

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR



**TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN
TUTELADO**

**ADECUACIÓN DEL MÉTODO IRGA PARA LA DETERMINACIÓN DE
LA RESPIRACIÓN EN AGUAS COSTERAS**

FEDERICO BALTAR GONZÁLEZ

Las Palmas de Gran Canaria, 2005

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TUTELADO DE SEGUNDO CICLO

*Adecuación del método IRGA para la determinación de la
respiración en aguas costeras*

30 de septiembre de 2005

Federico Baltar González

Índice

Introducción.....	2
Objetivos.....	5
Materiales y métodos.....	5
Resultados.....	11
Discusión.....	24
Conclusión.....	28
Agradecimientos.....	28
Referencias.....	29

Introducción

Una pregunta clave a la hora de comprender el ciclo global del carbono en la biosfera es si los océanos actúan como fuentes o sumideros netos de carbono. Este balance dependerá de la producción de materia orgánica en comparación con la descomposición debida a la respiración biológica. Aunque el océano es el ecosistema más extenso de la Tierra, nuestro conocimiento sobre su función es aún insuficiente, hasta el punto de que hace menos de cien años se consideraba que el océano profundo estaba desprovisto de vida. A este respecto del Giorgio y Duarte [2002] afirmaron que: "Por eso, no es extraño que mientras se piensa en los bosques como los pulmones de nuestro planeta, el papel del océano en el metabolismo queda pobremente entendido". La respiración oceánica y la descomposición de materia orgánica asociada es uno de los componentes más importantes del flujo de carbono global y una fuente primordial de dióxido de carbono en la naturaleza.

A la hora de estudiar la respiración planctónica se han venido utilizando distintos métodos aproximativos; estos son:

a) *Medidas de la tasa de producción/consumo de productos o reactivos*: este se basa en medidas del cambio de un reactivo (e.g. oxígeno) o de un producto (e.g. dióxido de carbono) en la respiración durante un periodo de tiempo característico (12 ó 24 h) bajo condiciones de oscuridad. Aunque este parece ser la mejor aproximación a la realidad, presenta algunas limitaciones. Por un lado se puede estar obviando una parte de respiración que se realice solamente en presencia de luz (e.g. reacción de Mehler, ...), y existe una dependencia temporal con el agotamiento de la concentración de sustratos de la que depende la respiración. Por otro lado, también limitaciones propias del método *in vitro*; esto es, el confinamiento puede ser fuente potencial de errores debido a dos motivos: i) el tamaño de muestra puede omitir una parte de la comunidad heterotrófica (provocando una disminución de la respiración debido a la pérdida de miembros de la comunidad, y también por la posible eliminación de la presión predatora), y ii) por el mismo continente debido al denominado "efecto botella". Por último, a veces puede existir un error de interpretación; ya que se asume que la técnica del oxígeno determina la disminución en ausencia de luz

admitiendo que ésta puede ser atribuida al proceso fisiológico de la respiración. Pero esta suposición fue criticada por Pamatmat (1997), que argumentó que la descomposición de hidróxido de peróxido, que acarrea una producción de oxígeno, puede enmascarar las medidas de respiración, dependiendo de la técnica usada para medir el oxígeno.

b) *Mediante relaciones con enzimas respiratorias apropiadas o sistemas enzimáticos:* el método de ETS (Sistema de Transporte de Electrones) estima la máxima actividad de las enzimas asociadas con el sistema de transporte de electrones respiratorio tanto de organismos eucariotas como de procariotas. Es una medida potencial que debe ser convertida a respiración *in situ* por relaciones determinadas empíricamente. Esto puede acarrear problemas, pero no más que para otras técnicas comúnmente utilizadas (^{14}C y ^3H -thymidina; del Giorgio 1992).

c) *Predicciones a partir de biomasa:* a partir de medidas o estimaciones de la biomasa de los distintos miembros de la comunidad planctónica, y con unas tasas apropiadas de relación entre la biomasa con las tasas metabólicas de cada grupo, se puede calcular una tasa de respiración comunitaria (Robinson et al., 1999). El problema es que, aunque existe un consenso sobre la relación existente entre la tasa de respiración y el tamaño para el plancton mayor, este no existe al ir disminuyendo la talla (es más que probable que las bacterias presenten la relación metabólica mayor de todos los organismos vivientes).

d) *A partir de la actividad y de las eficiencias de crecimiento:* a partir de medidas de producción primaria, producción bacteriana, y de la predación del microzooplancton, si se tienen unas eficiencias de crecimiento apropiadas para cada grupo planctónico, la respiración de cada conjunto puede ser calculada y obtener la respiración comunitaria como suma de todas. El problema radica en que las eficiencias de crecimiento, en particular para la fracción bacteriana, no están bien estimadas.

e) *Modelos inversos de la composición comunitaria*: este procedimiento se basa en un análisis inverso; en el cual se busca el mejor ajuste partiendo de unas tasas metabólicas obtenidas previamente.

La importancia que tienen las medidas de respiración planctónica para entender el flujo de carbono a través de la cadena alimentaria microbiana, y las relativamente pocas observaciones disponibles por los métodos tradicionales, hacen que continuamente se estén buscando nuevas aproximaciones que puedan incrementar nuestro conocimiento sobre la variabilidad espacial y temporal de la respiración comunitaria. De este modo, un método que está abriéndose paso actualmente es la medida de la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenada (IDH) en relación con la producción de dióxido de carbono y la producción de oxígeno. Por otro lado, Luz y Barkan (2000) introdujeron recientemente otra técnica para estimar las tasas integradas en el tiempo de respiración y fotosíntesis a partir de diferencias en la composición isotópica atmosférica (^{16}O , ^{17}O , y ^{18}O) y en el oxígeno disuelto y la tasa de intercambio atmósfera-océano. La ventaja de este método radica en que puede integrar tasas en periodos que van de semanas a meses, algo que es imposible de conseguir con incubaciones en botellas. La desventaja es el desconocimiento sobre las verdaderas tasas de intercambio de gases (un error asociado del 30%), así como el costo y la dificultad para realizar análisis de isótopos de oxígeno por espectrómetros de masa.

Uno de los problemas más acusados cuando se trabaja con medidas de respiración es el hecho de tener que medir la disminución en la concentración de oxígeno en vez del incremento de la de CO_2 . Este problema tiene especial importancia debido a que la mayoría de las medidas de respiración planctónica (>90%) se han realizado con el método del oxígeno (Aristegui et al. 2005). Esto es debido a que es más fácil determinar las concentraciones de oxígeno en el medio ya que éste se encuentra en mayor grado. Pero a la hora de transformarlas a unidades de carbono se hace necesario buscar un parámetro que relacione la concentración de CO_2 producida durante la respiración con la de O_2 consumida. Este parámetro se denomina “cociente respiratorio (RQ)” y suele tomarse como una constante. Al estar multiplicando la tasa obtenida en unidades de oxígeno por un cociente teórico es más que probable que se esté induciendo a errores; es decir, es posible que los

cocientes respiratorios de los distintos organismos de la comunidad sean distintos, y también es factible que exista un desacople entre la producción de CO₂ y el consumo de O₂ con el tiempo. Este desacoplamiento puede tener dos orígenes, por un lado el propio debido a errores experimentales, y por otro lado debido a los organismos.

Por otro lado, también es cierto que hay métodos que son capaces de proporcionar tasas respiratorias directamente en unidades de carbono (e.g. SOMMA), pero lo suelen hacer de forma indirecta. Esto es, midiendo el carbono inorgánico total (CIT), del cual la parte correspondiente al CO₂ es muy pequeña, pudiendo verse distorsionado por pequeños procesos de descalcificación de carbonato cálcico.

En este trabajo se presenta un método que mide directamente la utilización de CO₂, obteniendo así tasas respiratorias en unidades de carbono, eludiendo el tener que transformar unidades mediante la utilización de cocientes respiratorios, y obteniendo una señal directa de la variación de CO₂, evitando así los errores potenciales.

Objetivos

Los objetivos buscados en el presente trabajo eran los siguientes: la obtención de un sistema que proporcionara unas medidas estables, y la validación de este sistema elegido con muestras de agua de mar naturales.

Materiales y métodos

Procedimiento de muestreo

Las muestras de agua de mar fueron recogidas en el Este de la isla de Gran Canaria, concretamente en la zona de Taliarte. Las muestras de agua destilada fueron proporcionadas por el Centro de Biotecnología Marina de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, situado en Taliarte, obtenidas a partir de un Millipore Elix®.

Las muestras se incubaron en botellas BOD (borosilicato) previamente lavadas con ácido clorhídrico al 4% y enjuagadas con agua destilada varias veces. En las muestras de

agua de mar, por último, se realizaban varios enjuagues con el mismo agua de la muestra. Las botellas se rellenaban con una manguerita por rebose para evitar airear las muestras. Cada una de las botellas se cerraban y se aseguraban los tapones esmerilados con Parafilm. Todas las incubaciones se realizaron en oscuridad con el fin de obtener una medida de la respiración comunitaria.

Las incubaciones se llevaron a cabo dentro de una nevera llena de agua a una temperatura constante y esta a su vez se encontraba en una cámara de cultivo para evitar, en la medida de lo posible, que se produjeran variaciones térmicas importantes. Un día antes del comienzo de cada ensayo se introducía la nevera con agua en la cámara, sin botellas y destapada, para que el agua en su interior se aclimatara a la temperatura de la cámara; y así, se conseguía tener la temperatura adecuada el día del comienzo de las incubaciones.

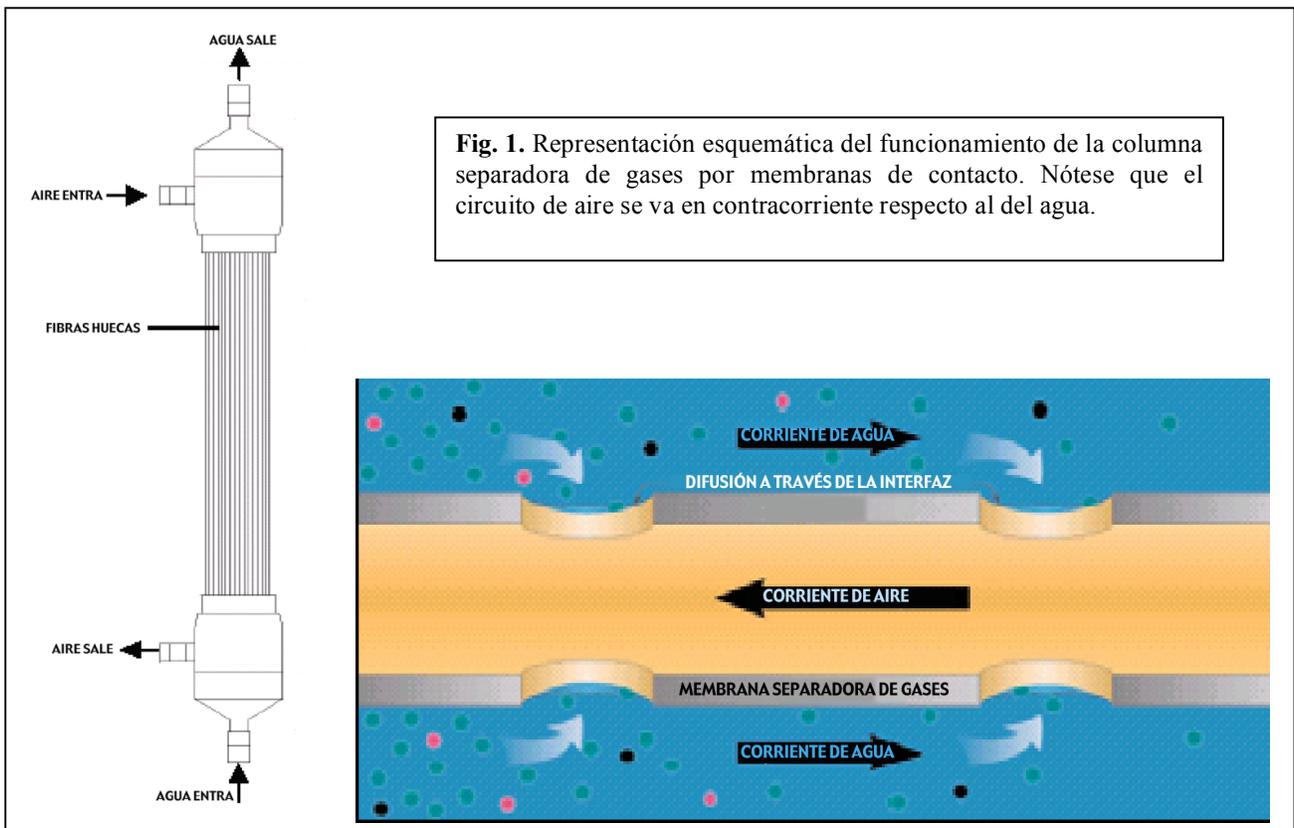
A la hora de la medición, siempre se pasaba, como mínimo, una muestra para limpiar el sistema. Posteriormente, se procedía a medir.

Sistema de medida

El sistema propuesto en este trabajo como método para la determinación de la respiración en aguas costeras se basa en una columna que separa los gases disueltos en agua, y de un aparato que detecta la concentración de CO₂ contenido en la fase gaseosa. En la **Fig. 2** se muestra una foto y una representación esquemática del sistema. Este consta de los siguientes componentes:

Monitor EGM-4 de gases ambientales para la medición de CO₂ (PP systems). Es un analizador de gases por infrarrojo que trabaja con una función “Auto-Zero”. Usando una técnica de análisis de gases por infrarrojo (IRGA, Infrared Gas Analyzer) se determina la concentración de CO₂ con una precisión de ppm, mediante medidas instantáneas. Esta detección se fundamenta en el hecho de que los gases con moléculas di-atómicas, tales como el CO₂, absorben fotones en el rango del infrarrojo. Para el caso del CO₂, una región de fuerte absorción es la de 4.26 micras. Si se sitúa una fuente que emite a esa longitud de

onda al final de un tubo, y en el extremo opuesto está instalado un sensor sensible a los fotones de 4.26 micras, se obtiene un sencillo analizador de gases por infrarrojo. Al pasar el dióxido de carbono por el detector, el gas absorbe parte del infrarrojo y la señal del sensor decrece. La función “Auto-zero” realiza una calibración que permite una adaptación rápida a cambios en las condiciones ambientales y una excelente estabilidad de la señal de CO₂. Esta función minimiza los posibles errores debido a cambios por la contaminación de la celdilla de la muestra, el envejecimiento de la fuente de luz y cambios en la sensibilidad del detector, durante el periodo de muestreo.



Columna de transferencia de gases por membrana de contacto (Minimodule® de Liqui-Cell®). Esta columna está constituida por unas fibras huecas microporosas de polipropileno (Celgard®). Estas fibras son hidrófobas y proporcionan una superficie donde se produce un contacto directo entre la fase líquida y la gaseosa, evitando que el líquido penetre en los poros (**Fig. 1**). De este modo se produce una separación de los gases disueltos en la muestra, para su posterior detección con el EGM-4.

Además el circuito diseñado está compuesto de una bomba peristáltica de Masterflex® L/S™ (modelo 7519-05), tubos Masterflex® 06409-16 Tygon., baño termostático (Isotemp Refrigerated Circulator, model 910) de Fisher Scientific, una columna de “lima de soda” y otra de drierita.

A la hora de la medida, la muestra de agua se coloca en el baño termostático (que está a la misma temperatura a la que se incuban las muestras), se introduce el tubo y se conecta la bomba peristáltica. Entonces el agua entra en la columna de transferencia de gases y sale por el extremo opuesto. En este recorrido la muestra se desgasifica parcialmente, siendo los gases conducidos hacia el detector IRGA donde se va obteniendo una señal en continuo. Una vez han pasado los gases por el sensor, son devueltos a la columna de transferencia de gases, de tal forma, que el circuito de aire siga un sentido contrario al circuito de agua, para así optimizar la eficiencia de separación de la columna.

En la mayoría de los ensayos llevados a cabo se añadió una columna de “lima de soda” con la intención de evitar la acumulación de dióxido de carbono en el circuito de aire (en la parte de reentrada a la columna separadora). Para una mínima influencia de la temperatura ambiental sobre las muestras durante el periodo de medida, el circuito de aire se forró con neopreno, y también por ello los tubos que se instalaron eran lo más cortos posibles.

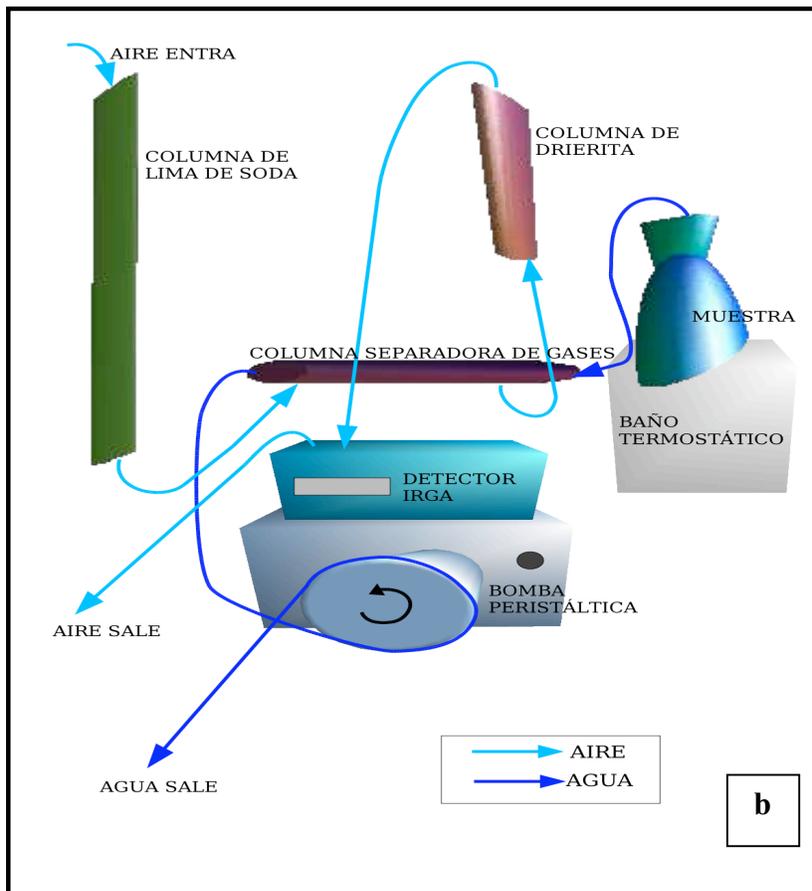
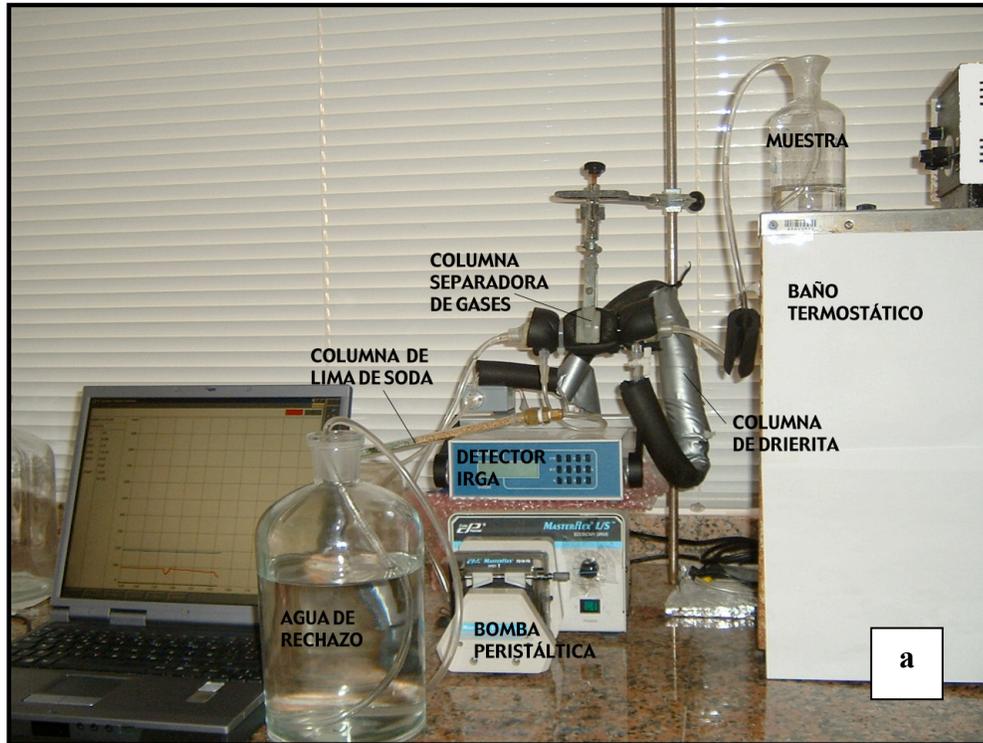


Fig. 2. a) Fotografía del sistema completo. b) Esquema representativo del sistema, donde las líneas celestes representan el circuito de aire y las azules el circuito de agua.

Experimento de validación del método con muestras de agua de mar

Se recogió un volumen de 15 litros de agua de mar de Taliarte no filtrada y se introdujo en botellas. Se incubaron durante 5 días a una temperatura de 22°C. Se midieron cada 24 horas, utilizando 2 botellas para limpiar y otras dos para medir, dejando una última botella para el caso de que hubiera algún problema con los dos replicados (“botella de respeto”). Durante la medición la muestra se encontraba en un baño a la misma temperatura que a la que se encontraba incubada.

Se utilizó, para la determinación de la variación de CO₂, el sistema que a la vista de los resultados (véase en Resultados) era el más fiable; es decir, el de circuito abierto de agua y con “lima de soda” en el circuito de aire (en el retorno a la columna separadora de gases). Se realizaron las medidas a la velocidad de flujo que mejor resultado daba, deducida de los experimentos anteriores ($18.5 \pm 0.5 \text{ ml.s}^{-1}$). Al principio de cada medida se realizaba un “Auto-zero” manual para calibrar el analizador de gases.

Experimentos de adición de nutrientes

Se prepararon incubaciones para 5 días a una temperatura de 22°C de agua de mar no filtrada de la zona de Taliarte. Se destinaron para cada jornada tres botellas para un cultivo control, tres para la adición de cloruro de amonio 5 μM , y otras tres para la adición de amonio 5 μM + glucosa 40 μM . De cada grupo de tres botellas se destinó uno a la limpieza de la columna y las otras dos como replicados. Estas botellas se midieron a intervalos de 24 horas. Se utilizó la misma velocidad que en el ensayo anterior ($18.5 \pm 0.5 \text{ ml.s}^{-1}$).

Cálculo de la concentración molar y de las tasas de respiración

Como el EGM-4 proporciona los datos de presión parcial de dióxido de carbono en ppm, para poder comparar los resultados obtenidos con la bibliografía, era necesario convertirlos a concentración molar. Para ello, se calculaba el coeficiente de solubilidad de CO₂ para una temperatura y una salinidad dadas (las de las muestras), y posteriormente, según la Ley de Henry, se multiplicaba la presión parcial por el coeficiente de solubilidad obteniendo así una concentración molar. El coeficiente de solubilidad (milimol/kg/atm) se calcula como sigue (Weiss, 1974):

$$\text{Coef. Solubilidad} = e^{\left((-60.2409 + 93.4517 * \left(\frac{100}{T}\right) + 23.3585 * \ln\left(\frac{T}{100}\right) + (0.023517 - 0.023656 * \left(\frac{T}{100}\right) + 0.0047036 * \left(\frac{T}{100}\right)^2) * S \right)} * 1000$$

Esta expresión proporciona un coeficiente de solubilidad para las condiciones de temperatura y salinidad de los ensayos (22°C y 36.5 respectivamente) de 30.4 mmol. kg⁻¹ atm⁻¹. Al calcular la concentración molar para estas condiciones se obtiene un comportamiento lineal; de tal modo que un incremento de 1 ppm se traduce en un aumento de 0.0311 µM. Finalmente, para obtener las tasas de respiración basta con restar la concentración de CO₂ de dos días consecutivos.

Resultados

Ajustes del método

Con la intención de hallar la metodología más correcta para la obtención de una medida estable que pudiera ser útil para la determinación de la respiración comunitaria de muestras de aguas costeras, se idearon distintas variaciones hasta llegar al método que se presenta en este trabajo. Estas variaciones consistieron en la utilización de diferentes circuitos de agua y aire; esto es, mediante retornos del agua a la botella de muestra original, o bien, no recuperándola.

Se apreciaba que la tendencia de la concentración de CO_2 era aumentar conforme transcurría el tiempo de medición, posiblemente debida a una acumulación en la columna de separación de gases. Con el objetivo de subsanar ese inconveniente se introdujo en el sistema de aire una columna de “lima de soda” justo antes del retorno a la columna de gases, la cual evitaría la acumulación de dicho gas en la columna.

En la **Fig. 3** se observan distintos pares de replicados representativos de las versiones más viables del método. En ella, los datos comprendidos entre los minutos 1 y 86 corresponden al sistema cerrado de agua y aire con la columna de “lima de soda”. Se obtienen valores decrecientes de la concentración de CO_2 , como era de esperar; ya que el agua en circuito cerrado, al ir recirculando el agua, cada vez tiene menos CO_2 debido a que es secuestrado por la columna de “lima de soda”.

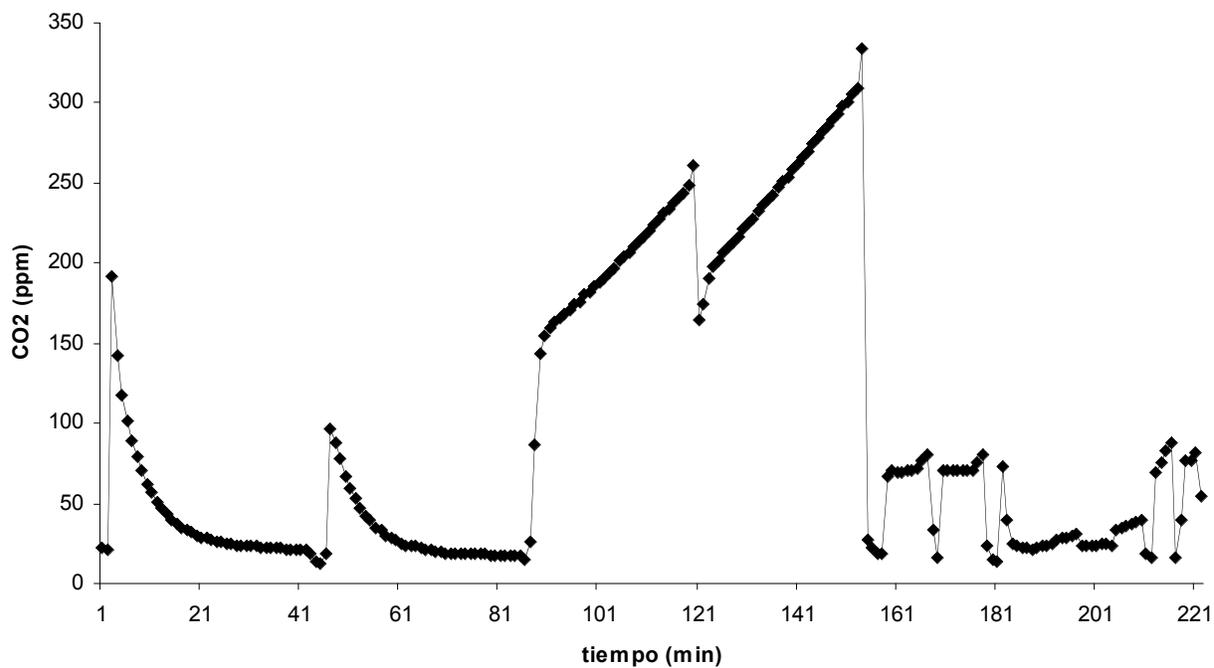


Fig. 3. Variación temporal de la señal de la dióxido de carbono en función de los distintas variantes del sistema: circuito de agua cerrado con “lima de soda” (1-86), circuito de agua cerrado sin “lima de soda” (87-154), circuito de agua abierto con “lima de soda” (159-178), circuito de agua abierto con “lima de soda” a mayor velocidad (183-221). Nótese que se realizaron dos replicados por cada variante.

Por otro lado, en los minutos posteriores (87-154), se muestran los resultados del sistema original (sin columna de “lima de soda”), donde se aprecia la acumulación de CO₂ mencionada anteriormente que no permite una medida estable. Además no sólo existía el problema de la acumulación sino que también se obtenían unos valores mayores.

A partir del minuto 159 y hasta el minuto 178 se probó otro procedimiento que consistía en un circuito de agua abierto (no retorno del agua) y una columna de “lima de soda”. En este caso los valores son más estables lo que hace sospechar la idoneidad de esta versión. A pesar de ser más estables los valores, se alcanzaron concentraciones mayores en los momentos finales de la medición de los replicados; lo cual se intentó subsanar con el objetivo de afinar el resultado de la medición. Para enmendar estas variaciones se acometieron ensayos que evaluaran la influencia del pH, temperatura y velocidad del flujo de agua en la concentración de dióxido de carbono determinada por este método. En lo referente al pH, mediante mediciones de la muestra antes y después de su paso por el circuito, no se encontraron cambios significativos. En cuanto a la temperatura, tampoco se observó un cambio reseñable dentro del sistema que pudiera contribuir a una variación del valor de la concentración. El parámetro que resultó ser clave en este método fue la velocidad del flujo del agua. Esto se puso de manifiesto en los últimos minutos representados en la **Fig. 3** (minutos del 183-222), donde los valores más bajos corresponden a menores velocidades del flujo de agua.

En las siguientes figuras (**Figs. 4 y 5**) se representan los resultados correspondientes a los experimentos graficados anteriormente (**Fig. 3**), pero separándolos según sean de circuito de agua abierto o cerrado. A este grado de detalle se pone de manifiesto como la replicabilidad del sistema de agua cerrado sin “lima de soda” es peor que con ella.

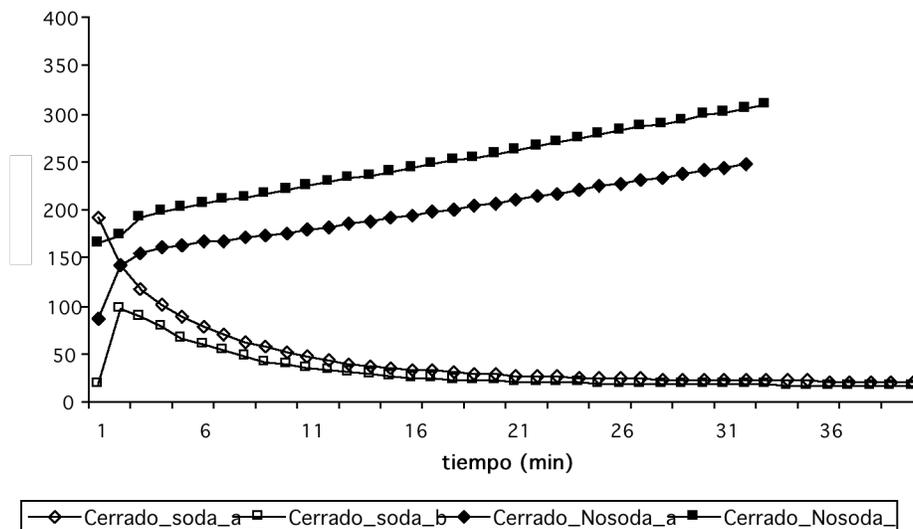


Fig. 4. Representación de la variación temporal de la señal de dióxido de carbono correspondiente a las pruebas en sistema cerrado de agua (recirculada) pertenecientes a la Fig. 3.

Mientras que en lo que corresponde a la Fig. 5 perteneciente al sistema de agua abierto, se denota un efecto de la velocidad del flujo (mencionado con anterioridad); de tal forma, que al aumentar la velocidad se incrementa la señal sin llegar a alcanzar la estabilidad (debido al efecto de la acumulación sumado a que el volumen muestral se acaba con mayor rapidez).

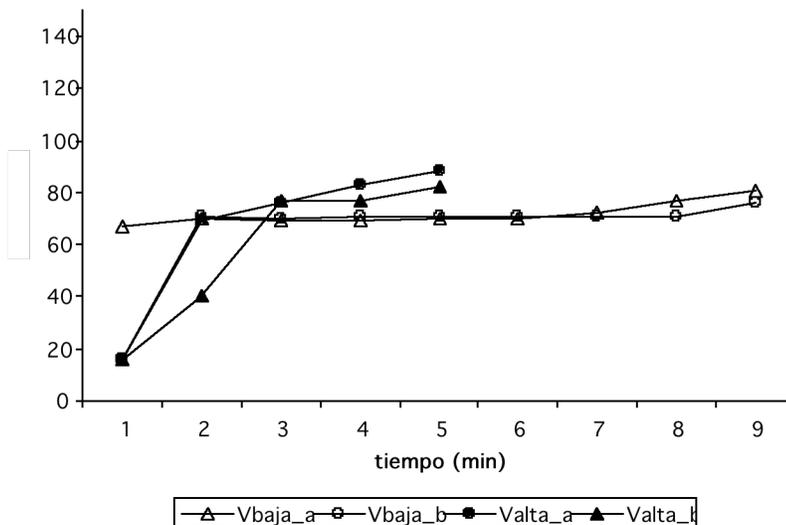


Fig. 5. Representación de la variación temporal de la señal de dióxido de carbono correspondiente a las pruebas en sistema abierto de agua (desechada) pertenecientes a la Fig. 3.

Para estudiar con más detalle el efecto potencial de la velocidad del flujo se realizaron pruebas específicas (**Fig. 6**). Utilizando muestras de agua destilada (para evitar la influencia biológica), se procedió a la medición de las concentraciones de CO_2 con la variación exclusiva de la velocidad del flujo. Los caudales que se utilizaron fueron $18.5 \pm 0.5 \text{ ml min}^{-1}$ (V1), $32.4 \pm 0.5 \text{ ml min}^{-1}$ (V2), $48.6 \pm 0.5 \text{ ml min}^{-1}$ (V3), $68 \pm 0.5 \text{ ml min}^{-1}$ (V4) y $85 \pm 0.5 \text{ ml min}^{-1}$ (V5). De este modo se puso de manifiesto que el sistema funciona mejor a velocidades bajas, debido a que a partir de una cierta velocidad la acumulación de gases alteraba el resultado; de tal forma que cuanto mayor fuera la velocidad más grande era la señal detectada. Esto se puede ver en las desviaciones obtenidas en las distintas velocidades (**Tabla 1**), donde al aumentar el caudal se incrementa también la desviación estándar.

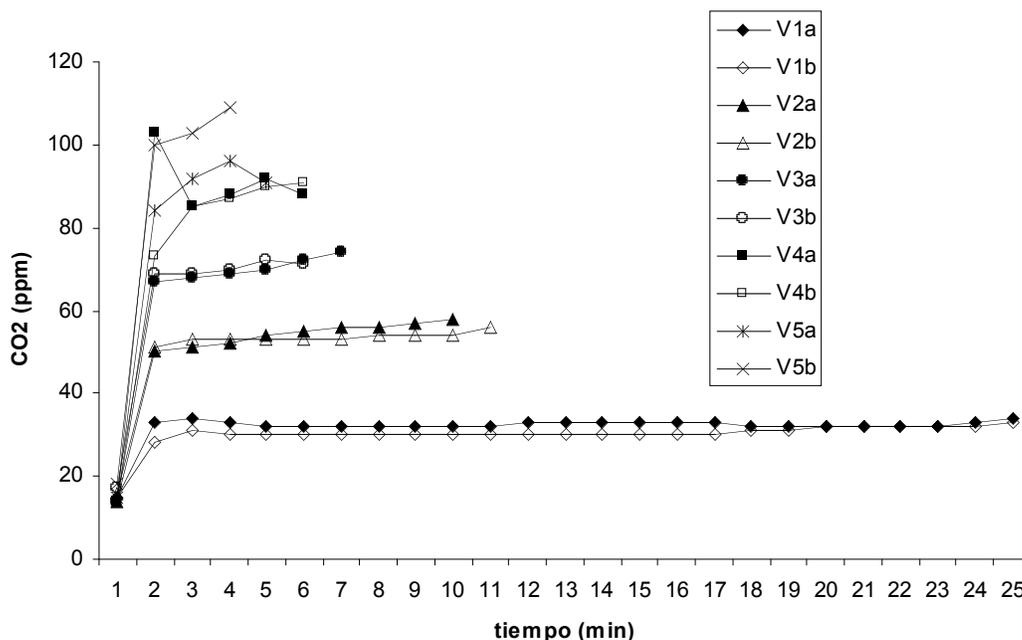


Fig. 6. Representación de la variación temporal de la señal de dióxido de carbono en función de cambios en el caudal en sistema abierto de agua (desechada). Nótese que se realizaron dos replicados para cada caudal.

Por otro lado, el caudal también afectaba a la señal obtenida en tanto en cuanto mayor fuera la velocidad del flujo, antes se acababa el volumen de muestra, evitando de este modo poder alcanzar un valor estable. Por esto el número de observaciones (n) va disminuyendo conforme aumenta el caudal, de este modo se añadió fiabilidad a la hora de calcular el valor final a partir de las medias.

A la hora de la elección del caudal más apropiado se debe llegar a un compromiso entre varios factores: el número de datos que se pueden obtener en cada medición (tiempo de medida), el valor de la media obtenida (no debe ser demasiado bajo ya que al ser una medida relativa el error también se incrementa al transformarlo en valor absoluto) y la estabilidad (la cual está íntimamente relacionada con la acumulación de gases en la columna separadora) debiendo ser la desviación estándar la menor posible.

Caudal (<u>ml.min</u> ⁻¹)	Media CO ₂ ± D.E. (ppm)	Pendientes (ppm.min ⁻¹)	n
18.5 ± 0.5 (V1)	31.64 ± 1.24	-0.0022	47
32.4 ± 0.5 (V2)	54.24 ± 1.85	0.964	17
48.6 ± 0.5 (V3)	70.10 ± 2.02	1.3714	11
68 ± 0.5 (V4)	88.2 ± 7.44	4.1	10
85 ± 0.5 (V5)	96.43 ± 8.34	5.7	7

Tabla 1. Valores de la señal de dióxido de carbono y de las pendientes obtenidos para las distintas velocidades de flujo.

Un síntoma de la acumulación de gases es la pendiente provocada en los registros; de tal forma que cuanto mayor es la acumulación mayor es también la pendiente, como se puede observar en la **Tabla 1**. En ella se puede apreciar como el caudal más bajo (V1) de los elegidos presenta la pendiente más apropiada, siendo prácticamente nula, lo que pone de manifiesto que se ha alcanzado la estabilidad necesaria para una buena medida.

Por todo esto se decidió utilizar el caudal de $18.5 \pm 0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (V1) como óptimo, debido a que este era el que mejor cumplía con los requisitos antes mencionados; esto es, no se producía acumulación (dando una señal más estable, pendiente nula), desviación típica pequeña y valor de la media no muy bajo (**Fig. 7**).

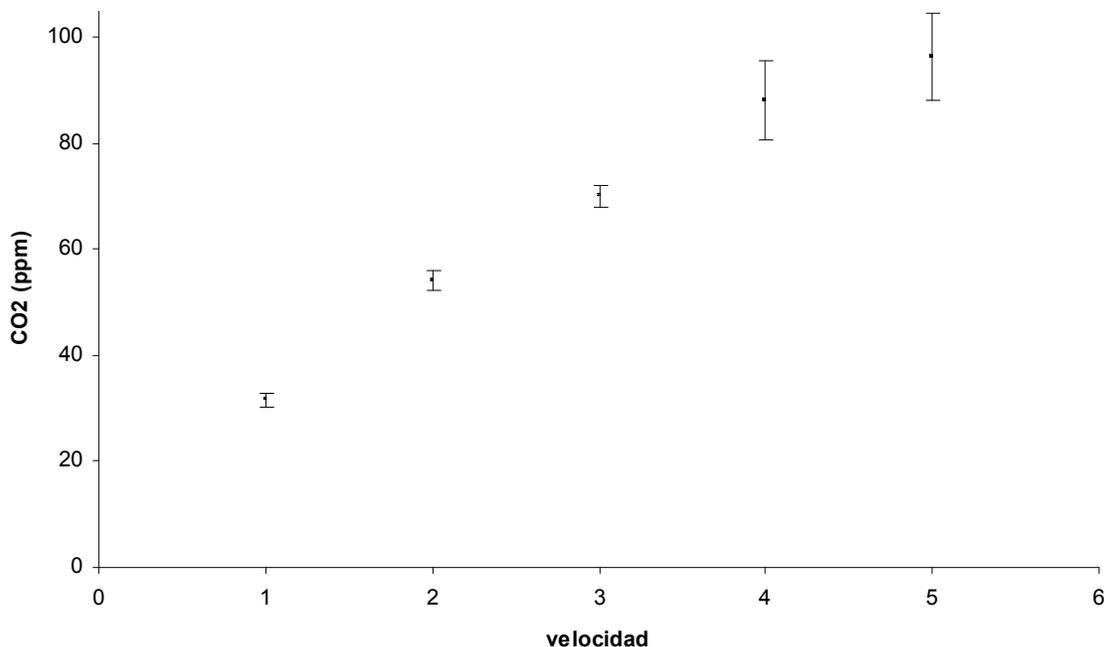


Fig. 7. Representación gráfica de las medias y las desviaciones estándar obtenidas para los distintos caudales.

Se observó que la eficiencia de separación de gases de la columna variaba en función de la velocidad del flujo, lo cual hizo necesario tomar esa velocidad como referencia inamovible, añadiendo el imperativo de que las medidas fueran relativas.

Para examinar el efecto de la temperatura se realizaron unos ensayos con agua destilada, también para evitar la posible influencia biológica, mediante determinaciones a dos temperaturas muy diferentes (5°C y 25°C). En las cuales, las muestras de agua partían con una misma concentración inicial de dióxido de carbono, y se evitó la posibilidad de intercambio con la atmósfera tapando las botellas simultáneamente. De este modo, no se

encontró un efecto significativo, obteniendo unos valores muy parecidos (55 ± 1.6 ppm CO₂ y 53.5 ± 2.38 ppm CO₂, para 5°C y 25°C respectivamente). A pesar de la diferencia tan importante que existían entre las temperaturas de la muestra de 5°C y la del ambiente (22°C), no se apreció una pérdida de gases significativa durante el proceso de medición a través del sistema (**Fig. 8**). Debido a que el tiempo invertido en cada medida es corto, y el sistema se encuentra bien aislado térmicamente, se puede afirmar que la diferencia de temperatura entre el agua muestral y la temperatura ambiente no produce un intercambio de CO₂ lo suficientemente importante como para ser tomado en consideración.

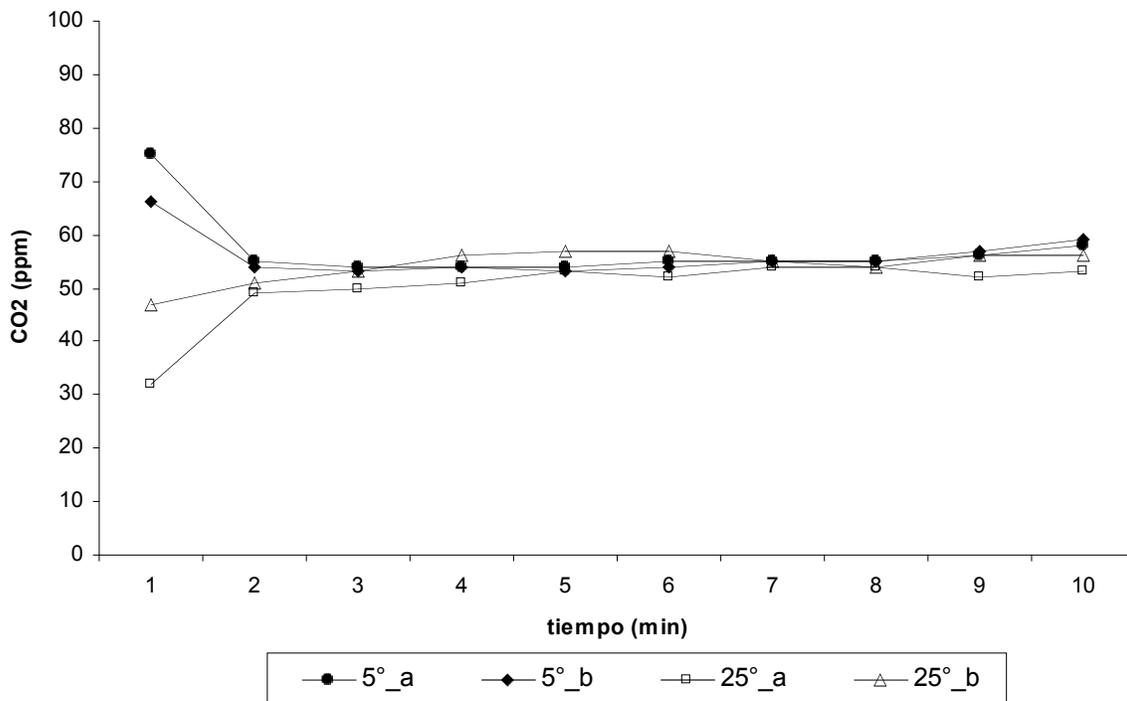


Fig. 8. Variación temporal de la señal de dióxido de carbono de las muestras de agua destilada a 5°C (símbolos negros) y a 25°C (símbolos blancos). Nótese que se realizaron dos replicados para cada temperatura.

Experimento de validación del método para muestras con agua de mar

Con el fin de comprobar la bondad del método a la hora de analizar muestras reales, tomadas en aguas costeras, se realizó una incubación con dicha agua como se describe en el apartado de “Materiales y Métodos”. En la **Fig. 9** se muestran los registros tal y como lo recogía el detector, uno cada minuto. Las letras A, B, C, D y E de la gráfica se refieren a los días de incubación 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En esta se observa la buena replicabilidad que se obtuvo en las medidas, lo cual también se refleja en las pequeñas variaciones de la desviación estándar en la **Tabla 2**. También se pone de manifiesto la estabilidad de la señal durante las mediciones. Se distingue un incremento en la concentración de CO₂ con el paso del tiempo, lo cual era previsible debido a la respiración comunitaria que ocurriría en incubaciones sin luz.

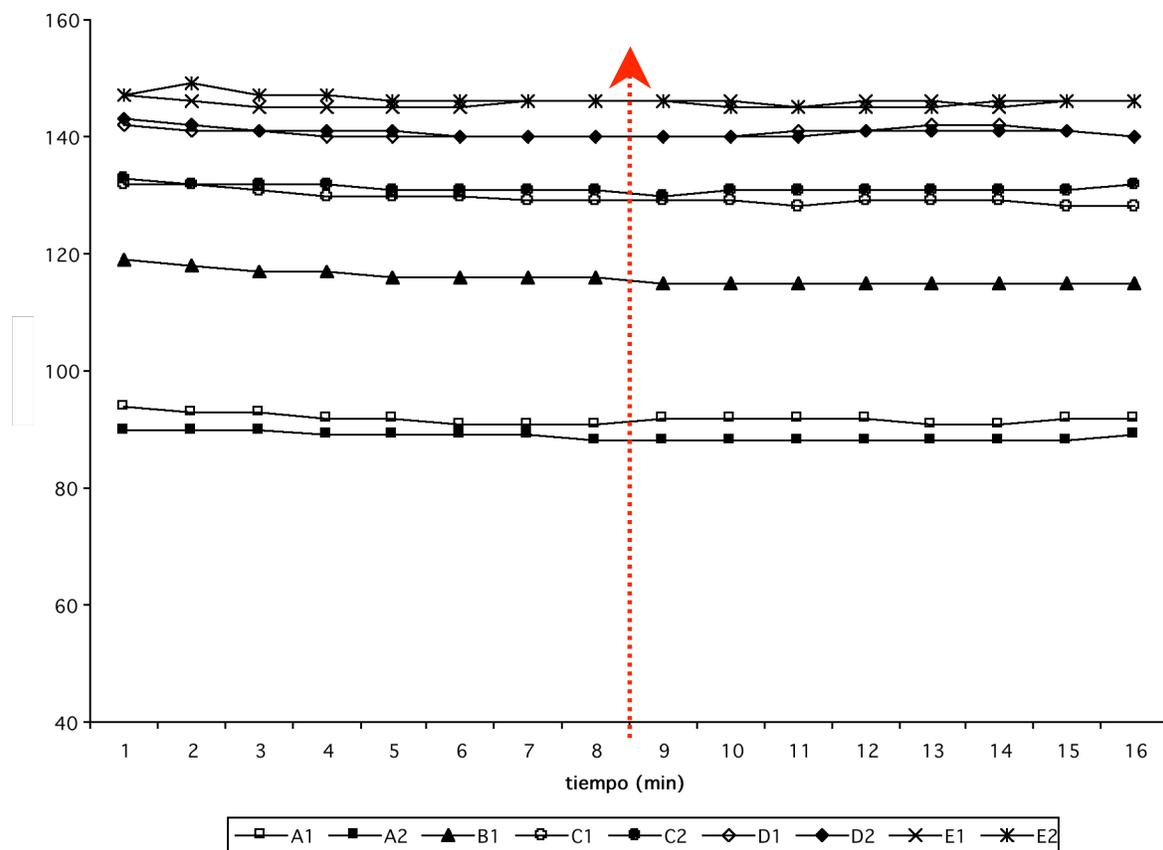


Fig. 9. Variación temporal de la concentración de dióxido de carbono de las muestras de agua de mar para los distintos días de incubación. Nótese que se realizaron dos replicados para cada día. La flecha roja indica el incremento de la concentración de dióxido de carbono con el paso de los días.

En la siguiente tabla se incluyen los valores medios y sus desviaciones estándar (DE) tanto en ppm y transformadas en μM . Estas medias se pueden ajustar a una función logarítmica ($R^2=0.9963$) como se observa en la **Fig. 10**. Esta distribución es debida a que la comunidad heterotrófica comienza respirando activamente hasta que los sustratos se van agotando, alcanzando así una fase final en la que la respiración tiende a ser nula.

Tiempo (días)	Media $\text{CO}_2 \pm \text{D.E}$ (ppm)	Media $\text{CO}_2 \pm \text{D.E}$ (μM)	n
1	90.25 \pm 1.76	2.822 \pm 0.05	37
2	115.94 \pm 1.24	3.625 \pm 0.04	17
3	130.69 \pm 1.506	4.087 \pm 0.05	43
4	140 \pm 0.97	4.378 \pm 0.03	46
5	145.18 \pm 1.54	4.540 \pm 0.05	67

Tabla 2. Medias y desviaciones estándar obtenidas de dióxido de carbono para cada de incubación en ppm y en concentración molar.

Como se puede observar en la **Tabla 3** y en la **Fig. 11** no se alcanzó ese punto final de no respiración, pero es más que probable que este se hubiera conseguido con unos cuantos días más de incubación.

Intervalo	Tasa ($\text{ppm} \cdot \text{día}^{-1}$)	Tasa ($\mu\text{M} \cdot \text{día}^{-1}$)
De día 1 a día 2	25.69 \pm 1.59	0.80 \pm 0.05
De día 2 a día 3	14.75 \pm 1.43	0.46 \pm 0.04
De día 3 a día 4	9.31 \pm 1.23	0.29 \pm 0.04
De día 4 a día 5	5.18 \pm 1.30	0.16 \pm 0.04

Tabla 3. Tasas respiratorias y desviaciones estándar obtenidas para los distintos días de incubación en ppm y en concentración molar.

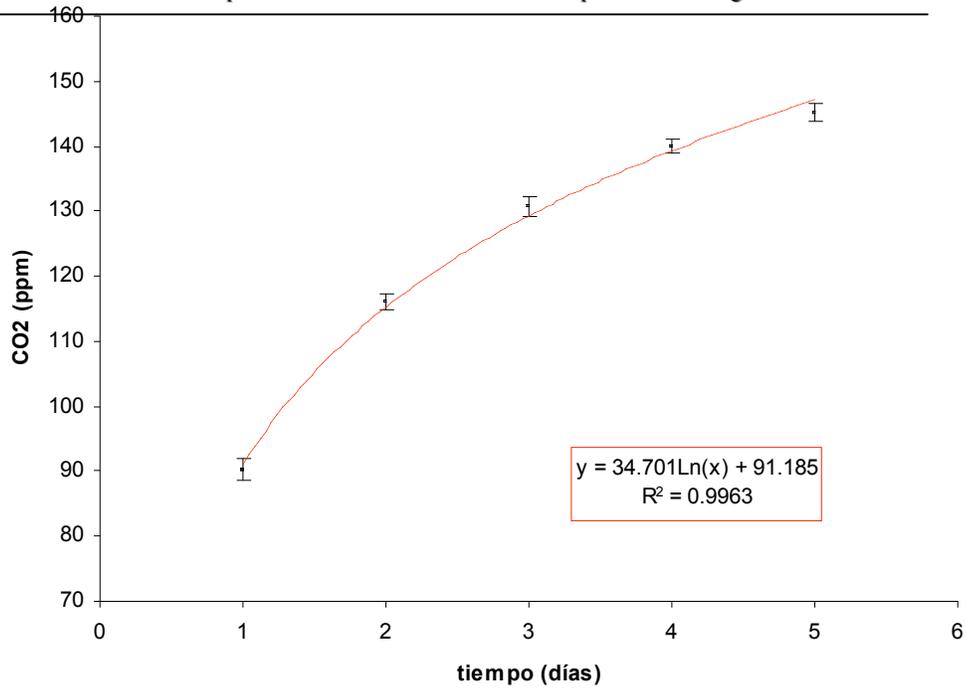


Fig. 10. Representación gráfica de las medias y desviaciones estándar obtenidas de dióxido de carbono para cada día de incubación en ppm. La línea roja representa un ajuste logarítmico.

Como el incremento en la señal de CO₂ fue cada día menor dio lugar a unas tasas de respiración también decrecientes, como se observa en la **Tabla 3** y en la **Fig. 11**.

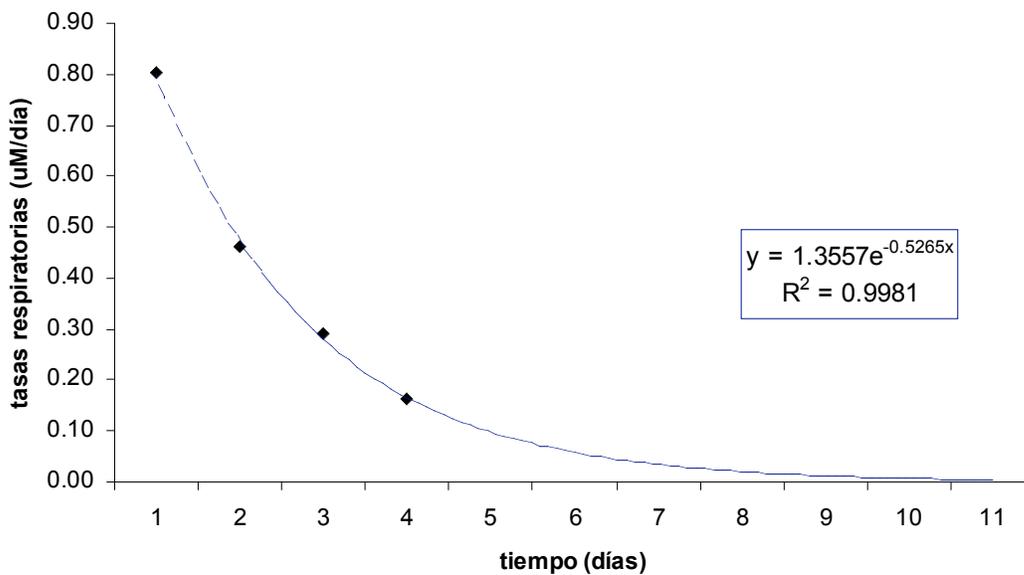


Fig. 11. Representación gráfica de tasas respiratorias obtenidas para cada de incubación en \square M.día⁻¹. La línea azul representa un ajuste exponencial negativo.

A la vista de las tasas obtenidas en este experimento se confirmó la expectativa de que las tasas que se consiguieran iban a ser relativas, debido a lo explicado en “Materiales y métodos” referente al efecto del caudal en la eficiencia de separación de la columna. En la **Fig. 11** se muestra como las tasas de respiración comunitaria (en $\mu\text{M}\cdot\text{día}^{-1}$) se aproximan a una exponencial negativa, que muestra como la tasa de respiración va disminuyendo cada vez más lentamente tendiendo a cero (valor que se alcanzaría aproximadamente a los 10 días de iniciar la incubación en el caso de seguir este patrón).

Experimentos de adición de nutrientes

En las incubaciones realizadas con distintas adiciones de nutrientes orgánicos (glucosa) e inorgánicos (cloruro de amonio) se obtuvieron respuestas diferentes en función del tipo de tratamiento que se aplicó. En la **Fig. 12** se puede apreciar como los valores del blanco (B) presentaron las menores respiraciones, seguidos del tratamiento con cloruro de amonio (N), y la mayor respuesta se consiguió con el tratamiento conjunto de cloruro de amonio y glucosa (CN).

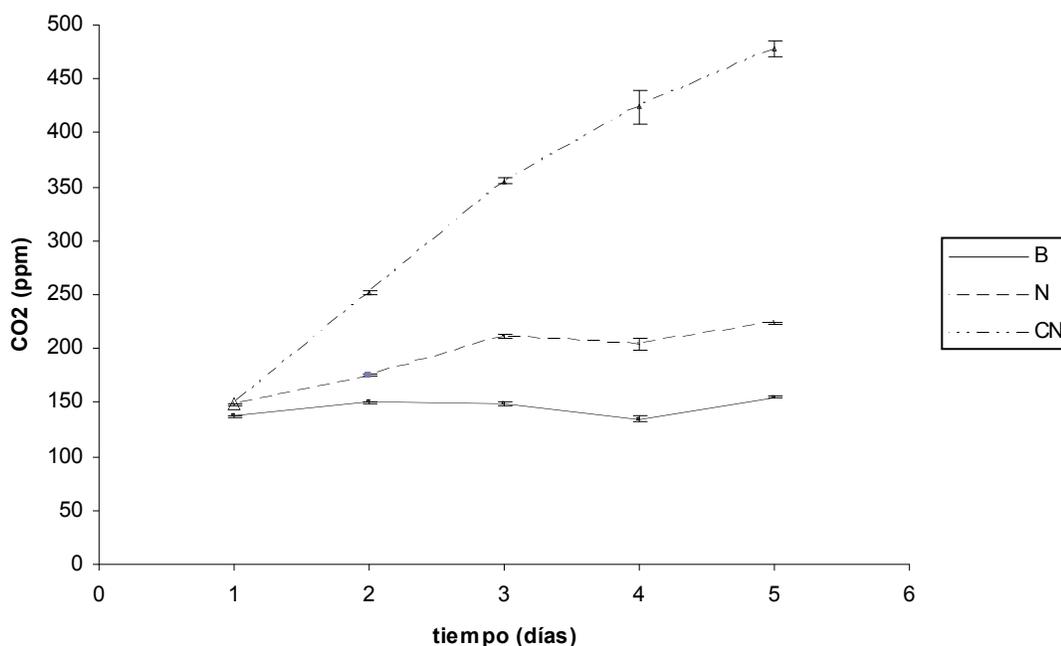


Fig. 12. Representación gráfica de la producción de CO_2 (\pm D.E.), para cada día de incubación en ppm, y para los distintos tratamientos: el blanco (B), cloruro amónico (N) y cloruro amónico + glucosa (CN).

Durante el periodo de incubación se alcanzaron distintas concentraciones de CO₂, obteniendo al final de dicho periodo un incremento en 0.55 µM, 2.04 µM y 10.19 µM para el blanco, las muestras enriquecidas con cloruro amónico y las que tienen cloruro amónico y glucosa, respectivamente (**Tabla 4**).

La variabilidad encontrada en este experimento fue muy baja, encontrándose reducida a la segunda cifra decimal de la desviación estándar de prácticamente la totalidad de los datos, excepto para las muestras N y CN del cuarto día, y para las de CN del último día.

día	B (ppm)	N (ppm)	CN (ppm)
1	137.53 ± 1.13	148.93 ± 0.88	148.75 ± 0.65
2	150.38 ± 1.26	175.30 ± 1.56	252.06 ± 1.21
3	148.55 ± 1.89	211.55 ± 1.47	355.57 ± 2.46
4	134.76 ± 2.43	203.78 ± 5.28	423.92 ± 15.56
5	155.07 ± 1.27	224.14 ± 1.01	477.76 ± 7.05
día	B (µM)	N (µM)	CN (µM)
1	4.28 ± 0.04	4.63 ± 0.03	4.67 ± 0.02
2	4.67 ± 0.04	5.45 ± 0.05	7.84 ± 0.04
3	4.62 ± 0.06	6.58 ± 0.05	11.06 ± 0.08
4	4.19 ± 0.08	6.34 ± 0.16	13.19 ± 0.48
5	4.83 ± 0.04	6.97 ± 0.03	14.86 ± 0.22

Tabla 4. Tasas respiratorias y desviaciones estándar obtenidas para los distintos días de incubación en ppm y en concentración molar, y para los distintos tratamientos: el blanco (B), cloruro amónico (N) y cloruro amónico + glucosa (CN).

En el caso del tratamiento CN las tasas de respiración logradas son bastante más importantes que para el resto de los casos, como mínimo triplicando a las demás. Nótese en la **Fig. 13** la importancia de las tasas de respiración obtenidas en este caso, sobretodo las de los dos primeros días. Posteriormente disminuyen, poniendo de manifiesto el posible

agotamiento de los sustratos, aunque siguen siendo elevadas en comparación con las otras. Además, al analizar el comportamiento que presentan estas tasas con el tiempo, se hace bastante plausible la posibilidad de que la disminución que presentará en los días subsiguientes al experimento siguiera un patrón bastante semejante a una curva exponencial negativa (como la que se encontró para el experimento de validación del método con agua de mar).

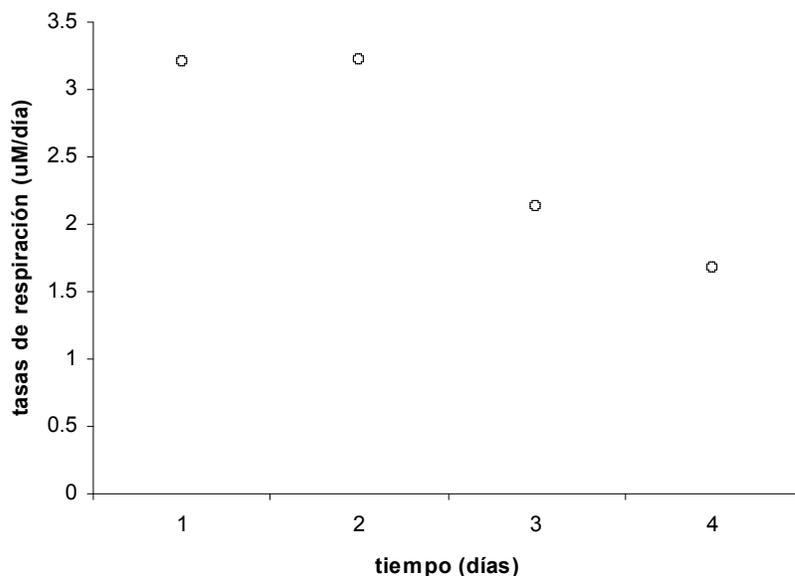


Fig. 13. Representación gráfica de tasas respiratorias obtenidas para cada de incubación en $\mu\text{M}\cdot\text{día}^{-1}$.

DISCUSIÓN

A la vista de todas las pruebas realizadas, analizando primero los parámetros que pudieran tener influencia en los resultados finales (velocidad de flujo, temperatura, pH,...) e intentando posteriormente subsanarlas, se ha conseguido seleccionar un sistema que da resultados estables y coherentes con los que a priori cabría esperar.

Este método presenta la ventaja de medir la respiración directamente en variación de dióxido de carbono, evitando así una fuente potencial de error al no tener que realizar transformaciones de unidades (e.g. cocientes respiratorios), como sería el caso si se midiera por la técnica Winkler, ya que ésta analiza la disminución en la concentración de oxígeno y no el incremento en carbono. Estos cocientes no tienen porque ser constantes a lo largo del periodo de incubación, y de hecho es más que probable que no lo sean, porque las necesidades metabólicas de los distintos organismos varían dependiendo del sustrato disponible y de su estado fisiológico. Por otro lado, estos cocientes también cambiarán en función de la estructura de la comunidad; esto es, no es lo mismo que la que este respirando sea una bacteria, un flagelado, cualquier otro miembro de la comunidad planctónica, o todos a la vez. Esto último tiene sentido partiendo de la base de que los requerimientos nutricionales son distintos para cada grupo. Por último, es posible también que exista un desacople entre el oxígeno consumido y el CO₂ producido, provocando que la relación entre estas dos variables no sea constante en el tiempo.

Además, este método presenta otra ventaja frente a otros métodos que miden ya en unidades de carbono, como puede ser el caso del SOMMA. Este método mide el carbono inorgánico total, lo que incluye tanto carbonatos como bicarbonatos además del dióxido de carbono. De hecho, la parte correspondiente al CO₂ es muy pequeña en comparación con la del resto de especies químicas de carbono inorgánico. Todo ello, lleva a que las verdaderas concentraciones de CO₂ se puedan ver enmascaradas por procesos de descalcificación y pequeños cambios en el pH (pudiendo variar el equilibrio de los carbonatos desplazándolo hacia uno u otro sentido de reacción).

Si bien, como suele suceder a menudo cuando se trata de ciencia, no todo son ventajas; esto es debido a que las medidas obtenidas por este *modus operandi* son relativas. Debido a ello, es recomendable seguir investigando más en esta línea, mediante comparaciones por medidas simultáneas con otros métodos que sean capaces de medir respiración, y así poder encontrar un factor de corrección que proporcionase tasas absolutas a partir de las relativas. A este respecto sería aconsejable que, al igual que para las técnicas

espectrofotométricas se deben realizar curvas de calibrado antes de cada experimento, para este método también se elaborarán unas curvas que relacionarán la señal del IRGA con la que se obtendría por otros procedimientos.

Asimismo, este método puede ser útil para la realización de distintos tipos de experimentos bastante interesantes. Por ejemplo, pueden acometerse estudios sobre los cocientes respiratorios y fotosintéticos, prestando especial atención al posible desacople entre el consumo de O_2 y la producción de CO_2 , comparándolo con otros métodos que determinaran la concentración de oxígeno con gran precisión. También es posible estudiar mejor el llamado “efecto-botella”, para lo que bastaría con incubar la misma muestra en botellas de distintas capacidades y analizar la variación con el paso del tiempo de la concentración de CO_2 en las mismas.

Experimento de adición de nutrientes

En las incubaciones realizadas con las adiciones de nutrientes se pudo observar como es posible que la comunidad se encontrara limitada por nutrientes, fundamentalmente por los de origen orgánicos (véase **Fig. 12**). Esto se pone de manifiesto con el gran incremento encontrado en el tratamiento de adición de la glucosa además del cloruro de amonio (CN). También se encuentra una respuesta positiva para el caso del cloruro de amonio sólo (N) pero de menor magnitud. Por tanto, se puede afirmar que la respiración comunitaria se encontraba limitada fundamentalmente por la disponibilidad de nutrientes orgánicos en el medio.

Sin embargo, a la hora de hablar de limitación de nutrientes en experimentos realizados con incubaciones en botellas, es imprescindible tener en consideración que cualquier manipulación de un sistema natural puede causar cambios en las comunidades naturales microbianas (“efecto botella”). Este efecto ya se conoce desde los primeros ensayos en microbiología. Ya a principio del siglo XX (1901) Whipple se dio cuenta de que cuando introducía agua dulce en una botella de cristal el número de bacterias cultivables se

incrementaba de 4 a más de 500 veces en 24 horas. El confinamiento de agua en botellas para la realización de ensayos cambia las propiedades hidrodinámicas (mezcla y luz), la dinámica de nutrientes, y la estructura de cadena trófica (eliminando predadores). Por tanto, estos experimentos sólo pueden ser utilizados para probar una potencial limitación de nutrientes (Zohary y Robarts, 1998). Por otro lado, Howarth (1988) apuntó que es posible que existan especies en aguas oligotróficas que se encontraran creciendo cerca de sus tasas máximas ya que se sabe que hay organismos que se encuentran muy bien adaptados a crecer con bajas concentraciones de nutrientes (organismo especialistas o estrategias de la K). Además, este mismo autor postuló que si la tasa de suministro de nutrientes se incrementaba, entonces, estas especies serían reemplazadas por otras que fuesen más competitivas en las nuevas condiciones y tendrían una mayor tasa de producción (organismos oportunistas o estrategias de la R). De este modo sería posible que presentaran un crecimiento cercano a sus tasas máximas y que no se encontraran nada limitadas por nutrientes (Zohary y Robarts, 1998).

Además, las incubaciones en botellas también se pueden ver afectadas por el recipiente, además de por el efecto ecológico, por un efecto puramente físico (la presencia de una pared). Esto es, los microorganismos, en particular las bacterias tienen tendencia a adherirse a superficies sólidas. Considerando que la velocidad de natación de una bacteria es aproximadamente de $30 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Azam y Ammerman, 1984) -de tal manera que si se desplazara en línea recta desde el centro de una botella de 100 ml podría alcanzar la pared en unos 15 minutos- y que la adsorción de la bacteria al cristal es instantánea (Marshall et al., 1971), es más que probable que las bacterias dejen de formar parte de la fase planctónica en el curso de una incubación normal. Una vez adheridas a la superficie las bacterias proliferan más rápidamente, quizás debido a los nutrientes adsorbidos, y como es bien conocido, después de 24 h la actividad heterotrófica de las muestras en botellas se incrementa de forma considerable.

Conclusión

Este sistema, que presenta la ventaja de medir directamente la utilización de CO₂, puede ser una alternativa real a los métodos que comúnmente se utilizan para medir la respiración en las zonas costeras. Esto se sustenta en que los resultados obtenidos para los distintos experimentos con aguas naturales eran coherentes con lo que cabía esperar, aunque el método no se encuentra totalmente desarrollado, ya que aún es necesario realizar experimentos de comparación con otras técnicas, con el fin de obtener tasas absolutas a partir de las relativas que aporta actualmente.

Agradecimientos

Durante la realización de este trabajo he podido contar con la ayuda de personas, y por ello deseo mostrar mi agradecimiento personal a todas ellas. Antes que nada agradecer a mi fiel compañero de trabajo Pere Ferriol por su tenaz colaboración, con quién trabajar ha sido un placer, incluso un domingo por la noche. A mi tutor Javier Arístegui, por orientarme cuando siempre que era necesario y por haberme ofrecido la oportunidad de trabajar con él y su fantástico equipo. Aprovecho también para agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Oceanografía Biológica (Iraida, Minerva, Juan Carlos y Pascal) por su ayuda cuando la necesité. También agradecer a Santiago M. Hernández por cederme amablemente su IRGA cuando se averió el que yo utilizaba. No quiero concluir sin darle las gracias a un buen amigo, que siempre me sirve de apoyo y me aconseja: Francisco J. Machín. Por último, no puedo terminar sin agradecer a Ángela por su paciencia, su ánimo, su apoyo y su cariño más que constante, tanto en los momentos buenos como en los malos.

Referencias

- Arístegui, J., S. Agustí, J. Middelburg, y C.M. Duarte. (2005). Respiration in the mesopelagic and bathypelagic zones of the oceans. In: P. Del Giorgio, P.J. LeB Williams (eds). *Respiration in Aquatic Ecosystems*. Oxford Univ. Press. (en prensa).
- Azzam, F. and Ammerman, J. W. (1984), The cycling of organic matter by bacterioplankton in pelagic marine ecosystems: microenvironmental considerations. In M. J. R. Fasham (ed.), *Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems*. Plenum Press, New York and London, 345-360.
- del Giorgio, P. A., and C. M. Duarte (2002), Respiration in the open ocean, *Nature*, 420, 379-384.
- del Giorgio, P. A. (1992), The relationship between ETS (electron transport system) activity and oxygen consumption in lake plankton-a cross system calibration, *J. Plankton Research*, 14, 1723-1741.
- Howarth, R. W. (1988), Nutrient limitation of net primary production in marine ecosystems, *Ann. Rev. Ecol.*, 19, 89-110.
- Luz, B. and Barkan, E. (2000), Assessment of oceanic productivity with the triple-isotope composition of dissolved oxygen, *Science*, 288, 2028-2031.
- Marshall, K. C., Stout, R. and Mitchell, R. (1971), Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surface, *J. gen. Microbiol.*, 68, 337-348.
- Pamatmat, M. M. (1997), Non-photosynthetic oxygen production and non-respiratory oxygen uptake in the dark: a theory of oxygen dynamics in plankton communities, *Marine Biology*, 129, 735-746.
- Robinson, C., Archer, S., and Williams, P. J. le B. (1999), Microbial dynamics in coastal waters of East Antarctica: plankton production and respiration, *Marine Ecology Progress Series*, 180, 23-36.
- Weiss, R. F. (1974), Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas, *Marine Chemistry*, 2, 203-215.
- Whipple, C. E. (1901), Changes that take place in the bacterial contents of waters during transportation. *Technol. Q. Proc. Soc. Arts* 14, 21-29.
- Zohary, T. and Robarts, R. D. (1998), Experimental study of microbial P limitation in the Eastern Mediterranean, *Limnology and Oceanography*, 43 (3), 387-395.