

# EVALUACIÓN DEL KIT *FISH FARMING FFIA*® PARA ANÁLISIS DE CALIDAD DE AGUAS EN ACUICULTURA

Higuera HE, González JF<sup>1</sup>

Laboratorio de Toxicología Acuática, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.

## RESUMEN

Se evaluó a través de métodos analíticos alternos y mediciones de varios observadores la confiabilidad en la cuantificación de pH, nitrito (NO<sub>2</sub>), amoníaco (NH<sub>3</sub>) y oxígeno disuelto (O<sub>2</sub>) en aguas utilizando el kit *Fish Farming FFIA*® (Hach). El análisis de NH<sub>3</sub> tuvo el mayor coeficiente de variación (CV = 15,2) cuando diferentes observadores (n=11) analizaron una muestra problema. Dos muestras (0,5 y 3,0 ppm N-NO<sub>2</sub>) fueron usadas para medir NO<sub>2</sub> comparando el método de diazotización y las lecturas obtenidas con el kit por diferentes observadores (n=10). Los resultados para la primera muestra fueron muy similares (diazotización = 0,54 ppm y Hach = 0,41 ppm N-NO<sub>2</sub>, CV = 10,5). En la segunda, se presentó una mayor diferencia (diazotización = 4,10 ppm y Hach = 2,97 ppm N-NO<sub>2</sub>, CV = 14,9). El promedio del pH (n=17) con el kit fue 7,29 ± 0,2 (CV = 2,77); mientras que con el potenciómetro fue de 7,06. La medición de O<sub>2</sub> usando el kit arrojó un resultado promedio de 6,1 ± 0,57 ppm (CV = 9,3) mientras que con el oxímetro fue de 4,67 ± 0,15 ppm (CV = 3,2) para 10 mediciones seguidas, hechas sobre un mismo punto en un tanque de peces. El kit de Hach mostró una buena sensibilidad para la medición del pH. El NH<sub>3</sub> indicó la mayor dispersión de resultados y los valores de O<sub>2</sub> con el kit estuvieron siempre por encima del valor registrado por el oxímetro. Estos resultados sugieren que para algunas variables (amoníaco, nitrito), el kit tiene imprecisiones determinando los valores reales en las aguas analizadas. Para el nitrito, ésto sería de riesgo para especies muy susceptibles al mismo (ej. salmónidos, peces gato) mientras que para el amoníaco, imprecisiones en la cuantificación serían de alto riesgo para todas las especies dada la alta susceptibilidad a este metabolito.

**Palabras clave:** análisis, calidad de aguas, acuicultura.

## EVALUATION OF KIT *FISH FARMING FFIA*®, A COMMERCIAL KIT FOR WATER QUALITY ANALYSIS IN AQUACULTURE

### ABSTRACT

Alternate analytical methods and sequential measurements by different observers were used to determine the reliability of the *Fish Farming FFIA*® kit (Hach) for the measurement of dissolved oxygen, nitrite (NO<sub>2</sub>), un-ionized ammonia (NH<sub>3</sub>), and pH. NH<sub>3</sub> analysis showed the highest coefficient of variation (C.V.= 15,2) amongst the observers (n=11) that performed the test. Nitrite analysis was done using two nominal concentrations (0,5 and 3,0 ppm N-

<sup>1</sup> jfgonzalezma@unal.edu.co

NO<sub>2</sub>). The tests that were performed compared the diazotization method and the results from different observers (n=10) using the kit. Results for the 0,5 ppm concentration sample were very similar between the two methods (diazo test = 0,54 ppm, Hach = 0,41 ppm N-NO<sub>2</sub>). A higher difference was found for the second concentration (diazotización = 4,10 ppm, Hach = 2,97 ppm N-NO<sub>2</sub>). The CVs found when 10 different observers read the kit disk were 10,5 and 14,9, respectively. Analysis of pH had an average value of 7,29 ± 0,2 (n=17). Measurement of the same sample by a pH meter was 7,06. The CV for the pH measurement using the kit was 2,77. Dissolved oxygen concentration (ppm) had an average value of 6,10 ± 0,57 (kit) while the oxymeter that was used as the alternate method had an average value of 4,67 ± 0,15. These average values came from 10 sequential measurements performed over the same point on a fish acclimation tank in our lab. CVs were 9,3 (kit) and 3,2 (oxymeter). The results found in this evaluation indicate that the kit had better precision for the pH and nitrite analysis (low concentration). The highest variation was for the ammonia results. Dissolved O<sub>2</sub> values obtained after analysis using the kit were always higher than those obtained from the oxymeter.

**Key words:** Aquaculture, water quality analysis.

## INTRODUCCIÓN

Dentro de los parámetros críticos que deben analizarse rutinariamente en las aguas destinadas para cultivo de peces y otros organismos acuáticos están el pH y las concentraciones de amoníaco, nitrito y oxígeno disuelto (1, 2). Cambios en estas variables pueden determinar desde efectos en la capacidad productiva de las especies hasta mortalidades masivas con grandes pérdidas económicas para el acuicultor. Los kits comerciales para uso en campo son de gran utilidad en la evaluación de la calidad del agua ya que ofrecen ventajas como la fácil y rápida ejecución de las pruebas (3). Adicionalmente, la disposición de las pruebas en los kits hace que no sean necesarios equipos de laboratorio difíciles de conseguir para trabajo en campo. Sin embargo, para algunas pruebas el resultado final puede interpretarse con cierta subjetividad dado que el punto final para obtenerlo se hace por comparación con una escala colorimétrica preestablecida. Errores en la interpretación de estos resultados podrían tener consecuencias serias para algunas especies particularmente susceptibles a variaciones en algunos de los parámetros de calidad de aguas.

El kit comercial *Fish Farming FFIA*<sup>®</sup> (Hach) es uno de los más usados en explotaciones comerciales en nuestro medio. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la confiabilidad de este kit mediante comparación con otros métodos y a través de lecturas hechas por varios observadores para estudiar el grado de dispersión en los resultados. Esta evaluación fue hecha por nuestra propia iniciativa sin que mediara solicitud directa de la casa comercial productora del kit.

### Materiales y métodos

Las muestras de agua utilizadas para este estudio fueron soluciones con concentraciones nominales conocidas de analitos (NO<sub>2</sub>), o muestras provenientes de tanques de mantenimiento de peces en nuestro laboratorio.

#### *Análisis de nitrito (NO<sub>2</sub>)*

Se prepararon dos soluciones a partir de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) usando agua destilada deionizada como solvente. Las concentraciones nominales calculadas para el análisis fueron 0,5 y 3 ppm N-NO<sub>2</sub>. Estos dos fueron sometidas a análisis espectro-

fotométrico usando el método de diazotización referenciado como prueba estándar por la *American Public Health Association* (APHA) (4), y la prueba correspondiente del kit de Hach. La prueba estándar se basa en la lectura en el espectro visible de la luz (543 nm) de un complejo de coloración que se forma cuando el nitrógeno ligado al (*N-NO<sub>2</sub>*) reacciona con difenilamina y N-(1-naftil)-etilendiamino dihidrocloruro (NED). Este método puede detectar, sin necesidad de dilución, concentraciones de nitrógeno ligado al *N-NO<sub>2</sub>* que van de 0,01 a 0,2 mg/L (ppm). La prueba con el kit es una variante de este método basada en la reacción entre el *N-NO<sub>2</sub>* y los reactivos de sal trisódica del ácido 1,2-ciclohexan-diaminotetracético, fosfato de potasio monobásico, piro-sulfato de potasio, sulfanilato de sodio y la sal disódica del ácido cromatrópico (5). Los resultados con el kit fueron obtenidos luego de que 10 observadores diferentes hicieron las lecturas sobre el disco para cada concentración.

#### *Análisis de amoníaco (NH<sub>3</sub>)*

Éste se hizo a través del kit de Hach cuyo fundamento es la reacción del nitrógeno ligado al amoníaco total (ionizado y no ionizado) presente en la muestra con el reactivo de Nessler (4). Dado que la cuantificación de la forma no ionizada (NH<sub>3</sub>) del amoníaco es de mayor importancia desde el punto de vista toxicológico por sus mayores efectos tóxicos sobre los peces, al valor obtenido con el kit (amoníaco total) se le calculó la fracción correspondiente de la forma no ionizada según su relación con el pH y la temperatura del agua (2). La muestra analizada provino de un tanque de aclimatación de nuestro laboratorio. El punto final de la prueba fue leído por 11 observadores diferentes para evaluación posterior de la dispersión de los resultados.

#### *Análisis de pH*

El pH de una muestra proveniente de un tanque de aclimatación de peces se midió

utilizando un potenciómetro convencional de laboratorio (Cole-Parmer) que fue calibrado previamente con soluciones estándar de pH = 4,0; 7,0 y 10,0. La muestra fue a su vez procesada con el kit agregando la solución indicadora de pH a la misma y haciendo la lectura mediante comparación con el disco del kit. Esta lectura fue hecha por 17 observadores diferentes.

#### *Análisis de concentración de oxígeno disuelto*

Esta variable fue medida tomando como referencia un mismo punto de un tanque de aclimatación de peces que tenía aireación suplementaria y estaba a una temperatura promedio de 26 °C. Sobre este punto se tomaron 10 lecturas sucesivas con un oxímetro de campo (YSI-55). El oxímetro fue calibrado previamente a las mediciones y se le hizo cambio de membrana y de solución electrolítica en la sonda. Cada vez que se hizo la lectura con el oxímetro se tomó una muestra para hacer el análisis con el kit de Hach. Este último es una variante del método de Winkler cuyo fundamento es la cuantificación del O<sub>2</sub> según que éste reaccione sucesivamente con sulfato de manganeso, ioduro de potasio y ácido sulfámico. La cantidad total de I<sub>2</sub>° formado es titulada con tiosulfato de sodio como un indicador del oxígeno disuelto presente en la muestra (5).

## RESULTADOS

Los resultados de los análisis de NO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, pH y O<sub>2</sub> aparecen en las tablas 1 a 4, respectivamente.

De las dos soluciones problema de nitrito que fueron utilizadas para evaluar el kit comercial, la de 0,5 ppm de *N-NO<sub>2</sub>* tuvo un resultado más cercano al valor obtenido con el método estandarizado que aquella que tenía 3,0 ppm de *N-NO<sub>2</sub>*. Por su parte, el amoníaco fue la variable que presentó el mayor coeficiente de variación (15,3) utilizando el kit de Hach cuando diferentes observadores

hicieron lecturas sobre una muestra problema. Los resultados obtenidos con el kit para la medición de pH fueron, no solamente los de menor coeficiente de variación para las 17 observaciones hechas (2,77), sino los más cercanos al valor obtenido con el método potenciométrico. Los valores encontrados para

la medición del oxígeno disuelto en las aguas utilizando el kit de Hach siempre estuvieron por encima de aquellos encontrados con el oxímetro. Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos ( $p < 0,05$  en test de Student).

**Tabla 1.** Lecturas de cada observador y promedios del análisis de nitrito (N-NO<sub>2</sub>) utilizando el kit de Hach. Resultado de la prueba de diazotización (APHA) con 2 concentraciones nominales diferentes de nitrito (partes por millón de N-NO<sub>2</sub>)

Observador No.	0,5 ppm N-NO <sub>2</sub> (Hach)	3,0 ppm N-NO <sub>2</sub> (Hach)	0,5 ppm N-NO <sub>2</sub> (diazotización)	3,0 ppm N-NO <sub>2</sub> (diazotización)
1	0,40	3,50	No reportan datos	
2	0,39	3,30		
3	0,36	3,10		
4	0,40	2,80		
5	0,44	2,80		
6	0,48	1,90		
7	0,37	3,30		
8	0,38	2,90		
9	0,47	2,90		
10	0,37	3,20		
Promedio ± DS	0,41 ± 0,04	2,97 ± 0,44	-	-
Valor único	-	-	0,54	3,21
CV	10,5	14,9	-	-
Valor mínimo	0,37	1,90	-	-
Valor máximo	0,48	3,50	-	-

DS : desviación estándar; CV : coeficiente de variación

**Tabla 2.** Mediciones individuales y promedios del análisis de amoniaco utilizando el kit de Hach (resultados expresados en partes por millón)

Observador No.	Hach (ppm NH3)
1	0,8
2	1,0
3	1,0
4	0,8
5	0,8
6	1,0
7	1,0
8	1,1
9	1,3
10	1,0
11	1,1
Promedio ± DS	0,99 ± 0,15
CV	15,3
Valor mínimo	0,8
Valor máximo	1,3

DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

**Tabla 3.** Mediciones individuales y promedio del análisis de pH utilizando el kit de Hach, y valor encontrado con potenciómetro (resultados expresados en unidades de pH).

Observador No.	Hach	Potenciómetro
1	7,25	No reporta datos
2	7,25	
3	7,25	
4	6,75	
5	7,50	
6	7,25	
7	7,25	
8	7,25	
9	7,25	
10	7,00	
11	7,50	
12	7,50	
13	7,25	
14	7,50	
15	7,25	
16	7,50	
17	7,50	
Promedio ± DS	7,29 ± 0,2	-
Valor único	-	7,06
CV	2,77	-
Valor mínimo	6,75	-
Valor máximo	7,50	-

DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

**Tabla 4.** Mediciones individuales y promedios del análisis de oxígeno disuelto utilizando el oxímetro de campo (YSI-55) y el kit de Hach (resultados expresados en partes por millón).

Muestreo No.	YSI 55 (ppm O2)	Hach (ppm O2)
1	4,40	6,0
2	4,63	6,0
3	4,75	6,0
4	4,69	6,0
5	4,45	6,0
6	4,85	6,0
7	4,74	7,0
8	4,61	7,0
9	4,82	6,0
10	4,75	5,0
Promedio $\pm$ DS	4,67 $\pm$ 0,15	6,1 $\pm$ 0,57 *
CV	3,2	9,3
Valor mínimo	4,40	5,0
Valor máximo	4,85	7,0

\*  $p < 0,05$  (test de student) al comparar medias obtenidas con los dos métodos  
 DS: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

## DISCUSIÓN

### Análisis de nitrito

Es interesante ver cómo de las dos soluciones problema analizadas se tuvo un resultado más preciso, con respecto al método estandarizado, con la solución de menor concentración (0,5 ppm N-NO<sub>2</sub>) que con la de mayor concentración (3,0 ppm N-NO<sub>2</sub>). Esto llama la atención si se tiene en cuenta que la sensibilidad de este tipo de kits suele ir disminuyendo cuando las concentraciones del analito por examinar son menores. Un factor que puede haber incidido en la menor precisión del resultado con la mayor concentración de nitrito puede haber sido que para esa concentración fue necesario llevar a cabo una dilución de la muestra original ya que el disco no puede leer directamente tal concentración (su rango de lectura va de 0,0 a 0,5 ppm de N-NO<sub>2</sub>). Con este método, La dilución de las muestras es requerida con concentraciones superiores a 0,5 ppm y esto puede involucrar un factor de error adicional que afectaría el resultado. Por su parte, el coeficiente de variación obtenido para esta prueba cuando las dos soluciones de nitrito fueron sometidas a lectura por parte de 10 observadores diferentes usando el kit fue mayor para la concentración de 3,0 ppm (14,9) en comparación con la de 0,5 ppm (10,5). Esta dispersión en las lecturas se podría atribuir a que la escala de colores en el disco del kit no tiene una variación suficientemente definida para que el observador diferencie con precisión entre una lectura y la siguiente (Figura 1). Este caso es muy similar al de la prueba del amoniaco, como se discutirá posteriormente.



**Figura 1.** Discos utilizados para la lectura del punto final de las pruebas de pH, nitritos y amoníaco con el kit Fish Farming FF1A®. Se observa cómo la diferenciación de colores entre los valores de pH (disco superior) está mejor definida que en el caso de las concentraciones para los discos de nitrito (inferior izquierda) y amoníaco (inferior derecha).

Las imprecisiones en los resultados de los análisis de nitrito usando el kit de Hach podrían tener diferentes consecuencias si las aguas analizadas son usadas en especies muy resistentes o muy susceptibles a este metabolito. Un análisis de una muestra proveniente de una explotación comercial de tilapia (*Oreochromis* sp.) o cachama blanca (*Piaractus brachyomus*), cuyo resultado variara en 1 ppm con respecto a la concentración real del analito, posiblemente no representaría mayores riesgos para estas especies. En éstas se han reportado concentraciones letales (CL50) tan altas como  $16,2 \pm 2,3$  ppm N-NO<sub>2</sub> en el caso de la tilapia (6), y valores muy elevados (35, 50 y 65 ppm de N-NO<sub>2</sub>) como causantes de intoxicación aguda para el caso de la cachama blanca (7). Por su parte, en especies de peces gato y en trucha arcoiris se sabe de una gran susceptibilidad al nitrito. Por ejemplo, en bagre del canal (*Ictalurus punctatus*) se recomienda que las aguas se mantengan con una lectura de nitrito (N-NO<sub>2</sub>) inferior a 0,1 ppm para evitar efectos en la salud de los animales (2).

En nuestro medio, trabajando con una especie nativa de bagre conocida como barbilla (*Rhamdia sebae*), nuestro laboratorio reportó un caso en el que se dio una intoxicación aguda con nitrito a una concentración de 1 ppm de N-NO<sub>2</sub>. Por su parte, para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y otros salmónidos se han descrito intoxicaciones con concentraciones tan bajas como 0,5 ppm N-NO<sub>2</sub> (2).

Una imprecisión en el análisis de nitrito por la poca sensibilidad del kit podría ser definitiva para determinar la muerte por intoxicación aguda en especies muy susceptibles al nitrito como las que fueron mencionadas previamente.

### Análisis de amoníaco

El alto nivel de dispersión en las lecturas hechas para esta variable por diferentes observadores indica un mayor riesgo de encontrar lecturas erróneas y diferentes a la concentración real de este metabolito en las aguas analizadas. La misma consideración hecha para el kit de nitrito se aplicaría para el de amoníaco, ya que como se observa en la figura 1, la poca diferenciación de color entre los puntos de lectura del disco exige un mayor entrenamiento por parte del analista.

El amoníaco como metabolito intermedio del ciclo del nitrógeno en el agua es el que ofrece los menores rangos de tolerancia para la gran mayoría de especies acuícolas. A diferencia del nitrito, en donde se puede hablar de diferentes grados de resistencia entre las especies, para el NH<sub>3</sub> la situación es diferente. Para este metabolito nitrogenado se tiene como estimativo general que concentraciones tan bajas como 1 a 2 ppm son letales en un periodo de 1 a 4 días para la mayoría de peces (1). La dispersión encontrada en las lecturas cuando varios observadores obtuvieron el resultado de la concentración de NH<sub>3</sub> (15,3) hace pensar en que éste sería el análisis del kit de Hach

con mayores riesgos de obtener resultados erróneos y apartados de las concentraciones reales. Un inconveniente serio a nivel de campo es que métodos más sensibles para la cuantificación de amoníaco, como los electrodos selectivos que son más precisos y sensibles, son difíciles de implementar en las granjas por sus costos.

### **Análisis de pH**

La gran similitud entre los resultados obtenidos con el kit de Hach y el potenciómetro podría atribuirse a la mejor definición de la escala de colores en el disco del kit y su correspondencia con los valores de pH verdaderos. Puede apreciarse cómo dicha escala de colores está mucho mejor definida en el disco para esta variable que para el nitrato y el amoníaco (figura 1).

El rango óptimo de pH para las especies acuícolas está entre 6,5 y 9,0 según lo reportado por Swingle (9). Valores inferiores o superiores a este rango son causantes de estrés para los animales y de efectos sobre la concentración de otras variables físico-químicas, especialmente el amoníaco. Por esta razón, la medición del pH es de gran importancia como práctica de rutina en sistemas de producción acuícola. El disco del kit tiene una escala que va de 4,0 hasta 10,0, rango que incluye aquellos pH extremos cuya detección sería de gran importancia ya que ejercerían un efecto indeseable en los animales. La prueba con el kit de Hach es además de ejecución muy rápida ya que sólo requiere la adición de unas gotas de solución estándar a la muestra y luego hacer la comparación directa con la escala de color.

### **Análisis de oxígeno disuelto**

Las diferencias significativas encontradas en las lecturas de oxígeno disuelto con el kit y el oxímetro pueden atribuirse a diferentes razones. Los inconvenientes asociados al método que utiliza el kit pueden estribar en

que la cuantificación definitiva de oxígeno se hace a través de una titulación en la que cada gota de tiosulfato de sodio gastada en la misma representa 1 ppm de oxígeno disuelto. El método, sin embargo, no permite hacer lecturas con decimales, como sí es el caso de las lecturas obtenidas con el oxímetro. Otro aspecto que se debe tener en cuenta es que con el método del kit se deben ir agregando sucesivamente reactivos sobre la botella medidora que contiene la muestra para poder llevar a cabo las reacciones químicas necesarias. Durante este procedimiento, la superficie del agua entra en contacto con el oxígeno atmosférico y por difusión de éste puede alterarse la concentración original del mismo en la muestra (incremento sobre el valor real cuando se hizo el muestreo). Esto podría explicar que las lecturas obtenidas con el kit siempre estuvieron por encima de las registradas con el oxímetro.

### **CONCLUSIONES**

Los análisis de pH y nitrato tuvieron los mejores resultados con el kit en comparación con los métodos analíticos alternos usados para la presente evaluación. Sin embargo, para especies muy susceptibles, se debe tenerse un mayor cuidado con la interpretación de los resultados del mismo nitrato usando el kit.

Los resultados obtenidos al analizar el amoníaco con el kit de Hach podrían tener una gran variabilidad por la interpretación subjetiva que puede darse del punto final de lectura. Esta variable es quizás una de las más críticas por sus rangos tan estrechos de seguridad para las especies acuícolas.

Los valores de oxígeno disuelto obtenidos con el kit siempre estuvieron por encima de los registrados por el oxímetro YSI-55. El acuicultor deberá considerar esta variación teniendo en cuenta que a través del primer método sobrestimaría una concentración cuando en realidad un estanque podría estar



necesitando aireación suplementaria para mantener a los animales en condiciones ideales.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al profesor Miguel Ángel Landines y al Laboratorio de Ictiología de nuestra Facultad por facilitarnos los equipos que sirvieron para la comparación de algunos de los resultados obtenidos en este estudio.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Meade JW. Allowable ammonia for fish culture. *Prog Fish Cult.* 47:135:145, 1985.
2. Noga EJ. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment.* Mosby, St. Louis, Missouri, 1996.
3. Zweig RD, Morton JD, Stewart MM. Source water quality for aquaculture, a guide for assessment. The World Bank, Washington, D.C. Document no. 23764, 1999.
4. American Public Health Association (APHA). American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 17 th ed. Washington, D.C., 1992.
5. Hach Company. *Fish Farmer's Water Quality Test Kit Manual.* Test Kit Model FF-1A. Cat. No. 2430-02, 1999.
6. Palachek RM, Tomasso JR. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can J Fish Aquat Sci.* 41:1739-1744, 1984.
7. Ochoa DM, Peña LC, González JF. Waterborne nitrite exposure on white cachama, *Piaractus brachipomus*. *Rev Asoc Colomb Ictiol (Dahlia).* 5:27-31, 2002.
8. González JF, Higuera HE. Intoxicación por nitrito en barbillas (*Rhamdia sebae*): reporte de caso. Resumen en Memorias V Seminario Internacional de Acuicultura. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Noviembre 21-25, 2005.
9. Swingle HS. Relationship of pH of pond waters to their suitability for fish culture. *Proc Pacific Sci Cong.* 10:72-75, 1961.