

UN NUEVO MÉTODO PARA MEDIR LA PRODUCCIÓN PRIMARIA DE FITOPLANCTON EN AGUAS COSTEROS: UN RESUMEN

Por

Algird G. Moigis K.
Consultor Ambiental Marino

En el presente documento fue resumido en el idioma castellano la aplicación de un nuevo método de dilución para medir la producción primaria de fitoplancton en aguas costeros que recientemente fue publicado en el "Journal of Plankton Research" (Moigis y Gocke, 2003). La versión original en inglés puede ser leído en: <http://plankt.oupjournals.org/cgi/content/full/25/10/1291?ijkey=22BnS5RX9LbTz&keytype=ref>. No obstante, el presente documento tiene comentarios, figuras y fotos adicionales no presentes en la publicación preliminar.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la producción primaria de fitoplancton ha sido principalmente estimada con los métodos de ^{14}C (Steemann-Nielsen, 1952) y O_2 (Gaarder y Gran, 1927). Aún cuando la mayoría de la comunidad científica ha usado el método de ^{14}C , todavía han habido otros investigadores que han usado el alternativo método de O_2 (e.g. Gocke et al., 2001). El método de ^{14}C tiene algunas desventajas tales como de necesitar una infraestructura de investigación especial para poder tratar la solución de ^{14}C de una manera segura, y además el método es muy caro.

En el presente documento ha sido desarrollado un protocolo para estimar la producción primaria de fitoplancton en aguas costeros teniendo como base el método de dilución de Landry y Hassett (1982). Debido al hecho que en aguas costeros puede haber un flujo de nutrientes del medio terrestre al medio acuático, de esto uno puede asumir de que el crecimiento de fitoplancton pudiera depender de dichos nutrientes externos, una posibilidad que había sido demostrado con los experimentos de Anderson et al. (1991). En dado caso habría una competencia intraespecífica por dichos nutrientes dentro de la población de fitoplancton y el crecimiento sería de tipo logístico (Begon et al., 1996). Si en un experimento de dilución hubiese una tal competencia, entonces la tasa específica de crecimiento de fitoplancton aumentaría con la dilución, y esto afectaría al experimento, especialmente en el caso cuando nutrientes no fuesen añadidos en lo absoluto o suficientemente a las botellas de incubación.

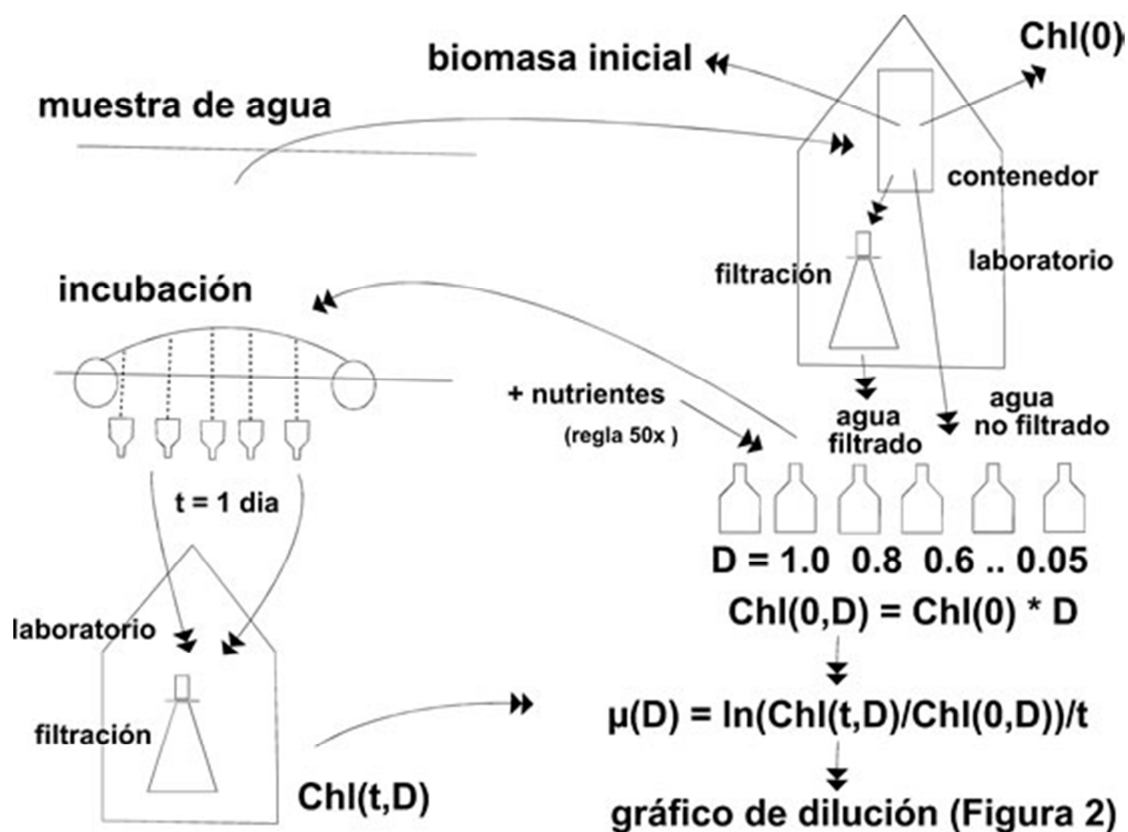
El protocolo que es presentado aquí con el objetivo de medir la producción primaria en aguas costeros toma en cuenta este posible crecimiento de tipo logístico, y describe los parámetros que deben ser estimados y los procedimientos de evaluación que debe ser considerados. Figura 1 (traducida de Moigis y Gocke, 2003) demuestra un diagrama de flujo de un experimento estándar de dilución para medir la producción primaria, y la Tabla 1 (traducida de Moigis y Gocke, 2003) los símbolos que son usados en el texto. El cálculo de la producción primaria se basa en parámetros que inicialmente tienen que ser estimados con un experimento de dilución. La Ecuación inicial (1) es (Moigis, 2000):

$$PP = \frac{k_{(in-situ)}}{(k_{(in-situ)} - g_{(in-situ)})} B_{(0)} \{ e^{[(k_{(in-situ)} - g_{(in-situ)}) t]} - 1 \} \quad (1)$$

donde PP es la producción primaria, $k_{(in-situ)}$ la tasa in-situ específica de crecimiento de fitoplancton, $g_{(in-situ)}$ la tasa in-situ específica de pastoreo de zooplancton, $B_{(0)}$ la biomasa inicial de fitoplancton y t tiempo. Los parámetros $k_{(in-situ)}$, $g_{(in-situ)}$, y $B_{(0)}$ tienen que ser estimados previamente para entonces poder calcular PP.

parámetros $k_{(in-situ)}$, $g_{(in-situ)}$, y $B_{(0)}$ tienen que ser estimados previamente para entonces poder calcular PP.

Figura 1



SERIE DE DILUCIÓN

Los parámetros k (in-situ) y g (in-situ) son estimados con el método de dilución de la manera siguiente: Agua natural tiene que ser diluido con agua filtrado del mismo origen a los siguientes señalados niveles de dilución (D): 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 y 1.00, obteniendo así una serie de dilución. D es definido como la fracción de agua no filtrado. Por ejemplo, $D=1.00$ significa que el agua natural no fue diluido, y un valor de D igual a 0.20 significa que el agua natural fue diluido al 20 %. Agua filtrado puede ser adquirido con filtros de fibra de vidrios tales como del tipo Whatman GF/F o, si es posible, con otros filtros que tengan una menor porosidad hasta del 0.2 μm . En cada nivel de dilución se añade primeramente a cada botella de incubación (con preferencia de tipo policarbonato) el volumen correspondiente de agua filtrado, añadiendo después de una manera gentil el correspondiente volumen restante de agua natural (no filtrado) con zooplankton (Landry, 1993). Solamente así se obtiene todas la muestras diluidas de una serie de dilución.

Seguidamente se añade una idéntica cantidad superabundante de nutrientes a todas las muestras diluidas para así obtener una igual concentración final de nutrientes en todos los niveles de dilución (ver comentarios abajo). Un exceso de nutrientes es añadido a cada muestra diluida de agua de la serie de dilución con el único propósito de mantener la tasa específica de crecimiento de fitoplancton ($k(max)$) en un nivel máximo durante todo el período de incubación. De este modo se obtiene un valor idéntico de la tasa específica de crecimiento de fitoplancton en todos los niveles de dilución durante la incubación. Fosfato, silicato, ambos recursos de nitrógeno, nitrato y urea (o amonio) y si es necesario, metales esenciales tales como hierro (ver comentarios abajo) tienen que ser añadidos a todas las muestras de agua de la serie de dilución.

Una evaluación matemática del método de dilución que fue hecha por el presente autor que se basó en soluciones específicas de ecuaciones diferenciales no lineales que describían la tasa de crecimiento de una población de microalgas (dN/dt) que simultáneamente dependía de una tasa específica de crecimiento de fitoplancton que era influenciado por una competencia intraespecífica (por ejemplo por nutrientes), y de un pastoreo de zooplankton (g) demostró el siguiente resultado: Justamente no antes cuando la concentración final de los nutrientes añadidos (este importe siendo recalculado como biomasa equivalente de fitoplancton usando Redfield) había correspondido a 50 veces la concentración de la biomasa inicial no diluida de fitoplancton (esto es $\sim 2-4 \mu M$ P por μg l-1 clorofila inicial no diluida, $\sim 32-64 \mu M$ N por μg l-1 clorofila inicial no diluida y

~32-64 μM Si por $\mu\text{g l}^{-1}$ clorofila inicial no diluida, estos últimos factores siendo calculado usando la relación atómica P:N:Si:C ~ 1:16:15:106 de Redfield et al., 1965 y un factor mg C: mg clorofila de 50-100; = regla 50x), la constancia de la tasa específica de crecimiento de fitoplancton no había sido afectado por dicha competencia dentro de la serie de dilución durante una incubación de 12 horas (= 1 día).

Esto significa que para cada μg de clorofila por litro que haya sido medido en la muestra de agua no diluida hay que añadir una tal cantidad necesaria de nutrientes como para obtener una concentración final de 2-4 μM P, 30-60 μM N y 30-60 μM Si. Por ejemplo, si una concentración de 4.5 μg de clorofila por litro haya sido medido, entonces hay que añadir tanto P, N y Si como para obtener una concentración final de 9-18 μM P (4.5 x 2, 4.5 x 4) 144-288 μM N (4.5 x 32, 4.5 x 64) y 144-288 μM Si (4.5 x 32, 4.5 x 64).

Es recomendable de tener 2 botellas de incubación en cada nivel de dilución (D). Además tienen también que ser preparadas dos botellas con agua natural no diluida y sin nutrientes añadidos junto a la serie de incubación.

Todas las botellas de incubación son entonces llevadas al lugar de incubación para iniciar una incubación in-situ (Foto 1). La incubación debería tener un periodo de incubación de 24 horas (ver Figura 1, traducida de Moigis y Gocke, 2003).

Foto 1



EVALUACION

La concentración inicial de clorofila (como indicador de la biomasa de fitoplancton) de la muestra de agua no diluido ($\text{Chl}(0)$) tiene que ser medida, y la concentración inicial de clorofila para cada nivel de dilución D ($\text{Chl}(0,D)$) puede ser calculada usando la Ecuación (2):
 $\text{Chl}(0,D) = \text{Chl}(0) D$ (2).

Después de la incubación es medida la concentración final de clorofila de cada botella de incubación de la serie de dilución ($\text{Chl}(t,D)$, con nutrientes añadidos), y de las muestras de agua no diluida y sin nutrientes añadidos ($\text{Chl}(t, \text{in-situ})$). Los valores correspondientes de la tasa aparente de crecimiento de fitoplancton de la serie de dilución (con nutrientes añadidos, $\mu(D)$) y de las muestras de agua no diluida y sin nutrientes añadidos ($\mu(\text{in-situ})$) son entonces calculados usando la Ecuaciones (3a y 3b).

$$\mu(D) = \ln (\text{Chl}(t,D) / \text{Chl}(0,D)) / t \text{ o} \quad (3a)$$

$$\mu(\text{in-situ}) = \ln (\text{Chl}(t, \text{in-situ}) / \text{Chl}(0, \text{in-situ})) / t \quad (3b)$$

La tasa aparente de crecimiento de fitoplancton $\mu(D)$ en un nivel de dilución D es definido como la diferencia de la tasa específica de crecimiento de fitoplancton (k) y la correspondiente tasa específica de pastoreo de zooplancton en dicho nivel de dilución D ($g(D)$, Ecuación 4):

$$\mu(D) = k - g(D) \quad (4)$$

También sería recomendable de incubar una muestra de agua filtrado a la cual la misma cantidad de nutrientes fue añadida, y de medir entonces la concentración final de clorofila (Li, 1990). Esto puede ser visto como un control de derrame de fitoplancton que puede ocurrir a través de los filtros que fueron usados para la adquisición de agua filtrado. Habiendo estimado un valor final de clorofila ($Chl(\text{filtrado})$), entonces los valores estimados de $Chl(t,D)$ tienen que ser corregidos para obtener $Chl(\text{corregido})$ usando la Ecuación (5):

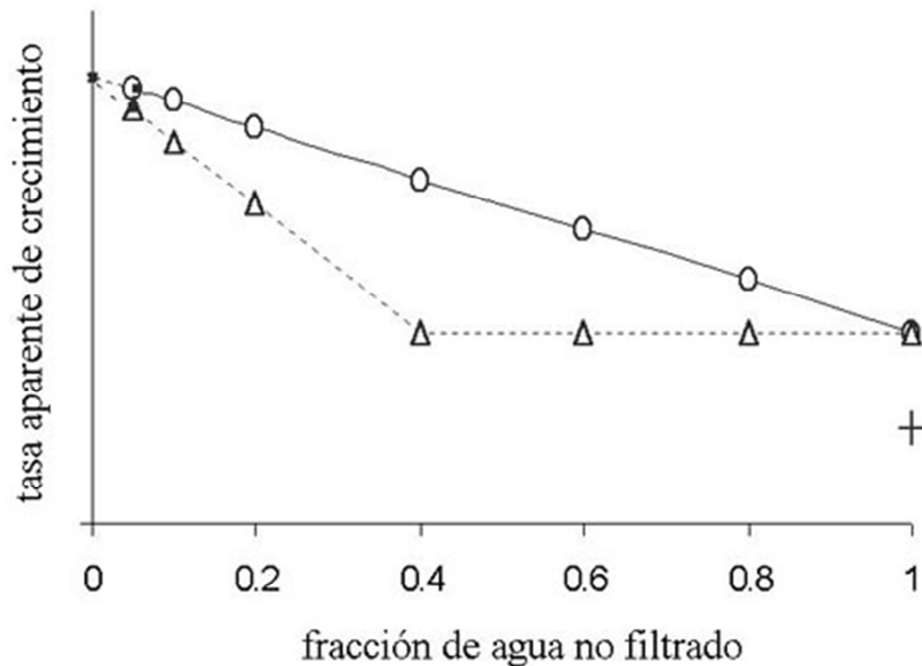
$$Chl(\text{corregido}) = Chl(t,D) - (1-D) Chl(\text{filtrado}) \quad (5)$$

Para calcular $\mu(D)$ (usando Ecuación 3) se debe entonces usar solamente el valor corregido de clorofila ($Chl(\text{corregido})$).

GRÁFICO DE DILUCIÓN

Todos los valores calculados de $\mu(D)$ y los correspondientes valores de D son entonces trazados en un plano de coordenada cartesiano XY , teniendo como eje- Y (u ordenada) $\mu(D)$ y como eje- X (o abscisa) D , mostrando esto la relación que existe entre $\mu(D)$ y D , y obteniendo así un gráfico de dilución (en inglés dilution plot). Dos posibles gráficos de dilución existen: El uno es de tipo lineal (Landry y Hassett, 1982) y el otro es de tipo no lineal (Gallegos, 1989). Figura 2 (traducida de Moigis y Gocke, 2003) aclara estos dos conceptos. Dependiendo de cual gráfico de dilución haya sido obtenido, el correspondiente procedimiento de evaluación será llevado a cabo.

Figura 2



CASO LINEAL

Si el gráfico de dilución es lineal (ver Figura 2, traducida de Moigis y Gocke, 2003), entonces la evaluación original de Landry y Hassett (1982) será llevada a cabo. En este caso será calculado una regresión estadística de tipo lineal teniendo como variable independiente a D y como variable dependiente a $\mu(D)$ (como valor promedio). Dicha relación va de acuerdo a la Ecuación lineal (Ecuación 6):

$$\mu(D) = k(\text{max}) - g(+D).$$

donde $g(+)$ es la tasa específica de pastoreo de zooplancton de la muestra no diluida con nutrientes añadidos, y $k(\max)$ la máxima (y así invariable) tasa específica de crecimiento de fitoplancton.

En este cálculo estadístico la constante de regresión es $g(+)$ y el intercepto de la eje Y es $k(\max)$. En un caso lineal $g(+)$ es idéntico al valor in-situ de la tasa de pastoreo de la muestra de agua sin nutrientes añadidos ($g(\text{in-situ}) = g(+)$, mirar también la Ecuación 7), de manera que el valor de $g(+)$ puede ser usado directamente para el cálculo de PP con las ecuaciones (1) y (7). El motivo de esta identidad es una tasa de filtración de zooplancton (f) que resulta ser máxima, y así constante, de manera que esta variable no demuestra una dependencia hacia la concentración de fitoplancton siendo éste su alimento. Como consecuencia, g también no depende de la concentración de fitoplancton. La tasa de filtración de zooplancton (f) es definida como el volumen equivalente de agua de la cual todo el alimento presente fue removido en un 100 % por un individuo de zooplancton durante un período de tiempo.

La tasa in-situ específica de crecimiento de fitoplancton (sin nutrientes añadidos, $k(\text{in-situ})$) es la suma del valor promedio de la tasa aparente de crecimiento de las 2 muestras de agua no diluido sin nutrientes añadidos ($\mu(\text{in-situ})$) y $g(\text{in-situ})$ (Eq 7):

$$k(\text{in-situ}) = \mu(\text{in-situ}) + g(\text{in-situ}) \quad (7)$$

Teniendo los valores de $k(\text{in-situ})$, $g(\text{in-situ})$ y $B(0)$, PP puede entonces ser calculada usando la Ecuación (1).

CASO NO LINEAL

Gallegos (1989) ha demostrado, como primero, casos de gráfico de dilución que son de tipo no lineal en aguas costeros (Figura 2, traducida de Moigis y Gocke, 2003). Esto ocurre solamente cuando el zooplancton consume su alimento (= fitoplancton) en su tasa máxima de ingestión. En caso de tener un gráfico de dilución no lineal, el valor de $k(\max)$ tiene que ser estimado con el procedimiento de extrapolación denominado como el de 3 puntos de Gallegos (1989), usando para ello los dos valores promedios de $\mu(D)$ que corresponden a los dos máximos diluciones (en este caso 5 y 10 %). Este procedimiento consiste simplemente en la extrapolación de la línea que conecta dichos ambos valores promedios de $\mu(D)$ en el gráfico de dilución al eje Y.

El parámetro $g(+)$ es entonces calculado como la diferencia del valor estimado de $k(\max)$ y del valor promedio de la tasa aparente de la muestra de agua no diluido con nutrientes añadidos ($\mu(+)$) según la Ecuación (8).

$$g(+)=k(\max)-\mu(+)\quad(8)$$

En un caso de no linealidad $g(+)$ no puede ser usado directamente como $g(\text{in-situ})$; el valor in situ de $g(\text{in-situ})$ solamente puede ser calculado usando la Ecuación (9):

$$g(\text{in-situ}) = \frac{g(+)\mu(\text{in-situ})[e^{(\mu(+))t} - 1]}{\mu(+)[e^{(\mu(\text{in-situ}))t} - 1]} \quad (9)$$

Ecuación (9) se basa de una manera implícita en la dependencia del promedio de la tasa de filtración de zooplancton ($f(\text{promedio})$) del promedio de la concentración fitoplancton (como alimento, $B(\text{promedio})$) durante una incubación que va de acuerdo a la relación $f(\text{promedio}) = I(\max) / B(\text{promedio})$, en donde $I(\max)$ es la tasa máxima de ingestión. Aquí se puede comentar que un valor de $\mu(+)$ que resulta ser mayor que $\mu(\text{in-situ})$ es también ocasionado por un valor de $g(+)$ que es menor que $g(\text{in-situ})$ suscitado por un menor valor de $B(\text{promedio})$ que hay en la muestra de agua en donde nutrientes no fueron añadidos. Si los valores de $\mu(+)$ y $\mu(\text{in-situ})$ no demuestran una diferencia, entonces $g(+)$ puede ser usado directamente como $g(\text{in-situ})$ para el cálculo de PP, de lo contrario $g(\text{in-situ})$ solamente puede ser calculado usando la Ecuación (9). $k(\text{in-situ})$ es la misma suma anterior de $\mu(\text{in-situ})$ y $g(\text{in-situ})$ indicada en la Ecuación (7). Teniendo los valores de $k(\text{in-situ})$, $g(\text{in-situ})$ y $B(0)$, PP puede entonces ser calculado usando la Ecuación (1).

Ecuación (9) se basa de una manera implícita en la dependencia del promedio de la tasa de filtración de zooplancton ($f(\text{promedio})$) del promedio de la concentración fitoplancton (como alimento, $B(\text{promedio})$) durante una incubación que va de acuerdo a la relación $f(\text{promedio}) = I(\max) / B(\text{promedio})$, en donde $I(\max)$ es la tasa máxima de ingestión. Aquí se puede comentar que un valor de $\mu(+)$ que resulta ser mayor que $\mu(\text{in-situ})$ es también ocasionado por un valor de $g(+)$ que es menor que $g(\text{in-situ})$ suscitado por un menor valor de $B(\text{promedio})$ que hay en la muestra de agua en donde nutrientes no fueron añadidos. Si los valores de $\mu(+)$ y $\mu(\text{in-situ})$ no demuestran una diferencia, entonces $g(+)$ puede ser usado directamente como $g(\text{in-situ})$ para el cálculo de PP, de lo contrario $g(\text{in-situ})$ solamente puede ser calculado usando la Ecuación (9). $k(\text{in-situ})$ es la misma suma anterior de $\mu(\text{in-situ})$ y $g(\text{in-situ})$ indicada en la Ecuación (7). Teniendo los valores de $k(\text{in-situ})$, $g(\text{in-situ})$ y $B(0)$, PP puede entonces ser calculado usando la

Ecuación (1).

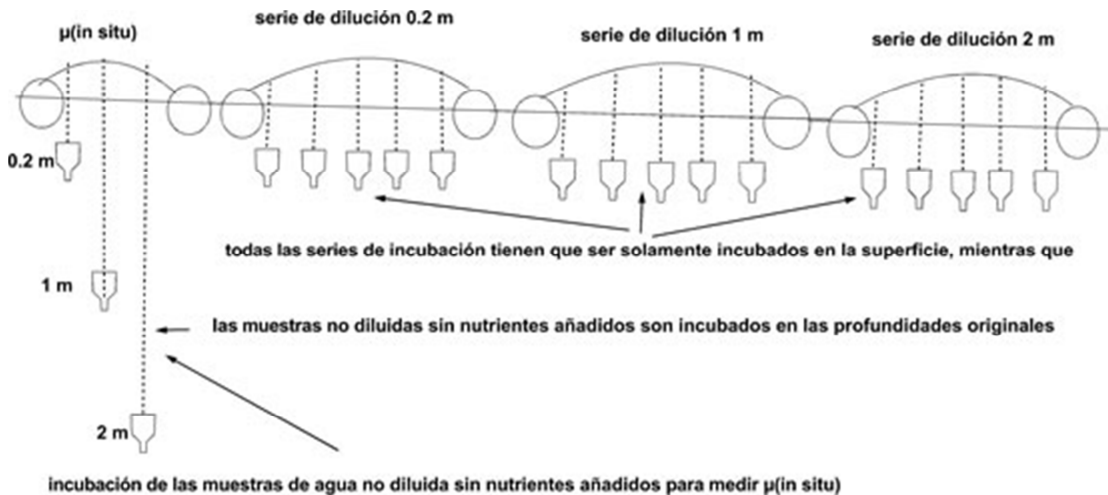
LA BIOMASA INICIAL DE FITOPLANCTON

La biomasa inicial de fitoplancton ($B(0)$) pudiera ser estimada con el método de conteo de células usando para ello un microscopio de inversión (Utermöhl, 1931, 1958; Hasle, 1978; Smayda, 1978; Edler, 1979). Un manual con recomendaciones de como llevar a cabo el conteo de células y de como calcular la biomasa puede ser obtenido en www.helcom.fi/combine_manual/c.html como documento "annex C6" (de la organización Helcom, Mar Báltico). La biomasa inicial ($B(0)$) pudiera ser alternativamente calculada usando un factor "carbono a clorofila" apropiado cuyo valor dependería de la composición taxonómica de fitoplancton que debería ser observada con un microscopio normal (Strickland, 1965; Smetacek, 1975) o de estimaciones estacionales hechas previamente en la región de estudio. Teniendo un dominio de diatomeas se podría usar un valor del factor "carbono a clorofila" de 30 a 50, y teniendo un dominio de dinoflagelados se podría usar un valor del factor "carbono a clorofila" de 80 a 100.

COMENTARIOS ADICIONALES

La Figura 3 que fue no incluida en la publicación original de Moigis y Gocke (2003) demuestra el procedimiento de como llevar a cabo la incubación de muestras de agua que provienen de diferentes profundidades (aquí, como ejemplo, 0.2 m, 1 m y 2 m) para medir la producción primaria. Cada muestra de agua tienen que ser tomada en su profundidad original, y para cada profundidad hay que preparar una correspondiente serie de dilución. Es entonces recomendable de incubar todas las series de dilución que corresponden para tal cual profundidad solamente en la superficie, mientras que la incubación de la correspondientes muestras no diluida y sin nutrientes añadidos (para estimar μ (in situ)) tienen que ser llevada a cabo en sus profundidades originales. Para recordar, una serie de dilución es concebida solamente para medir la tasa específica de pastoreo (g). El motivo de recomendar la incubación de todas esas series individuales de dilución solamente en la superficie es una tasa específica de crecimiento de fitoplancton que posiblemente tiene ahí un valor máximo dentro de la columna de agua debido a la máxima intensidad de luz presente allí, facilitando este máximo valor una estimación de g .

Figura 3



Si el gráfico de dilución resultase ser lineal, entonces el valor calculado de g puede ser usado directamente para el cálculo de PP usando para ello las ecuaciones correspondientes que fueron indicados arriba. Se puede comentar que en caso de una linealidad g dependería solamente de la composición taxonómica del zooplancton. Valores de g de la misma muestra de agua que fuesen estimados en diferentes profundidades de incubación con una serie de dilución deberían resultar igual, pero una medición de g en la superficie resultaría ser más viable por haber un mayor valor de k .

Pero si el gráfico de dilución resultase ser no lineal, entonces el valor in situ de g solamente puede ser calculado usando la Ecuación (9). En un caso de no linealidad g no dependería solamente de la composición taxonómica del zooplancton sino también de la concentración promedio de fitoplancton (como alimento) durante la incubación, y para compensar este último efecto se usa la Ecuación (9), y para dicho cálculo se necesita también el valor de μ (in situ).

Teóricamente, valores de g de la misma muestra de agua que fuesen estimados en diferentes profundidades de incubación con una serie de dilución no deberían resultar igual, pero aplicando después la Ecuación (9) se calcularía entonces el mismo valor in-situ de g . Dichos comentarios para el procedimiento de incubación descrito en la Figura 3 no fue descrito en la publicación original de Moigis y Gocke (2003).

EJEMPLOS

Aquí son descritos 4 experimentos de dilución que fueron publicados en Moigis y Gocke (2003). El primer experimento (R, R = Estuario Rhode River) fue llevado a cabo en Septiembre 1999 en el Estuario "Rhode River" ($38^{\circ} 53' N$. $76^{\circ} 32' W$), un subestuario eutrófico adyacente a la Bahía de Chesapeake localizado en el Estado de Maryland en los EEUU (en el Centro de Investigación "Smithsonian Environmental Research Center" en Edgewater). Los tres restantes experimentos (K1, K2 y K3, K = Fiordo de Kiel) fueron llevados a cabo en Agosto 2001 en el Fiordo de Kiel ($54^{\circ} 20' N$ $10^{\circ} 10' E$), también un estuario eutrófico localizado en el margen occidental del Mar Báltico en Alemania (adyacente al muelle del "Institut für Meereskunde", ver Fotos 2 y 3). En cada experimento fue tomada una muestra de agua superficial a las 7-8 de la mañana. Agua filtrado que fue usado para diluir las muestras de agua para obtener la serie de dilución fue obtenido con filtros tipo Whatman GF/F. En cada nivel de dilución fueron usados dos botellas de policarbonato (botellas de 2 litros en el Estuario Rhode River y botellas de 1 litro en el Fiordo de Kiel). Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo en una sola profundidad in-situ. La profundidad de incubación en el Estuario Rhode River fue aproximadamente 1 m y en el Fiordo de Kiel 0.4 m (Foto 1). Todas las incubaciones duraron exactamente 24 horas.

Foto 2



Foto3



El experimento R tuvo los siguientes niveles de dilución: 1, 0.8, 0.4, 0.2 y 0.05, y los tres experimentos K tuvieron los siguientes niveles de dilución: 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05. Nutrientes fueron añadidos a cada botella de incubación (ver mas abajo). Agua no diluido sin nutrientes añadidos fueron también incubados en duplicado en todos los experimentos realizados. Agua filtrado (con filtros GF/F) con nutrientes añadidos fue solamente incubado en los 3 experimentos realizados en Kiel (una botella). En dicha muestra fue medida al final de la incubación la concentración de clorofila (Chl(filtrado)). Los estimados valores de Chl(filtrado) fueron usados para corregir los valores de clorofila con la Ecuación (5).

Como medida adicional fue también examinado sí al final de la incubación hubo en dicha muestra de agua filtrado una disminución de las concentraciones de los nutrientes añadidos que pudo haber sido ocasionado por una posible demanda de bacterias por dichos nutrientes. La suposición era la siguiente: En aguas costeros pueden haber ecosistemas semi-terrestres de lo cual puede haber un flujo de una materia orgánica al ecosistema acuático, teniendo esa materia orgánica una posible alta relación carbono-nitrógeno (C/N y/o C/P). Tal alta relación puede inducir una limitación al crecimiento de bacterias, promoviendo esto una competencia interespecífica entre bacterias y fitoplancton por dichos nutrientes. Los métodos estándar que fueron usados para medir dichos nutrientes (experimentos de Kiel) están descritos en el manual de Grasshoff (1999).

En todos los experimentos fue tomada la muestra de agua que fue usada para ser diluida a todos los niveles de dilución de un contenedor común. De dicho contenedor fue también tomada la muestra de agua para determinar la concentración inicial no diluida de clorofila (Chl(0)). En ambas localidades fueron usados filtros GF/F para determinar las concentraciones finales de clorofila de todas las botellas de incubación de la serie de dilución. La extracción de clorofila fue llevado a cabo con acetona al 90 % en un sitio absolutamente oscuro y frío (4°C) por 24 horas. La concentración de clorofila de las muestras de acetona fue entonces medida con un fluorómetro Turner Designs 10-AU. Las muestras fueron acidificadas. La concentración de clorofila fue calculada según el manual de Parsons et al. (1985).

Nutrientes

En el experimento R fueron añadidos la misma cantidad de nitrato y fosfato a todas las botellas de la serie de dilución, obteniendo en todas las muestras una idéntica concentración final de 60 μM NO₃ y 6 μM PO₄.

En los experimentos de la serie K fueron añadidos más nutrientes a la serie de dilución para

obtener concentraciones finales mayores, siendo los valores medidos entre 255 y 386 μM para nitrato, entre 165 y 178 μM para amonio, entre 18 y 28 μM para fosfato y entre 90 y 94 μM para silicato. Esas mayores concentraciones (calculadas según la regla 50x) tenían el propósito de evitar una competencia intraespecífica por nutrientes dentro de la población de fitoplancton y así tener una mayor seguridad de tener una constante tasa específica de crecimiento de fitoplancton dentro de la serie de dilución.

En experimentos de dilución que previamente habían sido llevados a cabo a los indicados en Kiel no había sido añadido amonio como recurso principal de nitrógeno a la serie de dilución, y el gráfico de dilución mostró una típica limitación de tipo regenerativa, demostrando una disminución de la tasa aparente de crecimiento con el aumento de dilución (ver Anderson et al., 1991). Basándose en estas observaciones se tomó entonces la decisión de añadir amonio (como recurso adicional de nitrógeno) junto con nitrato, fosfato y silicato. Precisamente cuando amonio había sido añadido a la mezcla de nutrientes, el gráfico de dilución mostró el típico perfil de dilución, demostrando un aumento de la tasa aparente de crecimiento de fitoplancton con el aumento de dilución (ver Figura 2, traducida de Moigis y Gocke, 2003).

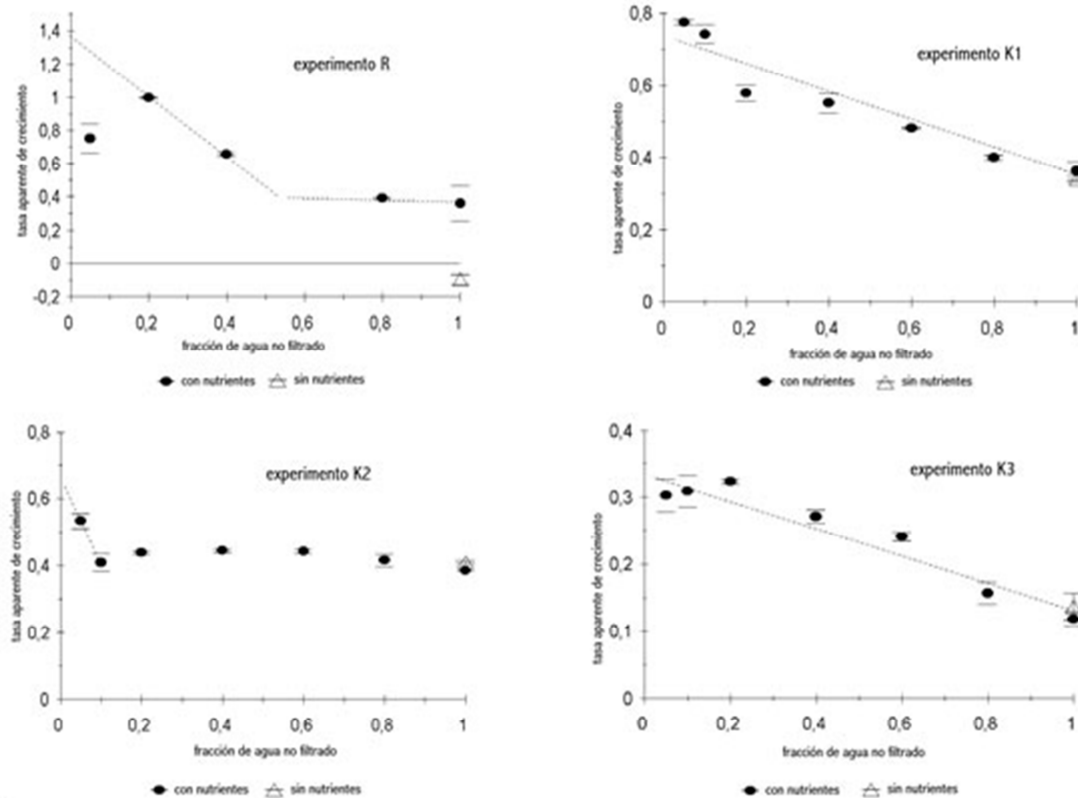
Biomasa inicial de fitoplancton

En el experimento R fue estimada la biomasa inicial de fitoplancton con el método de conteo de células de fitoplancton usando un microscopio de inversión (Gallegos, 1992). Los valores de la biomasa inicial de fitoplancton de los experimentos de la serie K fueron calculados usando un factor "carbono a clorofila" de 100. Este valor se basó en previas determinaciones estacionales que fueron hechas en la Bahía de Kiel (Smetacek, 1975) y en el Fiordo de Kiel (Stienen, 1985). Un dominio de dinoflagelados que había sido observado durante el período de experimentación (Marcos Sommer, comunicación personal) respalda este valor seleccionado.

Gráficos de dilución

Figura 4 (traducida de Moigis y Gocke, 2003) demuestra los gráficos de dilución de los experimentos realizados en el Estuario Rhode River y en el Fiordo de Kiel. El gráfico de dilución del experimento R fue no lineal, siendo el valor de $\mu(5\%)$ menor que $\mu(20\%)$. En el proceso de extrapolación de 3 puntos para determinar $k(\text{max})$ fue omitido el valor de $\mu(5\%)$ porque la suposición fue hecha de que una posible competencia interespecífica entre fitoplancton y bacterias por nutrientes pudo haber ocasionado una reducción de la tasa específica de crecimiento de fitoplancton, especialmente en el nivel de dilución $D = 0.05$ (ver más comentarios en Moigis y Gocke, 2003). Además, una suposición adicional era de que en el intervalo de dilución entre $D = 20\%$ y $D = 40\%$ la dependencia lineal del pastoreo era todavía válida, de manera que los valores correspondientes de $\mu(D)$ podrían ser usados para el proceso de extrapolación de tres puntos. En este experimento $\mu(\text{in-situ})$ tenía un valor menor que $\mu(+)$; el valor de $k(\text{max})$ era 1.34 d^{-1} , $g(+)$ tenía un valor de 0.97 d^{-1} , el valor de $g(\text{in-situ})$ era 1.23 d^{-1} , $k(\text{in-situ})$ tenía un valor de 1.14 d^{-1} y el valor de $C(0)$ era $643.2 \text{ mg C m}^{-3}$. Así, el valor calculado de PP era $701.2 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Figura 4



Los experimentos K1 y K3 mostraron gráficos de dilución lineal, y el gráfico de dilución del experimento K2 era no lineal (Figura 4, traducida de Moigis y Gocke, 2003). En esos experimentos los valores de $\mu(+)$ y $\mu(\text{in-situ})$, eran similares, de manera que el valor estimado de $g(+)$ en K2 pudo ser usado directamente como $g(\text{in-situ})$ (de todos modos, si se usaría la Ecuación (9) para calcular $g(\text{in-situ})$ se obtendría un valor casi idéntico a $g(+)$). Las muestras de agua filtrado no mostraron al final de la incubación ninguna reducción de la concentración de las nutrientes. Dicha no reducción no fue una sorpresa porque la localidad en Kiel puede ser considerado como netamente urbano (ver Fotos 2 y 3).

Los valores de $k(\text{max})$ eran para K1 y K3 0.74 y 0.34 d^{-1} , respectivamente, y el valor correspondiente para K2 era 0.66 d^{-1} . Los valores de $g(\text{in-situ})$ eran para K1 y K3 0.41 y 0.21 d^{-1} , respectivamente, y el valor correspondiente para K2 era 0.27 d^{-1} . Los valores de $k(\text{in-situ})$ eran para K1, K2 y K3 0.75, 0.68 y 0.35 d^{-1} , respectivamente. Los valores de $C(0)$ eran para K1, K2 y K3 1087, 1017 y 2684 mg C m^{-3} , respectivamente. Los valores de PP eran para K1, K2 y K3 971.0, 854.9 y 1008.3 $\text{mg C m}^{-3} \text{d}^{-1}$, respectivamente. La Tabla 2 (traducida de Moigis y Gocke, 2003) muestra un resumen de todos esos resultados.

COMENTARIOS GENERALES

El método puede ser considerado como uno posible alternativo a los métodos de ^{14}C y O_2 . En relación a su aplicación este nuevo método tiene diversas ventajas, tales como por ejemplo, su uso en regiones geográficas en donde no hay una infraestructura isotópica o en institutos en donde no hay la posibilidad de llevar a cabo experimentos con ^{14}C . Este método solamente necesita botellas, nutrientes, un procedimiento de conteo de células y un equipo estándar para medir clorofila. Este pigmento puede ser medido con métodos estándar en cualquier laboratorio acuático. Clorofila puede ser también extraída con etanol (un manual correspondiente puede ser obtenido en www.helcom.fi/combine_manual/c.html como documento "annex C-4"), de manera que implicaciones de seguridad y salud que pudieran ser vinculadas con un uso de acetona pueden ser esquivadas. Además no se necesita ninguna autorización especial o conocimientos especiales como las que se requieren para el método ^{14}C , y también es mucho más económico y factible.

En el método de dilución hay más trabajo que hacer que en los métodos de ^{14}C y O_2 . Sin embargo, si todos los niveles de dilución fueran incluidos en el diseño experimental, entonces, además de medir PP se estimarían también parámetros adicionales tales como g , k y por último, la estrategia de alimentación del zooplancton. Con solamente haber estimado un gráfico de dilución no lineal o lineal se podría llegar a la conclusión si en un experimento la tasa de consumo de

zooplancton en el nivel de dilución no diluido era máxima o no. Además, si un conteo de zooplancton fuera también hecho, entonces se podría estimar la reacción funcional de zooplancton (tasa de ingestión versus concentración de alimento, Moigis, comentarios personales). Los métodos de ^{14}C y O_2 solamente suministran valores de PP. Una desventaja adicional del método de dilución la cual consume tiempo es que este método necesita un valor exacto de la biomasa inicial de fitoplancton que solamente puede ser estimado con un conteo de células con el subsiguiente cálculo de biomasa. Sin embargo, siempre y cuando un conteo fuera llevado a cabo, la composición taxonómica de fitoplancton sería también simultáneamente determinada. De otro modo, si se usase un factor "carbono a clorofila" para calcular la biomasa inicial, entonces el valor de PP tuviera un error inevitable. La exactitud de un valor de PP que de esta manera fuera calculado dependería del seleccionado valor del factor "carbono a clorofila" que entonces se basaría en la composición taxonómica de fitoplancton la cual tendría que ser reconocida con un microscopio normal. Clorofila es normalmente el indicador de biomasa seleccionado para los experimentos de dilución, y midiendo este pigmento asume de que el valor de la relación entre biomasa y clorofila se mantenga constante durante la incubación. Una opción alternativa en un experimento de dilución podría ser la estimación de la biomasa final que entonces debería ser llevada a cabo por igual con un conteo de células, como lo fue hecho por e.g. Fonda-Umanil y Beran (2003).

El método de O_2 pudiera ser visto como uno alternativo al método de ^{14}C , especialmente en todos aquellos países en donde faltan infraestructuras radioisotópicas. Sin embargo, este método tiene la siguiente desventaja: Las unidades de oxígeno que son expresados en mg O_2 tienen que ser convertidas a unidades de carbono, y para esto se requiere el cociente fotosintético (CP). El valor de CP depende del nitrógeno (N) que es asimilado como recurso principal para el crecimiento de fitoplancton. Si amonio es asimilado, entonces CP tiene un valor de 1.2 (Raine, 1983), por otra parte si nitrato es asimilado, entonces CP tiene un valor de 2 (Williams et al., 1979; Davies y Williams, 1984). Esta diferencia ocasiona una inseguridad en los valores de PP si éstos son expresados en unidades de carbono. Normalmente no sé sabe en un experimento cual es el recurso principal de nitrógeno utilizado para el crecimiento de fitoplancton durante una incubación, de modo que un valor de PP estimado con el método de O_2 pudiera tener un máximo posible error del 66 % ($= 2/1.2$). Un valor de PP que haya sido estimado con el método de dilución no debería tener tal error si un conteo de células es llevado a cabo. Así, la fuente principal de incertidumbre del método de dilución debería ser solamente encontrada dentro del procedimiento del conteo de células.

En un experimento de dilución es muy importante tener la certeza de que el crecimiento de fitoplancton no sea limitado por nutrientes. Si el crecimiento de fitoplancton dependiera más de nutrientes externos, entonces nitrato tuviera que ser añadido como recurso principal de N (como lo fue hecho en el Estuario Rhode River), por el otro lado, si el crecimiento dependiera más de nutrientes regenerados, entonces urea o amonio debería ser añadido como recurso principal de N. Una opción ideal sería de añadir ambos componentes de nitrógeno, tal como lo fue hecho en los experimentos de Kiel. En lo que se refiere a un posible efecto tóxico que pudiera ocurrir en caso de que la cantidad añadida de nutrientes fuera alta, uno debería sugerir de añadir urea en lugar de amonio. Metales esenciales tales como hierro pudieran también limitar el crecimiento de fitoplancton, tal como lo fue demostrado por Zhang (2000) en aguas Chinas. En los presentes experimentos que fueron llevados a cabo en ambas áreas de estudio no fueron añadidos metales esenciales porque previamente se pudo demostrar que esos elementos no eran factores limitantes. De todas formas metales esenciales deberían ser añadidos a la mezcla de nutrientes si los experimentos son llevados a cabo en aguas más "desconocidos" para así tener la seguridad de que el fitoplancton vaya a tener un crecimiento máximo, y de esta manera tener un valor idéntico de k en todos los niveles de dilución. El método de dilución depende totalmente de un valor idéntico de k en todos los niveles de dilución. Por eso es muy recomendable de calcular las necesarias cantidades de los nutrientes (N, P, Si) que deben ser añadidas a todas las muestras de agua de la serie de dilución para obtener un valor idéntico de la tasa específica de crecimiento de fitoplancton en todos los niveles de dilución tomando en cuenta los factores "nutrientes por mg de clorofila inicial no diluida" que fueron indicados antes en el texto como la regla 50x.

AGRADECIMIENTO

El autor (A.G.M.) quiere agradecer de nuevo al Smithsonian Institution (U.S.A.) que financió a través de su "Office of Fellowships and Grants" el experimento R que fue llevado a cabo en el laboratorio de Dr. Charles Gallegos (Smithsonian Environmental Research Center, U.S.A.).

Referencias

Anderson, T., Schartau, A.K.L. y Paasche, E. (1991) Quantifying external and internal nitrogen and phosphorus pools, as well as nitrogen and phosphorus supplied through remineralization, in coastal marine plankton by means of a dilution technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 69, 67-80.
Begon, M.E., Harper, J.L. y Townsend, C.R. (1996) *Ecology*. Blackwell Science Limited, Oxford,

1088 pp.

- Davies, J.M. y Williams, P.J. (1984) Verification of ^{14}C and O_2 derived primary production measurements using an enclosed ecosystem. *J. Plankton Res.*, 6, 457-474.
- Edler, L. (ed) (1979) Recommendations for Marine Biological Studies in the Baltic Sea, Phytoplankton and Chlorophyll. *Baltic Marine Biologist* 5, Sweden, 38 pp.
- Fonda-Umani, S. y Beran, A. (2003) Seasonal variations in the dynamics of microbial plankton communities: first estimates from experiments in the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 247, 1-16.
- Gaardner, T. y Gran, H.H. (1927) Investigations of the production of phytoplankton in the Oslo Fjord. *Rapp. et Proc. Verb., Cons. Internat. Explor. Mer*, 42, 1-48.
- Gallegos, C.L. (1989) Microzooplankton grazing on phytoplankton in the Rhode River, Maryland: nonlinear feeding kinetics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 57, 23-33.
- Gallegos, C.L. (1992) Phytoplankton photosynthesis, productivity, and species composition in a eutrophic estuary: comparison of bloom and non-bloom assemblages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 81, 257-267.
- Gocke, K, Cortes, J y Murillo, M.M. (2001) The annual cycle of primary productivity in a tropical estuary: The inner regions of the Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 49, 289-306.
- Grasshoff, K. (1999) *Methods of Seawater Analysis*. Wiley VCH Verlag, 600 pp.
- Hasle, G.R. (1978) Using the inverted microscope. In: Sournia, A., (ed.) *Phytoplankton Manual*. Unesco, Paris, pp. 191-196.
- Landry, M.R. (1993) Estimating Rates of Growth and Grazing Mortality of Phytoplankton by the Dilution Method. In Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Cole, J.J. (eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Ecology*. Lewis Publishers, Boca de Raton, pp. 715-722.
- Landry, M.R. y Hassett, R.P. (1982) Estimating the grazing impact of marine micro-zooplankton. *Mar. Biol.*, 67, 283-288.
- Li, W.K.W. (1990) Particles in "Particle-free" Seawater: Growth of Ultraphytoplankton and Implications for Dilutions Experiments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47, 1258-1268.
- Moigis, A.G. (2000) Photosynthetic rates in the surface waters of the Red Sea: the radiocarbon vs. the non-isotopic dilution method. *J. Plankton Res.*, 22, 713-727.
- Moigis, A.G. & Gocke, K. (2003) Primary production of phytoplankton estimated by means of the dilution method in a coastal water. *Journal of Plankton Research*, 25: 1291-1300.
- Parsons, T.R., Malta, Y. y Lalli, C.M. (1985) *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, Oxford, 173 pp.
- Raine, R.C.T. (1983) The effect of nitrogen supply on the photosynthetic quotient of natural phytoplankton assemblages. *Bot. Mar.*, 25, 417-423.
- Redfield, A.C., Ketchum, B.H. y Richards, F.A. (1965) The influence of organisms on the composition of the sea water. In Hill, M.N. (ed.), *The Sea*, Vol. 2. Interscience Publishers, New York, pp. 26-76.
- Smayda, T.R. (1978) From phytoplankters to biomass. In: Sournia, A., (ed.) *Phytoplankton Manual*. Unesco, Paris, pp. 273-279.
- Smetacek, V. (1975) *Die Sukzession des Phytoplanktons in der Westlichen Kieler Bucht*. Dissertation Universität Kiel, Germany, 151 pp.
- Steemann-Nielsen, E. (1952) The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 18, 117-140.
- Stienen, C. (1986) *Das Phytoplanktons Entwicklung in Abhängigkeit von der Nährsalz-konzentration. Ein Vergleich zwischen Kieler Förde und Kieler Bucht*. Berichte aus dem Institut für Meereskunde an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, 152, 125 pp.
- Strickland, J.D.H. (1965) Production of Organic Matter in the Primary Stages of the Marine Food Chain. In Riley, J.P. y Skirrow, G. (eds.), *Chemical Oceanography*, Vol 1. Academic Press, London, N.Y., pp. 477-610.
- Utermöhl, H. (1931) Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons. *Verh. Inter. Verein Limnol.* 5.
- Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, 9, 1-38.
- Williams, P.J., Raine, R.C.T. y Byran, J.R. (1979) Agreement between the ^{14}C and Oxygen methods of measuring phytoplankton production: measurements of the photosynthetic quotient. *Oceanol. Acta*, 2, 411-416.
- Zhang, J. (2000) Evidence of trace metal limited photosynthesis in eutrophic estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.*, 45, 1871-1877.

Tabla 1. Lista de los símbolos usados en el texto, presentados alfabéticamente (tabla traducida de Moigis y Gocke, 2003).

B(0) biomasa inicial de fitoplancton no diluida (mg C m^{-3})
B(promedio) biomasa promedio de fitoplancton durante la incubación
Chl clorofila a (mg m^{-3})
Chl(0) clorofila inicial no diluida

Chl(0,D) clorofila inicial en el nivel de dilución D
 Chl(t,D) clorofila final en el nivel de dilución D
 D nivel de dilución (sin unidades)
 f tasa de filtración de zooplancton (volumen animal-1 tiempo-1)
 f(max) tasa máxima de filtración de zooplancton
 g tasa específica de pastoreo de zooplancton (d-1)
 g (D) tasa específica de pastoreo de zooplancton en el nivel de dilución D
 g(in-situ) tasa in situ específica de pastoreo de zooplancton en el nivel no diluido sin nutrientes añadidos
 g(+) tasa específica de pastoreo de zooplancton en el nivel no diluido con nutrientes añadidos
 I tasa de ingestión de zooplancton (mg C animal-1 tiempo-1)
 I(max) tasa máxima de ingestión de zooplancton
 k tasa específica de crecimiento de fitoplancton (d-1)
 k(in-situ) tasa in situ específica de crecimiento de fitoplancton en el nivel no diluido sin nutrientes añadidos
 k(max) tasa máxima específica de crecimiento de fitoplancton
 PP producción primaria de fitoplancton (mg C m⁻³ d-1)
 r factor de aumento de la relación entre la biomasa de bacteria y la biomasa de fitoplancton en el nivel no diluido.
 t tiempo (d)
 μ tasa aparente de crecimiento de fitoplancton (= k - g) (d-1)
 μ(D) tasa aparente de crecimiento de fitoplancton en el nivel de dilución D
 μ(in-situ) tasa aparente de crecimiento de fitoplancton en el nivel no diluido sin nutrientes añadidos
 μ(+) tasa aparente de crecimiento de fitoplancton en el nivel no diluido y con nutrientes añadidos

Tabla 2. Tasa máxima específica de crecimiento de fitoplancton, tasa específica de pastoreo de zooplancton con y sin nutrientes añadidos, tasa in situ específica de crecimiento de fitoplancton, biomasa y la producción primaria calculada para cada uno de los experimentos indicados (con la fecha). La tasa máxima específica de crecimiento de fitoplancton y la tasa específica de pastoreo de zooplancton con nutrientes de los experimentos K1 y K3 fueron estimadas con el procedimiento estadístico de regresión lineal, los valores indicados dentro de los paréntesis son de confianza al 5 %. Las unidades están indicados abajo (tabla traducida de Moigis y Gocke, 2003).

Experimento	R	K1	K2	K3
Fecha	Oct.10	Ago. 15	Ago. 20	Ago. 22
	1999	2001	2001	2001
Con nutrientes				
Tasa max. espec. de crecimiento (d-1)	1.34	0.74	0.66	0.34
	(0.66 - 0.82)	(0.30 - 0.38)		
Tasa aparente de crecimiento (D=1, d-1)	0.37	0.36	0.39	0.11
Tasa específica de pastoreo (d-1)	0.97	0.41	0.27	0.21
	(0.27 - 0.56)	(0.14 - 0.28)		
Sin nutrientes				
Tasa específica de pastoreo (d-1)	1.23	0.41	0.27	0.21
Tasa aparente de crecimiento (D=1, d-1)	-0.09	0.34	0.41	0.14
Tasa in situ espec. de crecimiento (d-1)	1.14	0.75	0.68	0.35
Clorofila (mg m ⁻³)	14.8	10.9	10.2	26.8
Biomasa (mg C m ⁻³)	643.2	1087	1017	2684
Producción primaria (mg C m ⁻³ d-1)	701.2	971.0	854.9	1008.3

Fig. 1. Diagrama de flujo de un experimento estándar de dilución (figura traducida de Moigis y Gocke, 2003).

Fig. 2. Gráficos de dilución lineal (círculo) y no lineal (triángulo). La cruz indica una posible posición de una incubación de una muestra de agua sin nutrientes añadidos (figura traducida de Moigis y Gocke, 2003).

Fig. 3. Para medir la PP de muestras de agua que provienen de diferentes profundidades (aquí 0.2, 1 y 2 m como ejemplo), las series de dilución hechas para cada profundidad tienen que ser solamente incubadas en la superficie mientras que las muestras no diluidas sin nutrientes añadidos tienen que ser incubadas en sus profundidades originales. Para recordar, una serie de dilución es solamente para medir la tasa específica de pastoreo (g), si el gráfico de dilución resulta ser lineal, entonces el valor estimado de g puede ser usado directamente como g(in-situ) para el

cálculo de PP, mientras que si el gráfico de dilución resulta ser no lineal. entonces el valor in situ de g ($g(\text{in-situ})$) solamente puede ser calculado usando la Ecuación (9).

Fig. 4. Gráficos de dilución de los experimentos R, K 1, K 2 y K3 (ver la abreviaciones en el texto). Los círculos y triángulos indican los promedios de dos réplicas, las líneas conectan los promedios. Las unidades de la tasa aparente de crecimiento están indicados como d^{-1} (figura traducida de Moigis y Gocke, 2003).

Foto 1: Incubación de una serie de dilución de un experimento de dilución hecho en Kiel.

Foto 2: Localidad de los experimentos realizados en Kiel, Alemania. El círculo demuestra el sitio exacto en donde fueron hechos los experimentos K1, K2 y K3.

Foto 3: Como Foto 2 pero visto desde una otra perspectiva. La foto demuestra el carácter urbano de la localidad.