

ESTIMACION DE LA PRODUCTIVIDAD PRIMARIA CON EL METODO DEL OXIGENO EN AGUAS DE BAJO ESTADO TROFICO: POSIBILIDADES Y LIMITES (*)

Lino Pizzolon

Laboratorio de Ecología Acuática
Universidad Nacional de la Patagonia. (UNPSJB)
Avda. Alvear 1021 - 9200 Esquel (Chubut)
Argentina

RESUMEN

Pizzolon, L. 1990. Estimación de la productividad primaria con el método del oxígeno en aguas de bajo estado trófico: posibilidades y límites. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 21 (1): 61 - 68.

El objetivo del trabajo fue la puesta a punto de una metodología automática para la determinación de oxígeno disuelto con precisión tal que fuera utilizable aún en aguas de bajo estado trófico. Las titulaciones fueron automatizadas, con determinación del punto final por la técnica del "Dead Stop" y alcanzaron una precisión de 10-20 mg. m⁻³ O₂, expresada como desviación estándar. Con este método es posible obtener resultados con un error no mayor del 20 % (p<0,05) si la productividad diaria media anual de un ambiente es superior a 230 mg. m⁻³ O₂. Por lo tanto, su uso queda restringido a aguas meso-eutróficas y eutróficas. La automatización de las titulaciones permitió procesar hasta 50 botellas en cuatro horas. Se diseñó un divisor de muestras que resultó apto para lograr un llenado simultáneo y perfectamente homogéneo en oxígeno disuelto en todas las botellas de una misma profundidad. En base al valor de la desviación estándar agrupada (S') del método y a la concentración media anual de clorofila *a* de un ambiente, se propuso un procedimiento estadístico para predecir el error porcentual que tendrán las mediciones de productividad en dicho ambiente y decidir en consecuencia sobre la aplicabilidad de la metodología a usar.

ABSTRACT

Pizzolon, L. 1990. Primary production estimation by the oxygen method in waters of low trophic state: possibilities and limits. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 20 (1): 61 - 68.

The precision of the Winkler method was improved automatizing the titrations by means of the dead stop end point technique, in order to allow its use in primary production estimations also in low trophic state waters. Fifty bottles were titrated in four hours, reaching a coefficient of variation in the range of 0.1-0.2 %, and a standard deviation of 10-20 mg.m⁻³ O₂. A water sample splitting was designed to fill until nine replicate bottles at the same time with the same initial oxygen concentration. A statistical procedure to estimate and to predict the percentual error involved in primary production estimation is proposed. To predict the error of a set of primary production estimations, the mean annual environment chlorophyll *a* concentration and the pooled standard deviation of the method are needed. The limit of detection of the methodology was 230 mg.m⁻³ O₂ annual mean daily production, with an error not higher than 20% (p < 0.05). In consequence, this methodology is able to be used only in meso-eutrophic and eutrophic waters. Probabilities of errors higher than 20 % would be assumed in lower production waters.

(*) Parte de este trabajo se publica en las Memorias del Istituto Italfano di Idrobiologia.

INTRODUCCION

La estimación de la productividad primaria del fitoplancton se ha realizado en gran medida en base a los métodos del carbono 14 y del oxígeno, en botellas claras y oscuras (Sakamoto *et al.* 1984). El método del oxígeno, a diferencia del método del radiocarbono, permite la discriminación entre producción neta, producción bruta y respiración. Sin embargo, su baja precisión, limita su empleo a ambientes de alto nivel productivo.

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto una metodología para la determinación del oxígeno disuelto con la precisión suficiente para ser usado en aguas de bajo estado trófico y agilizar los abundantes procedimientos de laboratorio y de campo implicados en esta metodología.

Raramente se han realizado estimaciones del error asociado a la medición de la productividad primaria con el método del oxígeno. En el presente trabajo se propone un procedimiento estadístico para cuantificar el error de un método y predecir su aplicabilidad en un ambiente, si se conocen la precisión del método y la concentración media de clorofila a del ambiente, respectivamente.

MATERIAL Y METODOS

Se escogió la modificación de Pomeroy y Kirschman del método de Winkler (Golterman *et al.* 1978) por dar mejores resultados en los trabajos en que se requiere alta precisión. Las titulaciones se efectuaron con el método amperométrico del punto final por "Dead Stop". Se automatizaron totalmente por medio de una bureta a pistón Radiometer ABU-80 y un pH-metro de la misma marca, PHM-84, ambos conectados a una computadora HP-85, por medio de una interfase BCD, procesándose hasta 50 botellas en cuatro horas.

Se tituló el volumen completo de las botellas, previamente calibradas, evitándose así los errores y pérdidas de tiempo derivadas de la toma de alícuotas. Se diseñaron e hicieron construir botellas de vidrio pyrex especiales, de 160 ml, con tapones largos, con el objeto de que al destaparlas, quedase volumen para agregar el titulante sin necesidad de extraer solución a titular.

El protocolo de titulación se registró en un programa en basic, simulando los pasos de una titulación manual. Al comienzo, el voltaje de salida de los electrodos es muy bajo (2-3 mV) y el titulante se agrega a alta velocidad (Fig. 1). Hacia el final de la titulación se produce la despolarización de los electrodos y un salto de potencial, que tiende a igualar el voltaje impreso. Durante esta fase, el titulante se agrega en pulsos de volumen cada vez menor, con el objeto de no sobrepasar el punto final. Cuando se ha erogado el volumen equivalente, sucesivos pulsos adicionales no producen ninguna modificación ulterior en el voltaje leído. Se elaboraron y ensayaron diferentes protocolos de titulación, escogiéndose el que arrojó mejor relación lineal entre el voltaje de salida de los electrodos y el volumen de titulante añadido en cada pulso (Talling 1973).

Los reactivos de fijación se añadieron con dispensadores Seripetor, con un coeficiente de variación de 0,4 %. La acidificación se realizó con 2 ml de ácido sulfúrico, en concentración ajustada para producir un pH final en las botellas a titular entre 2 y 2,5 con el objeto de evitar la reoxidación del yoduro desde la atmósfera, que tiene lugar a pH más bajos (Carpenter 1965; Carrit y Carpenter 1966).

Para estimar la producción primaria en condiciones de campo se trabajó con triplicados (tres botellas claras, tres iniciales y tres oscuras). Se construyó una caja —pintada de negro en su interior—, para cada profundidad de incubación, con compartimentos interiores para nueve botellas. Se diseñó un divisor de muestra (Fig. 2) que permitió llenar las nueve botellas de cada profundidad simultáneamente y con la seguridad de lograr en todas, la misma concentración inicial de oxígeno disuelto.

Se diseñó e hicieron construir soportes para incubar *in situ* hasta seis botellas por profundidad, en posición horizontal, de fácil y rápido manejo.

Fig. 1

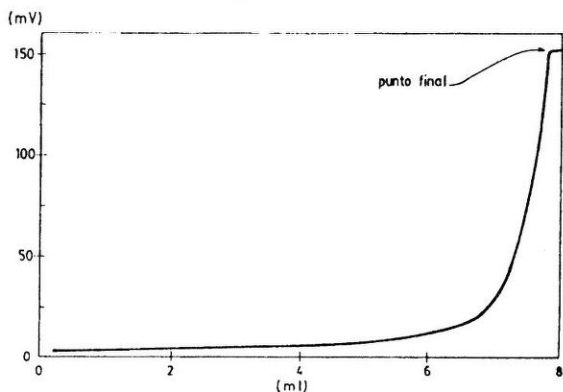


Fig. 1. Curva de titulación obtenida con la técnica del punto final por "dead stop" (tomada de Pizzolon, en prensa).

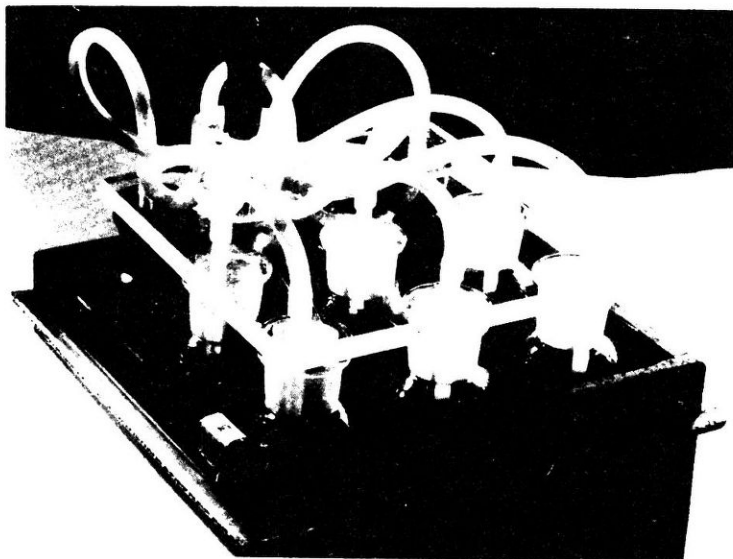


Fig. 2. Divisor de muestras, para el llenado perfectamente homogéneo y simultáneo de todas las botellas de una misma profundidad (modificada de Pizzolón, en prensa).

Cuadro 1

Precisión de los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio
(tomado de Pizzolon, en prensa)

Procedencia	Clorof. mg.m ⁻³	Conduct. µS.cm ⁻¹	Número muestras	Media g.m ⁻³	Desv. Std. mg.m ⁻³	Coef. Var. o/o
L. Varese	38	280	16	13,912	15	0,11
L. Orta	2	102	18	8,576	11	0,13
A. Destilada	0	0,3	13	8,433	15	0,18

RESULTADOS Y DISCUSION

Se probó la precisión del método en condiciones de campo y de laboratorio.

En condiciones de laboratorio (Cuadro 1) se obtuvieron coeficientes de variación entre 0,11 y 0,18 o/o, respaldándose la hipótesis de que el método del punto final por "Dead Stop" es menos preciso en aguas de baja conductividad (Limnet y Malvig, no fechado).

En condiciones de campo (Cuadro 2) se obtuvieron resultados cuya precisión se estimó por medio de la desviación estándar agrupada (S') de un conjunto de triplicados,

$$S' = \frac{\sum (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{(L-1) \cdot N} \quad 1/2$$

(Snedecor y Cochran 1967) donde, N es el número de replicados y L es el número de botellas en cada replicado; x_{ij} , es cada uno de los i valores de oxígeno en el replicado j-ésimo y \bar{x}_j , es la media de los mismos en el replicado j-ésimo.

Las desviaciones estándar agrupadas (S') obtenidas de esta forma fueron: 47 triplicados (iniciales) = 16 mg.m⁻³ O₂; 45 triplicados (claras) = 20 mg.m⁻³ O₂; 32 triplicados (oscuras) = 25 mg.m⁻³ O₂.

Los resultados obtenidos por autores que estimaron la productividad del fitoplancón con métodos semejantes al descrito en este trabajo (Cuadro 3), evidencian que las técnicas fotométricas muestran el mayor nivel de precisión en la determinación del punto final, con coeficientes de variación tan pequeños como 0,03 o/o. Los resultados obtenidos por la metodología puesta a punto coinciden con los de Talling (1973) y Goltzman (1978), quienes trabajaron también con técnicas amperométricas. Puede inferirse así que el 0,11 o/o está entre los coeficientes de variación más bajos que permite obtener la técnica de punto final por "Dead Stop".

Como el valor de la producción en el método del oxígeno se obtiene de las diferencias entre dos medias (por ej., botellas claras - botellas oscuras), puede estimarse el error asociado a dicho valor en base al intervalo de confianza (I.C.) para las diferencias entre las medias de los triplicados:

$$I.C. = S' \cdot t_{0,025} \cdot \left[\frac{1}{3} + \frac{1}{3} \right]^{1/2}$$

(Wonnacott y Wonnacott 1983).

Cuadro 2

Ejemplo de los resultados de la determinación de O₂ obtenidos regularmente en condiciones de campo, por triplicado.

7,379	7,411	7,437
7,289	7,268	7,337
7,392	7,358	7,400
7,608	7,624	7,624
8,572	8,585	8,555
8,811	8,808	8,862
11,381	11,327	11,338
11,753	11,761	11,760
10,606	10,646	10,625
8,405	8,406	8,400
10,706	10,679	10,693
13,132	13,131	13,094
13,215	13,164	13,170
13,031	13,032	13,036

Cuadro 3

Precisión de los resultados del método de Winkler obtenidos por autores que trabajaron con diferentes técnicas para la determinación del punto final (tomado de Pizzolon, en prensa).

Año	Referencia	Desv. Std. mg.m ⁻³	Coef. Var. o/o	tipo de titulación
1966	Carrit-Carpenter	50		manual-almidón
1968	Strickland-Parsons	24		manual-almidón
1981	A.P.H.A.	20		manual-almidón
1973	Talling	10-20	0,1	amperométrica
1976	Bryan <i>et. al.</i>		0,05-0,1	fotométr.—UV
1977	Tschumi <i>et al.</i>	2-5		fotométr.—visib.
1979	Vaatanen		0,03-0,15	amperométr.Pt/Au
1982	Williams-Jenkinson		0,03-0,1	fotométr.—UV
1978	Golterman (lab.)		0,1	amperométr. Dead.S.
1983	Golterman (campo)	25-38		amperométr. Dead.S.
1986	resultados presentes	15-25	0,11	amperométr. Dead.S.

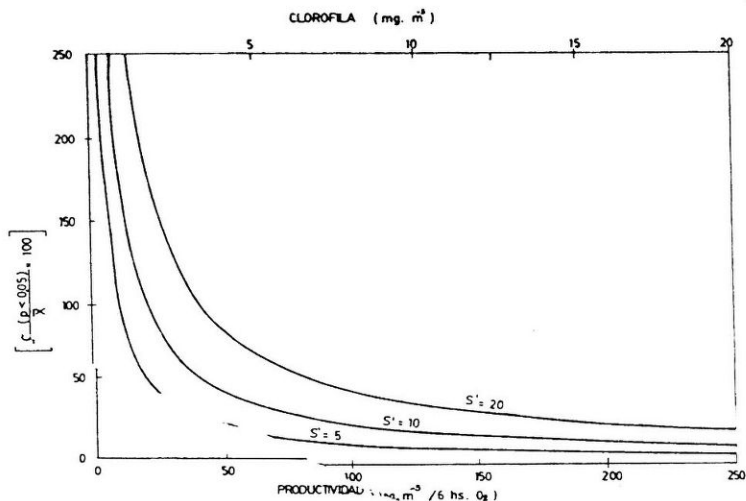


Fig. 3. Predicción de la probabilidad de error ($P < 0,05$) en las estimaciones de productividad primaria con métodos que tienen una precisión de 5, 10 y 20 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 , expresada como desviación estándar, en aguas de diferente concentración media de clorofila a ; \bar{x} representa la producción primaria media anual estimada durante el período de incubación.

Considerando que en condiciones de campo se obtuvieron valores de S' de alrededor de 20 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 , el I.C. ($p < 0,05$) para las medidas de productividad resultantes será de 45 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 , valor que puede considerarse como la cantidad más pequeña de producción detectable por esta metodología al 95 % de nivel de significación. Dividido por 100 y multiplicado por el valor medio anual de la productividad obtenido durante el período de incubación, permite una expresión porcentual ($p < 0,05$) del error asociado a dicha media.

En el Lago Orta (media anual de 7 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ de clorofila a) se obtuvo una producción primaria media anual durante el período de incubación (6 horas) de 90 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 . Por lo tanto dicho valor puede llevar asociado un error de hasta el 50 % ($p < 0,05$). Para obtener un error no mayor del 20 %, debería trabajarse con una metodología con una S' no mayor de 8 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 , tal que el I.C., no resulte más grande que 18 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 . Con el objeto de estimar la probabilidad de error asociada a las medidas de productividad primaria en aguas de diversos estados tróficos, se construyó un gráfico para métodos con 5, 10 y 20 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ O_2 como valores de S' , respectivamente (Fig. 3). Si fijamos

en un 20 % el máximo error aceptable en este tipo de trabajo, entonces la presente metodología sólo es aplicable en aguas con una productividad media anual superior a los 230 mg.m⁻³ O₂, es decir en aguas meso-eutróficas y eutróficas en el sentido de la O.E.C.D. (1982).

El mismo gráfico (Fig. 3) permite anticipar la productividad primaria de un ambiente, si se conoce su concentración media anual de clorofila *a*, y por lo tanto puede utilizarse para predecir el error que tendrán las estimaciones que en él se realicen, según la precisión del método a emplear y decidir en consecuencia sobre la aplicabilidad de la metodología disponible. La escala de concentración de clorofila *a* se ha construido según la ecuación de regresión, $\text{Chl } a = 0,98 + 0,073 \text{ pp}$ (N=12; $r=0,82$; $p < 0,001$) obtenida seleccionando valores de productividad (pp) y de clorofila de algunos lagos del estudio de la O.E.C.D. (Fricker 1980) con el criterio de tomar una muestra comprehensiva de las diferentes entre sí. Para convertir el valor de producción diaria medio anual al valor de producción medio anual durante un período de incubación de seis horas, se multiplicó por el factor 0,666. Para convertir valores de productividad de carbono a oxígeno se usó un PQ de 1,2.

Se considera que los resultados del método en condiciones de campo pueden mejorarse aumentando los cuidados durante el agregado de los reactivos de Winkler, en modo tal que la precisión en tales condiciones se acerque a la precisión obtenida en condiciones de laboratorio. Recientemente se han obtenido resultados semejantes al descrito mediante sensores de oxígeno polarográficos por los que se hace pasar una corriente eléctrica discontinua a intervalos controlados por un microprocesador (R. Carignan, com. pers.), con una gran economía de trabajo de campo y de laboratorio.

CONCLUSIONES

La precisión alcanzada por el método puesto a punto, 10–20 mg.m³ O₂, expresada como desviación estándar, hace posible su uso en aguas con más de 230 mg.m³ O₂ de productividad diaria media anual, si se acepta una probabilidad de error ($p < 0,05$) de hasta el 20 %. En aguas de menor estado trófico debe asumirse la probabilidad de incurrir en errores mayores al 20 %. Las referencias bibliográficas señalan que la precisión alcanzada es la máxima posible para esta metodología. Si se requiere un nivel mayor de precisión, el punto final debe detectarse por medio de técnicas fotométricas o recurrirse al método del carbono 14.

La automatización del método permitió procesar hasta 60 botellas en cuatro horas, agilizando así el intenso trabajo de laboratorio requerido por esta técnica.

El divisor de muestras resultó ser un dispositivo apto para lograr un llenado simultáneo y perfectamente homogéneo en oxígeno disuelto en las nueve botellas de cada profundidad de incubación.

Utilizando la desviación estándar agrupada y el intervalo de confianza para las diferencias entre dos medias, es posible estimar la probabilidad de error asociado a las estimaciones de la productividad primaria con el método del oxígeno, estimar la cantidad mínima de productividad determinable con una técnica de oxígeno dada y predecir su aplicabilidad en aguas de diferente estado trófico, si se conocen sus concentraciones medias anuales de clorofila *a*.

AGRADECIMIENTOS

La metodología descrita fue puesta a punto y empleada en el Istituto Italiano di Idrobiologia, de Pallanza, durante 1984 y 1985. Se agradece al Dr. Ricardo De Bernardi, director del Instituto, la hospitalidad; al Dr. Rosario Mosello, al Dr. Delio Ruggiu y al Tco. Químico Gabriele Tartari el apoyo y facilidades brindadas para el desarrollo de los trabajos.

REFERENCIAS

- American Public Health Association. 1980. Standard methods for the examination of the water and wastewater. 15a. ed. A.P.H.A., N. Y., 1134 pp.
- Bryan, J.R., J.P. Riley y P.J. leB. Williams. 1976. A Winkler procedure for making precise measurements of oxygen concentration for productivity and related studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 21: 191-197.
- Carpenter, J.H. 1965. The accuracy of the Winkler method for the dissolved oxygen analysis. *Limnol. Oceanogr.* 10: 135-140.
- Carrit, D.E. y J.H. Carpenter. 1966. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in sea-water, a NASCO report. *J. Mar. Res.* 24: 286-318.
- Fricker, H. (comp.) 1980. O.E.C.D. Eutrophication Programme. Regional Projects. Alpine Lakes. Swiss Federal Bd. Environm. Protection & Organization for Economic Cooperation and Development. Berna. 233 p.
- Golterman, H.L. 1983. The Winkler determination. En: E. Gnaiger y H. Forstner (eds.). Polarographic oxygen sensors, aquatic and physiological applications, p.: 245-264. *Springer-Verlag*, Berlin, 365 p.
- Golterman, H.L., R.S. Clymo y M.A.M. Ohnstad. 1978. Methods for physical and chemical analysis of freshwater. *Blackwell Sci. Pub.*, 2nd. ed., Oxford. 233 pp.
- Limnet, N y H. Malmvig. No fecha. Automatic dead-stop end-point titrations in the theory and practice. Radiometer ST4, A/S. Copenhagen. 15 p.
- Organization for the Economic Cooperation and Development. 1982. Eutrophication of waters. Monitoring assesment and control. O.E.C.D., París. 154 p.
- Pizzolon, L. (En prensa). Assessment of an automated oxygen method and its applicability to phytoplankton primary productivity estimations. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*
- Sakamoto, M., M.M. Tilzer, R. Gachter, H. Rai, Y. Collos, P. Tschumi, P. Berner, D. Zbaren, M. Dokulill, M. Bossard, U. Uehlinger y E.A. Nusch. 1984. Joint field experiments for comparisons of measuring methods of photosynthetic production. *J. Plankton Res.* 6 (2): 365-383.
- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1967. Statistical methods. *Iowa State Univ. Press* 703 pp.
- Strickland, J.D.H. y T. Parsons. 1966. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 167 p.
- Talling, J.F. 1973. The applications of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in freshwaters. *Freshwat. Biol.* 3: 335-362.
- Tschumi, P.A., D. Zbaren y J. Zbaren. 1977. An improved oxygen determination method for measuring primary production in lakes. *Schweiz. Z. Hydrol.* 39/2: 306-313.
- Vaatanen, P. 1979. Microbial activity in brackish water determined as oxygen consumption. En: Overbäck (ed.). Proceeding of the workshop on Measurement of Microbial activities in the carbon cycle of freshwaters. *Arch. Hydrobiol. Bei.* 12: 32-37.
- William, P.J. leB. y N.W. Jenkinson. 1982. A transportable microprocessor-controlled Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnol. Oceanogr.* 27: 576-584.
- Wonnacott, T.H. y R.J. Wonnacott. 1984. Introduzione alla statistica. *Franco Angeli*. Milán. 455 p.

Recibido / Received / : 25 octubre 1989

Aceptado / Accepted / : 21 agosto 1990