

Res. Exp. Cient. B/O Cornide	3	Págs. 129-145	Mayo 1974
---------------------------------	---	---------------	-----------

Análisis estadístico de la relación fluorescencia/clorofila a^*

por

ANTONIO CRUZADO y ZOILA R. VELÁSQUEZ **

En esta nota se presenta un estudio crítico realizado en un área comprendida entre los paralelos 18° y 23° N en julio de 1971 en el curso de la campaña oceanográfica SAHARA-I de la relación clorofila/fluorescencia con el objeto de determinar hasta qué punto esta última puede ser utilizada como indicador de la biomasa fitoplanctónica con la misma confianza con que tradicionalmente se ha usado la clorofila.

En un trabajo recientemente publicado, LORENZEN (1971) hace resaltar las ventajas que el análisis continuo presenta sobre las muestras discretas en el estudio de la distribución de la biomasa fitoplanctónica y sus relaciones con otras propiedades del medio ambiente. El sistema de muestreo y medida de la fluorescencia descrito por dicho autor es idéntico al que nosotros utilizamos a bordo del B/O «Cornide de Saavedra» para el nivel de superficie, consistente en una conducción de agua desde una toma situada directamente en el casco del barco hasta el laboratorio. La mínima longitud de los tubos y el elevado caudal de la bomba hicieron que, lo mismo el tiempo muerto que la mezcla en el interior del tubo, fuesen negligibles y se pueda considerar la señal eléctrica, suministrada por el fluorómetro, como función directa de la concentración real de clorofila en el agua por donde el barco se desplazaba.

Lo mismo se podría decir de las muestras tomadas a 20 m de profundidad, pero la falta de fluorómetro conectado al sistema de bombeo de dicho nivel no nos permite realizar idéntica comparación con las muestras de clorofila tomadas de dicha profundidad.

Con objeto de poder comparar la fluorescencia así determinada con la cantidad de pigmentos fotosintéticos presentes en el agua bombeada,

* Recibido el 1 de febrero de 1974.

** Instituto de Investigaciones Pesqueras. Paseo Nacional, s/n. Barcelona.

se tomaron muestras a la salida del fluorómetro de las que se determinó el contenido en clorofila siguiendo el método descrito en otra parte del presente informe. Simultáneamente a la toma de muestra se anotó la medida de la señal del fluorómetro aunque, a posteriori, se optó por usar el valor registrado en el sistema digital de adquisición de datos a la misma hora en que se tomó la muestra puesto que la imprecisión en la lectura del dial, cuando éste oscilaba muy rápidamente, introducía análogos errores a los producidos por la incertidumbre en el tiempo de toma de las muestras discretas.

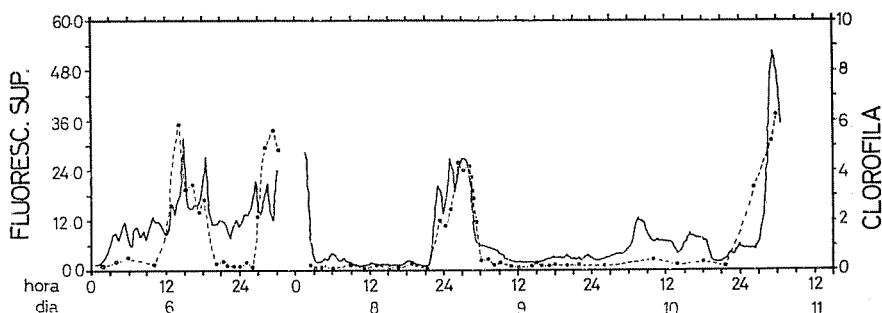


Fig. 1. — Series temporales de clorofila *a* y fluorescencia de la primera parte del recorrido (Punta Stafford a Punta Durnford). Unidades: clorofila, $\text{mg Cl } a/\text{m}^3$, y fluorescencia, lecturas de fluorómetro.

Así pues, para todos los efectos, se han considerado las muestras discretas como instantáneas y los correspondientes valores de clorofila han sido comparados a los valores relativos registrados de fluorescencia.

Aceptando la hipótesis de que existe una relación definida entre ambas magnitudes y de que dicha relación es lineal (LORENZEN, 1966) las discrepancias (que en adelante llamaremos errores) pueden ser debidas, al menos, a cuatro factores totalmente independientes pero estadísticamente (y a todos los efectos) indistinguibles:

- a) Errores debidos a la incertidumbre en la toma de muestras para determinación de clorofilas.
- b) Errores debidos a cambios en los controles del fluorómetro sin que se efectuara calibración alguna.
- c) Errores debidos al análisis de pigmentos en las muestras discretas.
- d) Errores debidos a las fluctuaciones de la relación fluorescencia/clorofila en las poblaciones de fitoplancton encontradas a lo largo del recorrido.

Aunque, desde un punto de vista científico, únicamente son estos últimos los que nos interesan, el presente trabajo muestra la imposibilidad

de realizar una verdadera comparación entre ambas magnitudes y nos tenemos que limitar a efectuar una calibración del instrumento estableciendo los límites de confianza con que se pueden estimar los pigmentos clorofílicos a partir de las medidas de fluorescencia.

La figura 1 da una idea de la distinta calidad de la información obtenida mediante muestras discretas y medidas continuas promediadas cada 30 minutos. Evidentemente, en las zonas de mayor variabilidad, el desacuerdo es notorio, a veces exagerado por la falta de medidas discretas precisamente en los lugares donde las variaciones horizontales son mayores (fig. 2). Sin embargo, en las zonas de poca variación (fig. 3) las discrepancias son casi nulas.

TABLA I

$$Cl-a = A + B \cdot F_l$$

A =	- 0.9617	Intercepto
B =	0.2104	Pendiente
R =	0.8196	Coef. Correlación
SE =	0.0189	Error estándar (B)
t =	11.110	Prueba significativa
t =	1.960	95 % nivel confianza
	99.9 %	Nivel conf. H (B= 0)

Por otra parte la figura 4 muestra la relación clorofila/fluorescencia para todo el recorrido, junto con la recta de regresión estimada. Los parámetros estadísticos obtenidos se encuentran en la Tabla I. El error estándar de la pendiente permite refutar la hipótesis de que no exista ninguna relación entre ambas variables a un nivel de confianza superior al 99,9 %.

Con el fin de detectar cambios en la magnitud de los errores a lo largo del recorrido, se han dividido los datos en subgrupos aproximadamente diarios según se indica en las figuras 5 a 23 y se han calculado las rectas de regresión para cada uno de ellos así como otros parámetros estadísticos que son presentados en la Tabla II.

Asimismo se da el nivel de confianza para refutar la hipótesis de que la pendiente de cada grupo es idéntica a la global, dado el valor calculado de *t* que se compara al tabulado (DRAPER and SMITH, 1968) para igual número de grados de libertad y 95% de confianza.

Como se puede observar, tales valores no son conclusivos por lo que no pueden establecerse claramente diferencias espaciales (o temporales) sobre las bases que nos da la Estadística. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los coeficientes de regresión que permiten pen-

sar que en la zona de Cabo Blanco (días 14 a 18 y 21 a 22) la relación Clorofila/Fluorescencia sea ligeramente más alta que en el resto del recorrido. Dada la falta de información respecto a las poblaciones de fitoplancton existentes en ambas zonas no se puede avanzar ninguna hipótesis que permita explicar tales diferencias.

Naturalmente, de poco serviría todo lo dicho anteriormente si no se indicaran modos de actuación para, en el futuro, eliminar en la medida de lo posible las fuentes de error *a*, *b* y *c* y poder establecer, con cierto rigor, la existencia de fluctuaciones en la relación Fluorescencia/Clo-

TABLA II

Día	Hora	Coeficiente correlación <i>r</i>	Coeficientes regresión		Err. st. (<i>b</i>)	Test <i>t</i>		Nivel %
			<i>a</i>	<i>b</i>		calc.	tab.	
6	0200							
6	2400	0.7960	— 0.3275	0.1068	0.0408	1.2083	2.262	87.5
8	1500							
9	0400	0.9698	— 0.3341	0.1611	0.0548	1.0740	2.306	75.
9	0200							
9	1400	0.9739	— 0.4412	0.1688	0.0578	0.8842	2.306	75.
10	0200							
11	0600	0.9639	— 0.1362	0.1233	0.0543	1.6857	2.571	90.
13	0100							
13	1700	0.9911	— 0.4076	0.1748	0.0648	0.6963	2.447	75.
13	1400							
14	0900	0.8846	0.7787	0.1241	0.0442	2.1664	2.201	97.5
14	1200							
15	1600	0.9460	0.0138	0.2261	0.0630	0.0984	2.160	0.
17	2000							
18	2400	0.7953	— 0.7618	0.2842	0.0991	0.6488	2.179	75.
19	0200							
19	2400	0.9677	0.1822	0.1353	0.0522	1.6216	2.447	90.
20	0200							
20	2400	0.8391	0.6135	0.1097	0.0436	2.5293	2.306	97.5
21	0200							
22	0800	0.9240	— 0.8753	0.2844	0.0889	0.7259	2.201	75.
22	0200							
22	2400	0.9602	— 3.3489	0.3270	0.1314	0.8153	2.447	75.
23	0400							
23	2400	0.6978	0.4251	0.1337	0.0661	1.3033	2.571	87.5
24	0200							
24	2400	0.9080	0.6414	0.0535	0.0186	8.9270	2.262	99.9
25	0200							
26	0400	0.9912	— 0.5977	0.1194	0.0492	2.0439	2.571	95.
27	1400							
27	2400	0.6798	0.8267	0.1586	0.1446	0.4238	3.182	65.
28	0200							
28	2400	0.9647	— 0.4853	0.1616	0.0530	1.8329	2.262	95.
29	0200							
29	2400	0.8706	0.9104	0.1227	0.0524	0.8362	2.447	75.
30	0200							
30	2400	0.9856	— 0.8465	0.1761	0.0533	0.8222	2.228	75.

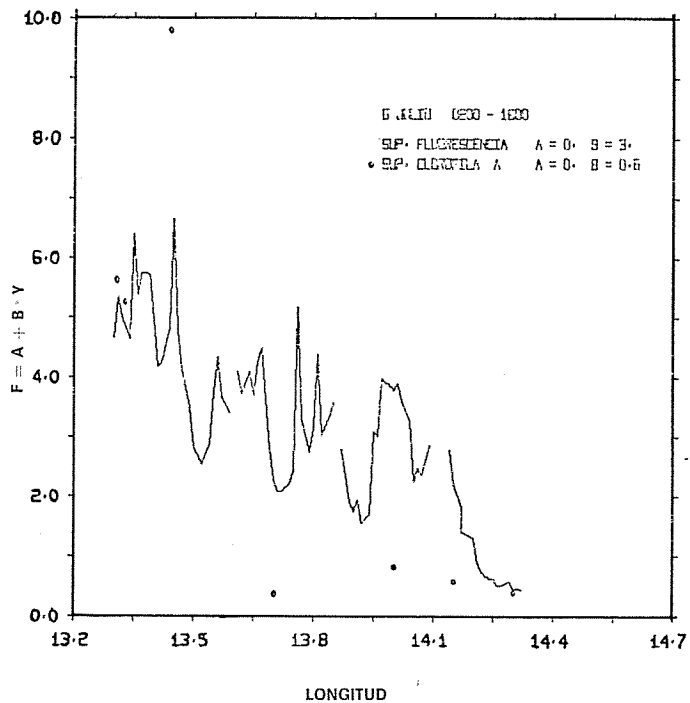


Fig. 2. — Proyección sobre un paralelo de parte del recorrido (Pta. Jandía a Pta. Stafford). Clorofila *a* (puntos) y fluorescencia (trazo continuo). Unidades como figura 1.

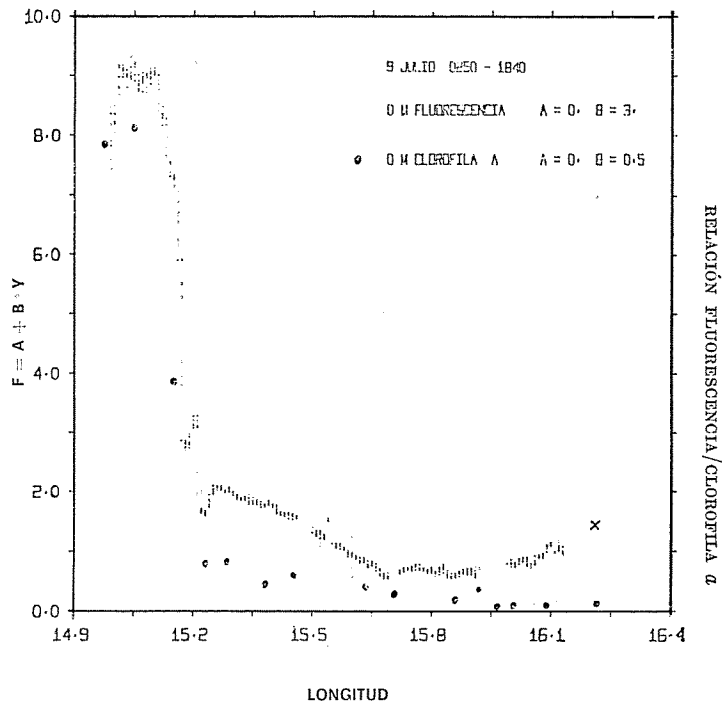


Fig. 3. — Como figura 2, sección frente a C. Peña Grande.

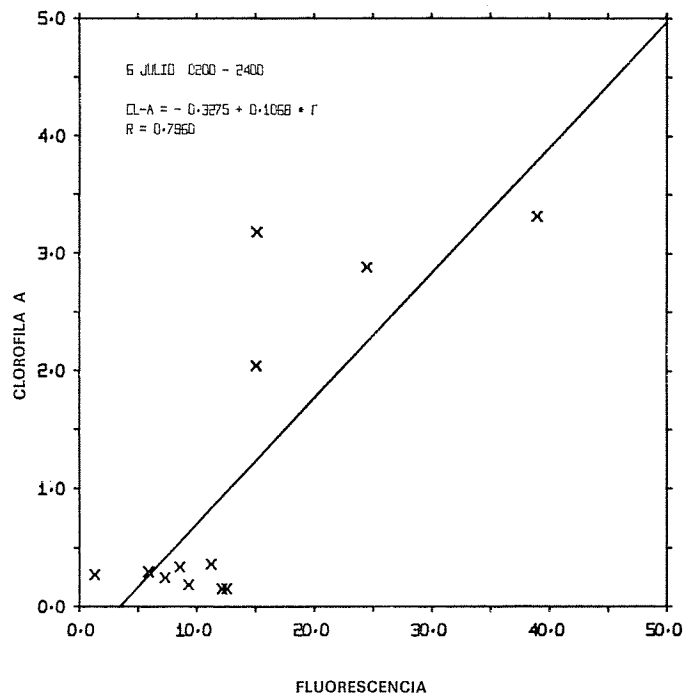
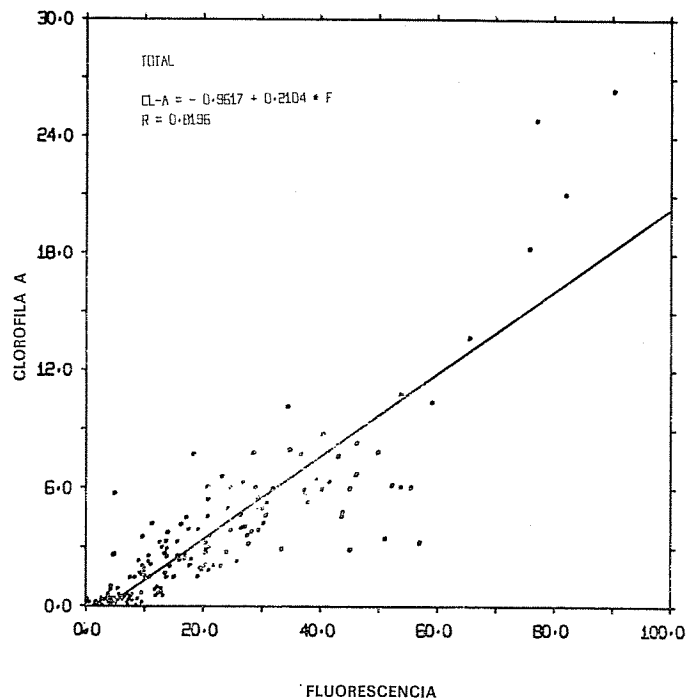


Fig. 4. — Diagrama de fase conteniendo todos los puntos de la tabla II. La línea continua es la recta de regresión definida por los coeficientes: $A = -0,9617$, $B = 0,2104$. El coeficiente de correlación es 0.8196. Unidades como en figura 1.

Fig. 5. — Como en figura 4 para el trayecto correspondiente al 6 de julio entre 0200 y 2400 horas.

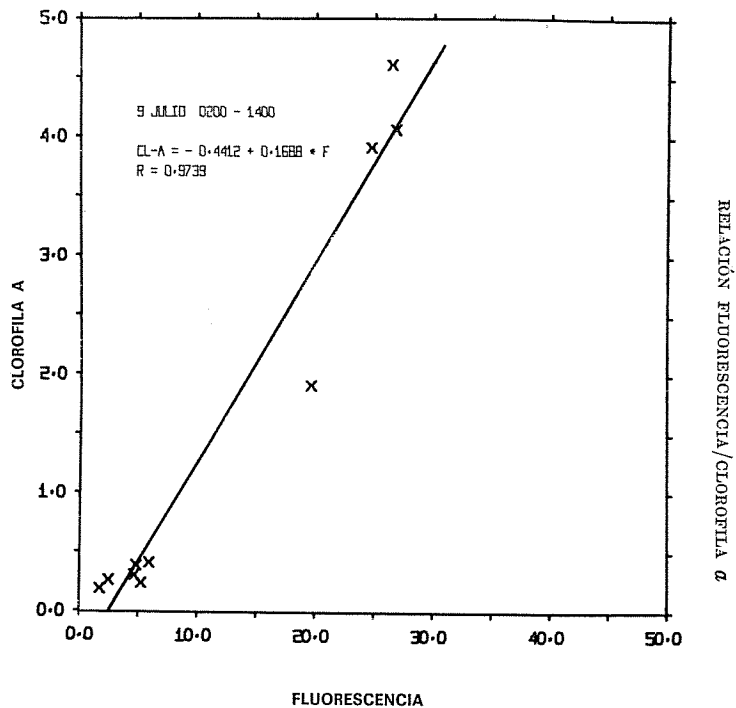
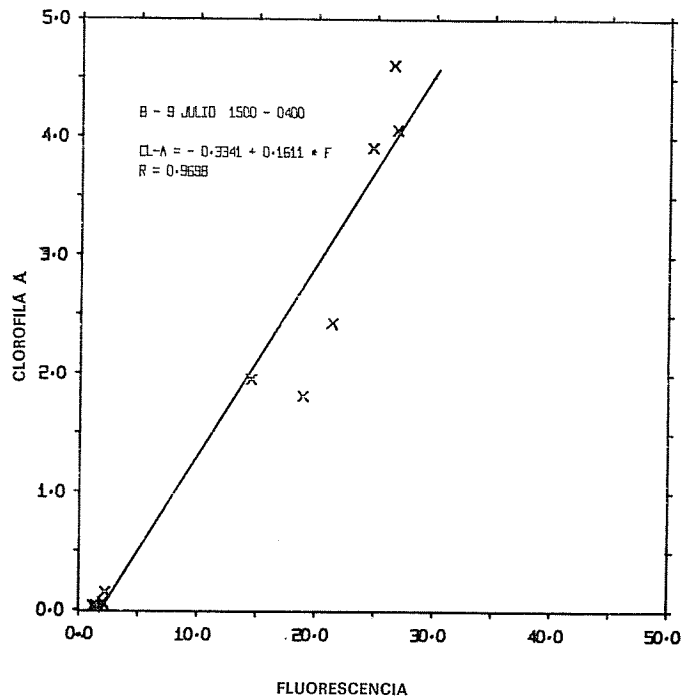


Fig. 6. — Como en la figura 4 para el trayecto entre el 8 de julio a las 1500 horas y el 9 de julio a las 0400 horas.

Fig. 7. — Como en figura 4 para el trayecto del 9 de julio entre las 0200 y las 1400 horas.

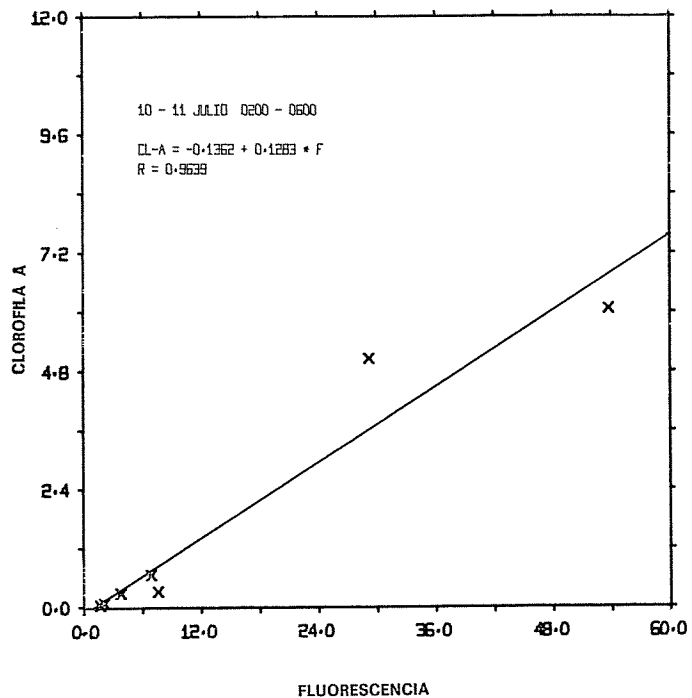


FIG. 8. — Como en figura 4 para el trayecto entre el 10 de julio a las 0200 y el 11 de julio a las 0600 horas.

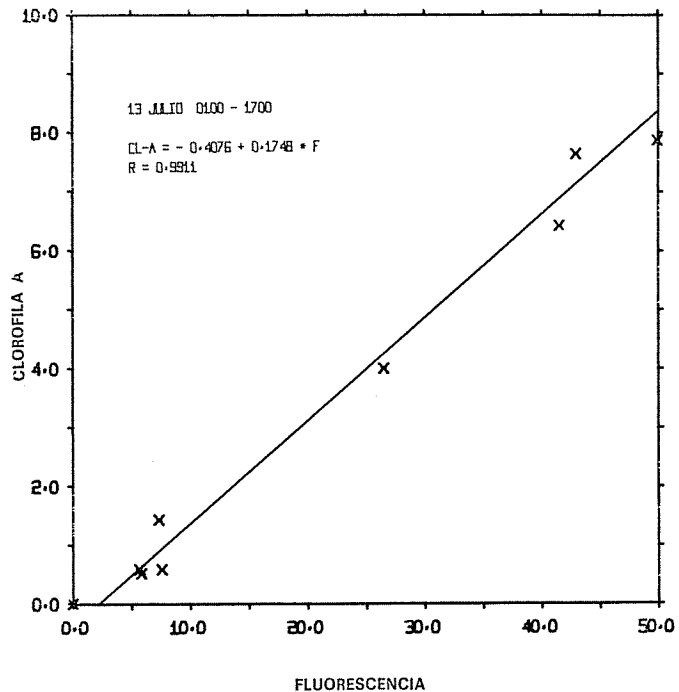


FIG. 9. — Como en figura 4 para el trayecto del 13 de julio entre las 0100 y las 1700 horas.

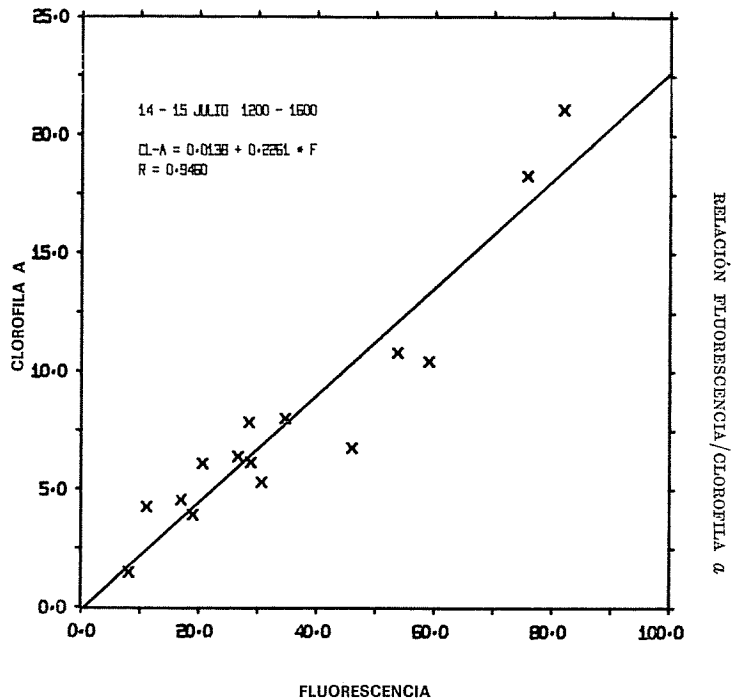
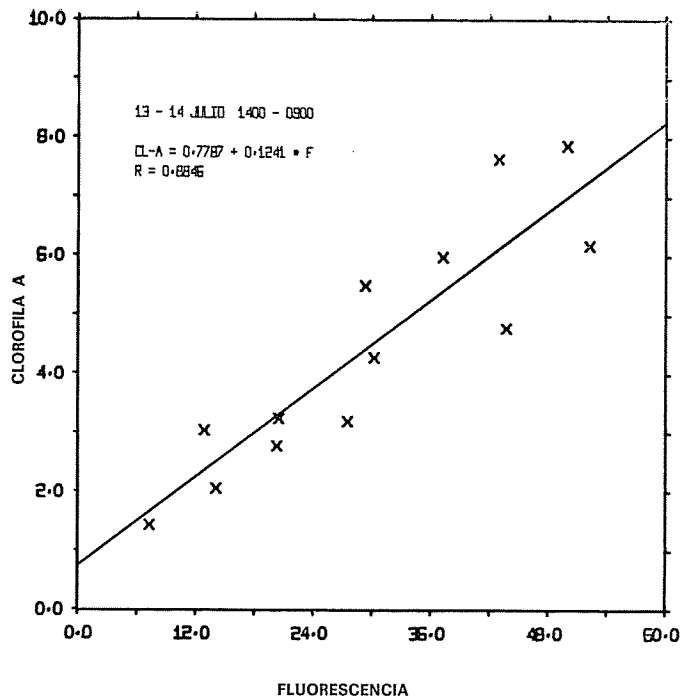


Fig. 10. — Como en figura 4 para el trayecto entre el 13 de julio a las 1400 horas y el 14 de julio a las 0900 horas.

Fig. 11. — Como en figura 4 para el trayecto entre el 14 de julio a las 1200 horas y el 15 de julio a las 1600 horas.

RELACION FLUORESCENCIA/CLOROFILA A

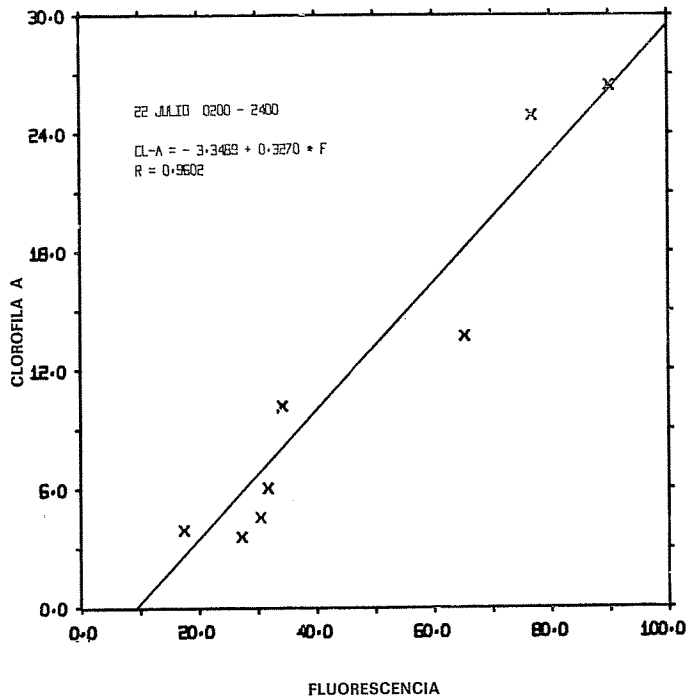


FIG. 12. — Como en figura 4 para el trayecto del 22 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

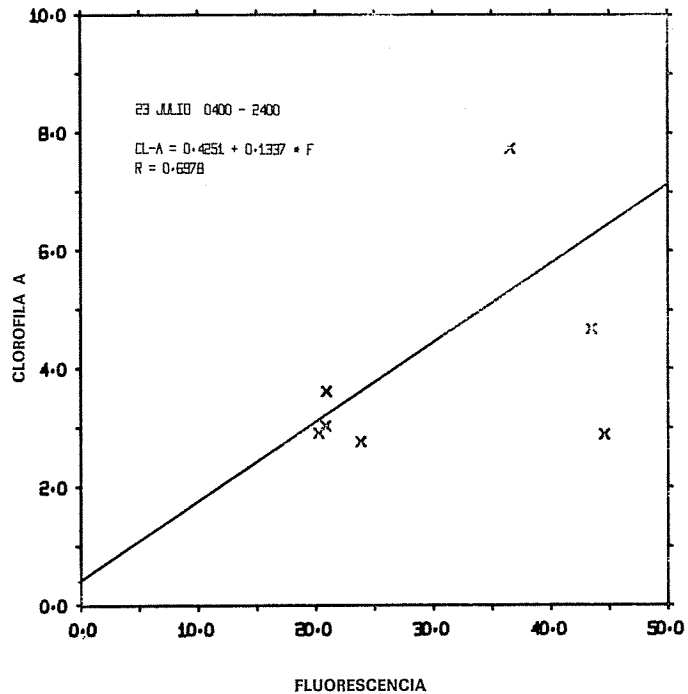


FIG. 13. — Como en figura 4 para el trayecto del 23 de julio entre las 0400 y las 2400 horas.

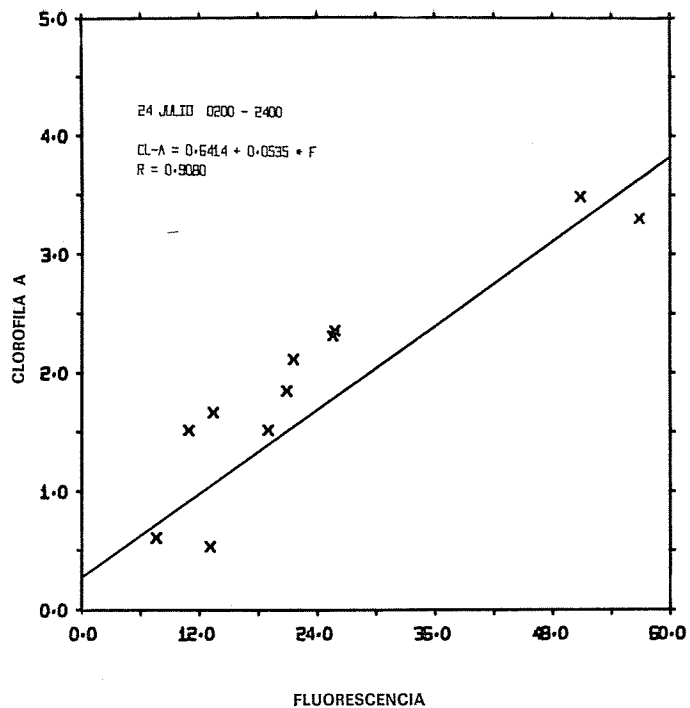


Fig. 14. — Como en figura 4 para el trayecto del 24 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

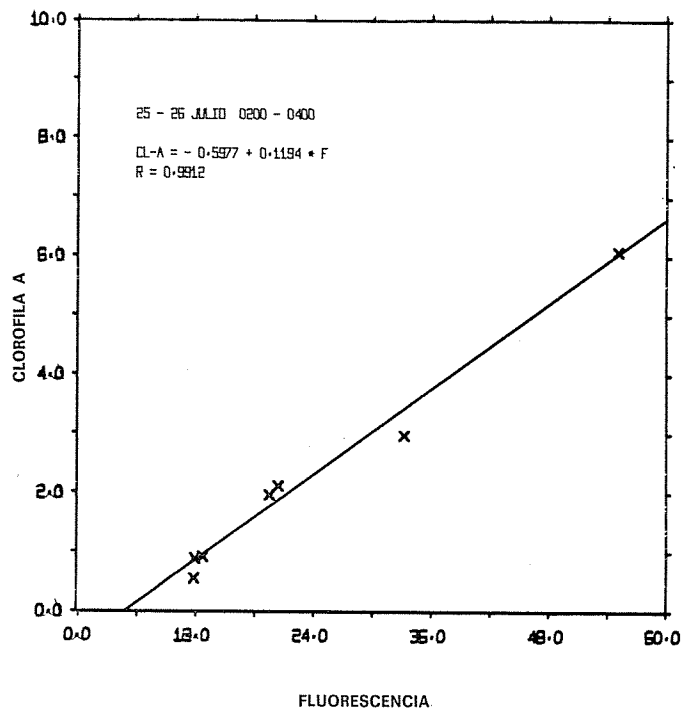


Fig. 15. — Como en figura 4 para el trayecto entre el 25 de julio a las 0200 horas y el 26 de julio a las 0400 horas.

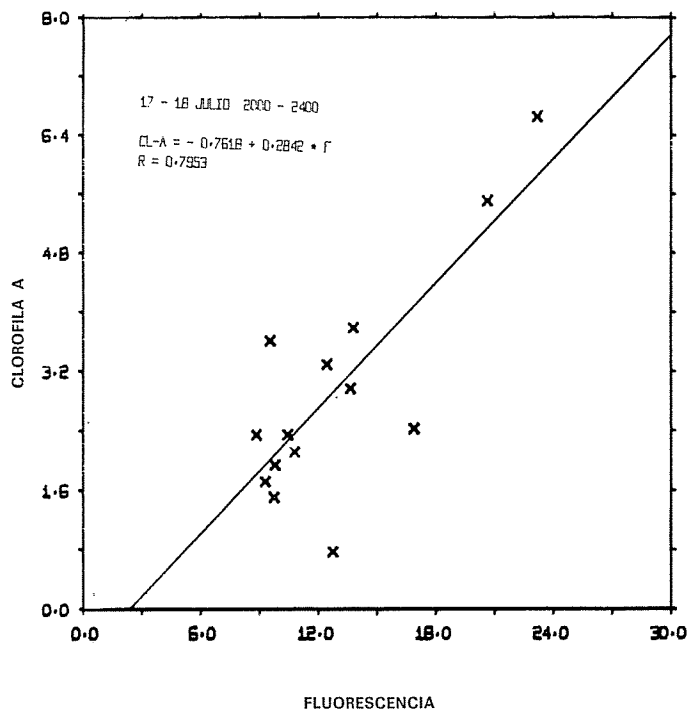


FIG. 16. — Como en figura 4 para el trayecto entre el 17 de julio a las 2000 horas y el 18 de julio a las 2400 horas.

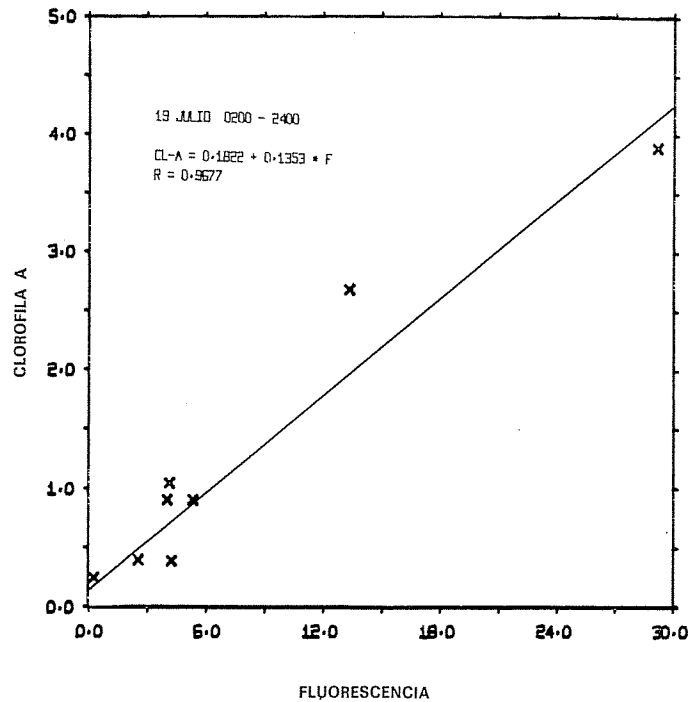


FIG. 17. — Como en figura 4 para el trayecto del 19 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

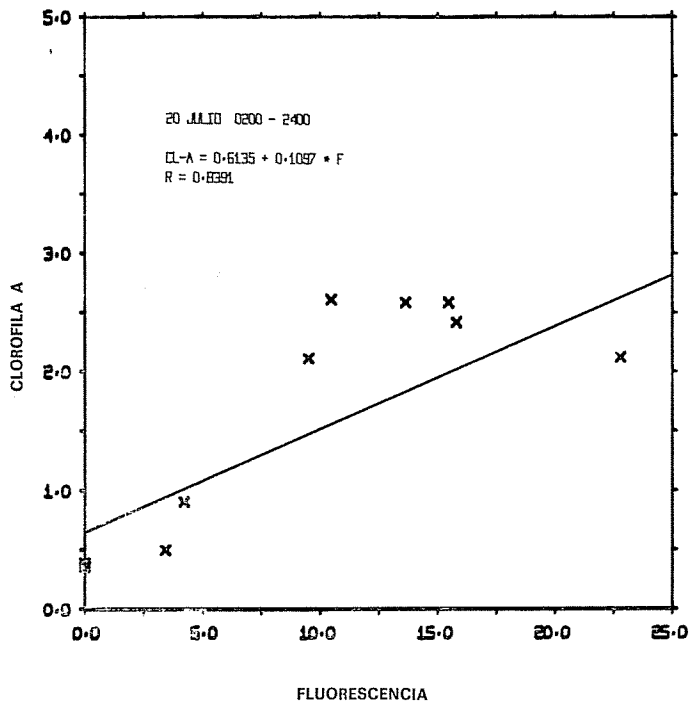


Fig. 18. — Como en figura 4 para el trayecto del 20 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

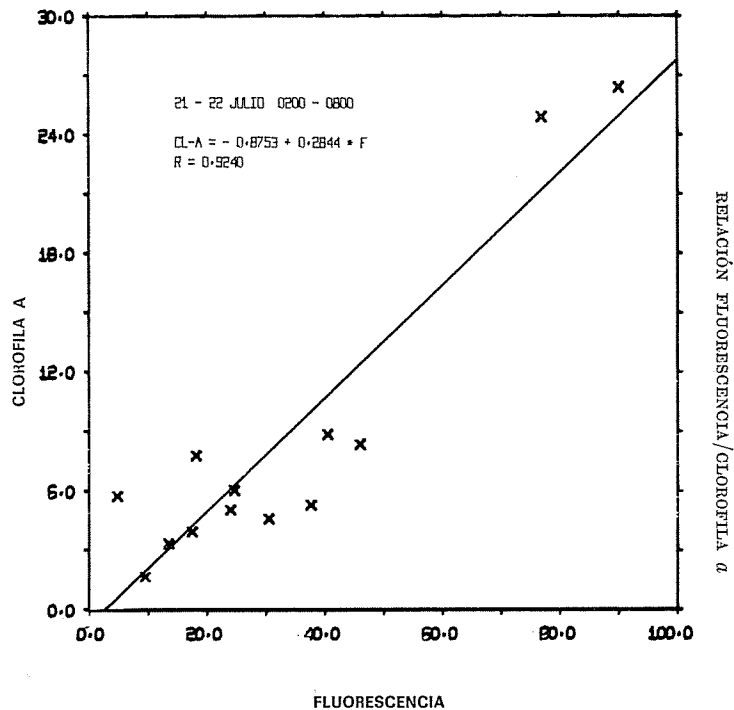


Fig. 19. — Como en figura 4 para el trayecto entre el 21 de julio a las 0200 horas y el 22 de julio a las 0800 horas.

RELACION FLUORESCENCIA/CLOROFILA a

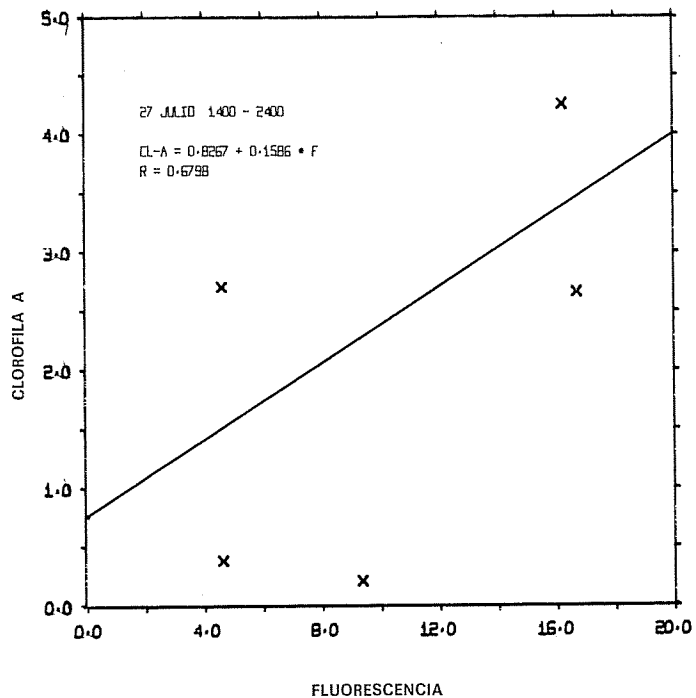


FIG. 20. — Como en figura 4 para el trayecto del 27 de julio entre las 1400 y las 2400 horas.

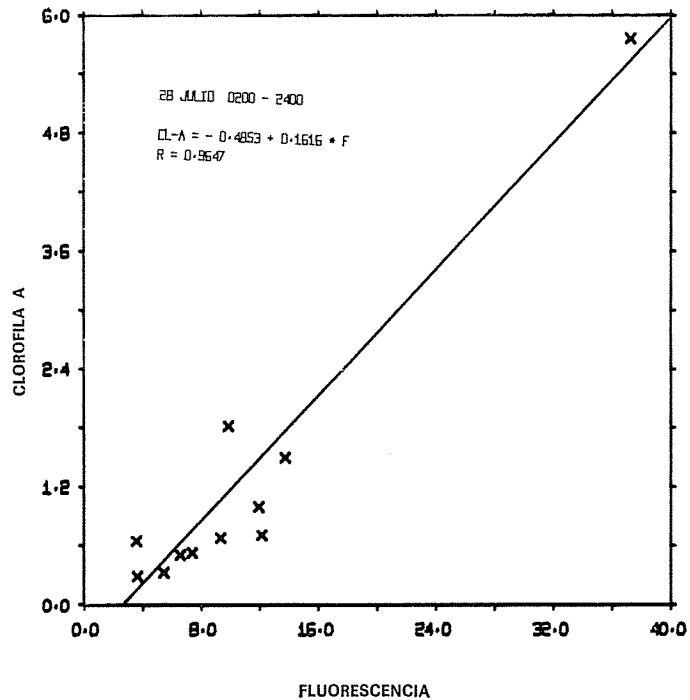


FIG. 21. — Como en figura 4 para el trayecto del 28 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

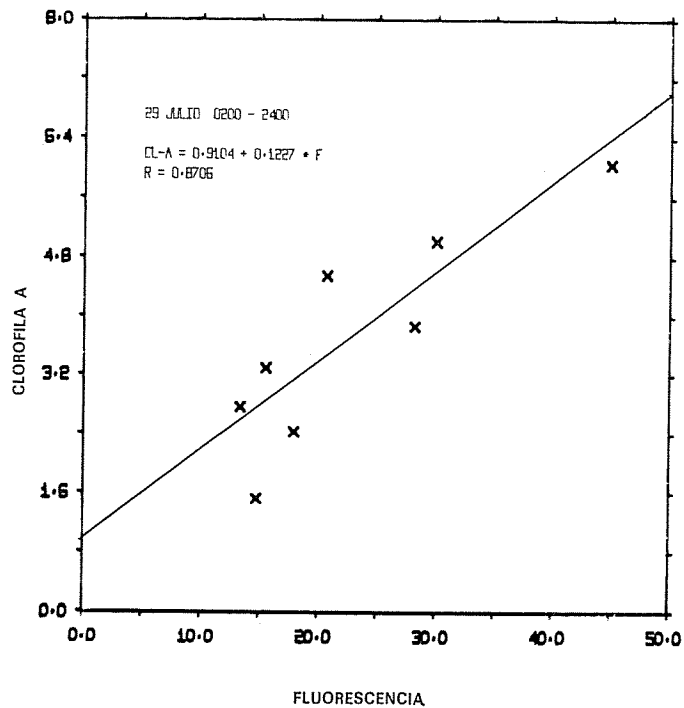


Fig. 22. — Como en figura 4 para el trayecto del 29 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

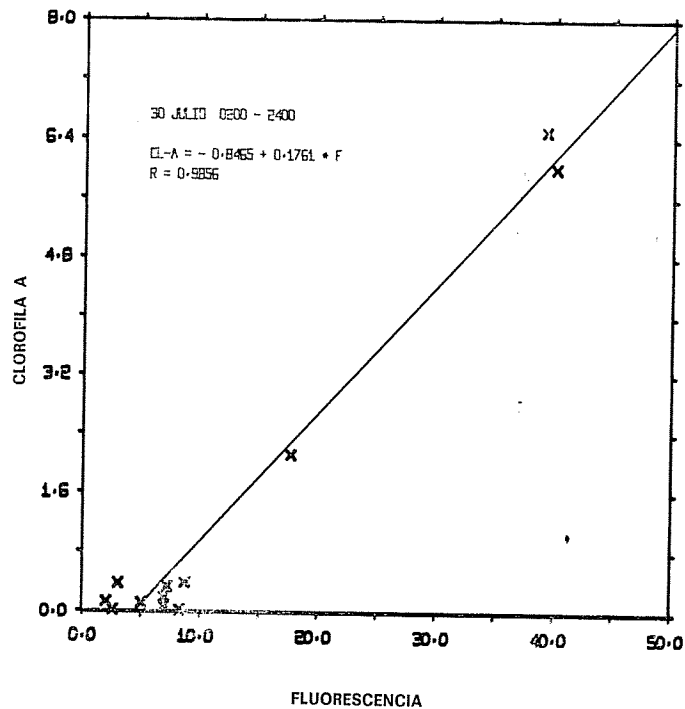


Fig. 23. — Como en figura 4 para el trayecto del 30 de julio entre las 0200 y las 2400 horas.

rofila que según RABINOWITCH (1969) y BLASCO (com. pers.) es función de la energía luminosa absorbida por las moléculas de clorofila y no utilizada en el proceso enzimático de fijación de carbono y refleja, por lo tanto, el estado fisiológico de las células fitoplanctónicas además de sus diferencias específicas.

A continuación se indican posibles vías de eliminación de errores:

a) La incertidumbre en la toma de muestras para clorofilas se puede eliminar por dos caminos: uno determinando independientemente la fluorescencia de las muestras una vez homogeneizadas y el otro efectuando la integración de las lecturas del fluorómetro a lo largo de todo el tiempo de muestreo ya sea mediante su registro continuo e integración gráfica o tomando con gran precisión la hora inicial y final de muestreo e integración numérica usando un intervalo de scanning en el D.A.S. adecuado.

b) Los cambios de los controles del fluorómetro deberían ir siempre acompañados de una calibración, independiente del sistema que se está estudiando, utilizando como patrón una sustancia fluorescente de actividad conocida (LORENZEN, 1966).

c) El método de análisis de pigmentos ha sido estudiado con suficiente atención para poder establecer las fuentes de error. Notablemente el tiempo y temperatura de la extracción, además de la presencia de luz y otros factores menos importantes, afectan la precisión de los resultados.

En síntesis, el presente estudio ha permitido una vez más (LORENZEN, 1966, 1971) demostrar la existencia de una relación lineal entre fluorescencia y clorofila y, a pesar de no poder ser demostrada la existencia de fluctuaciones naturales de dicha relación, tampoco existe base científica para demostrar lo contrario de aquí la conveniencia ya apuntada en el plan de trabajo elaborado para la campaña SAHARA-I, de extremar los cuidados metodológicos para poder establecer, sin lugar a dudas, la existencia de variaciones en la relación Fluorescencia/Clorofila de las poblaciones naturales.

SUMMARY

STATISTICAL ANALYSIS OF THE CHLOROPHYLL/FLUORESCENCE RELATIONSHIP. — Simultaneous Chlorophyll-*a* determinations, as measured by solvent extraction of phytoplankton filtrates followed by spectrophotometric evaluation, and «in vivo» fluorometer readings were obtained all along cruise SAHARA-I off NW Africa both at the surface and 20 meter deep. Assuming a linear relationship is justified by overall statistics given in Table-I. Deviations from the average are detected but not justifiable on the basis of statistics alone. Suggestions are made for minimization of experimental errors in order to enhance the effect of natural variations in the chlorophyll/fluorescence relationship.

BIBLIOGRAFÍA

- LORENZEN, C. J. — 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Res.*, 13: 223-227.
— 1971. Continuity in the distribution of surface chlorophyll. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 34 (1): 18-23.
- RABINOWITCH, E. — 1969. *Photosynthesis*. J. Wiley and Sons Inc. N. Y.
- DRAPER, N. R. and H. SMITH. — 1968. *Applied regression analysis*. J. Wiley and Sons, Inc. N. Y.