

# Sistema automatizado para la determinación fotométrica del punto final en titulaciones Winkler

Omar Calvario-Martínez<sup>1</sup>, Francisco J. Flores-Verdugo<sup>2</sup>,  
Claudia Saavedra-Rojas<sup>3</sup> y Alicia Cruz-Martínez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sábalo Cerritos s/n, Estero del Yugo, Apdo. Postal 711, Mazatlán 82010, Sin., México.

<sup>2</sup>Estación Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Explanada de la Azada y Cerro del Crestón, Apdo. Postal 811, Mazatlán 82240, Sin., México.

<sup>3</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, Apdo. Postal 70-572, C.P. 04510, México, D.F.

---

Calvario-Martínez, O., F. J. Flores-Verdugo, C. Saavedra-Rojas y A. Cruz-Martínez, 1998. Sistema automatizado para la determinación fotométrica del punto final en titulaciones Winkler. *Hidrobiológica* 8 (1): 1-8.

## RESUMEN

Se describe y evalúa un sistema para la determinación automatizada del punto final, en titulaciones Winkler para oxígeno disuelto. El sistema utiliza un detector fotométrico, el cual está conectado a una computadora IBM PC-XT compatible por medio de un convertidor analógico digital. La adición del tiosulfato se realiza por medio de una bureta de pistón, la cual cuenta con un puerto serial para comunicación con la computadora. La titulación de la muestra se controla completamente por la computadora, utilizando un programa diseñado específicamente para simular la titulación manual. El procedimiento empleado permite determinar el punto final de la reacción utilizando una fotocelda, con lo cual se elimina la subjetividad del método manual. El análisis de las muestras es rápido (2 a 3 minutos) y preciso, con un CV entre 0.01 y 0.18 % para 3 replicas, las cuales poseen valores similares a los descritos por otros autores. Este sistema puede ser utilizado para la determinación de las tasas de producción y respiración planctónica en aguas oligotróficas.

**Palabras clave:** Oxígeno, Winkler, Automatización, Producción primaria.

## ABSTRACT

A description and evaluation of a system for the automatic determination of the end-point during Winkler titrations for dissolved oxygen is presented. The system used a photometric detector which is connected to an IBM PC-XT compatible computer through an analogue to digital converter. Thiosulphate was added by means of a piston burette with a serial port for communicating with the computer. The titration of the sample is completely controlled by the computer using a programme specifically designed to simulate manual titration. The process employed allows the determination of the end-point of the reaction by means of a photocell with which the subjectivity present in the manual method is eliminated. The analysis of the samples is quick (2 to 3 minutes) and precise, with a CV of between 0.01 and 0.18 % for 3 replicates, which is similar to the values reported by other authors. This system can be used for the determination of phytoplankton production and respiration rates in oligotrophic waters.

**Key words:** Oxygen, Winkler, Automatic, Primary production.

## INTRODUCCIÓN

El oxígeno disuelto junto con la salinidad y la temperatura, son las variables oceanográficas que se evalúan más comúnmente (Culbertson y Huang, 1987). La cuantificación del oxígeno disuelto contribuye a caracterizar el movimiento de masas de agua (Kester, 1975), estimar la producción primaria planctónica (Williams y Purdie, 1991), así como comprender los procesos de interacción océano-atmósfera y los de remineralización de carbono (Karl *et al.*, 1990).

Si bien se han desarrollado avances considerables dentro de la química analítica, el procedimiento clásico para la determinación del contenido de oxígeno en agua de mar (Winkler, 1888), continua siendo el más confiable y preciso (Hartwig y Michel, 1978; Cajal *et al.*, 1991). Cuando el método se sigue rigurosamente, es posible obtener un coeficiente de variación (CV) del 0.5 % (cf. Strickland y Parsons, 1972). Sin embargo, esta determinación es relativamente lenta y subjetiva, dado que el final de la reacción se define visualmente por el analista. Consecuentemente, la calidad de las mediciones disminuye a medida que aumenta el número de muestras por procesar, debido al cansancio del operador.

Diversos autores han desarrollado soluciones para minimizar algunos problemas en la técnica (Carpenter, 1965; Carrit y Carpenter 1966; Green y Carrit 1966). La precisión de ésta se puede incrementar con el uso de: i) la concentración adecuada de reactivos (Carrit y Carpenter, 1966), ii) la detección fotométrica (Bryan *et al.*, 1976) o potenciométrica (Graneli y Graneli, 1991; Knapp *et al.*, 1991) del punto final y iii) la titulación en las botellas donde se fijó el oxígeno (Grasshoff, 1983; si bien Knapp *et al.*, 1991 difieren en esta forma de manejo). Bryan *et al.*, (1976) y Tijssen (1979) implementaron estas modificaciones y obtuvieron un CV del 0.05 al 0.1 % para réplicas provenientes del mismo recipiente.

La medición de fotosíntesis en aguas oligotróficas, donde la biomasa fitoplanctónica es pobre, solo era posible mediante el uso de procedimientos altamente sensitivos como la incorporación de  $^{14}\text{C}$  (Steemann Nielsen, 1952). Sin embargo, el incremento en la precisión de la técnica Winkler hizo posible la determinación de fotosíntesis en este tipo de ambientes (Tijssen, 1979; Williams *et al.*, 1983; Williams y Purdie, 1991), cuando se emplea la técnica de botellas claras y oscuras (Gaarder y Gran (1927).

Dada la gran cantidad de muestras de oxígeno que se generan tanto en cruceros oceanográficos como en experimentos de fotosíntesis, Williams y Jenkinson (1982) desarrollaron un sistema automatizado para la titulación

Winkler. La automatización permite aumentar la velocidad de procesamiento y mantener la reproducibilidad de las muestras, al eliminar la subjetividad en la definición del punto final por el analista.

El sistema presentado en este trabajo sigue las recomendaciones descritas por Bryan *et al.* (1976) y Williams y Jenkinson (1982), en la construcción de un detector fotométrico de punto final. La titulación, a diferencia del equipo de Williams y Jenkinson (1982), se realiza con una computadora IBM-PC compatible y se controla por medio de un programa diseñado específicamente para este propósito. La información generada se almacena en archivos ASCII, por lo que es importada fácilmente a otros programas. Se estableció la precisión del equipo, se determinó el número mínimo de muestra y se presentan los resultados de un experimento de fotosíntesis vs intensidad luminosa utilizando este sistema.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Las soluciones utilizadas fueron preparadas con reactivos grado analítico, siguiendo las recomendaciones de Carrit y Carpenter (1966). La concentración del tiosulfato de sodio fue incrementada a 0.25 M, para permitir la titulación en el cuello de la botella.

### Colecta de muestras para oxígeno disuelto

Las botellas empleadas fueron de vidrio borosilicato transparente, con tapón esmerilado y volumen nominal de 125 ml. Estas fueron lavadas con detergente RBS-35 y almacenadas posteriormente con una solución ácida.

Para obtener la máxima resolución de este sistema, es necesario conocer el volumen titulado con una exactitud  $>0.03\%$  (Williams and Jenkinson, 1982). Por lo tanto, el volumen de cada botella fue determinado gravimétricamente con una precisión de 0.01 ml.

Las botellas se llenaron con la muestra de agua utilizando un sifón, de tal forma que su volumen fuera desplazado dos veces para eliminar posibles burbujas. Posteriormente, las muestras fueron tratadas de acuerdo a Carrit y Carpenter (1966), así como Grasshoff (1983).

### Descripción del equipo

La determinación automatizada del punto final se realizó usando el equipo esquematizado en la Figura 1, conjuntamente con su programa de control. Se utilizó una computadora IBM PCXT compatible con puertos paralelo y serial y con capacidad para instalación de tarjetas de expansión.

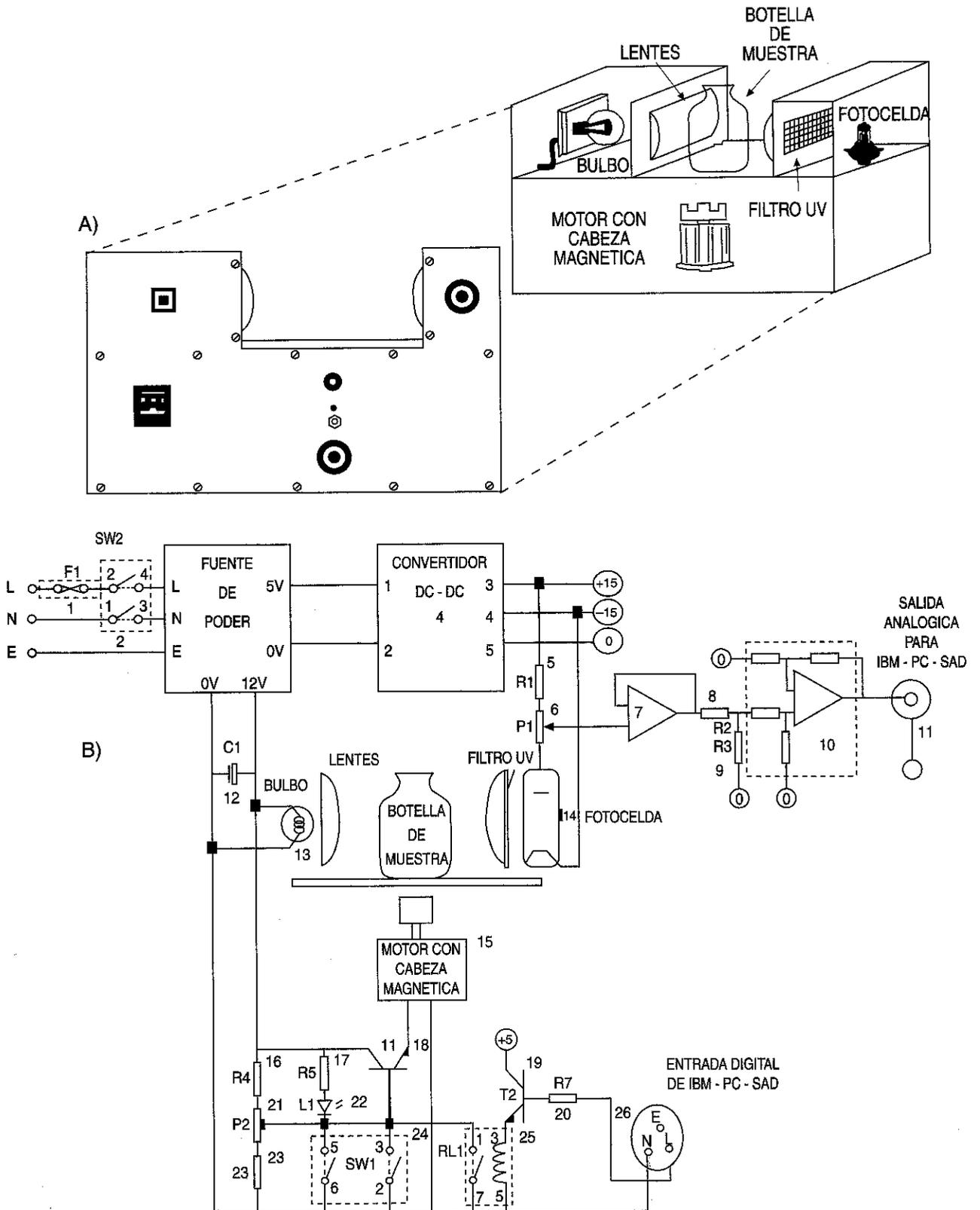


Figura 1. Componentes del equipo fotométrico utilizado para la determinación del punto final en titulaciones Winkler. A) detector fotométrico y B) diagrama electrónico.

La adición del tiosulfato de sodio se efectuó por medio de una bureta de pistón Metrohm 665 Multi-Dosimat. Dicha bureta estaba equipada con un puerto serial, a través del cual se le podía manejar e interrogar con la ayuda de una computadora. El pistón de la bureta trabajaba por medio de pulsos, de tal manera que cuando se generaban 10000, se adicionaba el volumen total de la unidad intercambiable. Cuando se emplea una unidad de 1 ml, el volumen mínimo adicionado es de 1  $\mu$ l (10 pulsos), mientras que con una unidad de 50 ml es de 5  $\mu$ l (1 pulso). Al remover la bureta de la unidad intercambiable de 50 ml y sustituirla con la bureta de la unidad de 1 ml, se incrementa la resolución a 0.1  $\mu$ l.

El detector fotométrico construido es similar al descrito por Williams y Jenkinson (1982). En un extremo se encuentra un bulbo incandescente (12 V, 21 W) y un lente cóncavo que dispersa el haz de luz. En el extremo opuesto se localiza un lente convexo con lo cual el haz se concentra, pasa a través de un filtro U.V. y se dirige a una fotocelda (Mullard 90 AV). La muestra a titular se coloca entre los lentes, justo arriba de un agitador magnético de velocidad variable.

La interface entre el detector fotométrico y la computadora se realizó por medio de un convertidor analógico/digital (A/D) MetraByte DAS-8, con 12 "bits" de resolución. La señal generada por la fotocelda se conectó a uno de los canales A/D, mientras que uno de los canales digitales se utilizó para activar el agitador magnético.

El programa para la titulación automatizada del oxígeno se diseñó ad hoc, utilizando el compilador Turbo Basic de Borland International. Dicho programa simula la titulación manual tal como es efectuada por un técnico experimentado y una vez inicializado, requiere de una intervención mínima del operador. Inicialmente, el programa solicita información para describir la muestra y forma de operación. Posteriormente, se activa el agitador y el Dosimat adiciona un volumen de tiosulfato. Después de una pausa, se lee el voltaje (absorbancia) en la fotocelda. A partir de este momento y con la progresiva disminución en la absorbancia, el programa adiciona cantidades cada vez más pequeñas de tiosulfato. Cuando la absorbancia disminuye al 18 %, el volumen de tiosulfato gastado se almacena en memoria, considerándose un posible punto final. Se continúa adicionando tiosulfato y leyendo la fotocelda para corroborar si efectivamente es un punto final. Si no hay más cambios en la absorbancia, la titulación termina y el volumen de tiosulfato almacenado se utiliza para calcular la concentración de oxígeno e imprimir los resultados. Por otro lado, si la absorbancia disminuye, se considera un falso punto final y se continúa adicionando tiosulfato hasta que la condición

anterior se cumple. Al concluir la titulación (2 a 3 minutos), se reinicializa el sistema para quedar listo y procesar otra muestra.

#### **Determinación de la precisión y del número mínimo de muestra**

Se colectó una muestra superficial de agua de mar frente a la Isla Pájaros en Mazatlán, Sin. (23° 14.04' N y 106° 27.55' W) y se distribuyó entre 40 botellas para medir oxígeno disuelto de acuerdo al protocolo previamente descrito.

Si bien la precisión y exactitud aumentan con el número de muestra, después de cierto valor los incrementos son muy pequeños. Por lo tanto, el número mínimo de muestra se obtuvo de acuerdo a Jeffery *et al.* (1989).

#### **Experimento de fotosíntesis vs intensidad luminosa**

El sistema desarrollado se evaluó midiendo la fotosíntesis y la respiración de una muestra superficial de agua de mar. El agua, proveniente de la misma localidad que en el experimento anterior, se colectó en un recipiente de plástico y se mantuvo en la oscuridad durante 24 h.

Las muestras para medir la evolución de oxígeno se colocaron en un incubador en el que la luz ambiental se disminuyó por medio de filtros de densidad neutral (100%, 97%, 86%, 59%, 32%, 16% y 5%) y la temperatura se mantuvo constante (30°C), al hacer circular agua durante el experimento (6 h).

Se colocaron cuatro botellas claras y cuatro oscuras en cada nivel, al mismo tiempo que se fijaron cuatro botellas para determinar el oxígeno al inicio de la incubación. Al final de la incubación, todas las botellas se fijaron y se determinó inmediatamente la concentración de oxígeno.

## **RESULTADOS**

#### **Determinación de la precisión y del número mínimo de muestra**

La precisión del equipo se evaluó por medio de la determinación del oxígeno disuelto en muestras provenientes del mismo recipiente. De las 40 muestras procesadas, cuatro se descartaron debido a la presencia de burbujas.

En la Tabla 1 se resumen los parámetros obtenidos, mientras que en la Fig. 2 se presenta un histograma de su distribución junto con la curva teórica de distribución normal, obtenida usando el programa SigmaPlot ver. 5.0. Las estimaciones presentan un mínimo de 3.712 y un máximo de 3.733 ml O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>, con un intervalo de 0.021 ml O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> (Fig. 2). El valor de "kurtosis" (-0.434, Tabla 1) sugiere una

Tabla 1. Parámetros estadísticos asociados a la determinación de muestras para oxígeno disuelto ( $\text{ml O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) provenientes del mismo recipiente, colectadas en Isla Pájaros, Mazatlán, Sin.

Media = 3.724	Mediana = 3.724
Moda = 3.721	n = 36
Desviación estándar = 0.005	Error estándar = $8.27 \times 10^{-4}$
CV = 0.13	Rango = 0.021
Mínimo = 3.712	Máximo = 3.733
Kurtosis = -0.434	Skewness = -0.124

distribución ligeramente platicúrtica y el valor de "skewness" (-0.124, Tabla 1) describe una curva cargada a la derecha.

El conjunto de valores se aproximó a una distribución normal, donde la media y la mediana coincidieron en  $3.724 \text{ ml O}_2 \text{ l}^{-1}$ , en tanto que la moda fue un poco menor,  $3.721 \text{ ml O}_2 \text{ l}^{-1}$  (Tabla 1). La dispersión de los datos presentó una desviación estándar de  $0.005 \text{ ml O}_2 \text{ l}^{-1}$  y un error estándar de  $0.0008$  (Tabla 1). La precisión analítica obtenida fue de  $0.13 \%$ .

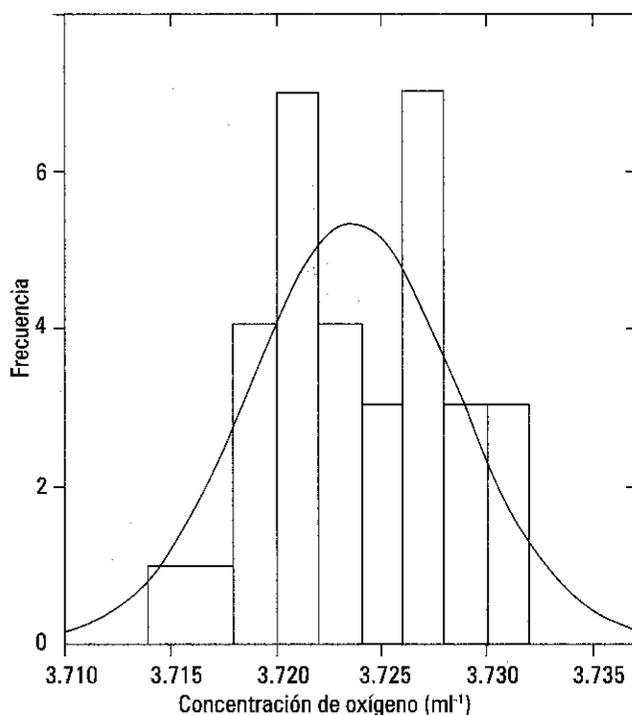


Figura 2. Distribución de muestras de oxígeno disuelto provenientes del mismo recipiente. La curva sobre-impuesta corresponde a la distribución normal esperada.

Tabla 2. Evaluación del mínimo número de muestras para oxígeno disuelto necesarias para obtener un nivel de aproximación (z) del 0.05 %. Error absoluto (D) para un número (n) de determinaciones; desviación estándar (s) = 0.005; valor de  $t(\alpha)[n-1]$ , tomado de la tabla de distribución t de Student con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , conjuntamente con el intervalo de confiabilidad (L).

n	t	D = ts / n	L = 100 D / z	Diferencia (%)
2	12.7	0.0318	63.6	
3	4.3	0.0072	14.4	49.2
4	3.2	0.0040	8.0	6.4
5	2.8	0.0028	5.6	2.4
6	2.6	0.0021	4.2	1.4

En la Tabla 2 se muestra el número mínimo de mediciones necesario para obtener una precisión aproximada al 0.05 %. El porcentaje de diferencia entre dos y tres análisis presentó un incremento sustancial (49.2 %), cuando se realizaron tres determinaciones. Una cuarta determinación no incrementó la reproducibilidad de las muestras.

#### Experimento de fotosíntesis vs intensidad luminosa

De acuerdo a los resultados descritos anteriormente, para la evaluación de oxígeno disuelto son suficientes tres estimaciones para obtener un CV aproximado al 0.05 %. Sin embargo, se decidió utilizar cuatro botellas claras, cuatro oscuras y cuatro iniciales en cada nivel de incubación. Esto permitió eliminar alguna determinación cuestionable, sin que la precisión en la determinación de la producción o respiración se viera deteriorada.

Las estimaciones de oxígeno disuelto para las botellas claras, oscuras e iniciales, a cada intensidad luminosa se muestran en la Tabla 3. La precisión alcanzada se mantuvo entre 0.01 y 0.18 % (Tabla 3).

Las tasas de producción y consumo de oxígeno se presentan en la Fig. 3. La producción bruta se incrementó desde  $0.08 + 0.08 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  al 5 % de iluminación, hasta alcanzar un máximo de  $2.08 + 0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  al 86 % de iluminación. A partir de este nivel, la producción bruta disminuyó hasta  $1.67 + 0.13 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  al 100 % de iluminación.

Si bien la distribución de la producción neta y bruta fueron similares, tanto al 5 % ( $-0.78 + 0.09 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) como al 15 % de iluminación ( $-0.23 + 0.05 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), la producción neta fue negativa. El máximo de producción neta se observó al 86 % ( $1.08 + 0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y disminuye a  $0.79 + 0.13 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  al 100 % de iluminación.

Tabla 3. Determinación de la concentración de oxígeno disuelto ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) en muestras incubadas *in vitro* a diferentes intensidades luminosas. Desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV) y número de muestras (n).

Botellas	Porcentaje de iluminación						
	100	97	86	59	32	16	5
<b>Claras</b>							
	190.20	191.81	192.07	191.30	187.78	184.71	180.12
	190.48	191.55	192.08	190.82	187.40	184.36	179.96
		191.63	192.44			187.56	181.38
Media	190.49	191.66	192.20	191.06	187.58	184.54	180.49
s	0.41	0.02	0.04	0.34	0.04	0.25	0.61
CV	0.10	0.07	0.11	0.18	0.10	0.13	0.16
n	2	3	3	2	3	2	3
<b>Oscuras</b>							
	179.35	179.91	179.75	180.87			180.06
	179.68	180.55	179.76	180.92			179.71
		180.27	179.61	180.84			180.27
Media	179.52	180.24	179.71	180.88			180.03
s	0.23	0.10	0.01	0.04			0.08
CV	0.13	0.18	0.05	0.02			0.16
n	2	3	3	3			3
<b>Iniciales</b>							
	185.21	185.21	185.56	185.41	186.06		185.58
	184.64	185.28	185.74	185.38	186.02		185.18
	185.19		185.86				
Media	185.01	185.25	185.72	185.42	186.04		185.38
s	0.11	0.05	0.02	0.02	0.03		0.28
CV	0.17	0.03	0.08	0.01	0.02		0.15
n	3	2	3	2	2		2

La tasa de respiración se mantuvo aproximadamente constante ( $0.82 \pm 0.03$  a  $1.00 \pm 0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), a las diferentes intensidades luminosas. La respiración fue mayor que las producciones bruta y neta al 5 y 16 % de iluminación. Para el 32 y 59 % de iluminación, la respiración se encontró entre la producción bruta y neta. A altas intensidades luminosas, 86, 97 y 100 % de iluminación, la respiración se localizó por debajo de la producción neta.

## DISCUSIÓN

El detector construido y el programa de control implementados, permitieron la determinación automatizada del punto final en titulaciones Winkler. El equipo liberó al operador de la evaluación visual del punto final con lo que fue posible aumentar la velocidad y consistencia de las mediciones. El sistema puede ser operado correcta y

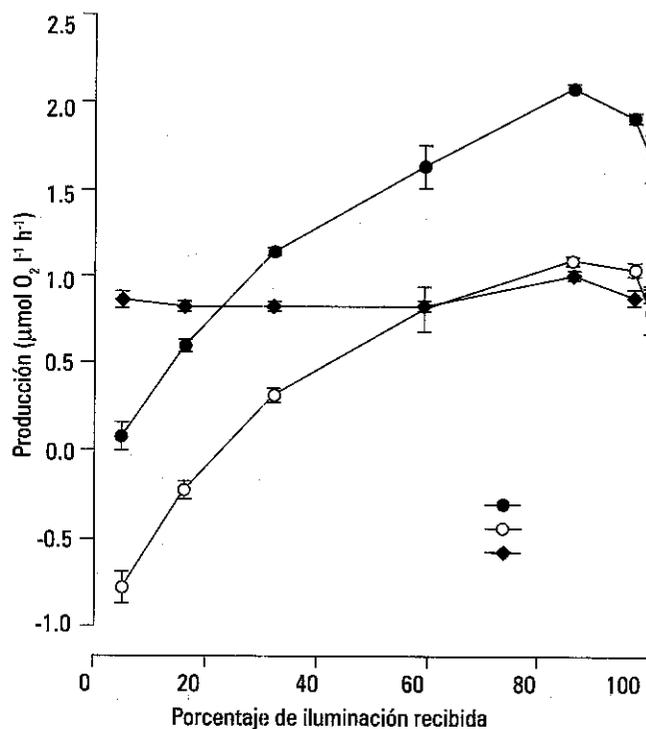


Figura 3. Tasas de producción y consumo de oxígeno *in vitro* de una muestra de agua de mar superficial. Las barras de error representan  $\pm$  error estándar de la media en la determinación de oxígeno.

eficazmente después de un entrenamiento mínimo (15 minutos).

La titulación automática del punto final puede llevar desde 2.5 a 5 minutos (Williams y Jenkinson, 1982; Culberson y Huang, 1987; Oudot *et al.*, 1988; Graneli y Graneli, 1991). El equipo aquí descrito realizó la titulación en 2 a 3 minutos, lo cual lo sitúa dentro de los más rápidos.

La estimación de la fotosíntesis en ambientes oceánicos utilizando este sistema, requiere que las determinaciones de oxígeno sean precisas más que exactas (Williams y Jenkinson, 1982; Graneli y Graneli, 1991). La reproducibilidad de las muestras provenientes del mismo recipiente (0.13 %) permitieron la medición de la producción y consumo de oxígeno, cuando se incuban *in situ* botellas claras y oscuras a diferentes intensidades luminosas. En este experimento se obtuvieron CV del 0.01 al 0.18 %, los cuales permiten situar a este sistema entre los equipos más precisos (eg. Bryan *et al.* 1976; Hartwig y Michael, 1978; Williams y Jenkinson, 1982; Oudot *et al.*, 1988; Knapp *et al.*, 1991; Smith y Kemp, 1995). Esta precisión es la adecuada para la determinación de fotosíntesis en ambientes oligotróficos (Oudot *et al.*, 1988).

De acuerdo a Graneli y Graneli (1991), el uso de sistemas automáticos comerciales para la titulación tienen la ventaja de que se entregan prácticamente listos para su uso. Por otro lado, los equipos descritos por Bryan et al. (1976), Tijssen (1979) y Williams y Jenkinson (1982), requieren de una gran cantidad de tiempo y apoyo técnico para la construcción, elaboración del programa y optimización del sistema. Si bien estos equipos no son caros, al adicionar los costos para su implementación estos se elevan hasta ser similares al de los equipos comerciales, entre 9000 y 18000 dólares americanos (Graneli y Graneli, 1991). El equipo presentado aquí tiene un costo menor y detalles para su implementación pueden ser obtenidos a través de correspondencia con el primer autor.

Si bien la mayoría de las estimaciones de producción primaria en el océano están basadas en el método de  $^{14}\text{C}$ , su interpretación ha sido sujeta a debates (cf Williams y Purdie, 1991). La estimación por el método de oxígeno, aunque menos precisa, proporciona una interpretación más directa (Bryan et al., 1976). Consecuentemente, la determinación de la fotosíntesis utilizando un sistema automatizado de alta precisión, como el aquí presentado, constituye una alternativa viable a la medición por  $^{14}\text{C}$ .

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo técnico proporcionado por las Biol. V. Patricia Domínguez Jiménez y Rosa Ma. Medina Guerrero, así como al FOSIMAC quien financió parcialmente esta contribución a través del proyecto SIMAC 94/CM-010.

### LITERATURA CITADA

- BRYAN, J. R., J. P. RILEY y P. J. LE B. WILLIAMS, 1976. A Winkler procedure for making precise measurements of oxygen concentration for productivity and related studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 21: 191-197.
- CAJAL MEDRANO R., E. MITRANI ABENCHUCHAN y M. CASTRO DELGADO, 1991. Sistema fotoelectrónico para titulaciones de oxígeno disuelto con alta precisión y su aplicación en oceanografía biológica. *Hidrobiológica* 1(2): 11-20.
- CARPENTER, J. H., 1965. The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnology and Oceanography* 10: 135-140.
- CARRIT, D. E. y J. H. CARPENTER, 1966. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in sea water; a NASCO Report. *Journal of Marine Research* 24: 286-318.
- CULBERSON, C. H. y S. HUANGS, 1987. Automated amperometric oxygen titration. *Deep-Sea Research* 34(A): 875-880.
- GAARDER, T. y H. H. GRAN, 1927. Investigations of the production of plankton in the Oslo Fjord. Rapport et ProcesverVaux des Reunion Conseil a Permanent International Pour le Exploration la Mer. 42: 1-48
- GRANELI, W. y E. GRANELI, 1991. Automatic potentiometric determination of dissolved oxygen. *Marine Biology* 108: 341-348.
- GRASSHOFF, K., 1983. Determination of oxygen. En: K. GRASSHOFF, M. EHRHARDT y K. KREMLING (eds). *Methods of sea water analysis*. Verlag Chemie. Weinheim, Germany, pp. 61-72.
- GREEN, E. J. y D. E. CARRIT, 1966. An improved iodine determination flask for whole bottle titration. *Analyst* 91: 207-208.
- HARTWIG, E. O. y J. A. MICHAEL, 1978. A sensitive photoelectric Winkler titrator for respiration measurements. *Environmental Science Technology* 12(6): 712-715.
- JEFFERY, G. H., J. BASSETT, J. MENDHAM y R. C. DENNEY, 1989. Errors and statistics. En: Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis. Longman Scientific and Technical, London, U.K., pp. 127-149.
- KARL, D. M., C. D. WINN, D. V. W. HEBEL y R. LETELIER, 1990. Hawaii Ocean Time-Series Program Field and Laboratory Protocols September 1990. University of Hawaii, U.S.A., 72 pp.
- KESTER, D. R., 1975. Dissolved gases other than CO<sub>2</sub>. En: J. P. RILEY y G. SKIRROW (eds.), *Chemical Oceanography*. V. 1, Academic Press, London, pp. 498-556.
- KNAPP, G. P., M. C. STALCUP y R. J. STANLEY, 1991. Iodine losses during Winkler titrations. *Deep-Sea Research* 38(1): 121-128.
- QUODOT, C., R. GERARD, P. MORIN e I. GNINGUE, 1988. Precise ship-board determination of dissolved oxygen (Winkler procedure) for productivity studies with a commercial system. *Limnology and Oceanography* 33(1): 146-150.
- SMITH E. M. y W. M. KEMP, 1995. Seasonal and regional variations in plankton community production and respiration for Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series* 116:217-231.
- STEEMANN NIELSEN, E., 1952. The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil International pour le Exploration la Mer* 18: 117-140.
- STRICKLAND, J. H. D. y T. R. PARSONS, 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada Bulletin* 167:310 pp.
- TIJSSSEN, S. B., 1979. Diurnal oxygen rhythm and primary production in the mixed layer of the Atlantic Ocean at 20° N. *Netherlands Journal of Sea Research* 13(1): 79-84.

- WILLIAMS, P. J. LE B. y N. W. JENKINSON, 1982. A transportable microprocessor controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnology and Oceanography* 27(3): 576-584.
- WILLIAMS P. J. LE B., K. R. HEINEMANN, J. MARRA y D. A. PURDIE, 1983. Comparison of  $^{14}\text{C}$  and  $\text{O}_2$  measurement of phytoplankton production in oligotrophic waters. *Nature* 305: 49-50.
- WILLIAMS P. J. LE B. y D. A. PURDIE, 1991. In vitro and in situ derived rates of gross production, net community production and respiration of oxygen in the oligotrophic subtropical gyre of the North Pacific Ocean. *Deep-Sea Research* 38(7): 891-910.
- Winkler, L.W., 1888. Die Bestimmung des im Wasser gelosten Sauerstoffes. *Chemische Berichte* 21: 2843-2855.
- Recibido:* 12 de octubre de 1996.  
*Aceptado:* 8 de agosto de 1997.