

# INDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Salinidad.....	
2	
Oxígeno disuelto.....	
17	
Nutrientes minerales disueltos.....	
33	
Nutrientes amoniacales.....	
40	
Nutrientes nitrosos.....	
51	
Nutrientes nítricos.....	
56	
Fósforo minerales disueltos.....	
66	
Silicio disuelto reactivo.....	
73	
Fósforo orgánico disuelto.....	
85	
Materia en suspensión.....	
87	
Carbono orgánico particulado.....	
94	
Fósforo y nitrógeno orgánico particulado.....	100
Clorofila y pigmentos.....	103
Bibliografía.....	
114	

Los siguientes manuales han servidos de base para la elaboración de esta guía práctica de análisis de los diferentes elementos en el agua de mar:

STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. R. 1972. - A practical handbook of seawater analysis.

Bull. Fish. Res. Board Can. 167, 311 p.

GRASSHOFF, K., 1976. - Methods of seawater analysis. Verlag CEIME. 317 p.

AMINOT, A. ET CHAUSSEPIED, M. , 1983.- Manuel des analyses chimiques en el milieu marin.

Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO) . BND/DOCUMENTATION. 395 P.

PARSONS, T. R., MAITA, Y. & LALLI, C. M., 1984. - A manual of chemical and biological methods for seawater analysis.

Pergamon Press. 173 p.

Igualmente el lector encontrará al final de la presente guía algunas referencias bibliográficas de las cuales se hace mención en el texto.

**W. SENIOR**

Actualizándolo actualmente

## **MEDIDAS DE LA SALINIDAD**

La medida de la salinidad es importante en el estudio del medio marino. Por su influencia sobre la densidad del agua de mar, ella permite conocer la circulación oceánica, de identificar las masas de agua de orígenes diferentes y de seguir sus mezclas mar adentro así como en la costa o en los estuarios.

La << Salinidad >> representa la proporción de sales minerales disueltas en el agua de mar. Pero ella no es accesible directamente por un método de medida, así varias definiciones y relaciones han sido establecidas a fin de acercarse lo mejor.

Dos métodos esenciales son actualmente utilizados corrientemente para determinación de la salinidad: el “método volumétrico” y el “método conductimétrico”.

La determinación conductimétrica, con la ayuda de un salino metro de presión, ha sido el único método retenido por los oceanógrafos del mar Báltico, reunidos en Helsinki para la 7ª conferencia en mayo de 1970. Sin embargo, el material necesario es muy caro y no se justifica siempre en el estudio de las aguas costera y estuarinas donde la salinidad varía grandemente.

Cualquiera que sea el método utilizado, el es standardizado con el Agua de Mar Normal (Standard Sea-Water), preparada actualmente en el Instituto Oceanographic Sciences de Wormley en Gran Bretaña y que posee una clorinidad conocida a  $\pm 0,001$  %..

En los océanos la salinidad es vecina de 35%. (o gramos por kilogramos). Las cubetas de concentración o de dilución presentan salinidades muy diferentes, por ejemplo, el Mediterráneo: 38-39%., el mar Rojo: 36-47%., el Báltico: <15%., el mar Negro: 18-22%.

### 1.-DEFINICION Y RELACIONES

#### 1.1-DEFINICIONES

La primera definición de la salinidad ha sido establecida después de haber afinado una técnica que ofrece resultados reproducibles (Sorensen, 1902):

“La salinidad es la masa, en gramos, de las sustancias sólidas contenidas en un kilogramo de agua de mar, cuando los iones bromuro e ioduro son reemplazables por sus equivalentes de cloro, los carbonatos convertidos en óxidos y toda la materia orgánica oxidada.”

El símbolo utilizado para la salinidad es: S %. <<El Working Group on Symbols, Units and Nomenclature in Physical Oceanology>> de la Asociación Internacional para las ciencias Físicas del Océano ha recomendado que el símbolo “% “. Sea abandonado y reemplazado por  $10^{-3}$ . Así, se debería escribir  $S = 35,12 \times 10^{-3} = 0,3512$  ó  $S \times 10^{-3}$ . Esta escritura ha sido adoptada por la revista Deep-Sea Research desde 1981.

La aplicación de tal procedimiento no siendo posible en rutina, un método más simple ha debido ser establecido.

Desde 1884, Dittmar había establecido la existencia de una proporcionalidad entre los principales constituyentes de las sales del agua de mar. El análisis de un solo constituyente permite pues de determinar la salinidad. Representando ellos solos 55% de la masa de minerales disueltos, los iones cloruro tienen la ventaja de ser fácilmente analizados con precisión con el nitrato de plata (de hecho, se trata más exactamente de los halógenos  $\text{Cl}^- + \text{Br}^- + \text{I}^-$  de los cuales  $\text{Cl}^-$  representa 99,7%), Así ha sido establecida la definición de la clorinidad (Sorensen, 1902):

“La clorinidad es la masa, en gramo, de cloro, equivalente a la cantidad total de halógenos, en un kilogramo de agua de mar.”

El símbolo utilizado para clorinidad es; CL %.

Sin embargo, la determinación con el nitrato de plata liga el valor de la clorinidad de una misma agua de mar a las determinaciones sucesivas de las masas atómicas de la plata y del cloro. Para evitar este problema, Jacobsen and Knudsen (1940) han dado la definición siguiente de la clorinidad, todavía en vigor:

“El número dando la clorinidad en %. (Por mil) de un agua de mar es por definición idéntico al número dando la masa en gramos de plata pura necesariamente justo para precipitar los halógenos en 0,3285234 kilogramo de agua de mar.”

Se utiliza de otra parte la noción de la clorosidad, valor accesibles por análisis volumétrico: esta cantidad se define de manera similar a la clorinidad, exceptuando el hecho de que ella no se reporta a un kilogramo si no a un litro de agua de mar a la temperatura  $T$  °C.

El símbolo utilizado para la clorosidad es (Cl / l)

De ahí resulta la relación:

$$\text{Clorinidad} = (\text{Clorosidad a } t \text{ } ^\circ\text{C}) \times 1 / d_t$$

Donde  $d_t$ , es la densidad del agua de mar a la temperatura  $t$  °c.

## 1.2.-RELACIONES CLORINIDAD- SALINIDAD, SALINIDAD- CONDUCTIVIDAD

A partir de los trabajos de Sorensen (1902), la relación siguiente ha sido establecida y utilizada en el plano internacional hasta 1969:

$$S \% = 1,805 \text{ CL \%} + 0,030.$$

Desde 1969, a causa de la utilización de los métodos conductrimétricos, una nueva relación ha sido adoptada:

$$S \% = 1,80655 \text{ CL \%}.$$

Esta nueva expresión concuerda con la anciana para una salinidad de 35 %., La desviación es de 0,0026 %., a los niveles 32 y 38 %.

Paralelamente a esta definición <<QUIMICA >>, definición de la salinidad relativa a la <<CONDUCTIVIDAD DEL AGUA DE MAR >>, es recomendada:

$$S \% = -0,08996 + 28,29720 R_{15} + 12,80832 R_{15}^2 - 10,67869 R_{15}^3 + 5,98624 R_{15}^4 + 1,32311 R_{15}^5.$$

$R_{15}$  es la razón entre la conductividad del agua de mar analizada y la conductividad del agua de Mar Normal a 35 % de salinidad, las dos muestras estando a 15 °C y bajo la presión de 1 bar. A una temperatura  $t$  °c la razón es  $R_t$  (permitiendo de calcular S) según  $R_{15} + \wedge R$  con:

$$\Delta R = 10^{-5} R_t (R_t - 1) (t - 15) (96,7 - 72,0 R_t + 37,3 R_t^2 - (0,63 + 0,21 R_t^2) (t - 15))$$

Más recientemente, una nueva escala de salinidad relativa a la conductividad ha sido recomendada por la UNESCO. El patrón absoluto de conductividad es en lo sucesivo una solución de KCl a 32,4356 g/Kg. De solución en sustitución del agua de Mar normal a 35 %. Pero esta última queda como el patrón secundario utilizado para calibrar los métodos. Esta utilización es recomendada a partir del 1<sup>er</sup> de Enero de 1982 (UNESCO, 1981).

La relación ligando a la salinidad práctica y la razón de la conductividad  $R_t$  a la temperatura  $t$  °C, bajo la presión de una atmósfera normal, es:

$$S = a_0 + a_1 R_t^{0,5} + a_2 R_t + a_3 R_t^{1,5} + a_4 R_t^2 + a_5 R_t^{2,5} + (t - 15) / 1 + K (t - 15) (b_0 + b_1 R_t^{0,5} + b_2 R_t + b_3 R_t^{1,5} + b_4 R_t^2 + b_5 R_t^{2,5}).$$

Con:

. $a_0 = 0,0080$	$b_0 = 0,0005$	
. $a_1 = 0,1692$	$b_1 = 0,0056$	$k = 0,0162$
. $a_2 = 25,3851$	$b_2 = 0,0066$	
. $a_3 = 14,0941$	$b_3 = 0,0375$	$a_1 = 35,0000$
. $a_4 = 7,0261$	$b_4 = 0,0636$	
. $a_5 = 2,7081$	$b_5 = 0,0144$	$b_1 = 0,0000$

La relación se puede aplicar a la gama de salinidad 2 a 42 %. Para más información consulta Lewis and Perkin (1981)

La salinidad y la clorinidad se convierten en variables independientes y se puede constatar una ligera fluctuación de la razón  $S / Cl$  (anteriormente 1,80655).

La salinidad absoluta  $S_A$  (masa en gramos de materia disuelta por kilogramo de agua de mar) está ligada a la salinidad práctica por  $S_A = a + bS$  con, para el agua de Mar normal  $a = 0$  y  $b = 1,0049 \pm 0,0003$  (UNESCO, 1979).

## 2.- MUESTREO Y ALMACENAMIENTO

### 2. 1.- MUESTREO

Todas las botellas de muestreo corrientemente utilizadas convienen para la toma de muestras de aguas destinadas al análisis de la salinidad.

### 2. 2.- ALMACENAMIENTO

#### 2. 2. 1.- ENVASES

Es aconsejado la utilización de canetas de vidrio cerrado rápido con junta de caucho (Fig.1), de un volumen de 100 a 250 ml (los salinómetros necesitan más agua que los métodos químicos).

Si se utiliza otro tipo de envase, su sistema de cerrado debe responder a los criterios siguientes:

.Ser perfectamente herméticos

.Ser de concepción tal que ninguno deposito salino, debido a la evaporación del agua de mar a nivel de la tapa, no puede caer en el frasco en el momento de su abertura.

### **MATERIAL**

El vidrio debe ser utilizado para obtener una buena conservación de las muestras. El polietileno no es aconsejable en razón de su permeabilidad al vapor del agua.

### **MANTENIMIENTO**

Se debe asegurar siempre la buena hermeticidad de las tapas y cambiarlas si ellas están muy usadas o partidas. Después de su utilización, frasco y tapas son cuidadosamente lavados con agua destilada, escurridos y secados. En caso de depósito en las paredes de los envases, cepillarlos o lavarlos con mezcla sulfocrómica.

#### **2.2.2- LLENADO DE LOS ENVASES**

Tomar el agua directamente a la salida de la botella de muestreo lavando dos o tres veces

El envase con el agua a analizar. Llenar seguidamente dejando algunos mililitros de aire para prevenir toda dilatación ulterior.

### **3.- CONSERVACION**

Las muestras deben ser conservadas en la oscuridad, en posición vertical. Ellas no deben sufrir variaciones importantes de temperatura, lo que podría modificar la composición el medio por evaporación o congelación.

Ha sido demostrado que el agua conservada en ampollas selladas no sufre modificaciones significativas de su clorinidad durante un periodo de treinta años. En envases, la conservación no debe pasar de algunos meses, salvo si se puede asegurar una hermeticidad absoluta sellado la tapa con parafina. Los envases no deben ser abiertos sino al momento del análisis. Los análisis repetidos del mismo frasco deben ser realizados en el espacio de una hora, tapándolos inmediatamente después de cada toma de muestra.

### **4.-METODO VOLUMÉTRICO**

#### **4.1.-PRINCIPIO DEL METODO**

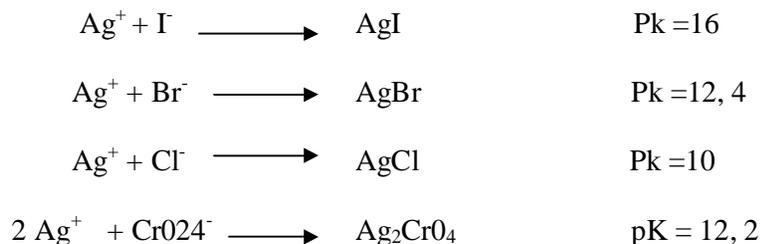
El método volumétrico de determinación de la clorinidad, afinado por Knudsen (método llamado de Mohr-Knudsen), permite obtener resultados con una gran precisión (= 0,01 %..). Para esto Knudsen utilizaba buretas y pipetas especiales (llamadas de Knudsen), pero de una gran fragilidad, de difícil mantenimiento, caras y actualmente difíciles de obtener. Condiciones particulares de limpieza y de manipulación deben además ser respetadas si se quiere conservar la precisión máxima.

El presente protocolo de una menor precisión, pero es muy satisfactorio en las aguas costeras y puede ser aplicado con el material corriente del laboratorio.

El principio de este método está basado en la precipitación de los halogenúros (Cl-, Br-, I-), del agua de mar, bajo la forma solución tituladora de nitrato de plata. El final de la titulación

se detecta gracias a un indicador, aquí el cromato de potasio, que reacciona con los iones  $\text{Ag}^+$  en exceso dando lugar a una coloración roja.

Las principales reacciones químicas son las siguientes:



Para facilitar los análisis en series, el modo operatorio descrito está concebido para que el número de mililitros leído en la bureta de titulación de directamente la clorosidad

#### 4.2.-DOMINIO DE APLICACIÓN

El método descrito aquí es recomendado cuando se desea un análisis rápido con una precisión de  $\pm 0,05$  a  $0,1\%$  de salinidad. El es utilizable en toda la gama de salinidad.

La precisión a nivel de  $30\%$  es de  $\pm 0,06 n^{-1/2}$  (nivel de confianza  $95\%$ ) para  $n$  medidas de la muestra.

En rutina, una doble titulación debe ser efectuada todas las cinco muestras: la desviación de las lecturas debe ser inferior a  $0,06$  ml de nitrato de plata.

#### 4.3.-MATERIAL.

Una pipeta automática de  $10$  ml y una de  $20$  a  $25$  ml a cero automáticos, o una bureta a pistón son recomendadas. Para evitar el engranaje de las llaves, se escogerán de preferencia llaves de teflón.

La titulación se efectúa en un beacker de  $200$  ml sobre fondo blanco y con agitación magnética.

Si la llaves (bureta) son en vidrio, lubricarlas con parafinas. No utilizar la grasa de silicona.

#### 4.4.-REACTIVOS

##### 4.4.1.-SOLUCIONES DE NITRATO DE PLATA $0,28$ mol / l

Disolver  $49$  g de nitrato de plata <<para análisis>> en el agua destilada y completar a  $1$  L. Conservarla en envase ámbar y a la oscuridad.

El titulo de esta solución es enseguida ajustado más precisamente por una ligera dilución, de tal manera que el número de mililitros añadidos en cada titulación corresponde a la clorosidad de la muestra.

##### 4.4.2.-INDICADOR DILUYENTE

Disolver  $3,5$  g de cromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_4$ ) en un litro de agua destilada.

##### 4.4.3.-AGUA DE MAR NORMAL

El agua de Mar Normal es vendida en ampollas selladas de  $250$  ml. Su clorosidad, de orden de  $19,38\%$ , es indicada sobre cada ampolla con una precisión de  $0,001\%$ .

#### **4.4.4.-PATRON SECUNDARIO.**

Para limitar el consumo de agua de Mar Normal, se puede preparar un patrón secundario a partir de un agua de mar de clorosidad superior a 18‰., almacenada durante una semana en el laboratorio, filtradas y estabilizadas con algunos cristales de “timol”. Esta agua se reparte sin pérdida de tiempo en los envases destinados al análisis de la salinidad.

Un envase por cada 10 es objeto de un doble análisis con nitrato de plata calibrado con agua de Mar Normal. El valor medio de los análisis de 10 envases (o más) permite de obtener la clorosidad a 20 °C del patrón secundario.

### **4.5.-MODO DE OPERACIÓN**

#### **4.5.1.-PRECAUCIONES PRELIMINARES**

Depósitos salinos pueden formarse a nivel de la rosca o de la junta de caucho. Para evitar riesgo de caída de los cristales en el envase durante su apertura, se eliminan con un lavado rápido con agua destilada. Esta operación puede ser hecha sistemáticamente desde el regreso al laboratorio, o a más tardar el día antes del análisis, a fin de asegurarse del secado completo de la tapa antes de abrir el envase.

Las muestras y la solución titulante deben ser colocadas en el laboratorio varias horas antes del análisis para que se estabilicen a la misma temperatura.

#### **4.5.2.-ANALISIS**

Efectuar la titulación con el nitrato de plata de la manera siguiente:

Introducir 10 ml de agua de mar a analizar en un beacker de 200 ml.

Añadir 15 ml del indicador diluyente.

Poner bajo agitación magnética rápida, sin proyección.

Dejar caer rápidamente el nitrato de plata hasta aproximadamente 1 ml del punto de equivalencia.

Lavar las paredes del beacker con un poco de agua destilada.

Continuar la titulación lentamente: el precipitado rojo formado por adición del nitrato de plata, al principio localizado, comienza a extenderse a todo el volumen cuando se aproxima el punto de equivalencia; el punto de equivalencia es alcanzado cuando el contenido del beacker, después de pasar de un amarillo-verde pálido al amarillo puro, se pone definitivamente rojo pálido.

Esperar de 20 a 30 s manteniendo la agitación para asegurarse que se ha alcanzado el punto de equivalencia; iones  $\text{Cl}^-$  pueden quedar atrapados en el precipitado y difundir lentamente: si el color amarillo reaparece, terminar la titulación por adición de pequeñas cantidades de nitrato de plata.

Anotar el v volumen añadido, V, si es posible a  $\pm 0,01$  ml.

Anotar el volumen las temperaturas de la muestra ( $t_{\text{cl}}$ ) y del nitrato de plata ( $t_{\text{ag}}$ ). Es siempre preferible tener  $t_{\text{ag}} \geq t_{\text{cl}}$  con  $t_{\text{ag}} - t_{\text{cl}} \leq 5$  °C.

### **4.6.-CALCULO DE LA CLOROSIDAD Y DE LA SALINIDAD**

#### **4.6.1.-CLOROSIDAD**

El cálculo de la clorosidad a 20 °C se efectúa según la expresión siguiente:

$(\text{Cl} / 1)_{20} = V + C_a + C_t + C_E$  con:

- .V : volumen en mililitros de nitrato de plata añadidos,
- .C<sub>B</sub> : corrección de la bureta (calibración por el fabricante o por el utilizador),
- .C<sub>t</sub> : corrección de la temperatura según la tabla I (despreciable si t<sub>Ag</sub> - t<sub>c1</sub> < 3°C y V < 15 ml),
- .C<sub>E</sub>: corrección de la calibración del nitrato de plata.

#### 4.6.2.-SALINIDAD

La salinidad es determinada a partir de la clorosidad utilizando la tabla II

Puede ser ventajoso calcular la salinidad a partir de la clorosidad sin dirigirse a la tabla. La salinidad está ligada a la clorosidad por la relación:

$$S \% = 1,80655 (Cl / 1)_{20} \times 1 / d_{20}$$

. d<sub>20</sub> es la densidad del agua de mar a 20 °C para la clorosidad (Cl/1)<sub>20</sub>. Si se admite por aproximación que la relación densidad-salinidad es lineal, la salinidad se obtiene según:

$$S \% = [436043 + 2389,87 (Cl / 1)_{20}]^{1/2} - 660,334$$

Esta relación proporciona los mismos resultados que las tablas oceanográficas Internacionales con una precisión de ± 0,01 % de salinidad.

#### 4.7.-CALIBRACION DEL NITRATO DE PLATA

##### 4.7.1.-AJUSTE DEL TITULO DEL NITRATO DE PLATA

El título del nitrato de plata debe ser ajustado antes de comenzar toda serie de análisis y al menos una vez por día.

Esta práctica, facilitando los análisis en serie, está destinada a hacer que el número de mililitros de nitrato de plata consumido por una muestra sea aproximadamente igual al número que expresa la clorosidad de esa muestra.

Se efectúa primeramente un análisis del agua de mar patrón (Agua de Mar Normal o Patrón Secundario) según el modo operatorio descrito previamente.

Después, la solución titulante de nitrato de plata es ajustada por dilución con la ayuda de pequeñas cantidades de agua destilada de manera de que el volumen consumido por la titulación del agua de mar patrón (llamado volumen corregido) corresponda a la clorosidad de esta última. El volumen corregido V es dado por  $v = V + C_B + C_t$  (V, C<sub>B</sub>, C<sub>t</sub> definidos anteriormente). Este ajuste de la correspondencia entre la clorosidad y v se efectúa a ± 0,1 ml.

Se calcula la clorosidad a 20 °C del agua de mar patrón (Cl / 1) E20 según:

$$(Cl / 1)_{20}^E = Cl \% d_{20}$$

Se determina d<sub>20</sub> con la ayuda de la tabla III; para el agua de Mar Normal, la cual presenta una clorosidad de aproximadamente 19,38 % d<sub>20</sub> es aproximadamente 1,0248.

La concentración del nitrato de plata estando ajustada, hacer 5 análisis cuyos resultados deben estar comprendidos en una playa de 0,06 ml. La media del volumen ajustado, v<sub>a</sub>.

##### 4.7.2.-CALCULO DE LA CORRECCION DE LA CALIBRACION C<sub>E</sub> DEL NITRATO DE PLATA

La corrección de la calibración  $C_E$  está destinada a corregir la pequeña diferencia que existe después del ajuste entre la clorinidad del patrón  $(Cl / l)_{20}^E$  y el volumen ajustado  $V_a$ .

El cálculo de  $C_E$  para cada muestra se obtiene utilizando la relación algebraica siguiente:

$$C_E = (Cl / l)_{20}^E - V_a / V_a \times V$$

Con:

$(Cl / l)_{20}^E$  : Clorinidad del agua de mar patrón a 20 °C.

$V_a$  : Volumen medio de nitrato de plata determinado por calibración.

$V$  : Volumen de nitrato de plata añadido para analizar la muestra.

La corrección  $C_E$  es redondeada a  $\pm 0,01$  ml.

## 5.1.- METODO CONDUCTIMETRICO

### 5.1.-PRINCIPIO DEL METODO.

Después de los años 50, este método ha comenzado a generalizarse a pesar del costo relativamente elevado de los salinómetros de precisión. El es hoy en día práctica corriente en razón de su rapidez y de su facilidad aliadas a su precisión. Después de 1969 la salinidad es definida oficialmente en términos de conductividad.

La <<Conductividad>> del agua de mar es aseguradas por los iones presentes. Por el hecho de la proporcionalidad de las Dittmar la conductividad permite determinar la salinidad con una grande precisión.

Dos tipos de salinómetros están generalizados:

**El <<Salinómetro>> electrodo en contacto directo con el agua de mar contenida en una celda inmersa en un baño termostático,**

**El <<Salinómetro a inducción>> con compensación electrónica de temperatura sobre una playa de algunos grados.**

Existe actualmente salinómetros de electrodos muy precisos para los cuales el problema del enmugrecimiento de los electrodos ha sido resuelto y cuyo baño termostático es regulado a  $\pm 0,001$  °C (la conductividad variando de más de 2% por grado, esta precisión es necesaria para obtener  $\pm 0,001\%$  de salinidad).

En los salinómetros de inducción, un transformador  $T_1$  alimentado por un oscilador de frecuencia elevada (10KHz) crea un campo eléctrico inducido en un anillo de agua de mar (fig. 2). La corriente inducida crea a su vez en los bornes del transformador  $T_2$  una tensión que se amplifica y se detecta. Por el circuito eléctrico que une  $T_2$  a  $T_1$ , se crea una contra corriente la tensión inducida, de donde se deduce la conductividad del agua de mar. La resistencia  $R_T$  compensa los efectos de temperatura a  $\pm 2-3$  °C. Estos aparatos, de pequeños tamaños, son fácilmente transportables.

## 5.2.-DOMINIO DE APLICACIÓN

Los salinómetros pueden ser utilizados en casi todas la gama de salinidad (2-40%.)

La precisión depende de los instrumentos, de su calibración, de las condiciones de utilización.

Para los salinómetros s inducción, los fabricantes garantizan una precisión de  $\pm 0,003$  % de salinidad. Para los salinómetros con baños termostatazo, ella puede llegar hasta  $\pm 0,001$ % se trata de la reproductibilidad de un mismo aparato.

### **5.3.-MODO DE OPERACIÓN**

Reportarse al manual de utilización del aparato para todo lo concerniente a su manipulación propiamente dicha.

#### **5.3.1.-PRECAUCIONES PRELIMINARES.**

Además de las precauciones descritas anteriormente, es bueno eliminar los gases de las muestras 1 a 2 horas antes de su análisis. Para esto, agitar fuertemente las muestras y abrirlas rápidamente.

#### **5.3.2.-CALIBRACION**

La calibración es realizada con el Agua de Mar Normal. Se evitará de transferir el Agua de Mar Normal la cual debe ser aspirada directamente en la ampolla de origen. Se procede de la manera siguiente:

**Lavar la celda dos veces con el agua de Mar Normal de una ampolla que haya sido comenzada o con un agua de mar de salinidad idéntica conservada para este uso.**

**Lavar de nuevo dos veces con el Agua de Mar Normal de una ampolla recientemente abierta.**

**Llenar la celda con esta misma agua evitando la introducción o la formación de burbujas (si no vaciar la celda y volverla a llenar).**

**Poner el agitador en marcha.**

**Ajustar los potenciómetros de calibración para que el valor leído sobre el aparato corresponda a la razón de conductividad del Agua de Mar Normal (una lectura inestable puede tener por origen la presencia de micro burbujas). Este ajuste no será cambiado durante la serie de medidas.**

**Renovar el agua de la celda y realizar una medida de control.**

**Anotar la hora (aparato susceptible de derivar).**

**Anotar la temperatura del patrón.**

**Hacer dos medidas del patrón secundario si se desea limitar el consumo se Agua de Mar Normal. Una muestra del patrón secundario será analizada cada 10 análisis aproximadamente.**

**Anotar la hora y la temperatura a cada lectura.**

#### **5.3.3.-ANALISIS DE LA MUESTRAS**

**Lavar dos veces la celda con la muestra. A cada lavado, poner el agitador en marcha durante unos momentos para obtener una mejor eficiencia; parar el agitador, vaciar y llenar de nuevo la celda.**

**Llenar por tercera vez la celda para efectuar la medida asegurándose que no quedan burbujas.**

**Anotar la temperatura de la muestra verificando que ella este en la gama de compensación del aparato (en el caso de los salinómetros a inducción)**

**Hacer la lectura de la razón de la conductividad.**

**Anotar la hora para cada muestra.**

Si se desea obtener una precisión máxima sin efectuar un número de lavado excesivo, se debe evitar pasar de seguido muestras cuya salinidad sean diferentes de más de 1 a 2 %. En la medida de lo posible, se analizarán las muestras en el orden presumido de aumento o disminución de sus salinidades o por grupo de muestras de salinidades vecinas. Si no, en caso de diferencias notables de salinidades, lavados suplementarios de la celda son necesarios.

#### **5.4.-CORRECCION, CALCULO DE LA SALINIDAD.**

Una corrección debe ser aplicada a las razones de conductividades dadas por el aparato: La corrección de deriva. Esta es estimada con la ayuda de patrones pasados a intervalos regulares. Se deduce la deriva durante el intervalo de tiempo considerado y se lleva a todas las muestras intermediarias redondeando a la última cifra significativa.

La razón de conductividad así corregida de la deriva es la razón  $R_t$  medida a la temperatura.

Conociendo  $R_t$ , se deduce la salinidad según las relaciones dadas anteriormente. Se utiliza de preferencia la relación más reciente; es recomendado precisar la referencia de la formula utilizada.

## ANÁLISIS DEL OXÍGENO DISUELTO

El oxígeno molecular disuelto es un parámetro importante del medio que gobierna la mayoría de los procesos biológicos de los ecosistemas acuáticos.

La concentración de oxígeno disuelto es la resultante de los factores físicos, químicos y biológicos siguientes:

- .- Intercambios a la interfase aire-océano,
- .- Difusión y mezcla en el seno de la masa de agua,
- .- Utilización en los fenómenos de foto-oxidación
- .- Utilización en las reacciones de oxidación química,
  - .- Utilización por los organismos acuáticos para la respiración (lo que incluye en largo sentido la degradación bacteriana de la materia orgánica) y para la nitrificación,
- .- Producción in situ por fotosíntesis.

Muy seguido tan importante como la concentración, el porcentaje de oxígeno en comparación con la saturación es un elemento necesario al estudio de un sistema acuático. La disolución del oxígeno en el agua es en efecto regida por las leyes físicas y depende de la presión atmosférica, de la presión de vapor saturante, de la temperatura del agua y de la salinidad.

Todo procedimiento exclusivamente mecánico de intercambio agua-atmósfera, tal que el efecto del viento o de la ola, tiende a llevar al agua a su nivel de saturación en oxígeno, que el agua se encuentre inicialmente en sub-saturación o en súper-saturación. Los estados de sub-saturación y de súper-saturación no pueden pues ser inducidos que por los fenómenos físico-químicos, químicos y biológicos citados anteriormente, y estos últimos no son perfectamente estudiados si no por el conocimiento del nivel de saturación.

La solubilidad del oxígeno es de 9 mg/l en el agua pura a 20 °C. El aumento de la salinidad reduce la solubilidad a 7,4 mg/l a 20 °C y para una salinidad de 35‰.

Son los procesos biológicos los que tienen generalmente una influencia preponderante sobre las concentraciones del oxígeno. Así, en los estuarios, zonas de acumulación de los detritos carbonados en descomposición pueden llegar a ser completamente anóxicas; la nitrificación del nitrógeno amoniacal es igualmente una fuente importante de falta de oxígeno. De otra parte, en zonas eutróficas, los crecimientos importantes de fitoplancton pueden provocar súper-saturaciones alcanzando 150-200 %.

### 1.-PRINCIPIO DEL METODO

#### 1.1.-PRESENTACION

A pesar del desarrollo de los electrodos para el análisis del oxígeno disuelto, el método químico clásico es todavía el método de referencia para el análisis del oxígeno disuelto. Se trata del método de WINKLER, que ha sido optimizado por Carpenter (1965) y Carritt and Carpenter (1966). Adoptado bajo esta forma por los oceanógrafos del mar Báltico, el es igualmente preconizado por la FAO (1975) y utilizado en la mayoría de los laboratorios.

#### 1.2.-REACCIONES QUÍMICAS.

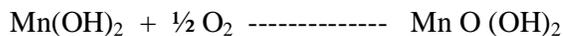
Se añade agua a analizar una solución de permanganato (II) el cual precipita por la presencia de una base fuerte.



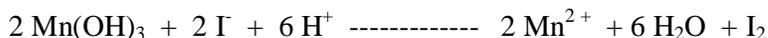
Por una reacción en medio heterogéneo, el oxígeno disuelto es fijado por el precipitado haciendo pasar el manganeso a grados de oxidación más elevados (III x IV):



y:



En lo que el oxígeno es totalmente fijado, el medio es acidificado: el precipitado se disuelve y el manganeso vuelve a su grado de oxidación II oxidando al estado de yodo los iones ioduro, que habían sido previamente introducidos en solución junto con la base fuerte:



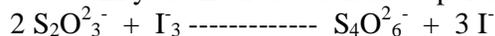
y:



En presencia del exceso de ioduro se establece el equilibrio:



El yodo liberado es titulado por el tiosulfato:



Se constata que son necesarios 2 moles de tiosulfato para titular un mol de yodo, él mismo liberado por  $\frac{1}{2}$  mol de oxígeno.

En total, 4 moles de tiosulfato equivalen pues a 1 mol de oxígeno disuelto.

El punto equivalente de la titulación del yodo con el tiosulfato es puesto en evidencia por métodos electroquímicos o fotométricos, o por indicadores (almidón, tiodeno). Si la detección visual por los indicadores coloreados no es tan sensible como en el caso de los otros métodos, ella es sin embargo muy buena y suficiente para el método descrito.

Además de los riesgos de modificación de las concentraciones durante la toma de la muestra, diferentes fuentes de error provienen de la técnica de análisis misma o de interferencias entre las cuales la principal es debida a lo iones nitrito. Sin embargo la mayoría de esos errores son llevados a proporciones despreciables, utilizando los reactivos a las concentraciones óptimas, y respetando un cierto número de reglas simples.

## 2.- DOMINIO DE APLICACIÓN

### 2.1.-GAMA DE CONCENTRACIONES

Según Srickland and Parsons (1972), este método es aplicable en un dominio de concentración muy extendido: 0,005 a 8 mili moles de oxígeno atómico por litro (sea 0,06 a 90 ml/l).

### 2.2.-PRECISION

En razón de los riesgos de error durante la toma de las muestras, es difícil de estimar la exactitud real de las medidas. Sin embargo practicando este método con un máximo de precauciones, Carpenter (1965) y Murria and Riley (1969) han obtenido una precisión de  $\pm 0,1\%$ , lo que demuestra las posibilidades intrínsecas de este análisis.

En rutina la precisión corriente que se puede alcanzar sin dificultad es del orden de  $\pm 0,03$  ml/l.

$\pm 0,035$  ml/l (Strickland and Parsons, 1972, a nivel de 8 ml/l,

$\pm 0,02$  a  $\pm 0,04$  ml/l (Grasshoff, 1976)

Los resultados de las ínter calibraciones realiza después de 1966 en el mar del Norte por los laboratorios de los países libéranos muestran que las desviaciones tipos intra laboratorios son en la mayoría inferiores a  $\pm 0,05$  ml /l. Al contrario, aparecen desviaciones Inter.-laboratorios más importantes que demuestran que una de las principales fuentes de error es la calibración del tiosulfato (Carritt and Carpenter, 1966).

### **2.3.-INTERFERENCIAS**

El método descrito no es adaptado al análisis de las aguas fuertemente contaminadas. Toda sustancia oxidante o reductora, presente en el agua a analizar, tal que hierro, sulfito ,tiosulfato, cloro, hipoclorito,cromato,nitrito,provocara resultados falsos por exceso para los oxidante o por defecto para los reductores. Las sustancias orgánicas, taninas, linginas, ácidos humitos,...susceptibles de fijar el yodo, interfieren igualmente así como las sustancias oxidables en medio básicas. Este caso se encuentra más frecuentemente en las aguas dulces y a veces en los estuarios cerca de los emisarios.

Algunas modificaciones del método de WINKLER han sido aportadas para permitir el análisis del oxígeno disuelto en las aguas que contienen contaminantes particulares. Una revista de esas técnicas ha sido efectuada por Legler <1972>: esta última estima que varias de las modificaciones no aportan un mejoramiento, siendo más largas e introduciendo nuevas fuentes de errores. Por otro lado, algunas modificaciones no son aplicables al agua de mar.

## **3.-TOMA DE LA MUESTRA Y ALMACENAMIENTO**

### **3.1-TOMA DE LA MUESTRA**

La muestra no debe ser tomada con la ayuda de botellas metálicas. Las botellas de muestreo clásicas en materia plástica o en vidrio convienen.

### **3.2-ALMACENAMIENTO.**

#### **3.2.1-ENVASES**

Los frascos ordinarios de vidrio blanco con esmerilado convienen perfectamente. Las tapas a base cónica o tallada evitan el riesgo de dejar burbujas de aire atrapadas. El esmerilado no debe en ningún caso ser engrasado. Se evitara la utilización de los frascos marrones o ámbar: su coloración esconde la del yodo e impide distinguir entre el precipitado y las partículas en las aguas turbias.

La capacidad recomendada es de 100 a 150 ml. Un volumen superior no es necesario puesto que el análisis debe ser efectuado en el mismo frasco. Para permitir la adición del titulante, puede ser necesario evacuar una parte del volumen, sea por pipetaje, sea utilizando un gran tapón el cual se inmerge en la solución <Fig.2>. El volumen analizado, debe ser conocido con precisión.

El mantenimiento de los frascos y tapas consiste en un lavado correcto con agua destilada: no debe quedar trazas de Mn (II). Dejarlos escurrir a fin de que se encuentren casi secos, y deben guardarse tapados.

### 3.2.2.-DETERMINACION DEL VOLUMEN DE LOS FRASCOS

Los volúmenes son obtenidos por pesada de la manera siguiente:

- Numerar cada frasco así como su tapa.
- Lavar perfectamente frascos y tapas y secarlos en la estufa (100°C), dejarlos enfriar a la temperatura del laboratorio.
- Pesar cada uno de los frascos con sus respectivas tapas a  $\pm 0,05$  g, sea P<sup>1</sup> este peso en gramo.
- Llenar los frascos con agua destiladas y taparlos sin dejar burbujas de aire, secarlos perfectamente, en particular a nivel de la tapa, con un papel absorbente sin pelusas.
- Pesar de nuevo los frascos llenos a  $\pm 0,05$  g: sea P<sup>2</sup> este peso en gramo.
- Anotar la temperatura del agua destilada en los frascos.
- Calcular el volumen según la relación :

$$V (\text{ml}) = P_2 - P_1 / d_t$$

- $d_t$  es la masa volúmica del agua destilada a la temperatura  $t$  °c, o sea :

T °C	$d_t$ (g / cm <sup>3</sup> )
15	0,99913
18	0,99862
20	0,99823
25	0,99707

### 3.2.3.-TECNICA DE MUESTREO

Las muestras para el análisis del oxígeno deben ser sustraídas de la botella de muestreo lo más rápido posible después de que las botellas estén a bordo y antes de cualquier otra muestra.

Fuente de error importante, la toma de la muestra debe ser efectuada con el más grande cuidado por la técnica descrita más adelante y evitando el chapoteo con el aire.

Para esto se le adapta a la botella de muestreo un tubo transparente de goma que se inmerge hasta el fondo del frasco (fig.1); su diámetro interior no debe exceder 4mm para que no se vacíe en lo que la salida del agua es interrumpida.

Es inútil lavar los frascos si estos están completamente secos.

**Purgar el tubo de goma a fin de que no quede ninguna burbuja de aire.**

**Introducirlo hasta el fondo del frasco.**

**Dejar salir el agua, al principio con un débito lento (control con la ayuda de una pinza de mohr o con una llave), después dejar salir el agua más rápidamente sin provocar jamás fuertes turbulencias y manteniendo siempre la llegada del agua a nivel del fondo.**

**Dejar rebosar al menos una vez el volumen del frasco.**

**Sin parar la salida del agua, remontar lentamente la goma hasta que su extremidad sea a 1 cm de las superficies del agua.**

**Parar la salida del agua y retirar la goma del frasco.**

**Añadir inmediatamente los reactivos 1 y 2 (ver más adelante); estos son introducidos bajos la superficies para evitar el burbujeo.**

**Tapar los frascos sin dejar aire en el interior y agitarlos para dispersar el precipitado.**

#### 4.- CONSERVACION

Si, excepcionalmente, los reactivos 1 y 2 no pueden ser añadidos al momento de la toma de la muestra, no se debe jamás dejar pasar más de una hora antes de añadirlos a las muestras. Estas últimas deben ser mantenidas al abrigo de la luz y en un lugar fresco.

Después de la adición de los reactivos, el oxígeno estando fijado, las muestras se conservan al menos un día. Las muestras pobres en materia orgánica pueden ser conservadas más tiempo a condición de que no exista ninguna entrada de aire en los frascos. Para estos hay que evitar el secado del esmerilado y las variaciones de la temperatura. El método preconizado para una conservación superior a 24 horas consiste a inmergir completamente los frascos bajo el agua. El tiempo de conservación es entonces de un mes.

Las muestras acidificadas no deben ser jamás conservadas; ellas deben ser colocadas en la oscuridad y analizadas en la hora que sigue la acidificación.

#### 5.- EQUIPOS

Los reactivos son añadidos preferencialmente con la ayuda de distribuidores automáticos de reactivos. Para el trabajo en el mar ese material es indispensable.

Para el análisis, una bureta de cero automáticos de 25 ml graduada al menor por 0,05 ml, o mejor, una bureta a pistón se revela muy útil y mejora la precisión. La agitación se efectuará con agitador magnético con velocidad regulable.

#### 6.-REACTIVOS

Utilizar en todo los casos productos químicos de pureza garantizadas<<para análisis>>

##### 6.1.-REACTIVOS 1: SOLUCION DE Mn (II) 3 mol / l

Para preparar un litro de solución disolver en el agua destilada 600 g de  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$  (ó 670 g de  $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$  ó 560 g de  $MnSO_4 \cdot 2 H_2O$  ó 510g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ).

Esos productos deben estar libres de Mn (III) y (IV): por esta razón, el cloruro será preferibles al sulfato; él es igualmente más solubles.

Conservar éste reactivo a la temperatura ambiente.

Este reactivo es utilizado a razón de 6 ml por litro de agua a analizar.

##### 6.2.- REACTIVO 2: SOLUCION BASICA DE IODURO ( $OH^-$ : 8 mol / l; $I^-$ : 4 mol / l )

**Disolver 320 g de soda NaOH en el mínimo de agua destilada (aproximadamente 300 ml).**

**Disolver calentando 600 g de ioduro de sodio (y no de potasio NaI en el mínimo de agua destilada (aproximadamente 300 ml )**

**Mezclar esas dos soluciones y completar a un litro; vista la fuerte concentración de esos reactivos ellos no se ponen claros sino después de esta operación. En caso de cristalización, dejar decantar y tomar el sobrenado.**

Conservar el reactivo a la temperatura ambiente.

Este reactivo es utilizado a razón de 6 ml por litro de agua a analizar.

### **6.3.- ACIDO SULFURICO (H- : 10 mol / l)**

En el agua destilada diluir 280 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $d = 1,84$ ) a 1 L.

Este reactivo se utiliza a razón de 6 ml por litro de agua a analizar.

### **6.4.- INDICADOR: SOLUCION DE ALMIDON**

El indicador puede ser preparado de diversas maneras; los dos modos operatorios propuestos tienen la ventaja de la simplicidad.

Almidón al 1 % en el agua: disuelve 1 g de almidón soluble en 100 ml de agua destilada calentando hasta que desaparezca la turbidez; añadir algunas gotas de cloroformo y conservarlo en el refrigerador. Esta solución se conserva durante dos semanas; renovarla después de ese tiempo o si el cambio de coloración no da un azul puro.

Este reactivo es utilizado en razón de 1 ml por aproximadamente 100 ml de muestra.

Almidón al 3 % en el glicerol: añadir 3 g de almidón soluble a 100 ml de glicerol y calentar a 190 °C. Esta solución se conserva más de un año a la temperatura ambiente; la aparición de una turbidez no modifica la eficacia del indicador.

Este reactivo es utilizado a razón de algunas gotas por ml de muestra.

### **6.5.- SOLUCION DE TIOSULFATO (NORAMLIDAD: (0, 01)**

Disolver 2,48 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en 1 L de agua destilada.

Conservar a la temperatura ambiente. Esta solución es inestable: su dosificación exacta debe imperativamente ser determinada con precisión antes de cada serie de análisis, y al menos una vez por día, por referencia al iodato de potasio.

### **6.6.- SOLUCION PATRON DE IODATO DE POTASIO (NORMALIDAD: 0,0100)**

El iodato de potasio  $\text{KIO}_3$  y el hidrógenodiodato  $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ . Son reconocidos en el plano internacional como patrones primarios para determinar la concentración exacta del tiosulfato. No se debe utilizar el bicromato de potasio.

Secar a 105 °C durante una hora el  $\text{KIO}_3$  de pureza analítica; dejar enfriar en el desecador y pesar exactamente 0,3567 g. Disolver en el agua destilada y completar a un litro. ATENCION: la disolución no se efectúa si no lentamente. Esta solución es estable indefinidamente a condición de evitar toda evaporación.

## **7.- MODO DE OPERACIÓN**

### **7.1.- PROCESO GENERAL**

#### **7.1.1.- FIJACION DEL OXIGENO**

**En lo que el frasco ha sido llenado según la técnica descrita anteriormente, añadir inmediatamente, sucesivamente o simultáneamente, una dosis de los reactivos 1 y 2**

profundamente bajo la superficie, a razón de 6 ml de cada uno por litro de muestra (ver más abajo).

**Tapar rápidamente los frascos sin dejar aire en su interior.**

**Agitar aproximadamente durante un minuto para dispersar uniformemente el precipitado.**

**Dejar que el precipitado se acumule en los 2/3 inferiores del frasco y repetir la agitación.**

**Las muestras puede ser conservada (ver anteriormente) o dejadas en decantación para analizarlas inmediatamente.**

### 7.1.2.- ANALISIS

**Una vez el precipitado acumulado en la mitad interior del frasco, evitar que se meta en suspensión y añadir el reactivo 3 (una dosis igual a la del reactivo 2: 6 ml por litro de muestra).**

**Tapar inmediatamente el frasco evitando de dejar aire en su interior y agitar hasta la disolución completa del precipitado. Si esta no se realiza en 5 minutos; es necesario entonces de añadir una cantidad suplementaria de ácido.**

**Colocar el frasco al abrigo de la luz y efectuar el análisis lo más tarde una hora después de la acificación, luego muy rápidamente después de la abertura del frasco.**

**Botar, si es necesario para permitir la adición del titulante, un cierto volumen de solución. La titulación es efectuada directamente en el frasco, respetando las condiciones siguientes:**

\*Añadir si posible 8 a 9 1/10 del volumen de tiosulfato sin agitar o con una agitación moderada.

\*Continuar la titulación bajo agitación lenta hasta obtener una coloración amarilla pálida.

\*Añadir el almidón: 1 ml al 1% en el agua o algunas gotas al 3% en el glicerol. El almidón no debe añadirse desde el comienzo de la titulación.

\*Terminar bajo una agitación más rápida añadiendo el tiosulfato por pequeñas fracciones hasta la decoloración completa del almidón persistiendo 20 s. Proceder rápidamente pero esperando la homogenización después de cada ajuste. No se tendrá en consideración una recoloración lenta después del punto equivalente debida a la oxidación del  $I^-$  con el aire.

#### • REMARQUES

Un tiempo de tres minutos debe ser un máximo para efectuar la operación de titulación propiamente dicha.

La observación del punto equivalente es mejorada por un análisis bajo la luz de intensidad moderada y por la observación casi vertical de la solución titulada colocada bajo fondo blanco.

#### 7.1.3.-DOSIS DE LOS REACTIVOS

Frasco (ml)	50	60	100	125	150	200	250	300
-------------	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Dosis (ml)	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9	1,2	1,5	1,8
------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

### 7.2.- CALIBRACION DEL TIOSULFATO

Este procedimiento es propuesto por Carrit and Carpenter (1966).

Al menos tres titulaciones del patrón son efectuadas antes de cada serie de análisis o una vez por día. Se toma la media de los volúmenes de tiosulfato, sea  $VT_{\text{patr}}$ .

\*Introducir con una pipeta, en un recipiente limpio, exactamente un mililitro (1,00) de la solución de  $KIO_3$  0,0100 normal.

\*Añadir aproximadamente 100 ml de agua destilada.

\*Añadir una dosis del reactivo 3 (6ml/l) y homogeneizar.

\*Añadir una dosis del reactivo 2 (6ml/l) mezclar.

\*Titular, sin esperar, como en el caso de una muestra.

### 7.3.- DETERMINACION DE LOS BLANCOS DE LOS REACTIVOS.

Impurezas oxidantes o reductoras pueden estar presentes en los reactivos, un control debe ser efectuado como mínimo una vez por cada lote de reactivos 1 y 2 frescamente preparados. Este se realizará de tiempo en tiempo para asegurarse de la ausencia de contaminación accidental. El procedimiento que se describe es uno de los más rigurosos (Carrit and Carpenter, 1966); el permite de terminar los blancos positivos o negativos.

El blanco de la muestra es determinado de la manera siguiente:

Introducir con una pipeta exactamente 1,00 ml de la solución de  $KIO_3$  0,0100 normal.

Añadir aproximadamente 100 ml de agua destilada.

Añadir una dosis del reactivo 3 (6ml/l) y mezclar

Añadir una dosis del reactivo 2 (6ml/l) y mezclar perfectamente

Añadir una dosis del reactivo 1 (6ml/l).

Titular rápidamente con el tiosulfato parando la titulación exactamente en el punto de equivalencia: sea  $V_1$ : el volumen.

Añadir de nuevo 1,00 ml de la solución de  $KIO_3$

Titular rápidamente con el tiosulfato: sea  $V_2$  éste volumen.

El blanco de análisis es  $B_{\text{muest.}} = v_1 - v_2$

El blanco de calibración puede ser diferente al blanco del análisis puesto que la calibración es efectuada sin reactivo 1; realizar el blanco de calibración como descrito aquí arriba ,pero sin reactivo 1: sea  $b_{\text{cal}}$ , el blanco de calibración.

### REMARQUES.

\*No debe existir ninguna traza de yodo durante la adición del reactivo 2 (NaI – NaOH).

\*Con buenos reactivos, los blancos son despreciables. Si ellos pasan el equivalente de 0,1 ml/l de oxígeno, renovar los reactivos.

### 8.1.-CALCULO DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO DISUELTO

Los volúmenes de tiosulfato para las titulaciones son representados por el símbolo VT, los blancos por B, los volúmenes por V. Los datos son los siguientes:

\* $V_{\text{fr}}$ : Volumen del frasco de muestreo.

\* $V_{\text{re}}$ : Volumen de los reactivos 1 y 2 introducidos en los frascos.

\* $V_{\text{m}}$  : Volumen de la muestra titulada (-  $V_{\text{fr}}$  )

\* $VT_{\text{m}}$ : Volumen de tiosulfato utilizado para titular la muestra,

\* $VT_{\text{p}}$  : Volumen de tiosulfato utilizado para la calibración,

\* $B_{\text{m}}$  : Volumen de tiosulfato correspondiente al blanco el análisis,

\* $B_{\text{p}}$  : Volumen de tiosulfato correspondiente al blanco de la calibración,

- \* $v_1$  : Volumen de Iodato utilizado en la calibración,
- \* $n_1$  : Normalidad del Iodato,
- \* $O_{2r}$  : Oxígeno añadido por los reactivos.

Todos los volúmenes son datos en mililitros.

La expresión final de la concentración de oxígeno es pues:

$$O_2 \text{ ml/l} = n_1 v_1 / (VT_p - B_p) \times (VT_m - B_m) / 1000 \times 22392 / 4 \times 1000 / V_m \times V_f / V_f - V_{re} - O_{2r}$$

Que se puede escribir:

$$O_2 \text{ ml/l} = A \times B \times C \times D \times E - O_{2r}$$

Con:

- A : Título del tiosulfato,
- A x B : Moles de tiosulfato consumidos por muestra,
- A x B x C : Numero de mililitros de oxígeno analizados en la muestra ( a presión y temperatura standards)
- A x B x C x D: Concentración aparente de oxígeno (ml /l) en el agua muestreada.
- E: Corrección debida a la dilución por los reactivos 1 y 2.

Si se sigue el procedimiento de titulación indicado (  $v_i = 10, n_i = 0,01$  ) la expresión queda de la manera siguiente:

$$O_2 \text{ ml/l} = 559,8 \times (VT_m - B_m) / (VT_p - B_p) \times 1 / V_m \times V_{fr} / V_{fr} - V_r - 0,015$$

#### REMARQUES:

.\_ El termino  $V_{fr} / V_{fr} - V_r$  puede ser determinado definitivamente si se utilizan los frascos de volúmenes vecinos y siempre los mismos volúmenes de reactivos. Se observará que el volumen  $V_r$  incluye solamente los reactivos 1 y 2, en efecto la adición posterior del ácido desplaza un volumen de agua totalmente libre de oxígeno.

.\_ El termino  $O_{2r}$  ha sido escogido igual a 0,015, valor intermedio entre los datos por Carritt and Carpenter (1966) y por murria et al (1968), respectivamente 0,018 y 0,012 ml/l de oxígeno.

#### 8.2.-CAMBIO DE UNIDADES

La habitud reconocida en oceanografía es de expresar en mililitros de oxígeno (condiciones Standard:  $P = 1 \text{ atm}$ ,  $t = 0 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por litro de agua, ml/l, expresando igualmente en las tablas internacionales en unidades SI,  $\text{cm}^3 / \text{dm}^3$ . Algunos autores expresan las concentraciones en milimoles de oxígenos atómico por litro, mmol/l. Para el agua dulce, los resultados son expresados en miligramos de oxígeno por litro, mg/l.

El paso de una unidad a la otra se efectúa como se indica en la tabla 1.

Tableau V .1

Unites d'expression de l'oxygene dissous

Pour exprimer la concentration d'oxygene en	Multiplier les ml.l <sup>-1</sup> par
Miligrammes par litre (mg.l <sup>-1</sup> )	1,429
Milimoles d'oxygene atomique par litre (mmol / l <sup>-1</sup> )	0,0893

Atención: la expresión en ppm (parte por millón) no es mencionada puesto que ella refiere la concentración a una masa de solución (1 ppm = 1 mg/kg). Si para el agua dulce, de densidad muy cerca de 1, esta unidad frecuente utilizada puede ser confundida con el mg/l, no es lo mismo en el agua de mar donde la diferencia es de 2,5 % a 35% de salinidad. También, para evitar toda confusión y todo error, no es aconsejable utilizar el ppm.

### 8.3.\_ SOLUBILIDAD DEL OXIGENO EN EL AGUA, PORCENTAJE DE OXIGENO DISUELTO.

La solubilidad del oxígeno en el agua depende de varios factores: La temperatura, la salinidad, la presión parcial del oxígeno.

Las determinaciones de la solubilidad del oxígeno en las aguas efectuadas por Murray and Riley (1969) de una parte y Carpenter (1965) concuerdan perfectamente y han sido introducidas en ecuaciones por Weiss (1970). Esos datos hacen el objeto de las TABLAS OCEANOGRÁFICAS INTERNACIONALES publicadas por la UNESCO (1973).

La solubilidad del oxígeno en el agua es calculada para una atmósfera a 20,95 % (en volumen) de oxígeno y una humedad relativa de 100% a la presión atmosférica total de 760 torr (101325 pa).

La ecuación del cálculo de la solubilidad es la siguiente:

$$.1 nC = A_1 + A_2 100 / t + A_3 I nT / 100 + A_4 T / 100 + S [B_1 + B_2 T / 100 + B_3 (T / 100)^2 ]$$

Con:

- C : Solubilidad del oxígeno en ml/l,
- T : Temperatura absoluta del agua: T (k) = t (°C) + 273,15,
- S : Salinidad del agua en por mil (g/kg)
- A<sub>1</sub>: - 173,4292
- A<sub>2</sub>: + 249,6339
- A<sub>3</sub>: + 143,3483
- A<sub>4</sub>: - 21,8492
- B<sub>1</sub>: - 0,033096
- B<sub>2</sub>: + 0,014259
- B<sub>3</sub>: - 0,0017000

La tabla II reproduce algunos valores de concentraciones.

El porcentaje de oxígeno disuelto con respecto a la saturación se calcula simplemente según:

$$\% \text{ O}_2 = \text{concentración medida/solubilidad} \times 100$$

## 9.\_ FUENTES DE ERROR

### 9.1.\_ MUESTREO, ALMACENAMIENTO

Se recuerda que todo chapoteo tiene tendencia de llevar la solución a su nivel de saturación que ella halla estado supersaturada o subsaturada. Al almacenamiento (muestras + reactivos 1 y 2), el secado del esmerilado o las variaciones de temperatura producirán un error por exceso debido a la penetración de aire en los frascos. La inmersión completa es la solución.

### 9.2.\_ TITULACION

El respeto de las concentraciones de los reactivos y de sus proporciones según el procedimiento descrito permite de obtener, durante la titulación, un pH vecino de 2. Este pH es un compromiso óptimo que favorece la reacción entre el yodo y el tiosulfato evitando una oxidación fotoquímica excesiva del ioduro en contacto con el aire. No se debe pues aumentar el volumen de ácido para acelerar la disolución del precipitado. Igualmente todo cambio de recipiente y toda agitación fuerte de la solución, favoreciendo la disolución del aire, pues la oxidación, deben ser evitados.

El yodo es bastante volátil, pero la escogencia de fuertes concentraciones de ioduro permite acomplejarlo bajo la forma no volátil  $\text{I}_3^-$  en aproximadamente 95 % del yodo formado por un agua de mar saturada de aire. Si se transfiere o se pipeta la solución de yodo una pérdida no despreciable es inevitable: el análisis directo en el frasco elimina éste riesgo.

La velocidad de titulación tiene pues una importancia: a efecto, la titulación es lenta, más los fenómenos que vienen de ser descritos toman importancia sin que sea posible prevenir cual dominará. Sin embargo, una titulación extremadamente rápida no es deseable tampoco puesto que la reacción yodo-tiosulfato se efectúa en dos etapas, la segunda siendo más lenta:



Durante la titulación demasiado rápida, aparece un punto de equivalencia falso seguido de una reaparición del oído (no debe ser confundida con la oxidación por el aire o con la interferencia debida a los nitratos). Por todos estos rezones, el tiempo de 2-3 minutos para una titulación es un compromiso razonable.

Existe una ligera diferencia entre el punto de equivalencia efectivo y el punto final de la titulación que se pone en evidencia por la utilización del almidón: esta diferencia es despreciable puesto que ella afecta de la misma manera la calibración y la titulación del agua de mar. Ella es más, pequeña cuando  $\text{VT}_m$  y  $\text{VT}_p$  son cercanos, condición que se puede lograr para la mayoría de las muestras, ajustando el título de la solución de tiosulfato.

### 9.3.- INTERFERENCIAS

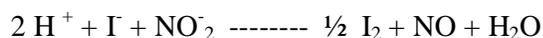
La mayoría de las interferencias se encuentran en el agua dulce o en el agua muy poco saladas.

Se puede eliminar las interferencias debidas a los iones férricos hasta 20 mg/l acidificando la muestra con ácidos fosfórico en lugar de utilizar el ácido sulfúrico.

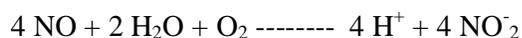
La eliminación de las interferencias reductoras (iones ferrosos, hidrógeno sulfuroso, materia orgánica), se realiza por una oxidación previa generalmente con la ayuda del permanganato ácido.

Cuando nos encontramos en presencia de aguas turbias ricas en materia orgánica, se pueden eliminar las partículas por floculación con la ayuda de alumbre, decantación, separación del sobrenadante y análisis de la manera habitual.

Los iones nitrito están al origen de una interferencia particular que puede ser eliminada por la adición de azoturo de sodio en los reactivos. El yoduro es en principio oxidado según:



Durante la titulación al entrar en contacto con el oxígeno del aire los iones nitrito son regenerados:



Las dos reacciones se suceden pues indefinidamente sin que se pueda observar el punto de equivalencia.

Se admite que hasta 50 ug/l de nitrógeno nitroso (3,5 umol/l) la interferencia es despreciable.

La introducción del azoturo de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) en el reactivo 2 elimina totalmente la interferencia por destrucción de los iones nitrito:



Al contrario, el azoturo interfiere el mismo ligeramente, introduciendo un error de 1 a 2 % (Aminot, 1983)

Cuando se esperan concentraciones de nitrito superiores a 3 umol/l, es todavía realista de efectuar una titulación correcta y precisa sin adición de  $\text{NaN}_3$ . Hay que tomar las precauciones durante la titulación para evitar la regeneración de los nitrito por disolución del aire en la muestra (no se debe transferir la muestra, debe existir una pequeña superficie de contacto con el aire, titulación rápida, agitación mínima). Los análisis pueden así ser realizados hasta 40 umol/l con una precisión aceptable.

## ELEMENTOS NUTRITIVOS MINERALES DISUELTOS.

- 1.- Muestreo, conservación y resultados
- 2.- Análisis del nitrógeno amoniacal
- 3.- Análisis el nitrógeno nitroso
- 4.- Análisis del nitrógeno nítrico
- 5.- Análisis del fósforo mineral disuelto
- 6.- Análisis del silicio reactivo disuelto.

## MUESTREO, CONSERVACION, RESULTADOS.

Los elementos nutritivos (N, P, Si) se presentan bajo diferentes formas minerales en solución.

Para el nitrógeno, se distinguen los diferentes grados de oxidación: nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), forma predominante, es el termino que será generalmente utilizado.

Para el fósforo, se utiliza el término de fosfato, quien cubren todas las formas de ortofosfatos presente ( $\text{H}_n\text{PO}_4^{<3-n>-}$ ).

Al pH del agua del mar  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  representan alrededor del 90 y 10 % respectivamente.

El termino silicio sobre entiende las formas  $\text{Si(OH)}_4$  y  $\text{SiO(OH)}_3$  representando la casi totalidad del silicio disuelto, respectivamente 95 y 5 % al pH del agua del mar.

Si se constata muy seguidamente concentraciones suficientemente elevadas de algunos compuestos cerca de los estuarios, es totalmente diferente cuando el efecto de esos aportes disminuye y, en medio oceánico, el orden de grandeza de las concentraciones en la superficie puede ser de algunos micros moles a algunas 1/10 de micro moles por litro. Después del crecimiento planctónico primaveral (<<boom>>), las concentraciones pueden ser inferiores a los límites de detección.

Algunos precauciones particulares deben ser tomadas si se quiere evitar todas contaminación de las muestras o asegurar su conservación.

### 1.-MUESTREO

El muestreo es fuente de contaminación si un cierto número de reglas no son respetadas. El material de muestreo será manipulado con cuidado y almacenado al abrigo de contaminaciones. Las botellas serán siempre mantenidas cerradas mientras éstas no sean utilizadas. Ellas no deben ser abiertas sino poco tiempo antes de su inmersión. Durante su manipulación, se debe siempre velar a no tocar las paredes internas de las botellas.

La inmersión debe efectuarse en el lado opuesto a los orificios de evacuación de las aguas usadas del barco (baños, cocina...) o de enfriamiento. En caso de que exista salidas de aguas usadas en los dos lados del barco, hay que alejarse lo más posible de esos orificios y tener en cuenta los desagües en las superficies para evitar las contaminaciones eventuales.

### 2.-ALMACENAMIENTO

#### 2.1.- FRASCOS

La escogencia de los frascos es importante para el análisis de los elementos nutritivos.

### **2.1.1.- MATERIAL, CAPACIDAD**

El tipo de material utilizado depende del elemento analizado, del modo y de la duración de la conservación.

Para el silicio, la utilización de envase de vidrio es proscrita. El plástico es necesario (polietileno, polipropileno...).

Para los fosfatos, el polietileno o el PVC no son recomendados por Murphy and Riley (1956), quienes constataron una disminución rápida de las concentraciones en fosfato. Sin embargo, cuando las muestras son congeladas rápidamente después de su toma, las experiencias de íter calibración RNO han probado que no existe disminución importante de las concentraciones, misma después de algunos meses de conservación (Aminot et Kerouel, 1979).

Para el nitrito y el nitrato, el polietileno conviene, en la hipótesis de una congelación rápida después de la toma de la muestra y de una conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En resumen, los envases de vidrio son grandemente aconsejados para los iones fosfato, pero inutilizables para el análisis de los silicatos: al contrario el plástico es obligatorio para el análisis de los silicatos pero poco aconsejable para los fosfato. Sin embargo, para simplificar, se puede almacenar el agua de mar en un envase único de plástico para el análisis de los cuatro elemento nutritivos: esta solución es satisfactoria:

\_Si las muestras pueden ser congeladas rápidamente,

\_Si se está seguro de la ausencia de interacciones entre el material utilizado y los iones fosfatos.

Un envase único de 500 ml de capacidad es normalmente suficiente para el análisis de los cuatros parámetros por métodos manuales. Si no, en vez de congelar y descongelar varias veces las muestras corriendo el riesgo de modificar las concentraciones, es preferible repartir el agua en cuatro envases de 125 a 250 ml de capacidad cada uno sirviendo el análisis de un solo parámetro.

El amonio debe normalmente ser muestreado en envase de vidrio para permitir la adición inmediata de los reactivos. Este compuesto evoluciona rápidamente y es difícil conservar las muestras.

### **2.1.2.-TAPAS**

Para el cerrado de los envases de vidrio, es imperativo la utilización de tapas cuya hermeticidad es asegurada sin la utilización de juntas intermediarias. Se utilizarán por ejemplo tapas de rosca en polietileno, polipropileno, teflón, etc...., a la excepción del caucho.

Para el cerrado de los envases plásticos de polietileno, se escogerán igualmente tapas simples que no necesiten capsulas intermediarias.

### **2.1.3.-TOMA DE MUESTRAS.**

El llenado de los envases se efectúa tomando todas las precauciones para evitar el contacto de los dedos con el agua, la boca de los envases o con el interior de la tapa, así como con la extremidad del grifo de la botella de muestreo o con el sistema de pre-filtración.

Los envases son lavados al menos tres veces con el agua a analizar. El envase es enseguida llenado como máximo a  $\frac{3}{4}$  de su volumen, para permitir la expansión del hielo durante la congelación, después las tapas son revisadas y cerradas al máximo. Es imperativo que ninguna pérdida de muestra, misma mínima, sea posible por la dilatación durante la congelación: en ese caso, **EL VOLUMEN EXPULSADO SERIA FUERTEMENTE CONCENTRADO EN SALES EN RELACION CON LA MUESTRA DE ORIGEN Y LAS CONCENTRACIONES SERIAN FALSAS POR DEFECTO. POR LA MISMA RAZÓN, LOS ENVASES DEBEN MANTENERSE SIEMPRE EN POSICIÓN VERTICAL HASTA SU COMPLETA CONGELACIÓN.**

#### 2.1.4.-MANTENIMIENTO DE LOS ENVASES

Antes de utilizarlos, los frascos son lavados varias veces con una SOLUCION ACIDA seguido de un lavado abundante con agua destilada o desmineralizada. Estos deben conservarse herméticamente cerrados.

#### 2.2.-FILTRACION

El límite arbitrario entre las materias disueltas y particuladas en el agua de mar es fijado a 0,45  $\mu\text{m}$ . Con todo rigor, una filtración sobre membrana de esta porosidad debería ser efectuada puesto que nos interesamos a las sustancias disueltas.

Desde el punto de vista analítico, la filtración es necesaria para las aguas que presentan una fuerte turbidez la cual es susceptible de perturbar las medidas de absorbencia. Igualmente cuando una interferencia debido a la presencia del compuesto analizado adsorbió sobre las partículas en suspensión puede falsear los resultados del análisis (fosfato por ejemplo). De otra parte, la conservación es mejorada por la filtración. Esta última presenta sin embargo los inconvenientes siguientes:

\_ Riesgo de contaminación o de pérdida cuando se trabaja con concentraciones muy bajas durante esta manipulación suplementaria de la muestra.

\_ Dificultad de aplicar este método cuando se trabaja en barcos de pequeña talla.

Algunas experiencias muestran, por otra parte, que los resultados obtenidos sobre el agua bruta o filtrada no son significativamente diferentes para ciertos elementos en medio oceánicos.

A fin de evitar esta operación de filtración, siempre que sea posible, se procede simplemente a una pre-filtración gruesa sobre red de plancton de 20 a 50  $\mu\text{m}$ , ver hasta 200  $\mu\text{m}$  si el agua está muy cargada. Esta operación tiene como finalidad de disminuir la turbidez y mejorar la conservación de la muestra por eliminación de una parte del plancton y de las partículas de gran tamaño. Esta pre-filtración se practica gracias a un simple dispositivo, adaptado directamente a la botella de muestreo, a través del cual circula el agua por gravedad sin ninguna intervención suplementaria. (ver figura).

Si una filtración debe ser practicada absolutamente, en el caso de los estuarios por ejemplo, se deben tomar precauciones para asegurar la limpieza del material utilizado.

Se tendrán en cuenta igualmente los riesgos de contaminación que provienen de ciertos filtros:

- .\_ No se deben utilizar membranas en fibras de vidrio si se van a analizar los silicatos,
- .\_ No se deben utilizar membranas en nitrato de celulosas para el análisis de los iones nitratos,
- .\_ Considerar todos los filtros como sospechosos de la contaminación en fosfato.

De una manera general, se tomará siempre la precaución de lavar abundantemente el filtro con agua destilada antes de la filtración del agua de mar, Además. Al menos 100 ml de agua de mar son pasados a través del filtro y botados antes de recoger la muestra filtrada.

### 3.- CONSERVACIÓN

La fuentes principal de no representatividad de una muestra reside menos en los errores analíticos que en la evolución de la concentración después del muestreo. Si las contaminaciones pueden ser minimizadas, el mantenimiento de la integridad de la muestras depende de su modo de conservación entre el muestreo y el análisis. La atención dada a la conservación es esencial, puesto que la evolución de las muestras es más o menos rápida según el periodo del año (plancton, temperatura,...), del lugar del muestreo (aguas residuales...), y del valor de la concentración.

Es siempre aconsejable de comenzar loa análisis lo más rápidamente posible después de la toma de las muestras, generalmente en la hora que sigue la toma de la muestra, Si esto no es posible, hay que estabilizar la muestra a fin de que las concentraciones no sufran una evolución antes del análisis.

La unanimidad no existe sobre la técnica a adoptar para una conservación perfecta de las muestras y parece que ninguna solución no sea satisfactoria para todos los elementos nutritivos.

Para los iones fosfato, por ejemplo, la acidificación de la muestra no debe ser practicada puesto que ella libera el fósforo polimerizado. Al contrario, para el análisis de los silicatos, la acidificación puede ser utilizadas con suceso. En cuanto a la utilización de sales mercurícas, ellas parece válidas para la conservación de los iones nitrato; sin embargos, el mercurio interfiere en la reducción sobre la columna de cadmium y no debe pues ser utilizado cuando se aplica este método de análisis.

Si se admite que toda adición de reactivos químicos a las muestras puede provocar una contaminación más importante que las evoluciones que se suponen inhibir, se puede considerar que el método único más simple y mas eficaz para la conservación de las muestras es la congelación rápida del agua a -20 o -30 °C. Las muestras deben ser colocadas en el congelador inmediatamente después de su toma. Si el barco no dispone de un congelador, las muestras se deben colocar inmediatamente en una cava a baja temperatura (4 a 5 °C o menos), hasta la llegada al laboratorio donde ellas deben ser congeladas el mismo día.

#### **4.- DESCONGELACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

Varias veces hemos recordado los riesgos de contaminación de las muestras para el análisis de los elementos nutritivos.

En el laboratorio existen igualmente diversas fuentes de modificación de las concentraciones de las muestras, en particular para el nitrógeno y el fósforo presenten el estado de trazas (frecuentemente  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  mol/l).

Primera etapa del análisis, la descongelación de las muestras debe efectuarse según reglas estrictas, puesto que ella puede estar al origen de evoluciones rápidas e imprevisibles de las concentraciones:

- Descongelar pocas muestras a la vez.
- Jamás descongelar con agua caliente o tibia, se debe siempre utilizar agua fría, si la descongelación se efectúa en el lavadero con circulación de agua, los frascos deben ser mantenidos verticalmente sin dejar que se sumerjan hasta el cuello. En efecto, el agua de alimentación, rica en nitrógeno, fósforo, y silicio podría contaminar la muestra e el momento de la abertura del envase.
- Descongelar todo el volumen de la muestra (ausencia de hielo en el envase) y homogeneizar perfectamente la muestra.
- Tomar el volumen necesario para el análisis y volver congelar el resto de la muestra rápidamente.
- Asegurarse de que la temperatura de la muestra a analizar sea superior a 15 °C.
- Hacer los análisis en el tiempo siguiente:
  - Inmediatamente para los iones nitrato, nitrito, fósforo, cualquiera que sea la salinidad, así que para el silicio en las aguas de salinidad superior a 27 ‰.,
  - Después de un tiempo de varias horas, se analizará el silicio en las aguas de salinidad inferior a 27‰., (y hasta 48 horas para las aguas muy desaladas) a fin de hacer desaparecer la polimerización de los silicatos provocada por la congelación; sin esta precaución, se puede obtener una subestimación de 10 al 20%.

La manipulación de amoníaco o de ácido nítrico concentrado en el laboratorio en el momento del análisis del amonio o del nitrato es evidentemente prohibida. La atmósfera de los laboratorios es fuente de contaminación en amonio y los envases que contienen las muestras para su análisis deben permanecer abiertos el mínimo de tiempo.

#### **ANALISI DEL NITROGENO AMONICAL**

El nitrógeno amoniacal se presenta bajo dos formas en solución el amoníaco  $\text{NH}_4^+$  y sus proporciones relativas dependen del pH, de la temperatura y de la salinidad (tabla # 1). En las aguas marinas y estuarios, el amonio es predominante, es por eso que este término es empleado para designar al nitrógeno amoniacal.

Como la forma  $\text{NH}_3$  es la tóxica para la vida acuática, las concentraciones de nitrógeno amoniacal se pueden elevar a varias decenas de micromoles por litro sin que el límite de toxicidad sea alcanzado por el fitoplancton como fuente de nitrógeno y oxidado por las bacterias nitrificantes.

Las concentraciones son muy variables en función del lugar y de la estación. En las aguas costeras no contaminadas y en medio oceánico, las concentraciones son generalmente inferiores a  $1 \text{ umol/l}$ . Las aguas profundas no contiene amonio, este habiendo sido oxidado, exceptuando los medios anóxicos; en el mar Negro por ejemplo, hasta  $100 \text{ umol/l}$ . En los estuarios las concentraciones aumentan traduciendo así la influencia de las descargas urbanas o agrícolas. Cuando nos acercamos de los emisarios urbanos, las concentraciones pueden alcanzar varias decenas, ver centenas de micromoles por litro. El amonio se convierte en esas condiciones en un buen indicador de contaminación urbana.

## 1.-PRINCIPIOS DEL METODO

El método descrito mide la totalidad del nitrógeno amoniacal, sea  $\text{N- NH}_3 + \text{N- NH}_4^+$ , simbolizado por  $\text{N- NH}_4^+$ , se trata del método de Koroleff (1969) que es simplemente y que ofrece una buena precisión así como una buena sensibilidad.

Es una aplicación al agua de mar de la reacción de Berthelot así esquematizada:



En un primer tiempo, el amoniaco forma una monocloramina con el hipoclorito en medio ligeramente básico. Esta última reacciona con el fenol en presencia de un exceso de hipoclorito para formar el azul de indofenol absorbiendo a  $630\text{nm}$ . La reacción es acelerada por el nitroprusiato o, más exactamente, un derivado formado en medio básico.

Grashoff and Johannsen (1972) han logrado reemplazar el hipoclorito por otro donador de cloro; el ácido 1,3- dicloro 1, 3, 5,-triazina-2, 4,6(1H, 3H, 5H)-triona) bajo la forma de su sal de potasio.

La precipitación de iones alcalinotérreos del agua de mar, al pH elevado de la reacción, es evitada por complicación con la ayuda del citrato de sodio (Solórzano, 1969).

## 2.-DOMINIO DE APLICACIÓN

### 2.1.-RANGO DE CONCENTRACIONES.

Bien que se puedan analizar concentraciones de  $0,05$  a  $100 \text{ umol/l}$  (Koroleff,1969), la ley de Beer no es verdaderamente seguida que hasta  $40$  a  $50 \text{ umol/l}$ .

Es entonces aconsejables de diluir las muestras susceptibles de presentar concentraciones superiores a esta si no se dispone de una buena curva de calibración para los valores elevados.

### 2.2.-PRECISIÓN

Koroleff (1969) indica una precisión mejor que  $\pm 5\%$ , lo que es confirmado por Riley et al. (1972) quienes anuncian  $\pm 4\%$  al nivel de 3  $\mu\text{mol/l}$  sea  $\pm 0,12 \mu\text{mol/l}$ .

### **2.3.-LIMITE DE DETECCIÓN.**

La más pequeña cantidad detectable con certeza es vecina de 0,05  $\mu\text{mol/l}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ : en celda de 10 cm de trayecto óptico eso corresponde a una absorbencia de 0,01 aproximadamente.

### **2.4.-INTERFERENCIAS.**

El método es considerado como específico del nitrógeno amoniacal  $\text{N-NH}_3$ , 4. Ha sido demostrado que la urea o los aminoácidos no interfieren que de manera despreciable.

Los iones sulfuros ( $\text{S}^{2-}$ ) interfieren por arriba de 2 mg/l. Los iones nitritos no interfieren por encima de varias decenas de micromoles por litro.

La salinidad interfieren por el hecho de que el pH de la reacción se encuentra modificado por el efecto tampón del agua de mar, el efecto de sal debe ser determinado.

## **3.-MUESTREO**

### **3.1.-FRASCOS**

La reacción se realizada directamente en los frascos de muestreo. El análisis puede hacerse sobre un volumen del orden de los 30ml, pero para reducir los riesgo de contaminación muy frecuentes con este parámetro, se tomaran 100ml de muestra en frascos de vidrios de 120ml de capacidad con tapas de polietileno; no deben utilizarse tapas de caucho.

La mejor manera de realizar la limpieza de los frascos es de efectuar una vez la reacción a blanco; el mantenimiento es enseguida asegurado por un simple lavado al agua destilada o desmineralizada. Los frascos no deben ser dejados abiertos. Ellos serán reservados exclusivamente para el análisis del amonio, ellos serán marcados por una línea a nivel de 100 ml.

### **3.2.-TOMA DE LA MUESTRA.**

Una vez que la botella de muestreo haya sido subida a bordo del barco, la toma de la muestra se realizará muy rápidamente, inmediatamente después de la toma del oxígeno disuelto y del pH. Lavar el frasco varias veces con el agua a analizar (mínimo tres veces) y llenarlo hasta la marca de  $100 \pm 5$  ml; la muestra no debe ser cambiada luego de envase.

El agua es prefiltrada a 50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente. El análisis el nitrógeno amoniacal necesita un cuidado particular y el muestreo debe ser efectuado evitando toda contaminación proveniente de la atmósfera. No se debe fumar durante el muestreo.

## **4.-CONSERVACIÓN**

Bien que algunos autores han obtenidos buenos resultados congelados rápidamente las muestras, la conservación será evitada puesto que la evolución de las concentraciones es imprescindible y rápida. En consecuencia, el análisis debe ser de preferencia comenzando a bordo rápidamente después del muestreo, o a más tardar en la hora que sigue si la muestra es mantenida en el frío al abrigo de la luz; La adición de los reactivos es hecha conformemente a los procesos descritos más adelante directamente en el frasco de muestreo.

## **5.-EQUIPOS**

Se debe disponer de un espectrofotómetro o de un colorímetro, dotado de un filtro teniendo un máximo de transmisión hacia los 630nm, pudiendo aceptar celdas de hasta 10cm de trayecto óptico.

Distribuidores automáticos de reactivos son bastante útiles, en particular en los barcos.

## **6.-REACTIVOS**

### **6.1.- REACTIVO 1: SOLUCIÓN DE FENOL – NITROPRUSIATO**

Para 1 L de reactivo: disolver 35 g de fenol y 400 mg de nitroprusiato de sodio ( $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) en el agua desmineralizada o frescamente destilada y completar a un litro.

Este reactivo debe ser conservado en el refrigerador y al abrigo de la luz; el no es estable sino durante algunas semanas y debe ser renovado si el toma coloración verdosa.

### **6.2.-REACTIVO 2 : SOLUCIÓN ALCALINA DE HIPOCLORITO**

Para 1 L de reactivo: y 2 g hidróxido de sodio en 800 ml de agua desmineralizada o frescamente destilada. Corresponde a 1,4 g de cloro, sea: 44 ml de una solución a 10 grados clorométricos o 40 ml de una solución normal (la concentración de esas soluciones debe ser controlada periódicamente, según el procedimiento descrito más adelante).

Se puede reemplazar el hipoclorito por el dicloroisocianurato de potasio  $\text{C}_3\text{CL}_2\text{KN}_3\text{O}_3$ . Se añaden entonces 5 g por litro de reactivo.

Este reactivo es utilizable en toda la gama de salinidad, pero de preferencia por encima de 5%, cuando se analizan aguas de salinidad inferiores a 5%, la cantidad de NaOH introducida en el reactivo debe ser bajada a 14g/l en lugar de 22g/l.

Este reactivo se conserva en el frío durante 1 ó 2 meses.

### **6.3.-SOLUCIÓN PATRON PRIMARIO DE AMONIO**

Secar durante 1 hora a 110 °C el sulfato de amonio de calidad analítica,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y disolver 0,661 g en 1000 ml de agua destilada:

1 ml contiene 10  $\mu\text{mol}$  de  $\text{N-NH}_4^+$

Esta solución es estable indefinidamente en el congelador.

#### **6.4.-SOLUCIÓN PATRON SECUNDARIO DE AMONIO**

Diluir 20 veces la solución patón primario con agua desmineralizada de buena calidad, o con agua frescamente destilada. Añadir cloroformo a razón de 1 ml/l:

1 ml contiene 0,5  $\mu\text{mol}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ .

Esta solución es estable durante una semana en el refrigerador, pero para más seguridad prepararla antes de su uso.

### **7.-MODO OPERATIVO**

#### **7.1.-PROCESO GENERAL**

- Tomar  $100 \pm 5$  ml de la muestra directamente en el frasco de reacción.
- Añadir 3,0 ml del reactivo 1.
- Tapar el frasco y agitar para homogenizar bien.
- Añadir sin tardar 3,0 ml del reactivo 2.
- Tapar el frasco y agitar de nuevo.
- Colocar inmediatamente al abrigo de la luz durante 6 a 8 horas (o mejor durante una noche) a la temperatura ambiente.
- Medir la absorbencia a 630 nm, contra el agua destilada, en celdas de 10 cm de trayecto óptico, o en celdas más pequeñas (por encima de 5  $\mu\text{mol/l}$ ). La coloración es estable durante varios días al abrigo de la luz. Sea  $A_{tr}$  esta medida.

#### **7.2.- CALIBRACIÓN**

La calibración demanda una atención particular en razón de la influencia no lineal de la salinidad sobre la coloración. Esta se realiza pues en dos etapas: la gama de calibración propiamente dicha, luego la corrección de la influencia de la salinidad (ver más adelante).

La gama de calibración puede ser efectuada con un agua de salinidad cualquiera, conocida. Sin embargo, es preferible de escoger agua de mar (34-35%..), pobre en amonio (por ejemplo después de un crecimiento fitoplanctónico o después de una incubación prolongada).

Se procede de la manera siguiente:

- Introducir en matraz aforados de 500 ml, 0,5-1, 2, 5, 10,20 ml etc. De la solución patón secundario y completar a 500 ml con el agua de mar para obtener la gama de concentraciones: 0,5-1, 2, 5, 10,20,  $\mu\text{mol/l}$ , etc.

.- Hacer dos análisis de cada uno de esos patrones así que del agua bruta que sirvió a prepararlos, según el proceso descrito en 7.1.

.- Restar de las medidas de absorbencia el valor obtenido sobre el agua de mar bruta y trazar la curva de calibración (el origen de las coordenadas es un punto significativo).

Una vez que la curva de calibración es establecida, se analizará al menos un patrón cada día, o con cada serie de análisis, a fin de controlar la buena conservación de los reactivos, la reproducibilidad de análisis y las posibilidades eventuales de contaminación.

### 7.3.-CORRECCIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA SALINIDAD

La influencia de la salinidad no es despreciable en toda la gama 0-40%,.. Si se tolera una imprecisión suplementaria de  $\pm 5\%$  sobre el resultado, se podrá eliminar la corrección entre 25 y 40 % a condición que la calibración haya sido realizada con un agua a 30-35 % de salinidad.

Para un trabajo más preciso o un análisis frecuente de aguas estuarios, a salinidades muy variables, se aconseja de realizar la corrección. Esta corrección no es lineal y será determinada por cada analista (fig. 1).

El efecto de sal proviniendo esencialmente de la variación del pH de la reacción con la salinidad, es posible que la corrección dependa del tipo de mineralización del agua del río mezclada al agua del mar. Generalmente, la riqueza de las aguas de los ríos en amonio no permite realizar patrones con las aguas estuarios naturales; se opera simplemente por mezcla agua de mar-agua destilada. Un control es sin embargo deseable, en la medida de lo posible, si se desean obtener resultados muy precisos.

Se procede de la manera siguiente:

.- Tomar o preparar aguas que posean una salinidad que cubra la gama 0-35%, y con concentraciones de amonio despreciables; un mínimo de 5 salinidad diferente es necesario, y una de ellas idéntica a la que ha sido utilizada para la preparación de la curva de calibración.

.- Preparar, para todas las salinidades, patrones de la misma concentración añadiendo una cantidad idéntica de amonio (por ejemplo 10  $\mu\text{mol/l}$ ).

.- Efectuar dos análisis de cada uno de esos patrones, así que de las aguas no dotadas correspondiente, y tomar la media de las absorbencias. Sustraer la absorbencia de las aguas brutas de la absorbencia de las aguas dotadas.

.- Determinar la corrección de salinidad como sigue. Sea  $A$  la absorbencia neta del patrón preparado con el agua de salinidad idéntica a aquella que ha servido a establecer la curva de calibración; sea  $A'$  la absorbencia neta de un patrón a otra salinidad  $S$ . El factor de corrección es:

$$C_s = \frac{A_{tr}}{A_n}$$

.- Trazar la curva  $C_s = F(S\%)$

Los resultados deben ser multiplicados por ese factor. La fluctuación total de  $C_s$  es generalmente comprendida entre 10 y 15 %.

#### **7.4.-BLANCOS.**

##### **7.4.1.-BLANCO DE TURBIDEZ.**

Es la absorbencia del agua de mar no tratada, sea  $b_t$ .

La medida de este blanco necesita tomar muestra del agua a analizar en la cual no se le añaden los reactivos: esta medida es necesaria si el agua presenta una turbidez visible y si se utilizan celdas de 10 cm de trayecto óptico. De hecho, teniendo en cuenta de la decantación que se produce durante el revelado de la coloración, es raro tener que efectuar esta medida.

##### **7.4.2.-BLANCO DE REACTIVOS.**

Este blanco no es despreciable en celdas de 10 cm (0,05 a 0,1 de absorbencia), y debe ser medido con cada serie de análisis, sea  $b_r$ .

Para eliminar todo riesgo de contaminación accidental, al menos dos blancos son efectuados y se toma el valor más pequeño.

El blanco es realizado utilizando 100 ml de agua desmineralizada o frescamente destilada. Los reactivos son añadidos y el frasco colocado al abrigo de la luz como en el caso de un análisis normal.

No se debe realizar el blanco midiendo la densidad óptica inmediatamente después de haber añadido los reactivos en el agua de mar; una tal medida no tiene en cuenta el amonio eventualmente presente en los reactivos.

La coloración amarillo pálido que se desarrolla en el agua desmineralizada o frescamente destilada no afecta en nada la medida.

### **8.-CÁLCULOS, EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Sea:

- .-  $A_{tr}$  la absorbencia medida para la muestra tratada
- .-  $b_t$  la absorbencia medida para la turbidez
- .-  $b_r$  la absorbencia medida para el blanco de reactivos
- .-  $C_s$  la corrección de la salinidad determinada a partir de la curva que da su variación en función de la salinidad.

La absorbencia neta corregida es  $A_c = C_s \times (A_{tr} - b_t - b_r)$ .

Este valor  $A_c$  es reportado sobre la curva de calibración para deducir la concentración de la muestra.

Se puede igualmente determinar la pendiente  $p$  de la recta de calibración en  $\mu\text{mol/l}$  por unidad de absorbencia. En este caso la concentración es:

$$[\text{N-NH}_{3,4}] \mu\text{mol/l} = p \times A_c.$$

Se observará que  $p$  depende de la longitud de las celdas utilizadas.

La presentación de la concentración de nitrógeno amoniacal en otras unidades se efectúa como lo indica la tabla I. Para conocer el porcentaje de la forma amoniaco  $\text{NH}_3$  en el nitrógeno amoniacal total ( $\text{N-NH}_4^+$ ), hay que reportarse a la tabla II.

## 9.-PRECAUCIONES PARTICULARES

### 9.1.-CONTAMINACIÓN

Para el análisis de pequeñas concentraciones, es importante respetar los puntos siguiente:

- .-No dejar jamás los frascos limpios destapados durante mucho tiempo.
- .-Lavar varias veces el frasco con el agua que se va a analizar ante de llenarlo.
- .-No fumar en el lugar donde son tomadas las muestras y donde se realizan los análisis.

### 9.2.-CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN COMERCIAL DE HIPOCLORITO.

A 50 ml de solución de yoduro de potasio al 1%, añadir 1,00 ml de la solución comercial y 0,25 ml de ácido clorohídrico concentrado ( $d = 1,18$ ), .Titular enseguida el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio 0,1 normal; 1 ml de tiosulfato 0,1 normal corresponde a 3,55 mg de cloro.

La solución comercial fresca a 10 grados clorométricos contiene teóricamente en cloro 31,2 mg/ml. La solución normal contiene 35,5 mg/ml.

## 10.-PROPORCIÓN $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ EN FUNCIÓN DEL Ph, DE LA TEMPERATURA Y DE LA SALINIDAD.

Tablas que dan las proporciones  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  han sido establecidas para el agua dulce y para el agua de mar.

Recientemente las constantes del equilibrio  $\text{NH}_3 \rightleftharpoons \text{NH}_4^+$ , han sido recalculadas en el agua de mar por Johansson and Wedborg (1980). Ha sido posible, a partir de esas constantes, establecer nuevas tablas. El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) están ligados en solución por el equilibrio:



Johansson and Wedborg han establecido la relación entre  $K_1$ , la salinidad  $S$  y la temperatura absoluta  $T$  ( $T(\text{K}) = t(^{\circ}\text{C}) + 273,15$ ):

$$\text{Log } K_1 = 0,467 + 0,00113 \times S + 2887,9 \times T - 1.$$

El porcentaje de amoniaco es:

$$\% \text{ NH}_3 = [\text{NH}_3] / [\text{NH}_4^+] + [\text{NH}_3] \times 100.$$

Luego de transformar esta expresión se tiene:

$$\% \text{ NH}_3 = 100 / [1 + \exp_{10} (\log K_1 - \text{pH})].$$

La tabla II muestra valores del %  $\text{NH}_3$  calculados con esta formula. El calculo de la concentración del amoniaco se efectúa según :

$$[\text{NH}_3] = \% \text{ NH}_3 / 100 \times [\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3].$$

La concentración determinada por el método analítico previamente descrito.

## ANÁLISIS DEL NITRÓGENO NITROSO

En el ciclo del nitrógeno, los iones nitrito son intermediarios relativamente fugaces entre el nitrógeno amoniacal y los iones nitrato. Las concentraciones generalmente encontradas en las aguas naturales, dulces, marinas, van de cero a algunos micromoles por litro de nitrógeno nitroso.

En las aguas oceánicas, las concentraciones son extremadamente bajas (en general inferiores a 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ); en aguas costeras ellas son del orden de 0,5 a 1  $\mu\text{mol/l}$ , en invierno pueden bajar a menos de 0,01  $\mu\text{mol/l}$ , en verano, siguiendo así el ciclo de utilización del nitrógeno por el fitoplancton.

En las aguas estuarios donde se encuentran bajas concentraciones de oxígeno la reducción de los iones nitrito pueden provocar concentraciones en nitrito superior a 5  $\mu\text{mol/l}$ . La riqueza en materia orgánica de estas zonas es generalmente al origen de estos fenómenos.

Concentraciones elevadas de nitrito en método oceánico son posible, debido a diferentes tipos de fenómenos. Un primer máximo se sitúa al límite de la zona eufórica a nivel del gradiente de asociado a un mínimo de oxígeno. Valores de más de 2  $\mu\text{mol/l}$  pueden entonces ser observados; lejos de las costas peruanas, Barber and Huyer (1979) han encontrado concentraciones de 8  $\mu\text{mol/l}$ . Las zonas de fuerte producción primaria tal que las zonas de sugerencias (upwelling) son enriquecidas en nitrito proviniendo de la excreción directa o de la oxidación de los compuestos nitrogenados excretados.

### 1.-PRINCIPIO DEL MÉTODO

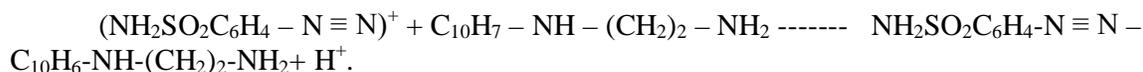
El método descrito, basado en la relación de Griess, y aplicado al agua de mar por Bendscheider and Robinson (1952), es uno de los más sensibles y de los más específicos para el análisis de las aguas naturales.

Los iones nitrito forman un diazoico con la sulfanilamida en medio ácido ( $\text{pH} < 2$ ) según la reacción:



Sulfanilamide,

Después el diazoico reacciona con el N – naftil-etilendiamina para formar el colorante:



Esté colorante Rosado absorbe a la longitud de ondas de 543nm.

### 2.-DOMINIO DE APLICACIÓN.

#### 2.1.-GAMA DE CONCENTRACIÓN.

La ley de Beer es seguida para las concentraciones que van de 0,01 a 20  $\mu\text{mol/l}$ .

Para las concentraciones muy superiores a 20  $\mu\text{mol/l}$ , la coloración se vuelve inestable por precipitación del colorante azoico. De otra parte, Grasshoff (1976) aconseja diluir las muestras con agua destilada si las concentraciones pasan de 3  $\mu\text{mol/l}$ .

## **2.2.-PRECISIÓN.**

La precisión dada por Strickland and Parsons (1972), APRA una medida (nivel de confianza 95%, son las siguientes:

- A nivel de 1  $\mu\text{mol/l}$  : media  $\pm$  0,032. n- 1/2  $\mu\text{mol/l}$ .
- A nivel de 0,3  $\mu\text{mol/l}$ : media  $\pm$  0,023. n- 1/2  $\mu\text{mol/l}$ .

En lo que concierne la reproductividad, Strickland and Parsons (1972) precisan que los resultados de dos medidas sobre la misma muestra deben ser descartados si sus absorbencias difieren de: 0,030 entre 0,5 y 1; 0,020 entre 0,1 y 0,5; 0,005 entre 0,03 y 0,1.

## **2.3.-LIMITE DE DETECCIÓN.**

La cantidad más pequeña detectable es del orden de 0,01  $\mu\text{mol/l}$ : en celdas de 10 cm de trayecto óptico, eso corresponde a una absorbencia de 0,005 aproximadamente.

El método no es afectado de manera apreciable por las variaciones de salinidad hasta 5  $\mu\text{mol/l}$ ; pero se observa un ligero efecto de sal por encima de esta concentración; 2% a nivel de 10  $\mu\text{mol/l}$  y 5% a nivel de 20  $\mu\text{mol/l}$ . (SCOR-IOC-UNESCO/CSK, 1969).

La temperatura no incluye sobre la reacción entre 15 y 25 °C.

## **3.-MUESTREO**

- Utilizar frascos de plástico o de vidrio de 125 ml, lavados al agua destilada.
- Lavar varias veces el frasco con el agua a analizar antes de llenarlo; el agua será pre-filtrada a 50  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

## **4.-CONSERVACIÓN.**

La muestra, colocada al abrigo de la luz y a baja temperatura, debe ser analizada en las 5 horas que siguen el muestreo; si no; congelar inmediatamente a bordo o, en caso de imposibilidad, enfriar a 4 °C en una cava y congelar el mismo día al llegar al laboratorio.

## **5.-EQUIPOS**

Se debe disponer de un espectrofotómetro o de un colorímetro equipado con un filtro que posee un máximo de transmisión de 540 nm, aproximadamente, pudiendo aceptar celdas de hasta 10cm de trayecto óptico. Los distribuidores automáticos de reactivos son muy útiles.

## **6.-REACTIVOS.**

### **6.1.-REACTIVO 1 :SOLUCIÓN DE SULFANILAMIDA**

Para preparar 500 ml de reactivo:

.- Diluir 50 ml de ácido clorhídrico concentrado ( $d = 1,18$ ) en 300 ml de agua destilada o desmineralizada.

.- Disolver 5 g de sulfanilamida en esta solución y completar a 500 ml.

Esta solución es estable indefinidamente.

### **6.2.- REACTIVO 2: SOLUCIÓN DE N-NAFTIL-ETILENDIAMINA.**

En 500 ml de agua destilada, disolver 0,5 g de diclohidrato de N -(1-naftil)-etilendiamina.

Conservar esta solución en el frío y al abrigo de la luz, cambiarla todos los meses o desde que aparezca una coloración marrón.

### **6.3.-SOLUCIÓN PATRON PRIMARIO DE NITRITO.**

Secar a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante varias horas nitrato de sodio anhidro  $\text{NaNO}_2$  de pureza garantizada.

Disolver 0,345 g en el agua destilada, completar a 1000 ml y añadir 1 ml de cloroformo, transferir la solución a un frasco de vidrio ámbar:

1 ml contiene  $5\text{ }\mu\text{mol/l}$  de  $\text{N-NO}_2^-$

Conservar en frío y al abrigo de la luz, esta solución es estable durante 1 a 2 meses.

### **6.4.-SOLUCIÓN PATRON SECUNDARIO DE NITRITO.**

Diluir 100 veces la solución patrón primario para obtener la solución secundaria:

1 ml contiene  $0,005\text{ }\mu\text{mol/l}$  de  $\text{N-NO}_2^-$

Esta solución debe ser preparada extemporáneamente; ella se conserva solamente durante unas horas.

## **7.-MODO DE OPERACIÓ**

### **7.1.-PROCESO GENERAL.**

La temperatura de las muestras debe estar comprendida entre  $15$  y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se procede de la manera siguiente:

.- Lavar un erlenmeyer de 150 ml con el agua a analizar e introducir  $50\text{ ml} \pm 1\text{ ml}$  de la muestra (el volumen de  $50 \pm 1\text{ ml}$  fijado para el análisis no es absolutamente crítico ; la adición de los reactivos provoca simplemente una ligera dilución de la muestra.

El volumen de los reactivos siendo pequeño en comparación con el volumen de la muestra (4%), una variación de  $\pm 5$  ml del volumen de la muestra no provoca un error superior a  $\pm 0,8$  % sobre el resultado.

- Añadir 1,0 ml de reactivo 1 y mezclar.
- Dejar reposar de 2 a 8 minutos.
- Añadir 1,0 ml del reactivo 2 y mezclar de nuevo.
- Esperar a los menos 10 minutos pero no más de 2 horas.
- Medir la absorbencia en celdas de 10 cm de trayecto óptico a la longitud de onda de 543 nm, tomando el agua destilada como referencia; sea  $A_{tr}$  este el valor.

## **7.2.- CALIBRACIÓN.**

- Preparar el patrón secundario.
- Introducir en matraces aforados de 500 ml, 1-2-5-10 ml, etc, del patrón secundario y completar a 500 ml con agua de mar pobre en nitrito ( $<0,2$   $\mu\text{mol/l}$ ) a fin de obtener la gama de concentraciones; 0,1-0,2-0,5-1  $\mu\text{mol/l}$ , etc.
- Efectuar dos análisis de cada uno de esos patrones, así como del agua de mar no dopada, según el procedimiento descrito anteriormente.

- Efectuar dos análisis de cada uno de esos patrones, así como del agua de mar no dopada, según el procedimiento descrito anterior.

- Sustraer de las medidas el valor obtenido con el agua de mar no dopada y trazar la curva de calibración (origen de las coordenadas es un punto significativo)

En celdas de 10 cm, la absorbencia es de aproximadamente 0,5 para  $\mu\text{mol/l}$ .

## **7.3.-BLANCOS.**

Las medidas de densidad óptica sobre las muestras deben sufrir dos correcciones de blancos.

### **7.3.1.- BLANCO DE TURBIDEZ.**

Es la absorbencia de la muestra bruta medida contra el agua destilada; sea  $b_t$  este el valor.

### **7.3.2.- BLANCO DE REACTIVOS.**

Es la absorbencia producida por los mismos reactivos (coloración propia o presencia de nitrito). La medida de este blanco necesita disponer de agua absolutamente libre de nitrito. Tomar agua frescamente destilada o desmineralizada y añadir los reactivos como para un análisis normal. Hacer dos determinaciones como mínimo y medir la absorbencia contra el agua destilada; sea  $b_r$  el valor medio.

## 8.- CALCULO Y RESULTADOS

Sea:

- .- $A_{tr}$  la absorbencia medida para la muestra tratada
- .- $b_t$  la absorbencia medida para el blanco de turbidez
- .- $b_r$  la absorbencia medida para el blanco de los resultados.

La absorbencia neta es:  $A = A_{tr} - b_t, b_r$ .

Este valor de A es reportado sobre la curva de calibración para deducir la concentración de la muestra: Se puede igualmente determinar la pendiente p de la curva de calibración en  $\mu\text{mol/l}$  por unidad de absorbencia. En ese caso, la concentración es :

$$[\text{N- NO}_2] \mu\text{mol/l} = p \times A.$$

## ANÁLISIS DEL NITRÓGENO NITRICO.

El ión nitrato es la forma oxidada estable del nitrógeno en solución acuosa. Este ión no presenta facultades de complicación o de adsorción. El entra en el ciclo del nitrógeno como soporte principal del crecimiento del fitoplancton. El es regenerado, a partir de las formas orgánicas, por las bacterias. Cuando la velocidad de regeneración llega a ser inferior a la velocidad de utilización, los iones nitrato son un factor limitante del crecimiento de las algas y su concentración queda casi siempre inferior a los límites de detección del análisis. Esta situación se encuentra frecuentemente en medio oceánico, en superficies, o en aguas costeras durante el verano. Al contrario, las aguas oceánicas profundas son ricas en nitrato (hasta aproximadamente 40  $\mu\text{mol/l}$ ) que puedan venir a enriquecer las capas superiores en las zonas de sugerencia. En aguas costeras, las concentraciones durante los meses de invierno son del orden de 10 a 15  $\mu\text{mol/l}$ , la producción primaria siendo despreciables. En los estuarios, cuando la salinidad disminuye, el efecto de los aportes terrestres es importantes y las concentraciones pueden alcanzar, a bajas salinidades, varias centenas de micromoles por litros.

### 1.- PRINCIPIO DEL MÁTODO.

Varios métodos de análisis han sido aplicados al agua de mar, pero; teniendo en cuenta las bajas concentraciones oceánicas y las posibles interferencias, el método retenido casi universalmente es el que está basado en el análisis de los iones nitrito obtenidos por reducción cuantitativa (> 95%) de los iones nitrato. Se mide en realidad la suma de la concentración en iones  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ . Por sustracción de la concentración en nitrito, determinada sin reducción, se obtiene la concentración de nitrato.

La reducción es efectuada por un pasado de la muestra sobre una columna de cadmiun tratada con cobre (Word et al., 1967). El método aquí descrito contiene solamente una pequeña modificación con respecto al método original; se utiliza el cloruro de amonio en lugar del EDTA (Grasshoff, 1964), conformemente a los mejores resultados así obtenidos por Strickland and Parsons (1972).

Señalemos que una técnica de reducción sobre alambre de cadmiun ha sido igualmente propuesta por Gardner et al. (1976)

### 2.- DOMINIO DE APLICACIÓN

#### 2.1.- GAMA DE CONCENTRACIONES.

Idéntica a la de los iones nitrito, al gama de concentraciones se extiende de 0,05 a aproximadamente 25  $\mu\text{mol/l}$ ; sin dilución de la muestra.

#### 2.2.- PRECISIÓN.

Las precisiones dadas por Strickland and Parsons (1972), para una medida (nivel de confianza 95% ), son las siguientes:

- .- A nivel de 20  $\mu\text{mol/l}$  : media  $\pm 0,5$  n-  $\frac{1}{2}$   $\mu\text{mol/l}$
- .- A nivel de 1  $\mu\text{mol/l}$ : media  $\pm 0.05$  n-  $\frac{1}{2}$   $\mu\text{mol/l}$ .

### **2.3.- LIMITE DE DETECCIÓN.**

La precisión, menos buenas que la obtenida en el caso de los iones  $\text{NO}_2^-$ , limita la detección a 0,05  $\mu\text{mol/l}$  aproximadamente, APRA un trayecto óptico de 10 cm.

### **2.4.- INTERFERENCIAS.**

La reacción es considerada como libre de interferencia (ver nitrito). Los sulfuros eventuales presentes serían fijados en la cabeza de la columna reductora y no interferencia; su presencia al mismo tiempo que los nitratos parece de todas formas extremadamente sospechosa (Grasshoff, 1976).

## **3.- TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO**

.- Utilizar frascos de vidrio o de plástico de 150 a 200 ml de capacidad lavados con agua destilada.

.- Lavar varias veces el frasco con el agua que va a ser analizada antes de llenarlo; el agua es pre-filtrada a 50  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

## **4.- CONSERVACIÓN**

La muestra, colocada en frío y al abrigo de la luz se conservan varias horas. Para una conservación más larga, congelar inmediatamente a bordo; en caso de imposibilidad, enfriarla a 4 °C en una cava y congelarla al regreso al laboratorio.

## **5.- EQUIPOS**

A parte del material necesario para el análisis de los iones nitrito, se debe disponer de columnas de vidrio, equipadas eventualmente con un sifón o una llave, en las cuales se introduce el reductor. La figura 1 presenta dos posibilidades de montaje de los cuales uno esta equipado con una bomba peristáltica.

## **6.- REACTIVOS**

### **6.1.- REACTIVO 1 : SOLUCIÓN DE SULFANILAMIDA**

El mismo reactivo que para el análisis de los iones nitrito.

### **6.2.- REACTIVO 2 : SOLUCIÓN DE N-NAFTIL-ETILENDIAMINA**

El mismo reactivo que para el análisis de los iones nitrito

### **6.3.-SOLUCIÓN PATRÓN DE NITRITO**

La misma solución que para el análisis de los iones nitrito

### **6.4.- SOLUCIÓN PATRÓN DE NITRATO**

Disolver 0,506 g de nitrato de potasio anhidro en 1 l de agua destilada, añadir 1 ml de cloroformo :

1 ml contiene 5  $\mu\text{mol/l}$  de  $\text{N-NO}_3 =$

La solución es estable varios meses si se conservar en frío y al abrigo de la luz.

### **6.5.- SOLUCIÓN CONCENTRADA DE CLORURO DE AMONIO**

Prepara una solución disolviendo 250 g de cloruro de amonio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por litro de agua destilada.

### **6.6.-SOLUCIÓN DILUIDA DE CLORURO DE AMONIO**

Diluir 40 veces la solución anterior con agua destilada (25 ml por l de solución).

### **6.7.- SOLUCIÓN DE SULFATO DE COBRE**

En 500 ml de agua destilada, disolver 10 g de sulfato de cobre ponte hidratado ( $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$ ).

### **6.8.- COLUMNA REDUCTORA.**

De esta columna depende la validez de los resultados, así ella debe ser preparada y mantenida con gran cuidado.

#### **6.8.1.- PREPARACIÓN DEL CADMIUM.**

.- Tamizar el cadmium en granos para guardar la fracción comprendida entre 0,5 y 2mm.

.- Lavar aproximadamente 50 g de granos con ácido clorhídrico 2 normal y luego lavar al agua destilada.

.- Lavar rápidamente con ácido nítrico 0,3 normal y luego lavar al agua destilada.

.- Lavar nuevamente con el ácido clorhídrico 2 N para eliminar los iones  $\text{NO}_3^-$  y luego lavar abundantemente con agua destilada.

.- Tratar el cadmium con 100 a 150 ml de solución de sulfato de cobre; en un erlenmeyer agitar el cadmium con esta solución y dejarlo en contacto durante varios minutos; la solución se decolora.

.- Lavar abundantemente con agua destilada, dejando desbordar el agua para no dejar jamás el cadmium en contacto con el aire, hasta eliminar las partículas más finas que se encuentran en suspensión.

#### **6.8.2.- LLENADO Y TRATAMIENTO DE LA COLUMNA.**

.- Meter a la base de la columna lana de vidrio, para retener el cadmium.

.- Llenar completamente la columna con la solución diluida de cloruro de amonio.

- Llenar de agua el erlenmeyer que contiene el cadmium y adaptarle un tapón que contenga un tubo de vidrio como se indica en la figura 2 (el agua debe llenar el tubo).
- Voltar el erlenmeyer en la columna sin hacer entrar aire y hacer caer el cadmium poco a poco hasta una altura de 15 a 25 cm golpeando la columna para obtener un depósito regular.
- Lavar abundantemente la columna con la solución diluida de cloruro de amonio.
- Regular el pesaje de la solución para que sea comprendido entre 8 y 12 ml por minuto; un pasaje muy lento puede provenir de la mala colocación de la lana de vidrio al pie de la columna (muy apretada).
- Meter un poco de lana de vidrio en la cabeza de la columna.
- Dejar la columna en medio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  diluido por un periodo de 24 a 48 horas cambiando varias veces la solución.
- Antes de la primera utilización, pasar por la columna 3 a 4 litros de agua de mar dopada con nitrato, aproximadamente 50  $\mu\text{mol/l}$ , a fin de estabilizar el rendimiento.

### **6.8.3.-UTILIZACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA COLUMNA.**

- La columna no debe jamás quedar seca.
- Después de cada serie de análisis, lavar la columna con la solución diluida de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y conservarla en este medio entre las utilidades.
- Si la columna queda sin ser utilizada por más de una hora, lavarla con 50 ml de la solución diluida de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  antes de pasar una muestra.
- Cada día, antes de comenzar la serie de análisis, pasar por la columna 100 ml de agua de mar dopada con nitrato a 100 150  $\mu\text{mol/l}$  y adicionada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 ml de solución concentrada por 100 ml de agua).

### **6.8.4.- TIEMPO DE VIDA, REGENERACIÓN DEL REDUCTOR.**

Se constata que la utilización frecuente de la columna mejora la estabilidad de la reducción y el tiempo de vida del reductor. En esas condiciones una columna puede durar varios meses (Grasshoff, 1976). Las pequeñas concentraciones reducen el tiempo de vida de la columna.

Si el rendimiento llega a ser muy pequeño, hay que reactivar o regenerar el reductor. Se puede intentar la reactivación según el método de Otsuki (1978); pasar por la columna durante 5 a 10 minutos, a la misma velocidad de una muestra, una solución conteniendo 38g/l de EDTA disódico y 12,5g/l de  $\text{CuSO}_4$  con pH de 7 y fijado con la ayuda de NaOH a 40g/l.

Si la reactivación no es satisfactoria, hay que regenerar el reductor; vaciar la columna y tratar el cadmium como se describió anteriormente.

## **7.- MODO DE OPERACIÓN.**

### **7.1.- PROCESO GENERAL.**

#### **7.1.1.- ANALISIS DE LA CONCENTRACIÓN TOTAL NITRATO + NITRITO.**

- Tomar  $100 \pm 2$  ml de la muestra, añadir 2,0 ml de la solución concentrada de cloruro de amonio y mezclar.

- Verter aproximadamente 5 ml de esta solución en la columna y dejarlo pasar; este procedimiento disminuye considerablemente los riesgos de interferencia entre muestras sucesivas..

- Vertir el resto de la muestra.

- Botar los 30 primeros mililitros.

- Lavar un cilindro graduado de 100 ml con algunos mililitros de la solución que sale de la columna y tomar 50 ml del efluente.

- Añadir inmediatamente 1,0 ml del reactivo 1 y mezclar.

- Dejar reposar de 2 a 8 minutos.

- Añadir 1,0 ml del reactivo 2, mezclar.

- Esperar al menos 10 minutos pero no más de 2 horas.

- Medir la absorbencia en celdas de 1 cm a 543nm, contra el agua destilada; sea  $A_{tr}$  esta medida.

### **.- REMARQUE**

-El tiempo de pasaje por la columna debe ser siempre el mismo para toda una serie de muestra y de patrones. Este tiempo ha sido previamente ajustado para obtener el rendimiento optimo (ver más adelante).

- Si se sospecha que la concentración de la muestra es superior a 25  $\mu\text{mol/l}$ , es necesario efectuar una dilución, antes de añadir los reactivos, para que la concentración sea inferior a ese valor.

### **7.1.2.- ANALISIS DE LOS IONES NITRITO.**

Tomar  $50 \pm 1$  ml de la muestra, añadir 1,0 ml de la solución concentrada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y mezclar; seguir el análisis como por los 50 ml del efluente recuperado de la columna.

### **7.2.- CALIBRACIÓN.**

Teniendo en cuenta que los iones nitrato son reducidos en nitrito por pasaje por la columna, la calibración es efectuada con soluciones de nitrito.

- Introducir, en los matraces aforados de 500 ml 0,25-1-1,5-5-2,5 ml de la solución patrón y completar a 500 ml con agua de mar pobre en nitrito ( $< 1 \mu\text{mol/l}$ ) para obtener la gama de concentraciones; 2,5-5-10-15-20 y 25  $\mu\text{mol/l}$ .

- Tomar  $50 \pm 1$  ml de cada una de esas soluciones, añadir 1,0 ml de la solución concentrada de cloruro de amonio y mezclar; hacer lo mismo con el agua de mar utilizada para la dilución.

- Proseguir los análisis sobre cada una de esas soluciones así como para el agua de mar bruta según el procedimiento descrito en el párrafo 7.1.1.-. Realizar los análisis por duplicado y tomar el valor promedio.

- Sustraer de las medidas el valor de la absorbencia obtenido con el agua de mar no dopada y construir la curva de calibración (el origen de las coordenadas es un punto significativo).

### 7.3.- CONTROL DEL RENDIMIENTO DE LA REDUCCIÓN.

El rendimiento puede variar de una columna a otra y en el transcurso del tiempo para la misma columna; es púes necesario su control antes de cada serie de análisis. Este control sirve igualmente a ajustar la velocidad de pasaje para obtener el rendimiento máximo.

- Preparar una solución de 20  $\mu\text{mol/l}$  de nitrito introduciendo en un matraz aforado 2,00 ml de la solución patrón de nitrato y completando a 500 ml con el agua de mar pobre en nitrato y en nitrito.

- Hacer un análisis por duplicado de esta agua de mar dopada y del agua der bruta, según los procedimiento descrito en 7.1.1.-.

- Hacer la diferencia de los dos valores medios de absorbencia y reportarse a la curva de calibración para deducir la concentración en nitrato obtenida después del pasaje por la columna.

- Calcular el rendimiento de la reducción (sea R este valor : $R < 1$ )

El rendimiento puede variar ligeramente con la salinidad. En el caso de las aguas estuarios, por ejemplo; o cuando es necesario diluir las muestras, es importante de controlar el rendimiento a diversas salinidades.

- Diluir un agua de mar pobre en  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  y de salinidad conocida con el agua destilada.

- Proceder como descrito aquí arriba

- Tener en cuenta la salinidad de la muestra efectivamente pasada por la columna, considerando las diluciones efectuadas, para las correcciones eventuales.

### 7.4.-CONTROL DE LA REDUCCIÓN DE LOS IONES NITRITO.

Un pequeño porcentaje de iones nitrito puede ser reducido por la columna. Ese porcentaje crece y llega a ser aleatorio cuando la columna envejece. Es necesario conocerlo si se realizan análisis de aguas que presentan una razón  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  elevada.

Para la medida, proceder exactamente como para la medida del rendimiento de reducción de los iones nitrato pero preparando en lugar de la solución de nitrato una solución de nitrito de 20  $\mu\text{mol/l}$  en el agua de mar. Sea r la fracción de los iones nitrito no reducida por la columna.

### 7.5.- BLANCOS

#### 7.5.1.- BLANCOS DE TURBIDEZ.

El blanco de turbidez  $b_t$  es generalmente despreciable en celdas de 1 cm pero debe ser medido para controlarlo sobre una fracción de muestra recogida a la salida de la columna.

#### 7.5.2.- BLANCO DE REACTIVOS.

Para medir el blanco de los reactivos  $b_r$ , se debe utilizar el agua desmineralizada o frescamente destilada. Tomar 100 ml de agua y aplicar el procedimiento completo del párrafo

7.1.-; hacer dos determinaciones. Este blanco es generalmente pequeño y no debe exceder 0,1 unidades de absorbencia en celdas de 10 cm.

## 8.- CALCULOS Y RESULTADOS

Sea;

- .-  $A_{tr}$ : la absorbencia medida para la muestra tratada.
- .-  $b_t$  : la absorbencia medida para el blanco de turbidez.
- .-  $b_r$  : la absorbencia medida para el blanco de los reactivos.
- .-  $R$  : el rendimiento de la reducción de los iones nitrato en nitrito ( $R < 1$ ).
- .-  $r$  : la fracción de iones nitrito no reducidos por la columna ( $r < 1$ ).

La absorbencia neta de la muestra es  $A = A_{tr} - b_t - b_r$ .

Este valor de  $A$  es reportado sobre la curva de calibración para deducir la concentración total de nitrito después de pasada la solución por la columna, sea  $C$  esta concentración.

Si  $[NO_3^-]$  y  $[NO_2^-]$  son las concentraciones respectivas en micromoles por litro de los iones  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$  en la muestra a analizar, se mide, después de pasaje por la columna:

$$C = R \times [NO_3^-] + r \times [NO_2^-]$$

De donde:

$$[NO_3^-] \text{ umol/l} = C \times 1/R - [NO_2^-] \times r/R.$$

$[NO_2^-]$  es conocida por medida directa de la muestra no pasada por la columna.

En la mayoría de los casos la razón  $r/R$  puede ser tomada como igual a la unidad. La transformación en otras unidades diferentes al umol/l se efectúa como se indica en la tabla I.

## ANÁLISIS DEL FOSFORO MINERAL DISUELTO

El fósforo es un elemento nutritivo y su forma mineral mayorista, ortofosfato, es esencial a la vida acuática. En el agua de mar, los ortofosfatos están presentes esencialmente bajo las dos formas  $\text{PO}_4^{3-}$  (10%) y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (90%);  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  representa menos del 1%.

Las concentraciones en ortofosfatos son generalmente muy bajas en la superficie del medio oceánico y costero no contaminado; 0 a 1  $\mu\text{mol/l}$ . Estas aumentan con la profundidad, por debajo de la zona eufórica, o cuando nos acercamos a los estuarios. Las aguas profundas tienen una concentración del orden de los 3  $\mu\text{mol/l}$  que varía ligeramente según la zona oceánica considerada. En los estuarios, concentraciones muy elevadas pueden ser alcanzadas; varias decenas de micro moles por litros según la salinidad. Esas concentraciones elevadas, índice de un enriquecimiento de origen doméstico y agrícola, son consideradas como al origen del fenómeno de eutrofización.

Al momento del crecimiento fitoplanctónico primaveral, el fósforo es consumido y puede descender hasta el límite de detección de los métodos corrientes de análisis ( $< 0,01 \mu\text{mol/l}$ )

En las aguas salobres turbias la concentración en fosfato en la fase líquida puede depender de la concentración y de la naturaleza de las partículas en razón de los fenómenos de absorción.

### 1.- PRINCIPIOS DEL MÉTODO.

El método de Murphy and Riley (1962); es todavía en nuestros días uno de los más rápidos y de los más simples para el análisis de los iones ortofosfato en el agua de mar. Los iones fosfatos reaccionan con el molibdato de amonio, en presencia de antimonio (II), para formar un complejo que es luego reducido por el ácido ascórbico; ésta forma reducida, de coloración azul, tiene un máximo de absorción a 885 nm. Este compuesto azul contiene al fósforo, al molibdeno y al antimonio en las proporciones atómicas 1-12-1. Los polifosfatos y el fósforo orgánico no son analizados por este método.

### 2.-DOMINIO DE APLICACIÓN.

#### 2.1.- GAMA DE CONCENTRACIÓN.

El dominio de concentraciones que puede ser estudiado es muy extendido; de 0,02 a 28  $\mu\text{mol/l}$  según Koroleff (1976). Según Riley et al (1972), la relación concentración-absorbencia sería lineal hasta 70  $\mu\text{mol/l}$ .

#### 2.2.- PRECISIÓN.

Strickland and Parsons (1972), dan las precisiones siguientes: para n medida (nivel de confianza 95%):

.- al nivel de 3  $\mu\text{mol/l}$  : media  $\pm 0,03 n^{-1/2} \mu\text{mol/l}$ ,

.- al nivel de 0,3  $\mu\text{mol/l}$  : media  $\pm 0,02 n^{-1/2} \mu\text{mol/l}$ .

Riley et al, (1972) confirman esos valores:  $\pm 1 \%$  al nivel de 2  $\mu\text{mol/l}$ .

### **2.3.- LIMITE DE DETECCIÓN.**

La más pequeña cantidad de fosfato detectada con seguridad es de aproximadamente 0,02  $\mu\text{mol/l}$ ; en celdas de 10 cm de trayecto óptico, esto corresponde a una absorbencia de 0.005 aproximadamente.

### **2.4.- INTERFERENCIAS.**

Los iones arseniatos reaccionan de manera idéntica a los iones fosfato pero su concentración, 0,04  $\mu\text{mol/l}$  aproximadamente, es suficientemente pequeña para ser generalmente despreciable. Sin embargo, Johnson (1971) presume que este no es siempre el caso en periodo de agotamiento de los elementos nutritivos debido al crecimiento fitoplanctónico. Además, la velocidad de reacción es más lenta para el arseniato que para los iones fosfato y si la medida se efectúa rápidamente, la interferencia es evitada.

El hierro, el cobre y los silicatos interfieren solamente a concentraciones muy superiores a las que se encuentran en el agua de mar. Los sulfuros no interfieren a concentraciones inferiores a 2 mg/l. En el caso de concentraciones más elevadas, los sulfuros pueden ser eliminados por diferentes métodos (Koroleff, 1976).

Las partículas en suspensión pueden perturbar las medidas, no solamente por la turbidez provocada, sino igualmente por el hecho de que los compuestos orgánicos y minerales del fósforo absorbidos a su superficies son susceptibles de reaccionar con el molibdato en las condiciones operatorias; se encuentran en particular los fosfatos de calcio y de hierro así que los fosfatos

Provenientes de las células vegetales (Strickland and Parsons, 1972). La temperatura no incluye sobre el desarrollo de la coloración entre 15 y 30 °C. La salinidad no tiene ninguna influencia entre 0 y 35%.

## **3.- TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO**

### **3.1.- ENVASES.**

Se utilizan frascos de 150 a 200 ml, lavados con agua destilada acidificada. Ellos deben ser preferiblemente de vidrio aunque el plástico puede ser utilizado. En este último caso, es necesario controlar la ausencia de absorción en las paredes de cada frasco. Para esto introducir en varios frascos agua de mar filtrada con una concentración de fosfato conocida, enseguida, después de haber dejado los frascos en el refrigerador durante una noche, medir de nuevo la concentración; ésta no debe haber disminuido.

### **3.2.- MUESTREO.**

Lavar varias veces los frascos con agua a analizar antes de llenarlos; el agua es prefiltrada a 50  $\mu\text{m}$ . Tener mucha atención con las posibles contaminaciones durante la manipulación y el llenado de los frascos.

#### **4.- CONSERVACIÓN**

No existe ningún procedimiento plenamente satisfactorio para la conservación prolongada de los iones fosfato. Las muestras deben ser colocadas inmediatamente en el congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). En caso de imposibilidad, conservarlas en una cava hasta su congelación. Solamente las muestras filtradas pueden eventualmente ser preservadas añadiéndole 0,5 ml cloroformo por cada 100 ml (Jones, 1963).

#### **5.- EQUIPO**

Se debe disponer de un espectrofotómetro, o de un colorímetro equipado con un filtro teniendo un máximo de transmisión a 885 nm aproximadamente, pudiendo aceptar celdas de hasta 10 cm trayecto óptico.

#### **6.- REACTIVOS**

##### **6.1.- SOLUCIÓN DE MOLIBDATO DE AMONIO.**

Disolver 15 g de paramolibdato de amonio << para análisis >>  $(\text{NH}_4)_6 \text{MoO}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , de preferencia en polvo fino, en 500 ml de agua destilada o desmineralizada. En frasco plástico y al abrigo de la luz, esta solución estable indefinidamente.

##### **6.2.- ACIDO SULFURICO 2,5 mol/l.**

Añadir poco a poco, con precaución, 140 ml de ácido sulfúrico ( $d = 1,84$ ) << para análisis >> a 900 ml de agua destilada. Dejar enfriar y conservar en botella de vidrio bien cerrada.

##### **6.3.- SOLUCIÓN DE ACIDO ASCORBICO.**

Disolver 54 g de ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) en 500 ml de agua destilada. En frascos de plástico, esta solución se conserva varios meses en el congelador; descongelándola solamente antes de su utilización y recongelándola inmediatamente después de su uso. En el refrigerador, en frasco protegido de la luz, se puede conservar algunas semanas.

##### **6.4.- SOLUCIÓN DE OXITARTRATO DE POTASIO Y DE ANTIMONIO.**

Disolver 0,34 g de oxitrato de potasio y de antimonio (III),  $K(SbO)C_4H_4O_6$ , en 250 ml de agua destilada calentando si es necesario. Esta solución se conserva varios mese en el refrigerador.

### **6.5.- MEZCLA REACTIVA**

Mezclar los reactivos previamente descritos en las proporciones siguientes:

- .- 100 ml de la solución de molibdato de amonio,
- .- 250 ml de ácido sulfúrico 2,5 mol/l,
- .- 100 ml de la solución de ácido ascórbico,
- .- 50 ml de la solución de oxitartrato de potasio y de antimonio.

Esta mezcla reactiva que no se conserva más de 6 horas debe ser preparada antes de cada serie se análisis. La cantidad así preparada permite el análisis de 50 muestras; no conservar todo exceso de reactivo inutilizable después de 6 h. Notar que se puede preparar una mezcla reactiva estable si no se introduce el ácido ascórbico la mezcla completa debe ser preparada a medida de la necesidades añadiendo la solución de ácido ascórbico en las proporciones indicadas.

### **6.6.- SOLUCIÓN PATRÓN PRIMARIO DE FOSFATO.**

Secar a 100 °C en un desecador, sobre  $H_2SO_4$  concentrado, el dihidrógenofosfato de potasio anhidro ( $KH_2PO_4$ ) de calidad<<para análisis>>. Disolver 0,6805 g en 1 L de agua destilada y añadir 1 ml de cloroformo:

1 ml contiene 5 umol de  $PO_4^{3-}$ .

Esta solución es estable varios meses en el refrigerador.

### **6.7.- SOLUCIÓN PATRÓN SECUNDARIO DE FOSFATO.**

Diluir 100 veces la solución patrón primario 10 ml completados a 1000 ml con agua destilada. Meterla en un frasco marrón con 1 ml de cloroformo:

1 ml contiene 0,05 umol de  $PO_4^{3-}$ .

Esta solución que debe ser colocada en el refrigerador se conserva algunas semanas, pero, para más seguridad, cambiarla todos los 10 días aproximadamente.

## **7.- MODO DE OPERACIÓN**

### **7.1.- PROCESO GENERAL.**

La temperatura de la muestras debe estar comprendida entre 15 y 30 °C.

Se procede de la manera siguientes:

- .- Preparar la mezcla reactiva,

- .- Medir 100 ml de la muestra
- .- Añadir  $10 \pm 0,5$  ml de la mezcla reactiva y mezclar inmediatamente.
- .- Esperar 5 minutos y medir la absorbencia a 885nm en celdas de 10 cm de trayecto óptico, contra el agua destilada; Sea  $A_{tr}$  esta medida.

Según Riley et al. (1972), la absorbencia es estable durante varias horas después de la formación de la coloración. Koroleff (1976), aconseja sin embargo de efectuar la lectura en menos de una media hora y si posible a los 5 minutos después de haber añadido los reactivos para eliminar totalmente los riesgos de interferencia de algunos iones.

## **7.2.- CALIBRACIÓN**

.- Introducir en matraces aforados de 500 ml; 1-2-5-10-20 ml, etc. De solución patón secundario y completar a 500 ml con agua de mar pobre en fosfato ( $<0,2 \text{ umol/l}>$ ) para obtener la gama de concentraciones siguientes: 0,1-0,2,-0,5-1-2 umol/l, etc., de  $\text{PO}_4^{3-}$ .

.- Hacer dos análisis de cada una de esas soluciones así como del agua de mar de dilución según el proceso descrito anteriormente.

.- Sustraer de las medidas de absorbencia el valor obtenido con el agua de mar bruta y trazar la curva de calibración (el origen de las coordenadas es un punto significativo).

La reacción siendo independiente de la salinidad, esta calibración puede ser efectuada indiferentemente con el agua destilada o con el agua de mar. Una vez que la curva de calibración halla sido establecida, se analizará por duplicado al menos un patrón, o con cada serie de análisis. Se controla así la calidad de los reactivos y la reproductibilidad analítica.

## **7.3.- BLANCOS.**

### **7.3.1.- BLANCOS DE TURBIDEZ**

Medir la absorbencia del agua de mar bruta, sin añadir los reactivos, contra el agua destilada; sea  $b_t$ . Esta turbidez puede ser apreciable en las aguas superficiales, pero no debe pasar 0,05 a 0,1 unidades de absorbencia en celdas de 10 cm para que las medidas sea válidas

### **7.3.2.- BLANCO DE OS REACTIVOS**

Tomar 100 ml de agua frescamente destilada o desmineralizada añadir 10 ml de la mezclas de reactivos; tomar la medida de dos medidas; sea  $b_r$ . Este blanco no es despreciable y debe ser efectuado con cada serie de análisis. Por encima de una absorbencia de 0,02 en celdas de 10 cm, debe sospecharse del milobdato de amonio después de haber verificado la buena calidad del agua destilada o desmineralizada.

## **8.- CALCULOS Y RESULTADOS**

Sea;

- .-  $A_{tr}$  : la absorbencia medida para la muestra tratada,
- .-  $b_t$  : la absorbencia medida para el blanco de turbidez,
- .-  $b_r$ : la absorbencia medida para el blanco de los reactivos.

La absorbencia neta es  $A = A_{tr} - b_t - b_r$ .

Este valor de A es llevado sobre la curva de calibración para deducir la concentración de la muestra.

Se puede igualmente determinar la pendiente p de la curva de calibración en  $\mu\text{mol/l}$  por unidades de absorbencia. En este caso la concentración es :

$$[\text{PO}_3^{4-}] \mu\text{mol/l} = p \times A.$$

.- p depende de la longitud de la celdas utilizadas. La transformación en otras unidades diferentes al  $\mu\text{mol/l}$  se efectúa como se indica en la tabla I.

tableau x.1

UNITES D

EXPRESSION DU

POUR EXPRIMER LA CONCENTRATION EN	MULTIPLIER LES UMOL/L <sup>1-</sup> par
mg.l <sup>1-</sup> de phosphore sous forme d orthophosphate (P-PO <sub>3</sub> <sup>4-</sup> )	0,031
mg.l <sup>1-</sup> d orthophosphate (PO <sub>3</sub> <sup>4-</sup> )	0,095

PHOSPHORE MINERAL DISSOUS

## ANÁLISIS DEL SILICIO DISUELTO REACTIVO

El silicio es un elemento nutritivo puesto que el entra en la composición de los esqueletos de algunas especies fitoplanctónicas (diatomeas, radiolarios,..) a las cuales él es indispensable.

La concentración de las aguas oceánicas superficiales puede ser muy baja ( $< 1 \mu\text{mol/l}$ ). Las concentraciones aumentan progresivamente cuando nos acercamos de las costas y en particular de los estuarios. Las aguas dulces son en efecto más cargadas que las aguas marinas superficiales; su concentración puede alcanzar varias centenas de micro moles por litro. Las concentraciones de las aguas oceánicas profundas alcanzan en algunas zonas aproximadamente  $150 \mu\text{mol/l}$ , pero la concentración varías en proporciones muy largas de un océano a otro. Al momento del crecimiento fitoplanctónico primaveral, las concentraciones de silicio en la zona eufórica pueden caer a algunas decenas de micromol por litro y llegar a ser indetectables por los métodos corrientes de análisis. Al pH habitual del agua de mar (8,2), el silicio disuelto se encuentra en un 95% bajo la forma de ácido ortosilícico,  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , 5% estando bajo la forma ionizada  $\text{SiO}(\text{OH})_3^-$ .

### 1.- PRINCIPIO DEL MÉTODO

El análisis es efectuado según el método de Mullin and Riley (1955), adaptado por Strickland and Parsons (1972). El análisis colorimétrico está basado en la formación de un complejo silicomolibdico que, después de su reducción da lugar a una coloración azul intensa.

El ácido ortosilícico tiene tendencia a formar polímeros de los cuales las formas mono- y dímeros reaccionan con los iones molibdato en las condiciones del análisis, de donde la expresión silicio reactivo más apropiada. De hecho, en el agua de mar, el ácido ortosilícico no está polimerizado. Por otro lado en el agua dulce la presencia de polímeros es bastante discutida (Riley et al .1972). En las condiciones de la reacción, los silicatos coloidales son medidos junto con los silicatos disueltos por este método (Koroleff, 1976).

### 2.- DOMINIO DE APLICACIÓN

#### 2.1.- GAMA DE CONCENTRACIONES.

Se puede medir concentraciones de 0,1 a  $140 \mu\text{mol/l}$ . Laley de Beer es seguida en toda esa gama.

#### 2.2.- PRECISIÓN.

Según Strickland and Parsons (1972), la precisión, para  $n$  medidas (nivel de confianza 95%), es la siguientes:

- a nivel de  $100 \mu\text{mol/l}$  : media  $\pm 2,5 n^{-1/2} \mu\text{mol/l}$ ,
- a nivel de  $10 \mu\text{mol/l}$  : media  $\pm 0,25 n^{-1/2} \mu\text{mol/l}$ .

Riley et al (1972), indican  $\pm 1,5$  % a nivel de 4  $\mu\text{mol/l}$ .

### **2.3.- LIMITE DE DETECCIÓN.**

En celdas de 10 cm de trayecto óptico la cantidad más pequeña detectada con certeza es de aproximadamente 0,1  $\mu\text{mol/l}$ .

### **2.4.- INTERFERENCIAS.**

La reacción es relativamente libre de interferencias; las condiciones de operación eliminan en particular la de los iones fosfato y arseniato. La salinidad influye sobre el desarrollo de la coloración. Se observa una reducción de la absorbencia de 10 % entre 0 y 35 %, de la salinidad; este efecto es proporcional a la salinidad. Los sulfuros no interfieren sino a concentraciones superiores a 5 mg/l. La temperatura no tiene ninguna influencia sobre la coloración entre 18 y 25 °C.

## **3.- MUESTREO Y ALMACENAMIENTO.**

NO se utilizarán frascos de vidrios sino exclusivamente en plásticos (polietileno, polipropileno,..); un frasco de 10 ml es suficientes. Lavar varias veces el frasco antes de llenarlo con el agua a analizar; el agua será pre-filtrada aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . No filtrar la muestra jamás sobre filtros de fibra de vidrio.

## **4.-CONSERVACIÓN**

La muestra colocada al abrigo de la luz y en frío debe ser analizada lo más tarde al día siguiente de la toma. Para una conservación más prolongada, congelar las muestras inmediatamente después de su toma.

La acidificación a razón de 1 ml de ácido sulfúrico 4,5  $\mu\text{mol/l}$  para 100 ml permite una excelente conservación de las aguas pobres en plancton, a la temperatura ambiente, durante algunos meses (Koroleff, 1976).

## **5.- EQUIPOS**

Se debe disponer de un espectrofotómetro o de un colorímetro equipado con filtro que posea un máximo de transmisión a 810 nm, aproximadamente, pudiendo recibir celdas de 10 cm de trayecto óptico. La reacción se efectúa de preferencia en probetas plásticas con tapas. La utilización de matraces aforados en plásticos es necesaria para evitar la contaminación de los patrones por el vidrio.

## **6.- REACTIVOS.**

### 6.1.- AGUA DESTILADA

Para los análisis de silicio, el agua destilada no debe ser almacenada en recipientes de vidrio. Utilizar recipientes en plástico. El agua destilada con la ayuda de un aparato de vidrio o de cuarzo contiene en general silicio en solución y no puede ser utilizada para realizar los blancos de los reactivos; se debe utilizar agua desmineralizada o agua destilada con un aparato metálico.

### 6.2.- REACTIVO 1 : REACTIVO CON MOLIBDATO

Para 500 ml de reactivo:

- Disolver 4,0 g de paramolibdato de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  en polvo fino en aproximadamente 300 ml de agua destilada.

- Añadir 12,0 ml de ácido clorhídrico concentrado ( $d = 1,18$ ). Mezclar y completar a 500 ml con agua destilada.

Esta solución, conservada en envase de polietileno y al abrigo de la luz; es estable durante varios meses, a pesar del depósito que se forma con el tiempo en las paredes.

### 6.3.- SOLUCIÓN DE METOL- SULFITO.

En 500 ml de agua destilada:

- Disolver 6g de sulfito de sodio anhidro,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,

- Añadir 10 g de metol (sulfato de p-metilaminofenol,  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ ); la disolución puede ser lenta.

- Filtrar la solución a través de papel de filtro ordinario y conservarla en una botella de polietileno bien hermética.

Esta solución se deteriora rápidamente y debe ser renovada todas las dos o tres semanas o si ella toma una coloración oscura.

### 6.4.-SOLUCIÓN SATURADA DE ACIDO OXALICO

Agitar 50 g de ácido oxálico << para análisis >>,  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , con 500 ml de agua destilada. Dejar decantar y tomar la solución. Esta solución es estable indefinidamente.

### 6.5.- SOLUCIÓN DE ÁCIDO SULFURICO AL 50% EN VOLUMEN.

Añadir, con precaución y mezclando continuamente, 250 ml de ácido sulfúrico concentrado ( $d = 1,84$ ) de calidad << para análisis >> a 250 ml de agua destilada.

### REACTIVO 2: REDUCTOR

Este reactivo reductor es obtenido mezclando sucesivamente, 250 ml de ácido sulfúrico aquí arriba descrito en el orden y en las proporciones siguientes:

- 100 ml de la solución de metol-sulfito,
- 60 ml de la solución de ácido oxálico,
- 60 ml de la ácido sulfúrico al 50%,
- completar con agua destilada hasta 399 ml.

Esta solución debe ser preparada antes de su utilización, ella no se conserva.

## **6.7.- SOLUCIÓN PATRON DE SILICIO**

Dos fuentes de silicio pueden ser utilizadas para preparar los patrones; el cuarzo y el hexafluorosilicato de sodio  $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ . Este último compuesto es considerado como pudiendo introducir un error del 5% por Riley et al. (1976). Por su parte, Strickland and Parsons (1972) y Koroleff (1976) toman en cuenta la impureza de este producto y pesan de 1 a 2 % de más. Grasshoff (1977) indica que los dos tipos de patrones dan resultados similares. Se encuentra actualmente  $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ , que presenta una pureza superior al 99%. (eje, CARLO ERBA n° 48005).

### **6.7.1.- PATRON A BASE DE CUARZO.**

Se utilizará cuarzo  $\text{SiO}_2$  muy puro y en cristales, barras o tubos molidos que hayan sido calentados a 1000 °C durante una hora y luego enfriado en un desecador.

Para preparar 1 L de solución:

- Pesar 0,3003 g de cuarzo en un crisol de platino,
- Añadir 1,5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhídrido <<para análisis>> y mezclar con una espátula metálica,
- Hacer fundir la mezcla y mantenerla a 1000 °C durante algunos minutos hasta que ella esté clara.
- Dejar enfriar y disolver el residuo con agua destilada calientes para transferirlo, sin pérdidas, a un matraz aforado en plástico de 1000 ml y completar;  
1 ml contiene 5 umol de Si.

Esta solución se conserva en envase plástico varios meses.

### **6.7.2.- PATRÓN A BASE DE HEXAFLUOROSILICATO.**

Secar el hexafluorosilicato a 105 °C durante 1 h.

Para 1 L de solución;

-Pesar 0,9403 g de hexafluorosilicato de sodio <<para análisis>>; si el producto es impuro, aumentar la cantidad pesada calculando la masa necesaria teniendo en cuenta la pureza indicada por el fabricante.

- Transferir el producto a un beacker de plástico con aproximadamente 300 ml de agua destilada y triturar los granos para acelerar la disolución y dejar la solución bajo agitación según la talla de los granos.

- transferirla a un matraz aforado de plástico de 1000 ml lavando varias veces el beacker y completar;

### **1 L contiene 5 umol de Si.**

Esta solución es considerada como estable indefinidamente si se evita la evaporación.

## **7.- MODO DE OPERACIÓN**

### **7.1.- PROCESO GENERAL.**

Las muestras de salinidad inferior a 27 % deben ser descongeladas varias horas antes del análisis. La temperatura de las muestras debe estar comprendida entre 18 y 25 °C.

- Introducir, en una probeta de polietileno de 50 ml, 10 ml del reactivo 1.
- Añadir con una pipeta 25,0 ml de la muestra, tapar y mezclar.
- Esperar como mínimo 10 minutos pero jamás más de 30 minutos, y anotar el tiempo a  $\pm \frac{1}{2}$  minuto a fin de operar siempre de la misma manera para todas las muestras y patrones.
- Añadir rápidamente el reactivo 2, frescamente preparado, para completar a 50 ml y mezclar rápidamente.
- Esperar entre 2 y 3 horas y medir la absorbencia  $A_{tr}$  en celdas de 1 cm, contra el agua destilada, a 810nm; por debajo de 12 umol/l se deben utilizar celdas de 10 cm para una medida más precisa.

Remarques:

- Es preferibles de añadir la muestra al reactivo 1 que la inversa; esto evita la formación posible de formas isómeras indeseables del complejo silicomolibdico.
- El tiempo requerido para la formación completa del complejo azul varía según la cantidad de silicio presente;
  - Por debajo de 50 umol/l, 1 hora es suficientes;
  - Por encima de 50 umol/l, el tiempo aumenta con la concentración t es preferible de esperar 3 horas.
  - Entre las 12 y 24 h que siguen, una ligera aumentación de 1 a 2 % de la absorbencia puede ser observada, pero se considerará, de manera general, que la coloración es estable entre 3 y 9 h después de haber añadido los reactivos.

### **7.2.- CALIBRACIÓN.**

La calibración es efectuada con agua de mar de salinidad habitual si las aguas analizadas no difieren en más de 3 %. Si no utilizan agua destilada y practicar una corrección de salinidad (ver más adelante).

- Introducir en matraces aforados de plástico con capacidad de 500 ml, 0,25-0,5-1-2-4-10 ml etc., de la solución patrón y completar a 500ml con agua de mar pobre en silicio o con agua destilada para obtener la gama de concentraciones; 2,5,-5-5-10-20-40-100 umol/l, etc.

.-Hacer por duplicado los análisis de esas soluciones así como del agua de mar utilizada para la dilución, según el procedimiento descrito anteriormente (ver 7.1.).

.-Sustraer de las medidas el valor de la absorbencia obtenida con el agua de mar bruta o con el agua destilada y trazar la curva de calibración.

.- Si se dispone solamente de matraces de vidrio, los patrones serán analizados inmediatamente después de su preparación y no deberán quedar más de algunos minutos en los matraces aforados para disminuir las contaminaciones. Estas últimas pueden ser de varias 1/10 de  $\mu\text{mol/l}$  en el agua de mar (Aminot, 1983).

### **7.3.- CORRECCIÓN DEL EFECTO DE LA SALINIDAD.**

El efecto de la salinidad debe ser conocido para las medidas en estuarios o en las aguas costeras; este efecto es proporcional a la salinidad.

.- Preparar dos patrones, 30  $\mu\text{mol/l}$  por ejemplo, uno en el agua destilada, el otro en el agua de mar de salinidad elevada S cubriendo así la gama de análisis.

.- Hacer inmediatamente dos análisis de cada una de esas soluciones patrones así como el agua destilada y del agua de mar que sirvieron a la preparación de las soluciones; tomar las medidas.

.- Sustraer de la absorbencia bruta de cada patrón la correspondiente al agua destilada o al agua de mar. Se obtiene así las absorbencias netas  $A_o$  y  $A_s$  correspondientes respectivamente a las salinidades O y S para una misma concentración de silicio.

El término de corrección de el efecto de la salinidad es dado por la relación:

$$C_s = (A_o - A_s) / A_o \times 1/S \quad (C_s \text{ es poco diferente de } 0,003)$$

## **7.4. BLANCOS**

### **7.4.1.- BLANCOS DE TURBIDEZ.**

Medir la absorbencia del agua de mar bruta, sin añadir los reactivos, contra el agua destilada, sea  $b_t$ .

### **7.4.2.- BLANCO DE LOS REACTIVOS**

Hacer dos medidas utilizando 25 ml de agua destilada según el procedimiento descrito en 7.1.-; sea  $b_r$ , el valor medio.

Este blanco no debe ser superior a 0,1 unidades de absorbencia en celdas de 10 cm de trayecto óptico; el debe ser controlado con cada lote de reactivos y antes de cada serie de análisis.

## **8.- CALCULOS Y RESULTADOS**

Sea:

- .-  $A_{tr}$  la absorbencia medida para la muestra tratada
- .-  $b_t$  la absorbencia medida para el blanco de turbidez
- .-  $b_r$  la absorbencia medida para el blanco de los reactivos
- .-  $C_s$  la corrección de la salinidad.

La absorbencia neta no corregida es  $A = A_{tr} - b_t - b_r$

## CALIBRACIÓN Y MEDIOS DE SALINIDAD IDENTICA

La absorbencia neta  $A$  es reportada sobre la curva de calibración para deducir la concentración de silicio en la muestra. Se puede igualmente determinar la pendiente  $p$  de la curva de calibración en  $\mu\text{mol/l}$  por unidad de absorbencia. En este caso la concentración es:

$$[\text{Si}] \mu\text{mol/l} = p \times A.$$

## CALIBRACIÓN CON AGUA DESTILADA; MEDIDAS EN MEDIOS DE SALINIDADES DIFERENTES

En medio de salinidad  $S_x$  la absorbencia neta corregida  $A_c$  es dada por la relación.

$$A_c = A \times (1 + C_s \times S_x)$$

El valor  $A_c$  debe ser reportado sobre la curva de calibración para deducir la concentración en silicio de la muestra. Se puede igualmente, conociendo la pendiente  $p$  de la curva de calibración en el agua destilada, calcular la concentración.

$$[\text{Si}] \mu\text{mol/l} = p \times A_c.$$

La transformación en otras unidades diferentes al  $\mu\text{mol/l}$  se efectúa como se indica en la tabla I.

tableau XI.1

Unités d'expression du silicium dissous

POUR EXPRIMER LA CONCENTRATION EN	MULTIPLIER LES UMOL/L 1 <sup>-1</sup> PAR
mg. l <sup>-1</sup> de silicium (Si).	0,028
mg. l <sup>-1</sup> de silicium (SiO <sub>2</sub> )	0,060

## **ANALISIS DEL NITROGENO ORGANICO DISUELTO**

En el medio oceánico, el nitrógeno orgánico disuelto (NOD), puede ser el resultado de la degradación de las materias orgánicas particuladas por las bacterias, o de la excreción por los organismos autótrofos y heterótrofos. En este último caso, el NOD es principalmente creado bajo la forma de urea, de aminoácidos, de aminas primarias, asociado a la liberación de amonio en el medio. En las aguas costeras, los aportes fluviales pueden sumarse a la producción <<in situ>> de NOD. En este caso, las aguas fluviales siendo más ricas que las aguas marinas, se pueden poner en evidencias una relación con la salinidad.

En los estuarios, los aportes de NOD son importantes y de naturalezas diferentes. Los aportes de origen terrestre son mínimos. Las zonas de ocupación humana pueden tener una fuerte incidencia sobre las aguas estuarinas; aportes debidos al urbanismo o todavía a la agricultura.

El sedimento puede igualmente constituir una fuente importante de NOD. Así, el pasaje al agua de aminoácidos provenientes del sedimento han sido comprobados (Wollast, 1979), los compuestos orgánicos nitrogenados hábiles se encuentran en equilibrio entre la fase sólida y las aguas intersticiales de los sedimentos (Jocteur Monrozier, 1979).

Según Antia et al. (1976). El NOD puede ser utilizado como sustrato por las algas unicelulares. Igualmente ha sido probado que ciertos compuestos nitrogenados pueden ser consumidos por el fitoplancton. Es el caso de la urea, de los aminoácidos, de sustancias variadas como el hipoxantina o la glucosalina.

### **1.- PRINCIPIO DEL MÉTODO**

El siguiente método es tomado de Parsons et al (1984). Es un método de más fácil aplicación que el Kieldahl, y al mismo tiempo, la oxidación de los compuestos orgánicos es más completa que cuando se utiliza la técnica de irradiación con luz ultravioleta. La fracción disuelta aquí estudiada es definida como el material orgánico que pasa a través de un filtro WHATMAN GF/C teniendo un diámetro efectivo de poro aproximadamente 1  $\mu$ .

Una muestra de agua de mar es oxidada con persulfato de potasio bajo presión y el nitrógeno orgánico es convertido en nitrato. El nitrato es analizado como se describió previamente.

### **2.- DOMINIO DE APLICACIÓN**

#### **2.1.- GAMA DE CONCENTRACIONES.**

Se pueden medir concentraciones de 2 a 40  $\mu\text{mol/l}$  de nitrógeno.

#### **2.2.- PRECISIÓN.**

Según Parsons et al (1984), el valor correcto, para la media de  $n$  medidas (nivel de confianza de 95%), a nivel de 20  $\mu\text{mol/l}$  es de  $\pm 0,4 n^{1/2}$  bajo la forma de nitrógeno.

### **3.- EQUIPOS**

Se debe disponer de un espectrofotómetro o de un colorímetro equipado con un filtro que tenga un máximo de transmisión a 540nm, pudiendo aceptar celdas de 10 cm de trayecto óptico.

- .- Autoclave,
- .- Columnas reductoras de nitrato,
- .- Erlenmeyers de 125 ml de capacidad con tapas.

### **4.- TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO.**

Las muestras son recolectadas en botellas previamente lavadas con una solución de ácido clorhídrico diluida y con abundante agua destilada o desmineralizada. Mientras que los envases destinados al análisis del NOD no sean utilizados, estos deben permanecer llenos con la solución diluida de ácido. El vidrio o el plástico pueden ser utilizados para el almacenamiento de las muestras.

Filtrar aproximadamente 500 ml de agua de mar sobre filtro WHATMAN GF/C. Lavar varias veces la botella con el agua de mar filtrada que va a ser analizada y congelar rápidamente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  si el análisis no se efectúa el mismo día. Conservar el filtro para realizar el análisis del nitrógeno orgánico particulado (NOP).

### **5.- REACTIVOS**

#### **5.1.- HIDROXIDO DE SODIO 1,5 N.**

Disolver 120 g de NaOH <<para análisis>> en dos litros de agua destilada. La solución es estable indefinidamente si se evita la evaporación y si se guarda en botella de plástico.

#### **5.2.- REACTIVOS OXIDANTE.**

Disolver 6,0 g de persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) doblemente recristalizado en 100 ml de NaOH 1,5 N, agitar durante varios minutos con un agitador magnético. La solución es estable durante una semana si se conserva en la oscuridad y en envases herméticamente cerrados.

#### **5.3.- ÁCIDOCLORHÍDRICO 1,4 N**

Diluir 200 ml de ácido clorhídrico concentrado a 1,7 l con agua destilada o desmineralizada. Determinar por titulación la cantidad de este ácido necesaria para reducir el pH a un rango de 2,6-3,2 de 40 ml de una solución de agua destilada a la cual se le añaden 6 ml del agente oxidante; anotar el volumen x ml.

El control del pH en este método es crítico. La oxidación tiene lugar a un pH que varía entre 12,6 y 13,2; el precipitado que se forma durante la oxidación se disuelve en el rango de pH 2,6-3,4 y la reducción de los iones nitrato debe efectuarse a un pH comprendido entre 8,0 y 8,4.

#### **5.4.- SOLUCIÓN BUFFER.**

Disolver 75 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en 400 ml de agua destilada o desmineralizada. Ajustar el pH a 8,5 añadiendo una solución concentrada de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y completar a 500 ml con agua destilada o desmineralizada. Esta solución es estable si se conserva herméticamente cerrada.

### **6.- MODO OPERATORIO**

.- Introducir 40 ml del agua de mar a analizar en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad y añadir 6,0 ml del reactivo oxidante.

.- Introducir los erlenmeyers tapados en el autoclave durante 30 min, a 15 lbs. de precisión y a 120 °C.

.-Enfriar las muestras y agitarlas. Añadir x ml de la solución de ácido clorhídrico 1,4 N con una pipeta automática y agite hasta disolución del precipitado.

.- Añadir 3,0 ml de la solución buffer; agitar proceder al análisis de los nitratos como se describió anteriormente.

.- Medir la absorbencia de las muestras y corregirlas del blanco de los reactivos. La cantidad de nitrógeno orgánico es dada por:

$$[\text{NOD}] \text{ umol/l} = (\text{E} \times \text{F}) - \text{A}$$

Donde E es la absorbencia de la muestra corregida, F es el factor y A es la concentración en umol/l de los nitrato más nitrito más amonio originalmente presente en la muestra.

### **7.- DETERMINACIÓN DE LOS BLANCOS.**

Introducir 40 ml de agua destilada en un erlenmeyers de 125 ml de capacidad y proceder como se acaba de describir. El valor medio de tres blancos será sustraído a las muestras y a los patrones. Algunas fuentes de agua destilada dan origen a blancos elevados, en estos casos una doble destilación es necesaria. El valor del blanco debe ser inferior a 1 umol/l de nitrógeno.

### **8.- CALIBRACIÓN**

El factor F es el mismo factor utilizado en el análisis de los nitratos haciendo la deducción del cambio de volumen. Sin embargo, F en el método de los nitrato (valor aproximado de 25) es multiplicado por el volumen final de solución en el erlenmeyers dividido por 40. Así:

$$F = F_N \times (49 + x) / 40,$$

Donde  $F_N$  es el factor de los nitratos, y x es el número de mililitros de ácido añadido para el ajuste del pH. El valor obtenido es aproximadamente 33.

### **8.1.- SOLUCIÓN PATRÓN DE NITRÓGENO ORGÁNICO.**

EL EDTA es definido como un reactivo estable. Disolver 186,2 mg de EDTA,  $(\text{HOOCCH}_2)^2 - \text{N} (\text{CH}_2) \text{N} (\text{CH}_2\text{COONa})_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ , en 100 ml de agua destilada o desmineralizada. La solución es estable durante varios meses si se guarda en el refrigerador y en botella de vidrio.

1 ml contiene 10 umol de nitrógeno.

### **9.- INTERFERENCIAS.**

Iones o compuestos normalmente presentes en el agua de mar o en las aguas residuales no interfieren con la determinación. El  $\text{H}_2\text{S}$  presente en las aguas anóxicas no provoca interferencias cuando su concentración es inferior a 2 mg/l. A concentraciones superiores a 20 mg/l se debe aumentar la cantidad de persulfato.

### **2.- MODO DE OPERACIÓN.**

8 ml de una solución al 5% de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  frescamente preparada son añadidos a 50 ml de agua de mar contenida en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad. La muestra es llevada a un autoclave durante media hora a 15 lbs./in<sup>2</sup> (1055 g/cm<sup>2</sup>) y a 120 °C. Después de enfriar la muestra, el volumen es completado a 60 ml con la ayuda de agua destilada o desmineralizada. El fósforo liberado es medido colorimétricamente por el método de Hurphy and Riley (1962).

Como resultado de la descomposición del  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  el pH del agua de mar, después de la oxidación, se reduce a 1,5-1,8 pero esto no interfiere en la determinación colorimétrica.

Otro producto de descomposición es el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y cantidades considerables de cloro son liberados produciendo una atmósfera altamente oxidante. La desviación Standard del método es de + 0,013.

Las interferencias del arsénico no son evitadas por este método y puede en algunos casos provocar una súper-estimación de la cantidad de fósforo presente. Para la calibración reportarse al análisis del fósforo mineral disuelto.

## **MEDIDA DE LAS MATERIAS EN SUSPENSIÓN.**

El conocimiento de la cantidad de materias en suspensión (MES) es importante para el estudio de los medios acuáticos. De una parte, las partículas reducen la transparencia del agua y por consecuencia la producción primaria fotosintética, de otra parte ellas presentan una superficie de contacto importante para los intercambios físico-químicos, químicos o biológicos con el agua de mar. Según su naturaleza, ellas son igualmente una fuente nutritiva no despreciable para la fauna.

Las concentraciones de materia en suspensión son muy pequeñas en los medios oceánicos profundos; Hobson (1967), señala valores de algunas decenas de microgramos por litro a más de 250 m de profundidad en el pacífico norte. En superficie, las concentraciones oceánicas son generalmente más elevadas; 0,5 a 1 mg/l. Es en medio costero y estuario donde las concentraciones más elevadas son observadas. Esas concentraciones sufren variaciones estacionales, plancton, aportes terrestres, tempestades. Valores que varían entre 0,5 y 5 mg/l pueden ser observados en las aguas costeras, varias centenas de miligramos por litro en los estuarios y hasta varios gramos por litro en la zona de máxima turbidez.

### **1.- PRINCIPIO DEL MÉTODO.**

El método consiste en filtrar el agua de mar sobre membrana filtrante a fin de retener todas las partículas de talla superior a 0,5-1  $\mu$ m. La membrana es secada y pesada antes y después de la filtración. La diferencia de peso permite de conocer la masa seca total de materia en suspensión en el volumen filtrado correspondiente.

El punto metodológico, durante el análisis de la MES en el agua salada, es el lavado de los filtros para eliminar la sal, fuente de error por exceso. El lavado con agua destilada es apropiado para los medios pobres en fitoplancton, al contrario, en los medios biológicamente ricos, este lavado está al origen de una pérdida de masa debido a la fragmentación de las células las más frágiles bajo el efecto del choque osmótico. Strickland and Parsons (1972), consideran que esas pérdidas son despreciables, bien que ellas puedan alcanzar cerca del 40% de la materia orgánica (Collos, 1983, no publicado). Este fenómeno es evitado si los filtros son lavados con una solución de formiato de amonio isotónica al agua de mar. Este compuesto se sublima al secado y no deja ninguna traza sobre el filtro.

### **2.- DOMINIO DE APLICACIÓN.**

#### **2.- GAMA DE CONCENTRACIÓN.**

Como se trata de un método por pesada, no existe límite superior a la cantidad medible de MES. Solo el volumen filtrado es limitado por la carga de MES y la naturaleza o la dimensión del filtro.

## **2.2.- PRECISIÓN.**

La precisión es limitada por la sensibilidad de la balanza. Si se elimina ese factor utilizando un material adecuado, se obtiene la precisión intrínseca del método. La precisión sobre la concentración depende del volumen filtrado y el factor importante es; en realidad, la precisión sobre la masa depositada en el filtro.

Banse et al. (1963). Señalan que obtienen una precisión de  $\pm 0,15$  mg (nivel de confianza de 95%) utilizando filtro MILLIPOREHA 0,45  $\mu\text{m}$ . Aminot (1983) obtiene resultados similares con filtro WHATMAN GF/C;  $\pm 0,1$  a  $\pm 0,15$  mg. Strickland and Parsons (1972), que utilizan un modo operatorio diferente, alcanzan solamente una precisión de  $\pm 0,4$  mg.

En ciertas aguas turbias, nos podemos satisfacer de una precisión menor; a partir de 20 mg sobre el filtro la pesada a  $\pm 0,5$  mg es suficiente. En este caso, sin embargo, la precisión relativa aumenta.

## **2.3.- LIMITE DE DETECCIÓN.**

La precisión de  $\pm 0,15$  mg provoca un límite de detección del orden de 0,3 mg depositados sobre el filtro. Como las aguas poco cargadas permiten de filtrar rápidamente grandes cantidades de agua, el límite de detección puede ser de algunas decenas de microgramos por litro para una filtración de aproximadamente 10 L. Este caso es solamente encontrado en medio oceánico.

## **3.1.- MUESTREO Y ALMACENAMIENTO.**

### **3.1.- MUESTREO.**

El muestreo se efectúa con el mismo material utilizado en el caso de los otros parámetros; no hay especificaciones especiales para la determinación de la MES.

### **3.2.- ALMACENAMIENTO.**

#### **3.2.1.- ENVASES.**

El material, al forma y el volumen del frasco quedan a la escogencia del utilizador. Los frascos son lavados al agua destilada y escurridos. Después de varias utilizaciones, asegurarse de la ausencia de depósito en las paredes, puede ser necesario cepillarlos interiormente o de lavarlos con un detergente.

#### **3.2.2.- TOMA DE LA MUESTRA.**

La muestra será tomada inmediatamente después de la toma destinada al análisis de los gases disueltos y del pH. Si hay un riesgo de decantación, se debe agitar la botella de muestreo para homogenizar de nuevo las partículas en suspensión.

El agua se filtra sobre malla a plancton de 200  $\mu\text{m}$  antes de ser almacenada en los frascos para evitar las grandes partículas. El envase no debe ser llenado completamente para facilitar su agitación.

## **4.- CONSERVACIÓN**

### **4.1.- MUESTRA DE AGUA.**

Para las aguas poco cargadas ( $< 1 \text{ mg/l}$ ). Parece difícil, en la práctica, de almacenar y de conservar las grandes cantidades de agua necesarias para el análisis, la filtración será pues efectuada a bordo. Una demora de algunas horas puede ser tolerado entre la toma de la muestra y la filtración a condición de mantener las muestras en el frío y al abrigo de la luz.

Las muestras que presenten una concentración mayor pueden ser conservadas varias semanas sin disminución importante. Las muestras serán colocadas en frío y al abrigo de la luz para limitar toda modificación de origen biológico.

### **4.2.- FILTROS.**

Una vez que las muestras hallan sido filtradas, es preferible secar los filtros lo más rápidamente posible. Ellos se conservan así indefinidamente. Cuando la filtración es efectuada poco después del muestreo pero que el secado debe ser diferido, los filtros son conservados en frío y añade abrigo de la luz. En esas condiciones, los filtros se conservan varias semanas. Para plazos superiores, la congelación puede ser aplicada.

## **5.- EQUIPOS**

### **5.1.- EQUIPOS DE FILTRACIÓN.**

La filtración puede ser efectuada bajo vacío o bajo presión (1 a 2 bar.). Los dispositivos bajo presión no son generalmente aplicables sino al agua dulce puesto que ellos no permiten para el agua de mar, el lavado de la corona del filtro cargada de sales. Los soportes de filtro a reja metálica no conviene para las membranas en fibra de vidrio; sobre esos soportes se observa una disminución del peso de algunas 1/10 de miligramos, probablemente debido a una pérdida de fibras a través de las mallas de la reja (Aminot, 1983). Es necesario pues en este caso utilizar soportes esmerilados.

### **5.2.- FILTROS.**

Se puede utilizar toda membrana filtrante susceptible de retener todas las partículas de talla superior a 0,5- $1\mu\text{m}$ . La fibra de vidrio, no higroscópica, se revela particularmente interesante para el análisis de la MES.

Se pueden citar los principales filtros en fibra de vidrio utilizando; Whatman GF/C y GF/F, REEVE ANGEL 984 H. Para el análisis de las aguas relativamente cargadas en MES, se pueden utilizar filtros de menor retención tipo MILLIPORE AP 15 Y AP 20, GELMAN tipo A, SARTORIUS SM 134. Los filtros serán manipulados con pinzas no oxidables a puntas planas y se tomará la precaución de no deteriorarlos.

### **5.3.- CAJA A FILTROS.**

Los filtros lavados y pesados, listos para el empleo, deben ser manipulados con precaución. Se colocan, de plano, en cajas individuales con sus tapas, del tipo cajas de Petri en vidrio o en plástico. Algunos fabricantes proponen cajas especiales extraplanas adaptadas a la dimensión del filtro; su resistencia a la temperatura de secado de los filtros debe ser verificadas.

Las membranas en estas de celulosa no se adhieren al material de las cajas, contrariamente a lo que sucede con los filtros de fibra de vidrio. Cuando esos filtros son despegados de la caja una cierta masa de fibra es perdida. Para evitar los errores inherentes a ese fenómeno, se coloca en las cajas un fondo de papel de aluminio. El filtro es depositado sobre este fondo y siempre pesado con el antes y después de la filtración. Este fondo de aluminio facilita también la toma de los filtros con la pinza.

### **6.- REACTIVOS.**

Para el lavado de las membranas después de la filtración de las aguas ricas en fitoplancton, se utiliza una solución isotónica al de agua de mar; disolver 68 g de formiato de amonio  $\text{HCOONH}_4$  << para análisis >> por litro de agua destiladas.

### **7.- MODO DE OPERACIÓN**

#### **7.1.- PREPARACIÓN DE LOS FILTROS.**

- Colocar los filtros de fibra de vidrio en la mufla a 450- 500 °C durante  $\pm$  1 hora; este tratamiento, aconsejando, refuerza la rigidez y al resistencia de las membranas. No sobrepasar los 500 °C.

- Colocar cada filtro sobre el soporte de filtro, sin colocar el embudo, y lavar abundantemente todas las superficies con agua destilada (50 a 70 ml de agua por filtro) bajo un pequeño vacío.

- Depositar los filtros en sus cajas y colocarlos en la estufa a 70 °C durante 2 horas o a 105 °C durante 1 hora.

- Dejarlos enfriar en e un desecador.

- Numerar las cajas de Petri de manera imborrable.

- Pesar cada filtro, con su fondo de aluminio, con una precisión de 0,01 mg. Una precisión de 0,1 mg es suficiente si las cantidades de MES habitualmente depositadas sobre el filtro son superiores a 5 mg. Sea  $P_1$  este peso.

- Colocar rápidamente cada filtro en su caja, al abrigo del polvo.

## **7.2.- FILTRACIÓN.**

- Homogeneizar la muestra. Una agitación violenta es necesaria si las muestras han sido conservadas un cierto tiempo.

- Medir enseguida el volumen de agua a filtrar; para que sea representativo, éste debe ser superior a 100 ml.

En el caso de aguas fuertemente cargadas en MES (estuarios), la filtración es acelerada si se deja decantar la muestra y se filtra al principio la solución.

- Colocar un filtro y centrarlo en el dispositivo de filtración. Verter la muestra sobre el filtro y aplicar el vacío, sin crear una depresión superior a 2/3 bar, después filtrar progresivamente todo el volumen medido.

- Suprimir la aspiración en lo que el filtro llegue a seco y verter entonces 5 a 10 ml de agua destilada o de la solución de formiato de amonio sobre el filtro y aspirar de nuevo.

Realizar una segunda vez esta operación de lavado.

- Efectuar si es necesario dos lavados del filtro con cloroformo cuando el agua contiene cantidades de hidrocarburos no despreciables.

- Retirar el embudo de filtración y, bajo aspiración, lavar con mucha atención la corona virgen del filtro con la ayuda de una pipeta de agua destilada o de formiato de amonio (10-15 ml).

- Suprimir la aspiración y meter cada filtro en su caja numerada.

- Meter las cajas en frío y al abrigo de la luz o secarlas inmediatamente.

## **7.3.- SECADO Y PESADA DE LOS FILTROS.**

- Meter las cajas conteniendo los filtros, sin la tapa, en la estufa a 70 °C durante 2 horas o a 105 °C durante 1 hora. La estufa debe estar libre de polvo.

- Dejar enfriar en el desecador y no sacar los filtros sino al momento de la pesada.

- Pesar cada filtro con su fondo de aluminio a la precisión requerida; 0,01 mg ó 0,1 mg si la masa depositada sobre el filtro es inferior o superior a 5 mg.; sea P<sub>2</sub> este peso.

## **REMARQUES:**

### **TEMPERATURA DE SECADO DE LOS FILTROS**

Habitualmente los protocolos de análisis (AFNOR, 1972; APHA, 1980), utilizan un secado de filtro a 105 °C. Sin embargo un calentamiento a 70 °C es suficiente para asegurar un secado perfecto y no presenta los inconvenientes siguientes:

- Filtros en este de celulosa que se vuelven muy frágiles a temperatura más elevadas.

- Riesgo de pérdida de material biológico.

### **DURACIÓN DEL SECADO DE LOS FILTROS.**

La duración del secado, fijada a 1 h a 105 °C a 2 h a 70 °C, es suficiente. En efecto, Strickland and Parsons (1972) consideran que a 70 °C, 1 h basta para el secado. Sin embargo, en caso de lavado con formiato de amonio, es aconsejable de aumentar el tiempo de secado hasta 2 h para asegurarse de la eliminación total de este compuesto.

## 8.- CALCULOS Y RESULTADOS

Sea;

- .-  $P_1$  : peso del filtro antes de la filtración (mg),
- .-  $P_2$  : peso del filtro después de la filtración (mg),
- .-  $V$  : volumen filtrado (l).

La concentración de la MES es dada por la expresión:

$$[\text{MES}] \text{ mg/l} = (P_2 - P_1) / V.$$

## **ANÁLISIS DEL CARBONO ORGANICO PARTICULADO**

La materia orgánica presente en el agua de mar se reparte en dos dominios; la materia orgánica disuelta y la materia orgánica particulada. El límite entre esos dos dominios ha sido escogido de manera arbitraria; por convención, la materia orgánica disuelta es aquella que atraviesa un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidad, la materia orgánica particulada es aquella que es retenida sobre el mismo filtro. Los dos dominios son de importancia in igual; la materia orgánica particulada representa habitualmente una pequeña fracción ( $< 10\%$ ) del conjunto de la materia orgánica. En la zonas costeras que están sometidas a los efluentes o bajos el efecto de las fuertes turbulencias y en las zonas de gran productividad, ésta fracción puede llegar a ser notablemente más importante.

Las concentraciones y las composiciones del material particulado son muy variables. En las zonas oligotróficas la contribución del plancton es pequeña (entre 20 y 50 %). Ella puede alcanzar 90% en las zonas de gran productividad donde la fracción detrítica es más reducida. Medidas en equivalentes de carbono, las concentraciones de COP (carbono orgánico particulado) varían entre algunas decenas de microgramos de carbono por litro en las masas de agua oceánicas profundas y algunas centenas de carbono por litro en las aguas superficiales las ricas. Se trata pues de analizar la materia orgánica al estado de trazas. Es necesarios de operar con cuidado y manipular al abrigo de las contaminaciones.

### **1.- PRINCIPIO DEL MÉTODO**

El método siguiente, descrito en detalles por Le Corre (1983), permite evaluar la materia orgánica particulada en el agua de mar bajo la forma de equivalentes de carbono. La materia orgánica recogida sobre un filtro de fibra de vidrio es oxidada por la mezcla sulfocrómica. El oxidante en exceso es titulado en retroceso por una solución de fe (II). Este modo es aplicable a bordo de los barcos, su simplicidad hace que sea preferible a los métodos más precisos basados en la combustión de la materia orgánica en el oxígeno seguida de la determinación del  $\text{CO}_2$  (analizador infrarrojo, analizador CHN) pero necesitando un material más sofisticado. La calibración se realiza a partir de soluciones de glucosa. Se obtienen así equivalentes de carbono de glucosa.

### **2.- DOMINIO DE APLICACIÓN**

#### **2.1.- GAMA DE CONCENTRACIÓN**

El método permite de evaluar cantidades de carbono que van de 10 a 4000  $\mu\text{g/l}$  operando sobre volúmenes de agua de mar que varían entre 0,5 y 10 L.

#### **2.2.- PRECISIÓN.**

La precisión para n medidas (nivel de confianza del 95% es al nivel de 800  $\mu\text{g}$ ; media  $\pm 120 n^{-1/2}$   $\mu\text{g C}$ .

El método está adaptado a las aguas de mar ricas en materias orgánica particuladas. En la gama la más baja, bien que es posible de compensar teóricamente la falta de precisión por una aumentación del volumen filtrado, es conveniente de operar con técnicas más finas (análisis infrarrojo o CHN).

### **2.3.- LIMITE DE DETECCIÓN.**

El límite de detección es difícil definirlo en la medida donde él es función del volumen de agua de mar filtrado. En la práctica una toma de 10 L es un máximo para las medidas de rutina. El límite de detección se sitúa entonces a nivel de 10 ug/l.

### **2.4.- INTERFERENCIAS.**

Durante el análisis, los iones cloruros atrapados en el filtro pueden interferir puesto que ellos son oxidados por el bicromato. Un primer tratamiento consistiendo en lavar el filtro con sulfato de sodio tiene como función la eliminación de un máximo de cloruros. Un segundo tratamiento con el ácido fosfórico, inmediatamente antes de añadir el oxidante, permite la eliminación, bajo la forma de HCl, de los iones cloruros que quedan.

## **3.- MUESTREO Y ALMACENAMIENTO**

Las botellas en materia plástica (NISKIN, VAN DORN, etc.), pueden ser utilizadas para la toma de muestras. El volumen necesario para el análisis (0,5 a 10 L) será rápidamente transferido en un frasco de vidrio o de plástico a fin de evitar un depósito de partículas que puede operarse en el fondo de la botella de muestreo en ausencia de agitación. Las muestras son pre- filtradas a 200 um a fin de eliminar diversos elementos de gran tamaño de la fauna o de la flora que presentan una distribución aleatoria y pudiendo afectar la reproducibilidad de la medida.

## **4.- CONSERVACIÓN**

Es aconsejable filtrar rápidamente las muestras a bordo del barco. Los filtros doblados cuidadosamente pueden ser conservados durante algunas semanas, guardando en pequeños tubos de vidrio tapados y en un congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## **5.- EQUIPOS**

El material siguiente es necesario:

- .- Un sistema de filtración adaptado a la utilización de filtros WHATMAN GF/C de 4,7 cm de diámetro,
- .- Una bomba o una trompa de vacío equipada de un manómetro,
- .- Una mufla,
- .- Un baño de arena y un termómetro (0 a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),
- .- Una serie de erlenmeyers que se puedan tapar con cristalizadores pequeños.

Todo el material de vidrio debe ser lavado con la mezcla sulfocrómica, y con agua destilada antes del comienzo de cada análisis.

## **6.- REACTIVOS**

### **6.1.- MEZCLA SULFOCRÓMICA.**

En un recipiente de PYREX, introducir 20 a 40 g de bicromato de potasio  $K_2Cr_2O_7$  y disolverlo en 50 a 100 ml de agua destilada. Añadir rápidamente 1 L de ácido sulfúrico. El calentamiento violento permite la solubilización del bicromato.

**ATENCIÓN:** Tomar todas las precauciones para evitar las proyecciones.

La limpieza del material se efectúa por inmersión durante varias horas en la mezcla.

## **6.2.- SOLUCIÓN DEL SULFATO DE SODIO**

Disolver 45 g de  $Na_2SO_4$  << para análisis >> en 1 L de agua destilada.

## **6.3.- ACIDO FOSFORICO << PARA ANÁLISIS >>**

## **6.4.- MEZCLA OXIDANTE**

Disolver 4,84 g de bicromato de potasio  $K_2Cr_2O_7$  en 200 ml de agua destilada. Añadir poco a poco esta solución a 500 ml de ácido sulfúrico concentrado <<para análisis >>. Enfriar y completar el volumen a 1000 ml de ácido sulfúrico concentrado.

## **6.5.-SOLUCIÓN DE Fe (II) 0,1 NORMAL.**

Disolver 39,21 g de sulfato doble de hierro y de amonio (sal de Mohr) en  $\frac{1}{2}$  L de agua destilada. Añadir 20 ml de ácido sulfúrico y completar a 1000 ml con agua destilada.

## **6.6.- INDICADOR COLOREADO: FERROINA.**

Disolver 1,485 g de monohidrato de ortofenantrolina  $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$  en 100 ml de una solución de sulfato ferroso 0,025 mol/l (0,695 g de sulfato ferroso en 100 ml de agua), se obtiene así la ferroina  $(C_{12}H_8N_2) FeSO_4$ .

## **6.7.- SOLUCIÓN DE GLUCOSA**

Disolver 7,5 g de glucosa en el, agua destilada y completar a 100 ml. Esta solución se deteriora rápidamente y puede ser estabilizada por varios cristales de cloruro mercuríco (debe ser manipulado con mucha precaución).

# **7.- MODO DE OPERACIÓN**

## **7.1.- FILTRACIÓN.**

La filtración se efectúa sobre filtros WHATMAN GF/C de 4,7 cm de diámetro, calcinados previamente en la mufla a fin de eliminar al máximo todas las trazas orgánicas. Para este tratamiento los filtros, dispuestos uno por uno sobre una hoja de aluminio, son mantenidos a 450-500 °C durante 30 minutos. Evitar de pasar los 500 °C a fin de no modificar su capacidad de retención.

Al momento de la filtración, el modo operatorio siguiente se aplica así:

- Equipar el dispositivo de filtración con un filtro tratado como se indicó previamente. Utilizar pinzas metálicas limpias y al abrigo de la partículas atmosféricas (polvo, humo,...).
- Filtrar el agua de mar bajo presión reducidas; no descender por debajo de los 0,5 bar, para evitar el riesgo de ruptura de las partículas y en particular las células fitoplanctónicas.
- Dejar el filtro a sequedad.
- Volver a la presión atmosférica.
- Añadir 2 ml de la solución de sulfato de sodio y aspirar de nuevo hasta sequedad del filtro.
- Efectuar un segundo lavado con el sulfato de sodio.

Los lavados con el sulfato de sodio son efectuados rápidamente para no modificar el equilibrio celular.

## **7.2.- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.**

### **7.2.1.- OXIDACIÓN DE LOS FILTROS.**

- Colocar una serie de filtros en los erlenmeyer de 100 ml,
- Aplicar los filtros con una barra de vidrio limpia, al fondo de los erlenmeyers.
- Añadir 2 ml de ácido fosfórico.
- Cubrir con los cristalizadores.
- Meterlos en le baño de arena a 100-110 °C durante 30 minutos.
- Añadir 10 ml de la mezcla oxidante y cubrir de nuevo.
- Recolocar en el baño de arena durante 60 minutos.

### **7.2.2.- ANÁLISIS.**

- Enfriar los erlenmeyers.
- Añadir 50 ml de agua destilada y 2 gotas de ferroina.
- Titular con la solución de Fe (II).

Sea  $V_1$  el volumen añadido en ml.

## **7.3.- DETERMINACIÓN DEL BLANCO.**

Tratar una serie de tres filtros vírgenes exactamente de la misma manera que viene de describir.

Sea  $V_0$  el volumen de la solución de Fe (II) añadida, media de las tres determinaciones.

## **7.4.- CALIBRACIÓN DE LA SOLUCIÓN TITULANTE DE Fe (II).**

Se verifica el título de la solución de Fe (II) con la ayuda de una solución de glucosa. A partir de la solución madre (6.7) se prepara una solución diluida (1 ml de la solución madre completada a 100 ml) que contiene por cada ml 300 ug de carbono.

.- Tomar 5,0 ml de la solución secundaria, sea 1500 ug de C en un erlenmeyer de 100 ml y oxidarlos como en el caso de los filtros, después titularlos. Sea  $V_1$  (ml) el volumen de la solución de Fe (II) correspondiente.

.- Titular igualmente 10,0 ml de la mezcla oxidante con la solución de sulfato ferroso. Sea  $V_0$  (ml) el volumen añadido.

.- El factor de calibración F es obtenido por:

$$F = 1500 / (V_0 - V_1).$$

Teóricamente; 1 ml de la solución de Fe (II) 0,1 normal corresponde a 300 ug de carbono; Sea  $F = 300$ .

## 8.- CALCULOS Y RESULTADOS

Sea:

.-  $V_f$  : volumen de agua filtrada,

.-  $V_0$  : volumen de titulante añadido para el blanco,

.-  $V_1$  : volumen del titulante añadido para la muestra,

.- F : factor de calibración.

La concentración en carbono orgánico particulado se calcula como sigue:

$$[\text{COP}] \text{ ug/l} = F (V_0 - V_1) / V_f.$$

## 9.- REMARQUE

La calibración siendo realizada a partir de una solución de glucosa, se obtiene las concentraciones bajo la forma de equivalentes en carbono de glucosa. Los resultados se acercan mucho más de la realidad si la materia orgánica participada tiene una composición más cerca de los glúcidos. La composición media del plancton y de los detritos diversos que forman el particulado es tal que los valores determinados por este método no se alejan sino de 10 al 20 % de los valores verdaderos.

## **ANÁLISIS DEL FOSFORO Y DEL NITROGENO ORGÁNICO PARTICULADO**

En el grupo de trabajo de inter calibración del mar Báltico que tuvo lugar en Kiel, marzo de 1977, Koroleff (1977), presentó un método basado en la oxidación simultánea de los compuestos de nitrógeno y del fósforo en el agua. El nuevo método proporciona, además de otras ventajas, la posibilidad del análisis simultaneo del nitrógeno total (NT) y del fósforo total (PT) en la misma muestra. El método ofrece una gran reproducibilidad y precisión.

Para la oxidación de los compuestos nitrogenados es necesario utilizar un medio alcalino, de otra manera los nitratos no serian producidos cuantitativamente. Al contrario, la oxidación de los compuestos de fósforo debe realizarse en medio ácido. En la oxidación simultánea la reacción comienza a PH 9,7 y termina a PH 5,6. Estas condiciones son obtenidas utilizando el sistema ácido bórico-hidróxido de sodio (Valderrama, 1981). La adición del agente oxidante al agua de mar no provoca la formación de precipitado. A temperaturas elevadas (100-120 °C) un precipitado se forma el cual, sin embargo, se disuelve a medida que avanza la oxidación. Después de la oxidación el precipitado restante se disuelve fácilmente por agitación de la muestra. El cloruro, que se forma en las muestras de agua de mar, es reducido añadiendo el ácido ascórbico antes del reactivo de molibdato.

El rendimiento obtenido por oxidación de varios compuestos nitrogenados depende de la forma en la cual los N están enlazados. Así, por ejemplo nitrato, nitrito, amonio, urea algunos aminoácidos alifáticos y algunas proteínas dan un rendimiento superior al 92%. (Valderrama, 1981). Rendimientos bajos son obtenidos con compuestos que contienen enlaces nitrógeno-nitrógeno. Mientras que la existencia de un doble enlace entre los átomos de nitrógeno evita la oxidación completa en nitrato (Valderrama 1981). El tiempo de digestión, que es función de la auto descomposición del peroxo-disulfato, no debe ser superior a 30 minutos, siempre y cuando la temperatura alcanzada por el autoclave sea comprendida entre 110-115 °C.

Este método, descrito en detalle por Valderrama (1981), ha sido utilizado en el laboratorio desde Marzo 1987 dando buenos resultados APRA el análisis del NT y del PT en diferentes tipos de agua (agua de mar, aguas residuales, etc....). En el presente protocolo vamos a utilizar este método con algunas modificaciones para el análisis del nitrógeno y del fósforo orgánico particulado en el agua de mar.

### **METODO**

#### **REACTIVOS**

El agente de oxidación (RO) se prepara disolviendo 60 g de peroxo-disulfato de potasio << para análisis >>, y 40 g de ácido bórico en 350 ml de hidróxido de sodio 1 N. La solución se completa a un litro con agua destilada o desmineralizada. El RO es conservado en una botella de vidrio oscura a la temperatura ambiente y protegida de la luz. Los reactivos para el análisis de los nitrito, nitrato y fosfato son los mismos que se describieron anteriormente.

#### **MODO DE OPERACIÓN.**

500 a 1000 ml de agua son filtrados sobre filtros WHATMAN GF/C previamente calcinados durante 3 horas a 450 ° C. Los filtros son introducidos en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad y se les añaden 10 ml de agua destilada o desmineralizada. A cada erlenmeyer se

le añaden 10 ml del RO con una dispenseta. Luego de cerrado los erlenmeyers son introducidos en el auto clave durante 30 minutos a 15 lbs./in<sup>2</sup> y a una temperatura de 110-115 °C.

Luego de los 30 minutos los erlenmeyers son agitados suavemente y dejados enfriar a la temperatura del laboratorio antes de abrirlos. Completar el volumen a 60 ml con agua destilada o desmineralizada. 30 ml son tomados para el análisis de los fosfatos y los 30 ml restantes son utilizados para el análisis de los iones nitrato. Con cada serie de análisis dos blancos utilizando filtros vírgenes son realizados. La determinación del valor del blanco causado por el oxidante es necesaria, puesto que el peroxo-disulfato de potasio contiene trazas de nitrógeno.

Para el análisis los nitratos a 30 ml de la muestra se le añaden 3 ml de la solución tampón NH<sub>4</sub>CL-NH<sub>3</sub> (ver análisis de nitrato) y se analiza como se describió previamente. Para el análisis de los iones fosfato se le añaden a los 30 ml de muestra 0,7 ml del agente de reducción (ver fosfato), y después de haber homogeneizado la muestra y esperado de 1 a 2 minutos, se agregan 0,7 ml del reactivo para fosfato ácido-sulfúrico-molibdato. El procedimiento se continúa como para los fosfatos.

### **CALIBRACIÓN.**

Una solución Standard (S) es preparada disolviendo 0,4504 de glicina << para análisis>> y 0,1361 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 100 ml de agua destilada.

**1 ml = 60,0 umol – N y 10,0 umol-P.**

Una serie de soluciones patrones son preparadas a partir de S, diluyendo con el volumen correspondiente de agua destilada. Poe ejemplo, preparar soluciones con concentraciones de 1,5-3,0-6,0-18,0-36,0 umol/l de nitrógeno y de 0,25-0,50-1,0-3,0-6,0 umol/l en fósforo.

### **PRECISIÓN.**

En el caso del nitrógeno, la precisión es del orden del 4 % a nivel de 30,0 umol/l y de 11,7 % a nivel de 6,0 umol/l. La precisión es mucho mejor para el análisis del fósforo total. Ella alcanza 0,2 % a nivel de 5,0 umol/l y es de 2 % a nivel de 1 umol/l.

### **ESTABILIDAD DEL AGENTE OXIDANTE**

Este reactivo es estable durante más o menos 8 meses si se conserva al abrigo de la luz y a la temperatura ambiente evitando toda evaporación.

### **CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

Las muestras deben ser conservadas inmediatamente después de la filtración si estas no van a ser analizadas el mismo día. Una vez que las muestras han sido oxidadas estas se conservan varias semanas a la temperatura del laboratorio y al abrigo de la luz.

### **CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES.**

La concentración de nitrógeno total viene dada por:

$$\text{Conc. NT} = F_N \times (A_N - B_N) \times v/V \text{ umol/l}$$

La concentración de fósforo total es dada por:

$$\text{Conc. PT} = F_P \times (A_P - B_P) \times v/V \text{ umol/l}$$

Donde  $F_N$  y  $F_P$  son los factores de calibración del nitrógeno del fósforo, respectivamente,  $A_N$  y  $A_P$  son las absorbencia de las muestras,  $B_N$  y  $B_P$  son las absorbencias de los blancos,  $v$  es el volumen final (60 ml) y  $V$  es el volumen filtrado, en litros.

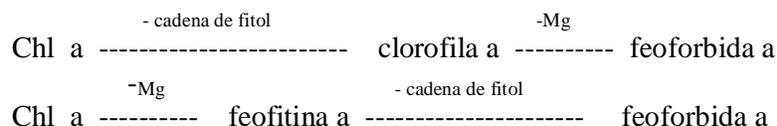
NOTA: Para efectuar la calibración se toman 50 ml de las soluciones patrones y se oxidan con 10 ml de la solución RO.

## ANÁLISIS DE LA CLOROFILA Y DE LOS FEOPIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

La determinación cuantitativa global de la fracción participada viviente en los medios acuáticos es importante para el estudio y la comprensión de los fenómenos ecológicos. Para esto, una estimación del fitoplancton por vía química, por extracción y determinación de los pigmentos fotosintéticos, es satisfactoria, es más simple y más rápido que los métodos basados, por ejemplo, en el conteo de células. El análisis de los principales pigmentos clorofilianos (clorofilas a, b, c y sus feo pigmentos) e igualmente de los carotenos necesitan la extracción, la cromatografía y la espectrofotometría. El desarrollo reciente de la cromatografía líquida a altas performance (HPLC) debería simplificar estos procedimientos para la determinación cuantitativa y simultánea de numerosos pigmentos. Sin embargo, esta última técnica necesita de un material muy caro y un personal especializado.

Así, los métodos clásicos determinando el pigmento escanciar, la clorofila a, y sus feopigmentos, serán todavía muy utilizados.

En cuanto a las otras clorofilas y a los productos de degradación, no son analizados sino ocasionalmente como indicadores del estado fisiológico y de la composición del plancton. En la práctica esos compuestos interfieren frecuentemente en la determinación de la concentración de la clorofila a. Para la clorofila a (fig. 1 ), Yentsch (1967) resume la degradación según los esquemas:



La acidificación provoca la eliminación del átomo de magnesio y de la cadena de finol. Si algunos autores han señalados la presencia de clorofilida en el medio marino (Jeffrey, 1974), parece que los principales productos de degradación sean la feoforbida y la feofitina (Shuman and Lorenzen, 1975). Estos últimos son agrupados bajo el nombre de feopigmentos en la continuación de este capítulo.

### 1.- PRINCIPIO DEL MÉTODO

#### 1.1.- GENERALIDADES

Una literatura importante da cuenta de los diferentes métodos de medidas espectrofotométricas de la concentración de la clorofila (y derivados) en las aguas; Parsons (1966) y Humpphrey and Wootton (1966) hacen una síntesis y una crítica de esos métodos en la monografía de la UNESCO sobre la determinación de los pigmentos fotosintéticos. En resumen; después de la filtración de un cierto volumen de agua de mar para concentrar el material particulado, el filtro es inmerso en un solvente que asegura la extracción de los

pigmentos, luego se mide la absorbencia del extracto a una o varias longitudes de ondas, antes y después de acidificación si se busca determinar también las formas degradadas.

## 1.2.- FASE PREPARATORIA: FILTRACIÓN, EXTRACCIÓN.

Un grupo de trabajo SCOR-UNESCO ha sido creado en 1963 para estudiar e intentar de estandarizar los puntos siguientes:

- .- Tipo de filtro a utilizar para retener el plancton,
- .- Succión a aplicar al filtro,
- .- Necesidad de triturar o de desintegrar por ultra-sonido,
- .- Escogencia del solvente de extracción,
- .- Adición de productos básicos (carbono de magnesio o dimetilnilina),
- .- Desecación de los filtros,
- .- Tratamiento al vapor,
- .- Conservación,
- .- Duración de la extracción,
- .- Filtración o centrifugación de los extractos.

Todos esos puntos son considerados en el documento de la UNESCO (1966). Más recientemente, Hola-Hansen and Reiman (1978), han vuelto a tomar y precisado algunos aspectos metodológicos. Los filtros en fibras de vidrio han sido durante mucho tiempo acusados de dejar pasar finas partículas conteniendo clorofila. Si los resultados de Humphrey and Wootton (1966) parecen confirmarlo, los de Hola-Hansen and Reimann (1978) indican lo contrario. Se consideran como equivalentes las membranas de fibra de vidrio (tipo GF/C WHATMAN) y en celulosas o similares (tipo HA MULLIPORE 0,45 um). Hay que admitir sin embargo algunas ventajas de la fibra de vidrio; rapidez de filtración, facilidad de degradación (comparada a la lenta disolución de la membrana de celulosa), ausencia de turbidez debido al filtro, utilización corriente para otros análisis del material particulado (C, N, P), costo poco elevado.

utilización de un triturador o de un desintegrador a ultra-sonido, recomendado por la UNESCO como asegurando una mejor extracción, no parece de una necesidad absoluta y resultados equivalentes son obtenidos por extracción durante una noche (Holm-Hansen and Reiman, 1978; Aminot, 1983).

El solvente de extracción es importante. La acetona al 90% es recomendada por la UNESCO y corrientemente utilizada puesto que los coeficientes de absorción específica de la clorofila en ese solvente son bien conocidos. El metanol es sin embargo considerado como un mejor solvente; la extracción es más rápida y más completa para algunas especies de algas. Sin embargo, con el plancton marino costero, resultados comparables son obtenidos con el metanol y la acetona al 90%, si este último actúa durante mucho tiempo (Hola-Hansen and Reiman, 1978). Más recientemente el dimetil sulfoxido, mezclado con la acetona, ha igualmente sido demostrado más eficaz que la acetona al 90% (Burnison, 1980), pero el autor reconoce, como en el caso del metanol, que no existen diferencias significativas en el caso donde la poblaciones naturales. Es solamente en el caso donde la población planctónica contiene grandes cantidades de algas verdes (chlorophyceae) que la acetona al 90% podría ser reemplazada por otro solvente. De una manera general, la acetona al 90% será pues recomendada. Se señalará también que los pigmentos tiene tendencia a degradarse más

rápidamente en el metanol (Tett et al. 1975) y que el desplazamiento del pico de la feofitina en medio ácido implica sea una neutralización suplementaria sea una complicación de los cálculos de concentración (Tett et al., 1977; Høla-Hansen and Reiman, 1978).

La utilización del carbonato de magnesio ha sido introducida a la vez para mejorar la retención sobre los filtros y para prevenir la extracción, lo que provoca una degradación de la clorofila en feopigmentos. El documento de la UNESCO 1966, lo recomienda, pero algunos autores consideran que el adsorbe los pigmentos.

### **1.3.- FASE ANALITICA, MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS**

El método tricromático permite determinar las concentraciones de las clorofilas a,b,c a partir de medidas de absorbencia realizadas a las longitudes de ondas de máximo de absorción de las tres clorofilas, respectivamente, 663,645 y 630 nm en la acetona al 90%. Las ecuaciones estabilizadas por Richards and Thopson (1952) han sido revisadas por Parsons and Strickland (1963) puesto que los coeficientes de absorción específica utilizados por los primeros autores eran muy bajos. El grupo de trabajo reunido por la UNESCO ha establecido nuevas ecuaciones parecidas a las de Parsons and Strickland. Más recientemente, Jeffrey and Humphrey (1975) han propuesto nuevas ecuaciones bajo la base de una determinación de los coeficientes de absorción, esencialmente para la clorofila c. Los resultados para las clorofilas a y b son muy poco diferentes de los obtenidos por las otras ecuaciones, pero para la clorofila c ellos son más bajo en aproximadamente 50%.

El método monocromático de Lorenzen (1967), permite determinar solamente los pigmentos clorofilianos de tipo a, pero tiene la ventaja de dar las concentraciones en feopigmento. La absorbencia del extracto pigmentario es medida a 665 nm antes y después de la acidificación, transformando toda la clorofila en feopigmentos. El coeficiente de absorción específica de los feopigmentos siendo más débil que el de la clorofila, la disminución de la absorbencia resultando de la acidificación permite de conocer la razón de las formas. La acidificación practicada en el método monocromático debe ser efectuada con rigor. La cantidad de ácido debe ser suficiente para transformar la clorofila en feopigmentos pero un exceso de ácido puede a veces ser una fuente de error importante:

- .- Desplazamiento del máximo de absorción de los feopigmentos,
- .- Transformación de los epoxy-carotenoides en compuestos absorbiendo en el rojo, zona de absorción de la clorofila,
- .- Reacciones secundarias lentas provocando una deriva continua de la medida.

Según los autores, el pH óptimo después de la acidificación es de 2,6-2,8, pero en la acetona al 90% la tolerancia de pH es más elevada, puesto que las reacciones secundarias son más lentas.

### **1.4.- VALIDEZ DE LOS MÉTODOS**

Si las ecuaciones tricromáticas son interesantes para conocer las concentraciones de los diferentes tipos de clorofila, al contrario, como lo reconocen los autores de los diferentes métodos, la presencia de feopigmentos puede provocar serios errores. Los feopigmentos a, por ejemplo, son asimilados como clorofila en aproximadamente 60 % de su concentración. El método de Lorenzen permiten determinar únicamente las concentraciones de clorofila a y de feopigmentosa, que son las formas más importantes y las más corrientemente buscadas. Bien que no hay distinción entre feofitina y feoforbida, es sin embargo correcto, desde el punto de vista espectrofotométrico, de agruparlos bajo el término de feopigmento en razón de la identidad de sus coeficientes de absorción específica (Shuman and Lorenzen, 1975). La presencia de cantidades importantes de clorofila b puede introducir una ligera superestimación de la clorofila a y de los feopigmentos a (Holo-Hansen and Riemann, 1978), no obstante las aguas oceánicas superficiales siendo muy pobres en clorofila b (Parsons, 1966), es en aguas estuarios muy desaladas o a nivel de los máximos oceánicos profundos de clorofila que el caso se puede presentar (la razón clorofila b / clorofila a debe ser inferior a 0,4).

Clorofila y clorofilida (Lorenzen, 1967; Strickland and Parsons 1972).

Así como lo precisa Lorenzen (1967), se constata que las aguas costeras y sobre todo las estearinas son ricas en feopigmentos; aproximadamente 50% del pigmento total en invierno hasta casi la totalidad en los medios estuarios turbios. Es la razón por la cual se recomienda la utilización del método de Lorenzen.

## **1.5.- RESUMEN DE LOS MÉTODOS PRESENTADOS.**

Tres combinaciones son posibles y presentadas aquí abajo:

.- Extracción con acetona al 90% medida monocromática, llamado método de Lorenzen (método recomendado).

.- Extracción con metanol y medida monocromática, llamado método de Lorenzen modificado, según el protocolo de Holo-Hansen and Riemann (1978).

.- Extracción con acetona al 90% y medida a tres longitudes de onda, llamado método tricromático, según las ecuaciones de la UNESCO (1966) o las de Jeffrey and Humphrey (1975).

## **2.- DOMINIO DE CONCENTRACIÓN**

### **2.1.- GAMA DE CONCENTRACIONES.**

El método se aplica sin restricción a toda concentración, las limitaciones provienen de los equipos utilizados y de las posibilidades de filtración. La cantidad depositada sobre el filtro está limitada aproximadamente 10 ug de clorofila para evitar de efectuar una segunda extracción del filtro. Se buscará, en la medida de lo posible, obtener una absorbencia comprendida entre 0,2 y 0,8, zona de precisión óptima.

### **2.2.- PRECISIÓN.**

La precisión es difícil a definir; ella depende del volumen de agua filtrada, de la cantidad de solvente utilizado, de la longitud del trayecto óptico. Strickland and Parsons (1972), la expresan relativamente a la cantidad depositada, sobre el filtro y no a la concentración en el medio. Para la clorofila a, la precisión sería de  $\pm 5\%$  a nivel de 5 ug (sea  $\pm 0,25$  ug). Esta precisión, para el método tricromático, se entiende en la ausencia de feopigmentos; ella puede aplicarse al método monocromático en ausencia de grandes concentraciones de clorofila b. Para los feopigmentos a, la precisión es de 10% a nivel de 0,5 ug (sea  $\pm 0,05$  ug).

### **2.3.- LIMITE DE DETECCIÓN.**

El límite de detección depende del volumen filtrado así como de la cantidad de solvente de extracción y de la longitud del trayecto óptico. En la practica, para el volumen filtrado de 10 L, con 10 ml de solvente y un trayecto óptico de 10 cm, el limite de detección es de orden  $0,02 \text{ mg/m}^3$  para la clorofila a; para los feopigmentos a, él sería de  $0,04 \text{ mg/m}^3$ .

## **3.- MUESTREO Y ALMACENAMIENTO**

Las botellas en materia plástica, tipo NISKIN, VAN DORN, etc., pueden ser utilizadas para la toma de la muestra. El volumen necesario para el análisis (<10 L) es guardado en envases de vidrio o de plástico. Durante este almacenamiento, una filtración grosera a 300 um pueden ser practicada a fin de eliminar los restos vegetales y el zooplancton, pero ella puede, en ciertos casos, provocar una sub-estimación de la clorofila a planctónica.

## **4.- CONSERVACIÓN**

Es preferibles no dirigir el análisis de las muestras, filtradas o no, y la extracción será comenzada lo más rápidamente posible. Si se deben conservar las muestras no filtradas, estas deben ser colocadas en el refrigerador y al abrigo de la luz. Sin embargo, la filtración debe ser efectuada menos de 8 horas después del muestreo.

Una vez las muestras filtradas, es posibles conservar los filtros a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  al abrigo de la luz durante al menos 1 mes sin que haya modificado notable de la cantidad de clorofila o de la razón clorofila/feo pigmentos. Para esto, los filtros son inmediatamente colocados en tubos cerrados herméticamente, por ejemplo los tubos destinados a la centrifugación, y conservados así con o sin adición del solvente de extracción. Si se adopta la solución de conservar los tubos en el solvente de extracción, hay que vigilar que no existan perdidas del extracto durante la manipulación de los tubos; mantenerlos verticalmente, controlar el nivel del solvente; además, hay que evitar absolutamente la exposición de los extractos pigmentarios a la luz. En el mar, así los filtros no pueden ser congelados rápidamente, colocarlos en una cava, al abrigo de la luz, hasta el retorno al laboratorio donde ellos son congelados.

## **5.- EQUIPOS**

### **5.1.- DISPOSITIVO DE FILTRACIÓN**

La filtración es efectuada con un dispositivo de filtración por aspiración con la ayuda de un soporte de filtros permitiendo eventualmente de filtrar en una sola vez varios litros.

### **5.2.- CENTRIFUGADORA.**

Una centrifugadora de mesón pudiendo girar a 3000-4000 tr/min (aceleración del orden de 2000 x g) conviene.

Los tubos de centrifugación, en vidrio o en polipropileno, deben poder ser tapados herméticamente; resistentes y ligeros, el polipropileno es un material interesante para el trabajo en los barcos. Los tubos deben tener una capacidad de 10 a 15 ml y deben ser de preferencia graduados para la medida directa del solvente y para controlar las pérdidas o evaporaciones eventuales.

### **5.3.- ESPECTROFOTOMETRO.**

Los espectrofotómetros a banda ancha pasante no convienen para la medida de la clorofila. Más la banda pasante es ancha más la concentración en clorofila a encontrada es sub-estimada, mientras que ella es súper-estimada para la clorofila b. Para obtener resultados correctos, la banda pasante debe ser del orden de 1 a 2 nm. La clorofila a es sub-estimada de aproximadamente 6% para 5nm, 15% para 10 nm y 30% para 20 nm de banda pasante.

El aparato debe aceptar celdas de 5 a 10 cm de trayecto óptico para una buena sensibilidad. El volumen útil a la medida debido ser inferior a 10 ml, esas celdas deben ser causa de una pérdida de luz en las orillas del rayo óptico, fuente de valores errados de absorbencia. Se debe asegurar que la totalidad del rayo óptico atraviesa bien la celda; identificar eventualmente la plaza precisa de la celda en el compartimiento. Celdas de 5 cm pueden ser preferibles a las de 10 cm si la geometría del rayo provoca mucha pérdida en las celdas de 10 cm. Se debe escoger de preferencia celdas con tapas puesto que la evaporación provoca movimientos de convección modificando la absorbencia.

### **5.4.- TRITURADOR O DESINTEGRADOR.**

La utilización de un triturador o de un desintegrador a ultra –sonido no parece de gran necesidad para el estudio del plancton natural. La ventaja de un tal aparato es que él permite de reducir el tiempo de extracción a algunos minutos, en lugar de una hora o 24 horas respectivamente para el metanol y la acetona al 90%. En el caso particular de las poblaciones de fitoplancton muy difícilmente extractables (ej. Chlorophyceae), el aparato puede entonces ser necesario.

## **6.- REACTIVOS**

### **6.1.- SOLVENTE DE EXTRACCIÓN**

Utilizar acetona de muy buena calidad analítica, no es necesario destilarla. La deshidratación del solvente es efectuada con carbonato de sodio anhidro. La acetona al 90%

no será preparada en cantidades importante. En un matraz aforado de 500 ml, introducir con una pipeta 100 ml de agua destilada y completar con la acetona deshidratada.

## **6.2.- SOLUCIÓN DE ACIDO CLORHIDRICO 0,3 mol/l**

Diluir 40 veces el ácido clorhídrico concentrado ( $d = 1,18$ ) en el agua destilada, sea 2,5 ml de ácido por 100 ml de solución.

## **7.- MODO DE OPERACIÓN**

### **7.1. FILTRACIÓN.**

El agua debe ser filtrada lo más rápidamente posible después de su recolección. Utilizar de preferencia las membranas filtrantes en fibra de vidrio del tipo WHATMAN GF/C que retienen las partículas de talla superior a 0,5-1  $\mu\text{m}$ .

- Colocar una membrana sobre el soporte de filtros,
- Aplicar vacío y filtrar la muestra tomando la precaución de agitarla para bien recuperar todas las partículas; para evitar el riesgo de la ruptura de las células, no se creara un vacío superior a  $\frac{1}{2}$  bar, la presión residual bajo el filtro debe quedar superior a  $\frac{1}{2}$  bar.
- Lavar el embudo de filtración con un poco de agua de mar filtrada, para reunir todas las partículas sobre el filtro.
- Eliminar toda el agua del filtro.
- Guardar el filtro en el tubo previsto para este uso y si posible comenzar la extracción.
- Colocar inmediatamente el filtro o el extracto al abrigo de la luz, y en frío si el análisis es diferido.

### **7.2.- EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS.**

El filtro y el extracto pigmentario no deben jamás quedar en contacto con la luz; para evitar esto es aconsejables de cubrir los tubos con papel de aluminio.

- Introducir el filtro en un tubo de centrifugación y añadir 10 ml del solvente de extracción.
- Romper el filtro con la ayuda de una barra de vidrio, tapar y agitar para dispersar las fibras.
- Dejar que la extracción continúe, durante 2 horas en la oscuridad y en el refrigerador.
- Dejar revenir a la temperatura ambiente; si es necesario, ajustar el volumen, tapar y agitar.

- Centrifugar durante 1 minuto, retirar los tubos de la centrifugadora y hacer caer las fibras de vidrio, que se adhieren a la pared por encima de las superficies del solvente, por un ligero movimiento de agitación.

- Centrifugar de nuevo durante 5 a 19 min a 3000-4000 tr/min; los tubos deben estar tapados para evitar la evaporación (la centrifugación puede ser reemplazada por una filtración del extracto, pero esta práctica exige grandes precauciones; posibilidad de evaporación, contaminación, pérdida del extracto, exposición a la luz,...).

### **7.3.- MEDIDA DE LA ABSORBENCIA.**

#### **7.3.1.- LONGITUDES DE ONDA DE LAS MEDIDAS.**

La absorbencia debe ser medida a 665 y 750 nm.

#### **7.3.2.- DETERMINACIÓN DE LOS BLANCOS.**

Dos blancos entran en juego en las medidas espectrofotométricas de la clorofila; el blanco de las celdas y el blanco de la turbidez. El blanco de las celdas  $b_c$  debe ser determinado puesto que el puede no ser despreciables delante de las pequeñas absorbencias generalmente medidas sobre los extractos naturales.

- Llenar las dos celdas del espectrofotómetro con el solvente de extracción.  
 - Medir las absorbencia a  $\pm 0,001$  a las dos longitudes de onda; se obtiene así los blancos  $b_{c750}$  y  $b_{c665}$ .

El blanco de turbidez resulta de la presencia de finas partículas en el extracto. La medida del blanco de turbidez se efectúa para cada muestra a la longitud de onda de 750 nm, a la cual los pigmentos no absorben; se obtiene así el blanco bruto  $A_{c750}$ . El blanco neto de turbidez es obtenido restando el blanco de las celdas:  $A_{c750} - b_{c750}$ .

Este blanco debe ser inferior a 0,005 unidades de absorbencia por centímetro de trayecto óptico. Los filtros en fibra de vidrio bien centrifugado no crean ninguna turbidez. Las membranas de esteres de celulosas dan absorbencias mediables en la acetona al 90%.

- Transferir el sobrenadante de la centrifugación a la celda del espectrofotómetro; se evitará el traspaso de fibra de vidrio aspirando lentamente el extracto con una jeringa de vidrio.

- Colocar la celda en su plaza y asegurarse de su posicionamiento correcto.  
 - Medir las absorbencias brutas de los extractos no acidificados a las longitudes de onda de 665 y 750 nm, sea  $Ab_{665}$  y  $Ab_{750}$ . La medida a 750 nm debe ser inferior a 0,005 por centímetro de trayecto óptico.

- Acidificar por adición de 10 ul de ácido clorhídrico 0,3 mol/l por ml de extracto (sea una gota por cada 5 ml) directamente en las celdas y esperar de 2 a 3 minutos.

- Medir las absorbencias brutas de los extractos acidificados a 665 y 770 nm, sea  $Ab_{665}$  y  $Ab_{750}$ .

## 8.- CALCULOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las absorbencias brutas a 665 nm y los blancos de turbidez a 750 nm deben ser corregidos de los blancos de celdas; se obtienen así las absorbencias netas restando las absorbencias corregidas medidas a 750 nm de las absorbencias corregidas medidas a 665 nm.

Antes de la acidificación:

$$A^{na}_{665} = (Ab^{na}_{665} - b_{c665}) - (Ab^{na}_{750} - b_{c750}).$$

Después de la acidificación:

$$A^a_{665} = (Ab^a_{665} - b_{c665}) - (Ab^a_{750} - b_{c750})$$

Los otros datos son:

V: volumen de agua filtrada (litros),

v : volumen de solvente de extracción (mililitros),

l: longitud del trayecto óptico de la celda de medida (centímetros).

Las concentraciones de clorofila a y de feopigmentos a se calculan según las relaciones:

**BIBLIOGRAFÍA**

## MEDIDA DE LA SALINIDAD

- Anonimo., 1981.- Editorial note. Deep- Sea Res. 28(A) 4, p.i.
- Jacobsen, J.P. & Knudsen, M., 1940.- Urnormal 1937 or primary standard sea water 1937. Int.Unión Geodes Geophys. Assoc. Phys. Oceanogr. Publ. Sci. 7, 38 p.
- Sorensen, S.P.L., 1902.- Chlor-Und Salzbestimmung, p. 93-138, in M.Knudsen (ed), Berichte uber die Konstantenbestimmungen zur Aufstellung der hydrographischen Tabellen, 3 . Copenhagen.
- UNESCO. 1979.- Ninth repor of the joint panel on oceanographic tables and standards, UNESCO, Paris, 11-13 September 1978. UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci. 30.
- UNESCO. 1981. - Tables Océanographiques Internationales, 3 volume. UNESCO Tech.Pap.Mar. Sci. 39.

## ANALISIS DEL OXIGENO DISUELTO

- Carpenter, J.H., 1965.- The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis.Limnol.Oceanogr. 10,, 135-140.
- Carritt, D.E. & Carpenter, J.H., 1966.- Comparison and evaluation of currently employed modification of the Winkler method for determining dissolved oxygen in sea-water; a NASCO Repor. J.Mar. Res. 24, 286-318.
- FAO. 1975.- Manual of methods in aquatic environment research. Par. 1 . Methods for detection, measurement and monitoring of water pollution. FAO Fisheries Technical paper 137.
- Legler, C., 1972.- Methoden der Sauerstoffbestimmung und ihre Bewertung. Fortschr. Wasserchem. And Ihrer Grenzgeb. 14, 27.
- Murray, C.N., 1972.- & Riley, J.P., 1969.- The solubility of gases in distilled water and sea water. II. Oxygen. Deep sea Res. 16, 311-320.
- Murray, C.N., Riley, J.P. & Wilson, T.R.S., 1968.l- The solubility of oxygen in Winkler reagents used for determination of dissolved oxygen. Deep sea res. 15, 237-238.
- NIO-UNESCO., 1973.- Tables Océanographiques Internationales, Volumen 2, UNESCO, París.
- Weiss, R.F., 1970. - The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and sea water. Deep Sea Res. 17, 721-735.

## ELEMENTOS NUTRITIVOS MINERALES DISUELTOS.

Aminot, A et Kerouel, R., 1979.- Exercice d'intercalibration RNO 1978: Sels nutritifs (nitrate, nitrite et phosphate). Préparation des échantillons et résultats. MECV-CNEXO, Réseau National de Observation de la Qualité du Milieu Marin, Bulletin trimestriel n° 11, 179-214

Murphy, J & Riley, J.P., 1956. - The storage of sea water samples for the determination of dissolved inorganic phosphates.

#### ANALISIS DEL NITROGENO AMONIACAL.

Grasshoff, K & Johannsen, H., 1972. - A new sensitive and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water. J., Cons., Cons. Int. Explor. Mer 34, 516-521.

Koroleff, F., 1969. - Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. ICES. C.M., 1969/C; 9 Hydr. Comm.

Riley, J.P., Grasshoff, K. & Voipio, A., 1972.- Nutrient chemicals, P. 81-110, in. A Guide to Marine Pollution, compiled by E. D. Goldberg. Gordon and Breach Science Publishers INC., N-Y.

Solórzano, L., 1969.- Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. Limnol.Oceanogr. 14, 799-801.

#### ANALISIS DEL NITROGENO NITROSO

Bendschneider, K & Robinson, R.J., 1952.- A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. J. Mar.Res. 11, 87-96.

FAO., 1975.- Manual of methods in aquatic environment research. Part 1. Methods for detection, measurement and monitoring of water pollution. FAO Fisheries Technical Paper 137, 238 p.

SCOR-IOC-UNESCO/CSK., 1969. -On the preparation of CSK standards for marine nutrients on Oceanic Research, Science Council of Japan, 56p.

#### ANALISIS DEL NITROGENO NITRICO

Gardner, W.S., Wynne, D.S. & Dunstan, W.M., 1976. - Simplified procedure for the manual analysis of nitrate in sea water.

Grasshoff, K., 1964. - Zur Bestimmung von Nitrat in Meer-und Trinkwasser. Kieler Meerresforsch. 20(1), 5-11.

Wood, E.D., Armstrong, F. A: J., & Richards, F.A., 1967. - Determination of nitrate in sea water by cadmium copper reduction to nitrite. J.Mar.Biol.Ass.U.K. 47, 23-31.

#### ANALISIS DEL FOSFORO MINERAL DISUELTO

Johnson, D.L., 1971.- Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. Environ.Sci.Technol.5 (5), 411-414.

Jones, P.G.W., 1963.- The effect of chloroform on the soluble inorganic phosphate content of unfiltered sea water. J.Cons., Cons.Int.Explor.Mer 28(1), 3-7.

Murphy, J. & Riley, J.P., 1962.- A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal.Chim.Acta 27, 31-36.

Riley, J.P., Grasshoff, K. & Voipio, A., 1972.- Nutrient chemicals, P. 81-110, in A Guide to Pollution, compiled by E.D. Goldberg. Gordon and Breach Science Publishers Inc., N-Y.

#### ANALISIS DEL SILICIO DISUELTO REACTIVO

Grasshoff, K., 1977.- Results of the Baltic Intercalibration Workshop, Kiel, March 1977. ICES, C.M. 1977/C ; 4 Hydr. Comm.

Mullinn., J.B. & Riley, J.P., 1955.- The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural water with special referente to sea water. Anal.Chim.Acta 12, 162-170.

Riley, J.P., Grasshoff, K., & Voipio, a., 1972.- Nutriente Chemicals, P. 81-110, in .A Guide to marine Pollution, compiled by E.D. Goldberg. Gordon and Breach Science Publisher Inc., N-Y.

#### ANALISIS DEL NITROGENO ORGANICO DISUELTO

Antia, N.J., Berland, B.R., Bonin, D.J., & Maestrini, S.Y., 1976.- Utilisation de la matière organique dissoute en tant que substrat par les algues unicellulaires. In "Actualité de biochimie marine, colloque GABIM-CNRS, 1976", 147-178.

Jocteur-Monrozier, L., 1979.- Azote organique. Nature et évolution dans les sédiments récents. Relation avec l'origine du matériel organique. In "Biogéochimie de la matière organique à l'interface eau-sédiment. Colloques Internationaux du CNRS.293, 167-171.

Wollast, R., 1979.- Dégradation mécanisme of organic nitrogen in superficial sediments and its mathematical modeling. In "Biogéochimie de la matière organique à l'interface eau-sédiments.

#### ANÁLISIS DEL FOSFORO ORGANICO DISUELTO.

Hansen, A.L. & Robinson, R.J., 1953.- The determination of organic phosphorus in sea water with perchloric acid oxidation. *J.Mar.Res.* 12, 31-42.

Menzel, D.W., & Corwin, N., 1964.- The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. *Limnol.Oceanogr.* 10(2), 280-282.

Menzel, D.W., & Vaccaro, R.F., 1964.- The measurement of dissolved organic and particulate carbon in sea water. *Limnol.Oceanogr.*, 9, 138-142.

Redfield, A.C., Smith, H.P., & Ketchum, B.H., 1937.- The cycle of organic phosphorus in the Gulf of Maine. *Biol.Bull.*, 73, 421-443.

#### MEDIDA DE LAS MATERIAS EN SUSPENSION

AFNOR., 10972.- Détermination des matières en suspension. Norme Expérimentale T 90-115.

APHA-AWWA-WPCF., 1980. - Standard methods for examination of water and wastewater. 15 ed., Amer.Publ.Health Assoc., Washington DC. 1134 p.  
Banse, K., Falls, C.P., & Hobson, L.A., - A gravimetric method for determining suspended matter in sea water using Millipore filters. *Deep Sea Res.*, 10, 639-642.