extracción, mientras que en cianofíceas son sólo un 88 % comparadas con las muestras de metanol. Sin embargo, si las muestras son trituradas y extraídas durante unas pocas horas, los resultados son comparables en ambos solventes. Por tanto, cuando se emplea acetona, si se desea una extracción completa, las muestras deben triturarse o bien extraerse duran-

te al menos 24 h, aunque en este caso la extracción no sea completa en algunos grupos, especialmente clorofíceas y cianofíceas. Como se comprobará posteriormente, la acetona presenta durante los procesos de acidificación numerosas ventajas comparada con el metanol, haciendo que su uso sea preferible al de éste. Además, dado que las diatomeas constituyen en general el grupo más abundante del fitomicrobentos, el empleo de acetona no conduce a grandes subestimaciones de la cantidad de clorofila. Incluso en el caso de la presencia de organismos en los que la extracción sea incompleta con acetona, puede incrementarse la eficacia de ésta, hasta el nivel de la del metanol, utilizando una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) y acetona a partes iguales (V/v) (tabla II). Por otra parte, el DMSO no modifica el espectro de absorción de la clorofila-a.

#### ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS EN DISTINTOS SOLVENTES

Como ya se ha señalado, el cambio en la absorbancia de una solución de pigmentos después de la acidificación, es la base de los métodos espectrofotométricos para la estimación de clorofila en presencia de feofitina. Los métodos están basados en la suposición de que el coeficiente de absorción de la feofitina, próximo a 665 nm, no varía con la acidificación. Esta suposición es sin embargo incorrecta, y el coeficiente de absorción puede variar ampliamente dependiendo del tipo de solvente, su contenido en agua y la molaridad del ácido en el extracto y por tanto del pH.

La figura 1 muestra claramente la

influencia en el espectro de distintas concentraciones de ácido. Si la molaridad final del ácido se mantiene por debajo de ciertos valores, la degradación de la clorofila-a a feofitina-a provoca el desplazamiento del máximo de absorción, en la parte roja del espectro, de 665 a 667 nm. Un incremento en la concentración de ácido origina un corrimiento del máximo a 657 nm. Por la observación de la figura, resulta evidente que la aplicación de bajas concentraciones de ácido, junto con cortos tiempos de reacción, es insuficiente para asegurar la conversión de toda la clorofila

Tabla II - Comparación de la eficacia extractora de acetona al 90 % y dimetilsulfóxido (DMSO + acetona 90 %, v/v) (de SHOAF & LIUM, 1976).

GRUPO TAXONÓMICO	EXTRACTOR	mg/l
		CLOROFILA-a
<b>Diatomeas</b>		
<u>Nitzschia</u> sp.	DMSO	1,32
	Acetona	1,31
<u>Cyclotella</u> sp.	DMSO	0,86
	Acetona	0,86
<b>Clorofíceas</b>		
<u>Chlorella pyrenoidosa</u>	DMSO	2,66
	Acetona	0,64
<u>Selenastrum capricornutum</u>	DMSO	1,18
	Acetona	0,02
<u>Ankistrodesmus braunii</u>	DMSO	1,05
	Acetona	0,21
<b>Cianofíceas</b>		
<u>Anacystis nidulans</u>	DMSO	0,40
	Acetona	0,40
<u>Anabaena flos-aquae</u>	DMSO	2,45
	Acetona	2,45
<u>Fremyella diplosiphon</u>	DMSO	3,28
	Acetona	3,16

presente en feofitina, y en este caso se obtendrían valores de feofitina muy elevados, y valores de la relación entre las absorbancias antes y después de la acidificación ( $R$ ) muy bajos. De otro lado, una fuerte acidificación hace que el pico de absorción se desplace de 667 a 657 nm. Esto se debe (USACHEVA, 1971) a la existencia de un equilibrio, dependiente del pH, entre la forma neutra de la feofitina, su monocación y su dicación. La aparición del pico de absorción a 657 nm sería indicativa de la formación de dicaciones de feofitina. En aquellos casos en que estas transformaciones no hayan sido detectadas, esto llevaría a la obtención de valores de feopigmentos muy bajos, incluso negativos, y valores de  $R$  altos. Una concentración de ácido elevada puede incluso

llegar a incrementar de forma considerable la absorción de fondo, utilizada para corregir la turbidez de la solución, introduciendo de esta forma nuevos errores en el cálculo de pigmentos. Este incremento de la absorción a 750 nm se debe a la escisión de la fucoxantina en productos de tipo furano (fig. 2).

El empleo de metanol como solvente presenta problemas semejantes al de la acetona, con desplazamientos de los máximos de absorción hacia longitudes de onda menores de la esperada (fig. 3).

Esta reacción es mucho más rápida en metanol acuoso que en acetona acuosa. La transformación de monocaciones de feofitina en sus respectivos dicaciones tiene lugar a un pH  $< 2$  en metanol acuoso y sólo a pH  $< 0,5$  en acetona acuosa. Este desplazamiento del espectro es com-

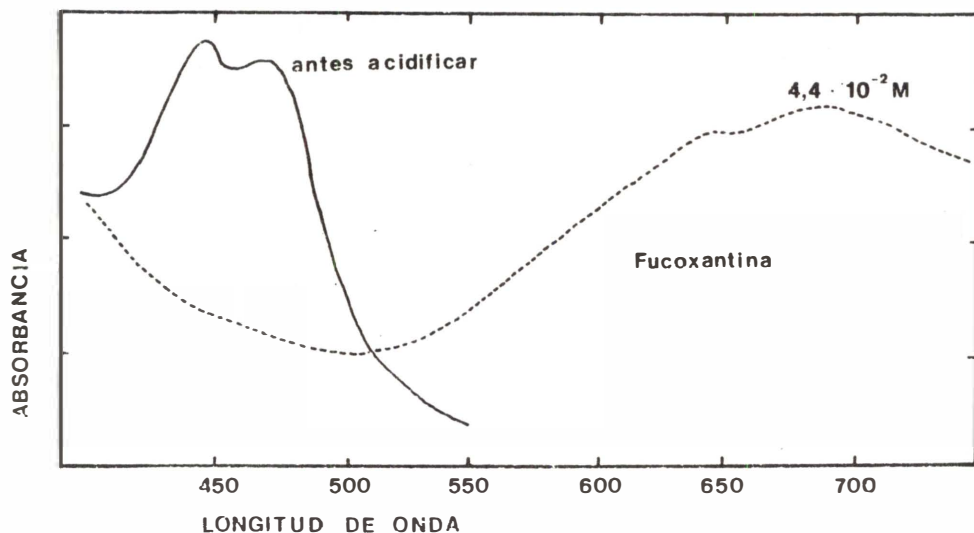


Fig. 2. Espectros de absorción de la fucoxantina antes (—) y después (---) de ser acidificado el extracto (100 % de acetona) hasta una molaridad final de ClH de  $4,4 \times 10^{-2} M$  (MOED & HALLEGRAEFF, 1978).

Fig. 2. Absorption spectra of fucoxanthin before (—) and after (---) acidification with ClH. Final molarity of the acid,  $4,4 \times 10^{-2} M$  (MOED & HALLEGRAEFF, 1978).

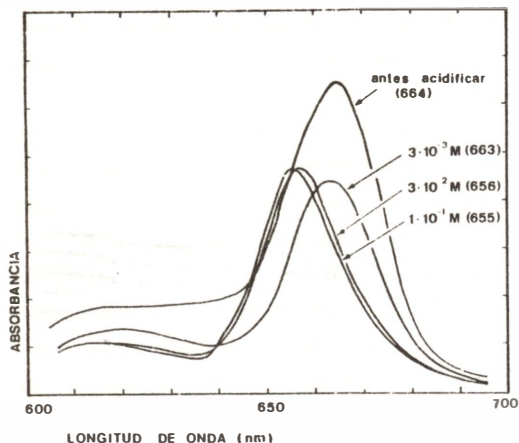


Fig. 3. Espectros de absorción de pigmentos extraídos en metanol de un cultivo de *Dunaliella tertiolecta* (HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978).

Fig. 3. Absorption spectra of pigments extracted in methanol from a culture of *Dunaliella tertiolecta* (HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978).

pletamente reversible mediante neutralización con  $\text{Ca}_3\text{Mg}$ , lo cual indica la existencia de un cambio físico más que de uno químico de transformación en feoforbido.

Estos cambios espectrales de la feofitina en relación con el pH, han sido señalados para metanol al 80, 90, 95 y 100 % (LIVINGSTONE *et al.*, 1953; MARKER, 1972) y 100 % de acetona (MOED & HALLEGRAEFF, 1978), y no fueron detectados en acetona al 80, 90 y 95 %. Esto es debido a que en acetona acuosa es necesario alcanzar un pH tan bajo como 0,5 para que comience la formación de dicaciones de feofitina, mientras que en metanol acuoso esta transformación tiene lugar ya a un pH de 2. Por tanto, cuando se emplee el metanol como **solvente, después de la acidificación** es necesario neutralizar el extracto hasta un nivel de pH en el cual no se

presente formación de dicaciones. HOLM-HANSEN & RIEMANN (1978) aconsejan el empleo de 25 mg de  $\text{CO}_3\text{Mg}$  por ml de extracto, para una concentración final de ácido  $3 \times 10^{-3}\text{M}$ , con un tiempo de reacción de 10 minutos y agitación suave.

#### MEDIDAS DEL pH ANTES Y DESPUÉS DE LA ACIDIFICACIÓN

MOED & HALLEGRAEFF (1978) han llevado a cabo un completo estudio acerca de la influencia del pH del extracto en la absorbancia de los pigmentos, que permite explicar de forma clara numerosos problemas que plantea la acidificación, en un intento de caracterizar las condiciones óptimas de la misma en relación con la molaridad final del ácido. En este sentido, la determinación del pH en los extractos parece ser un criterio más adecuado que el cálculo de la molaridad del ácido puesto que aquél no depende únicamente de la cantidad de ácido añadido sino también del contenido en agua del solvente. De todas formas las medidas de pH en solventes acuosos orgánicos deberían ser interpretadas con grandes precauciones, ya que el concepto de pH ha sido definido únicamente en relación con el agua como solvente.

La adición de incluso pequeñas cantidades de ClH diluido a solventes orgánicos con un bajo contenido en agua ( $\leq 5\%$ ) hace descender el pH, en sólo un minuto, a valores comprendidos entre 0,5 y 2,0; mientras que la misma cantidad de ácido en solventes con un mayor contenido en agua (10-20 %), da lugar a valores de pH que oscilan entre 2,5 y 3, dependiendo de la naturaleza del solvente (fig. 4). El consumo de ácido

es, pues, mayor cuanto mayor sea la cantidad de agua, y es superior en metanol que en acetona para la misma cantidad de agua. En soluciones acuosas de metanol y acetona la completa degradación de clorofila en feofitina tiene lugar a un pH comprendido entre 2,6 y 2,8.

La rotura de la fucoxantina en furanos y el incremento subsiguiente de la absorción a 750 nm es dependiente del tiempo y comienza a un pH  $\leq 2-2,5$ , veri-

ficándose de forma muy lenta y siendo mucho más rápida a un pH comprendido entre 1 y 1,5.

Dado que el pH final del extracto no es únicamente función de la molaridad del ácido sino del contenido en agua del mismo, los cálculos del pH del extracto, a partir de la concentración del ácido en el mismo, no corresponden al valor real. Por esta razón, aun cuando teóricamente una concentración de ácido en el extracto entre 2 y  $3 \times 10^{-3}$  daría el rango de pH señalado como idóneo (2,6-2,8), en la práctica esto no es cierto. La figura 4 representa la disminución del pH en relación con la cantidad de ácido añadido a distintos solventes con diferentes concentraciones de agua. A partir de la misma se puede deducir el volumen de ácido a añadir a distintos volúmenes de extracto. Muchos autores acidifican directamente en la cubeta del espectrofotómetro aunque sería preferible utilizar extractos de mayor volumen con objeto de poder añadir cantidades exactas de ácido. Además, dado que numerosos investigadores usan acetona, metanol e incluso etanol con variadas concentraciones de agua, sería conveniente que, en cada caso, se estableciese el volumen de ácido requerido para alcanzar el pH señalado: 2,6-2,8.

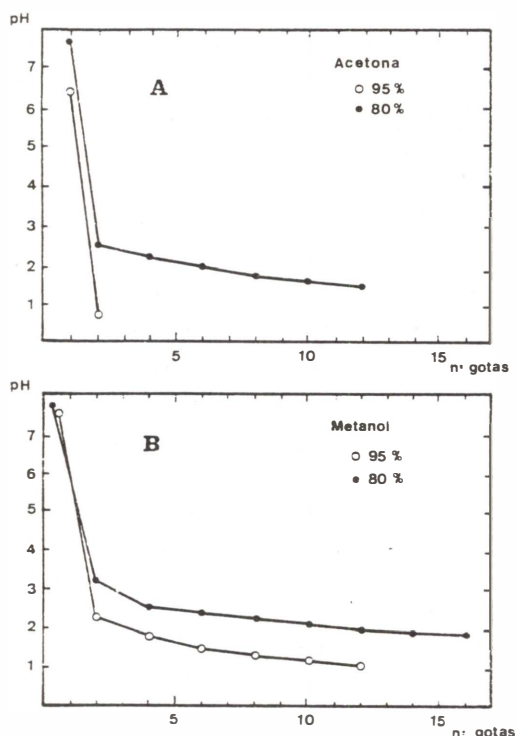


Fig. 4. Variación del pH en relación con la cantidad de ácido (ClH 0,4 M) añadido a 25 ml de diferentes extractos de acetona y metanol con distintas concentraciones de agua (MOED & HALLEGRAEFF, 1978).

Fig. 4. Effect of the addition of an increasing amount of acid (0,4 M ClH) on the pH of extracts (25 ml) of acetone and methanol with different water contents (MOED & HALLEGRAEFF, 1978).

#### CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS

Una vez obtenidos los extractos en acetona del 90 %, las lecturas se realizan en el espectrofotómetro a 665 nm, antes y después de la acidificación con ClH, corregidas por la lectura a

750 nm y con las precauciones anteriormente señaladas en relación con la cantidad de ácido añadido.

El cálculo de la concentración de clorofila-a se obtiene a partir de las siguientes ecuaciones (LORENZEN, 1967):

$$\text{Clorofila a (mg/m}^2\text{)} = \frac{AxKx(6650-665a)vx10}{LxS}$$

$$\text{Feofitina a (mg/m}^2\text{)} = \frac{AxKx(Rx665a-6650)vx10}{LxS}$$

(A, coeficiente de absorción de la clorofila a = 11,0; K, factor para igualar la reducción en la absorbancia a la concentración inicial de clorofila = 2,43; 6650, absorbancia antes de la acidificación, corregida; 665a, absorbancia después de la acidificación, corregida; v, volumen de extracto acetónico en ml; 10, factor de conversión a m<sup>2</sup>; L, longitud de paso de la cubeta en cm; S, superficie de la muestra, en cm<sup>2</sup>; R, máxima relación de 6650/665a en ausencia de feopigmentos = 1,7).

#### LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS NORMALMENTE UTILIZADOS

Los métodos espectrofotométricos empleados para la determinación de pigmentos, tal como el descrito anteriormente (LORENZEN, 1967) u otros similares (HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978; TETT *et al.*, 1975), así como los de fluorescencia (YENTSCH & MENZEL, 1963; HOLM-HANSEN *et al.*, 1965), proporcionan estimaciones poco válidas ya que la medida de clorofila-a corresponde a la suma de clorofila-a y clorofilida-a y la de feofitina-a a la suma de feofitina-a y feofórbido-a. Esto supone un serio

inconveniente, especialmente en muestras bentónicas, en donde estos productos de degradación pueden representar un elevado porcentaje de la cantidad total de pigmentos. Por otra parte, si la clorofila-b está presente, se obtiene un valor de feofitina-a muy alto, ya que el espectro de absorción de la feofitina-a y de la feofitina-b en los extractos acidificados es muy semejante (fig. 5). JEFFREY (1974) comenta estas limitaciones y señala que cualquier método que no implique la separación física de los pigmentos proporciona resultados poco precisos y está comprometido por la presencia de productos de degradación nuevos, resultantes de la acidificación de las muestras. Este autor propone la utilización de técnicas de cromatografía en capa fina, las cuales permiten la separación de las formas principales de clorofila (a, b y c) y carotenoides, así como feofitinas, feofórbidos y clorofilidas. Sin embargo, en la estimación de la biomasa de la microflora bentónica, en la que el problema de la patchiness exige la toma de numerosas muestras son quizá preferibles a aquéllos más exactos pero lentos.

#### UNA APROXIMACIÓN AL PROBLEMA

El empleo de técnicas de separación de fase es sugerido por JEFFREY (1974) como una opción para mejorar la metodología normalmente utilizada. WHITNEY & DARLEY (1979) desarrollan en este sentido un procedimiento para la determinación precisa de clorofila-a en muestras que contienen grandes cantidades de productos de degradación. La partición con

hexano de un extracto acetónico da lugar a un sistema de dos fases. La hiperfase contiene los carotenos, clorofilas a y b y feofitinas a y b, debido a que estos componentes retienen la cadena no polar (fitol). La hipofase contiene la clorofila-c, parte de carotenos y los productos de degradación de la clorofila que carecen del grupo fitol, clorofilidas a y b y feofórbridos a y b. De esta forma, la partición con hexano separa las formas degradadas de la clorofila activa. La clorofila a puede entonces ser calculada en la capa de hexano, en presencia de feofitina-a por una ligera modificación de las ecuacio-

nes de LORENZEN (1967). Dado que este procedimiento supone una importante mejora en la metodología, es más simple y rápido que las técnicas cromatográficas en uso, y no requiere equipo especial, será descrito en detalle.

La partición con hexano es como sigue: 10 ml de un extracto acetónico (90 % de acetona) se añaden a 3,5 ml de ClNa al 0,05% y 13,5 ml de hexano (de grado espectroscópico, rango de ebullición: 68,0-68,8) en un embudo de decantación de 60 ml. El embudo es agitado fuertemente durante 5 minutos en una agitadora recíproca a 60 vibraciones por minuto, para alcanzar una máxima

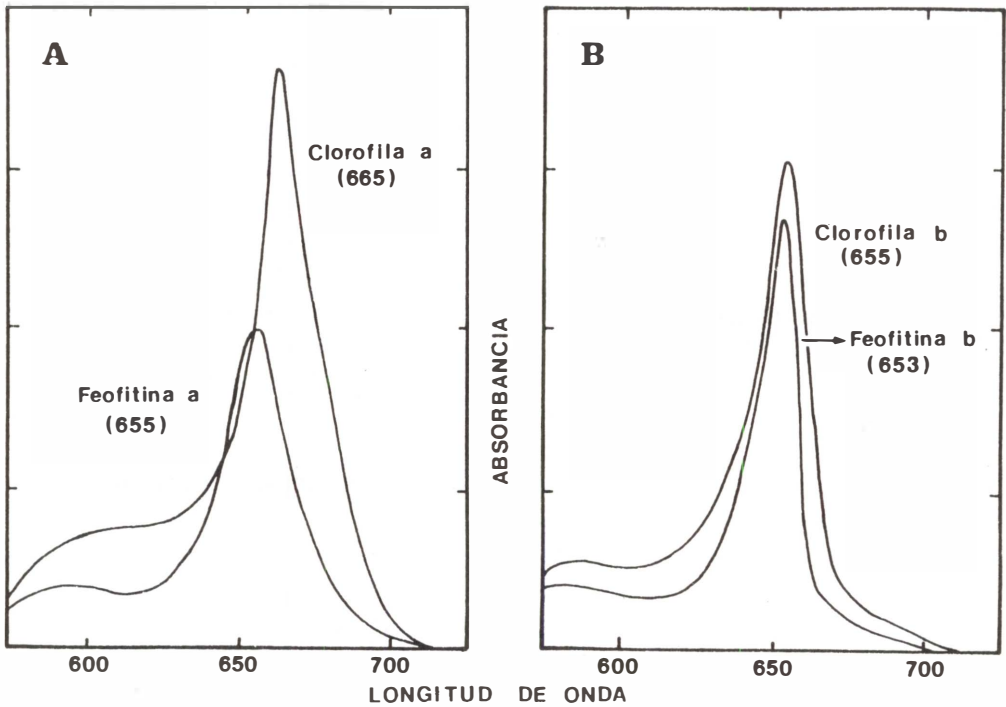


Fig. 5. Espectros de absorción de las clorofilas a y b y feofitinas a y b en metanol. Acidificación hasta una molaridad de  $3 \times 10^{-2} M$  (HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978).

Fig. 5. Absorption spectra for chlorophylls a and b and phaeophytins a and b in methanol. Molarity of the acid in the extract,  $3 \times 10^{-2} M$  (HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978).



separación. Después de eliminar la hipofase acetónica, dos alícuotas de la hipofase, de 5 ml cada una, se recogen en viales de vidrio de 20 ml de capacidad. Una gota del ClH al 50 % se añade a uno de los viales agitándose a continuación para convertir la clorofila en feofitina. Aproximadamente 0,5 g de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro se añade a cada vial con objeto de secar el hexano. Las absorbancias de las dos soluciones de hexano se miden contra un blanco de hexano a 663 y 750 nm en un espectrofotómetro. La concentración de clorofila-a puede entonces ser calculada a partir de las ecuaciones de LORENZEN (1967), adaptándolas a las muestras de hexano.

$$\text{Clorofila a (mg/m}^2\text{)} = \frac{AxKx(663o-663a)xVxvx10}{LxS}$$

$$\text{Feofitina a (mg/m}^2\text{)} = \frac{AxKx(Rx663a-663o)xVxvx10}{LxS}$$

(A, coeficiente de absorción de la clorofila-a en hexano = 11,05; K, factor para igualar la reducción en la absorbancia a la concentración inicial de clorofila = 1,82; 663o, absorbancia del extracto original corregida; 663a, absorbancia del extracto acidificado; V, factor de corrección para la diferencia de volumen entre las capas de hexano y acetona = 1,6; v, volumen del extracto acetónico original en ml; 10, factor de conversión a  $\text{m}^2$ ; L, longitud de paso de cubeta en cm; S, superficie de la muestra en  $\text{cm}^2$ ; R, relación 663o/663a para clorofila-a pura = 2,23).

La transferencia de clorofila-a a la capa de hexano es independiente de la concentración de clorofila-a en el rango estudiado por los autores (hasta 3 mg/l de acetona) y es prácticamente

completa (100,3±0,8%), de acuerdo con las determinaciones de la absorbancia de la clorofila remanente en la hipofase acetónica. Aunque la presencia de extracto de sedimento interfiere algo la transparencia, este problema se reduce en gran parte agitando los solventes durante 5 minutos.

Usando feofitina-a obtenida por acidificación y neutralización de clorofila-a pura, se ve que su espectro de absorción no varía con el pH (MARKER, 1977) en hexano. Los valores de R próximos a 1,0 de muestras fecales apoyan esta conclusión (tabla III). La relación de las absorbancias antes y después de la acidificación, R, varía significativamente con pequeños cambios en la longitud de onda para ambos solventes, pero de manera especial en los extractos de hexano (fig. 6). El grado de hexano empleado afecta también a esta relación. Por esto es necesario calibrar cuidadosamente el espectrofotómetro utilizado, determinando la longitud de onda a la cual se obtiene el máximo de absorción, o bien estableciendo el valor de R para el aparato, usando clorofila purificada por cromatografía.

Los pares de muestras analizadas por ambos métodos, acetona y hexano, son comparables, ya que proceden de la misma solución de acetona. Los valores obtenidos para clorofila-a y feofitina-a pura son iguales. Para muestras con productos de degradación, el hexano proporciona valores de clorofila-a más bajos. Las clorofilidas son retenidas en la hipofase acetónica durante la partición y por tanto no son medidas como pigmento activo. Estas diferencias en porcentaje de pigmento activo pueden

Tabla III - Comparación de las cantidades de clorofila-a y feofitina-a obtenidas por los métodos de acetona y hexano, en varios tipos de muestras. Concentraciones en mg de pigmento por litro de extracto acetónico (de WHITNEY & DARLEY, 1979).

	Acetona			Hexano		
	R		feofitina	R		feofitina
	664o:664a	Cl-a		663o:663a	Cl-a	
Clorofila-a pura	1,802	23,896	0,002	2,227	23,898	0,009
<i>Cylindrotheca fusiformis</i> (cultivo)	1,768	37,893	1,138	2,105	34,083	7,139
Fitoplancton	1,569	5,400	2,215	1,798	3,592	1,926
Fango	1,544	9,583	4,548	1,711	7,648	5,547
Heces	1,054	0,525	7,270	1,057	0,200	4,085
Feofitina pura	1,021	0,128	4,651	1,050	0,164	3,958

ser de hasta el 62 % (tabla IV). Incluso en la fase logarítmica de cultivo de *Cylindrotheca fusiformis*, el porcentaje de productos degradados de la clorofila-a puede alcanzar el 10 % (tabla III).

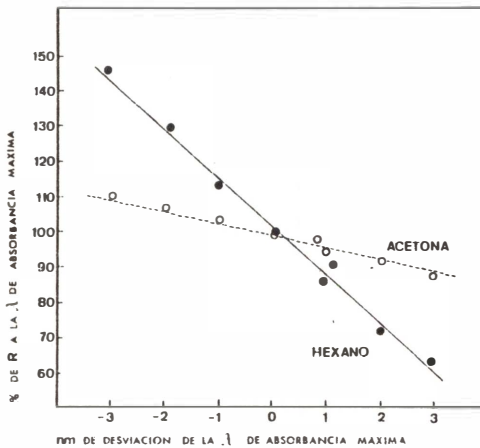


Fig. 6. Variación del valor de R (relación de las absorbancias a 663 nm antes y después de acidificar) con la longitud de onda para la clorofila-a pura, en acetona al 90 % y hexano. (WHITNEY & DARLEY, 1979).

Fig. 6. Dependence of before-to-after acidification ratio, R, on wavelength for pure chlorophyll-a in 90 % acetone and hexane (WHITNEY & DARLEY, 1979).

Tabla IV - Comparación de los valores de clorofila-a y feopigmentos obtenidos por los métodos de acetona y hexano. En el caso de la clorofila, los porcentajes corresponden a la relación entre los valores de hexano y acetona, considerando que los primeros representan la forma activa del pigmento y los segundos el total (activa + degradada = clorofila + clorofilida). En el caso de los feopigmentos, los porcentajes expresan la relación entre los valores obtenidos por uno y otro método. Las muestras señaladas con un \* representan cantidades de feopigmentos más elevados en acetona que en hexano. Muestras procedentes de la ría de Arosa (VARELA & PENAS, en preparación). N, número de muestra.

N	Clorofila-a (mg/m <sup>2</sup> )		% Cl-a activa FEOPIGMENTOS (mg/m <sup>2</sup> )		
	acetona	hexano	% acetona	hexano	%
1	373,3	198,4	53	285,1	348,5 122
2	257,3	133,1	51	301,7	399,8 132
3	377,8	217,7	58	283,2	453,7 160
4	133,4	52,3	39	365,8	628,5 171
5	203,0	118,5	58	225,9	210,1 *107
6	245,2	123,4	50	226,7	204,9 *110

Las diferencias entre las concentraciones de feofitina no son consistentes; en algunos casos el método del hexano proporciona una mayor cantidad de feofitina que el de acetona (tablas III y IV). En el caso de muestras de sedimentos procedentes de la ría de Arosa (VARELA & PENAS, en preparación), el hexano proporcionó en la mayoría de los casos valores más elevados que la acetona (tabla IV), en ocasiones hasta un 170 % mayores. Esto resulta probablemente de la diferencia en el nivel de feofórbido en las muestras (WHITNEY & DARLEY, 1979) o de algún tipo de interferencia no conocida, puesto que la acetona debería proporcionar valores de feopigmentos más elevados que el hexano, pues en éste los feofórbidos son eliminados en la hipofase acetónica durante la partición y no son medidos como feofitina.

#### EL USO DE $\text{CO}_3\text{Mg}$ DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN

El  $\text{CO}_3\text{Mg}$  es ampliamente utilizado durante la extracción de pigmentos en fitoplancton, macrófitos y fitomicrobentos, para prevenir la acidificación de los extractos. Sin embargo, su empleo es discutido por HOLM-HANSEN & RIEMANN (1978), quienes encuentran poca o ninguna diferencia entre muestras de fitoplancton con y sin tratamiento con  $\text{CO}_3\text{Mg}$ . Por otra parte, su uso en muestras destinadas al estudio de pigmentos por los métodos de acidificación descritos puede causar serios problemas, ya que hace que los valores de pH subsiguientes a la acidificación sean mayores que los requeridos para una completa

feofitización. Además, MOED & HALLE-GRAEFF (1978) señalan que nunca los valores de pH del extracto son tan bajos como para permitir la más mínima feofitización. Desde este punto de vista, por tanto, la aplicación de  $\text{CO}_3\text{Mg}$  sería innecesaria y sólo debería ser empleado en condiciones de acidez de muestras procedentes de cuerpos de agua o sedimentos ácidos.

Pero el uso de  $\text{CO}_3\text{Mg}$  plantea además otro grave problema, como es su tendencia a absorber cantidades significativas de clorofilidas y feofórbidos. Por todo ello, el empleo de  $\text{CO}_3\text{Mg}$  es desaconsejado, mientras no se presente una alternativa adecuada.

#### CONCLUSIONES

Aunque la información existente acerca de la determinación de pigmentos en muestras con gran cantidad de productos de degradación, como son las procedentes del bentos, y que exigen la acidificación de los extractos para distinguir las formas activas de las degradadas es abundante, numerosos autores siguen analizando sus muestras sin las debidas precauciones, lo cual hace que los resultados obtenidos sean poco fiables y en ocasiones difícilmente comparables. Está claro que es precisa una puesta a punto de la metodología y una estandarización de la misma. En este sentido se proponen los siguientes puntos:

- 1) El empleo de acetona con un contenido en agua del 10 al 20 % es aconsejable sobre otros solventes, por proporcionar una mayor estabilidad a los pig-

mentos durante los procesos de acidificación, aunque su capacidad extractora sea inferior a la del metanol.

2) La trituración, sonicación o el empleo de DMSO con acetona acuosa, permiten una eficacia y una rapidez en la extracción comparable a la del metanol.

3) La acidificación de los extractos debe permitir alcanzar un pH final comprendido entre 2,6 y 2,8. Si se em-

plea metanol como solvente, el extracto debe neutralizarse con  $\text{CO}_3\text{Mg}$ .

4) El método del hexano se presenta como una alternativa adecuada por reunir eficacia y rapidez en la determinación de clorofila-a activa. El uso conjunto del método tradicional de acetona y el del hexano permite conocer la cantidad de productos de degradación existente en las muestras.

5) El uso de  $\text{CO}_3\text{Mg}$  debe omitirse.

### SUMMARY

#### THE PROBLEM OF CHLOROPHYLL *a* DETERMINATION IN THE PHYTOMICROBENTHOS: A METHODOLOGICAL DISCUSSION

A general discussion about the determination of pigments in samples containing high percentages of degradation products, as those from the benthos, is presented. The traditional methods based on the spectrophotometric readings before and after acidification of the extracts are discussed in relation with the solvents, their water content, the molarity

of the acid in the acidified extract and the use of  $\text{CO}_3\text{Mg}$ . The method of WHITNEY & DARLEY (1979), which involves partition of acetic extracts with hexane, allows a better distinction between active and non-active forms of chlorophyll-*a*, which is not possible with the current spectrophotometric procedures, and is proposed as a suitable alternative.

### BIBLIOGRAFÍA

- HOLM-HANSEN, O., LORENZEN, C.J., HOLMES, R.W. & STRICKLAND, J.D.H., 1965. Fluorimetric determination of chlorophyll. J. Cons. perm. int. Explor. Mer., 30:3-15.
- HOLM-HANSEN & RIEMANN, 1978. Chlorophyll-*a* determination: improvements in methodology. Oikos, 30:438-447.
- JEFFREY, S.W., 1974. Profiles of photosynthetic pigments in the Ocean using thin-layer chromatography. Mar. Biol., 26:101-110.
- LIVINGSTONE, R., PARISER, R., THOMPSON, L. & WEBBER, A., 1953. Absorption spectra of solutions of pheophytin-*a* in methanol containing acid or base. J. Am. Chem. Soc., 75:3025-3026.
- LORENZEN, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr., 12:343-346.
- MARKER, A.H.F., 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. Freshwat. Biol., 2:361-385.
- MARKER, A.H.F., 1977. Some problems arising from the estimation of chlorophyll-*a* and phaeophytin-*a* in methanol. Limnol. Oceanogr., 22:578-579.
- MOED, J.R. & HALLEGRAEFF, G.M., 1978. Some problems in the estimation of chlorophyll-*a* and phaeopigments from pre- and post-acidification spectrophotometric measurements. Int. Revue ges. Hydrobiol., 63:787-800.
- SHOAF, W.T. & LIUM, B.W., 1976. Improved extraction of chlorophyll-*a* and *b* from algae using dimethyl sulfoxide. Limnol. Oceanogr., 21:926-928.
- TETT, P., KELLY, M.G. & HORNBERGER, G.M., 1975.

- A method for the spectrophotometric measurement of chlorophyll-a and phaeophytin-a in benthic microalgae. Limnol. Oceanogr. 20:887-896.
- USACHEVA, M.N., 1971. Nature of the effect of addition of acids on the spectra and phototics of the moles of phaeophytin. Bio-physics, 16:1021-1028.
- WHITNEY, D.E. & DARLEY, W.M., 1979. A method for the determination of chlorophyll-a in samples containing degradation products. Limnol. Oceanogr., 24:183-186.
- YENTSCH, C.S., 1967. The measurements of chloroplastic pigments—thirty years of progress?. In: Proc. IBP-Symp. Amsterdam: Nieuwersluis, 1966. pp. 255-270.
- YENTSCH, C.S. & MENZEL, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep-Sea Res., 10:221-231.

