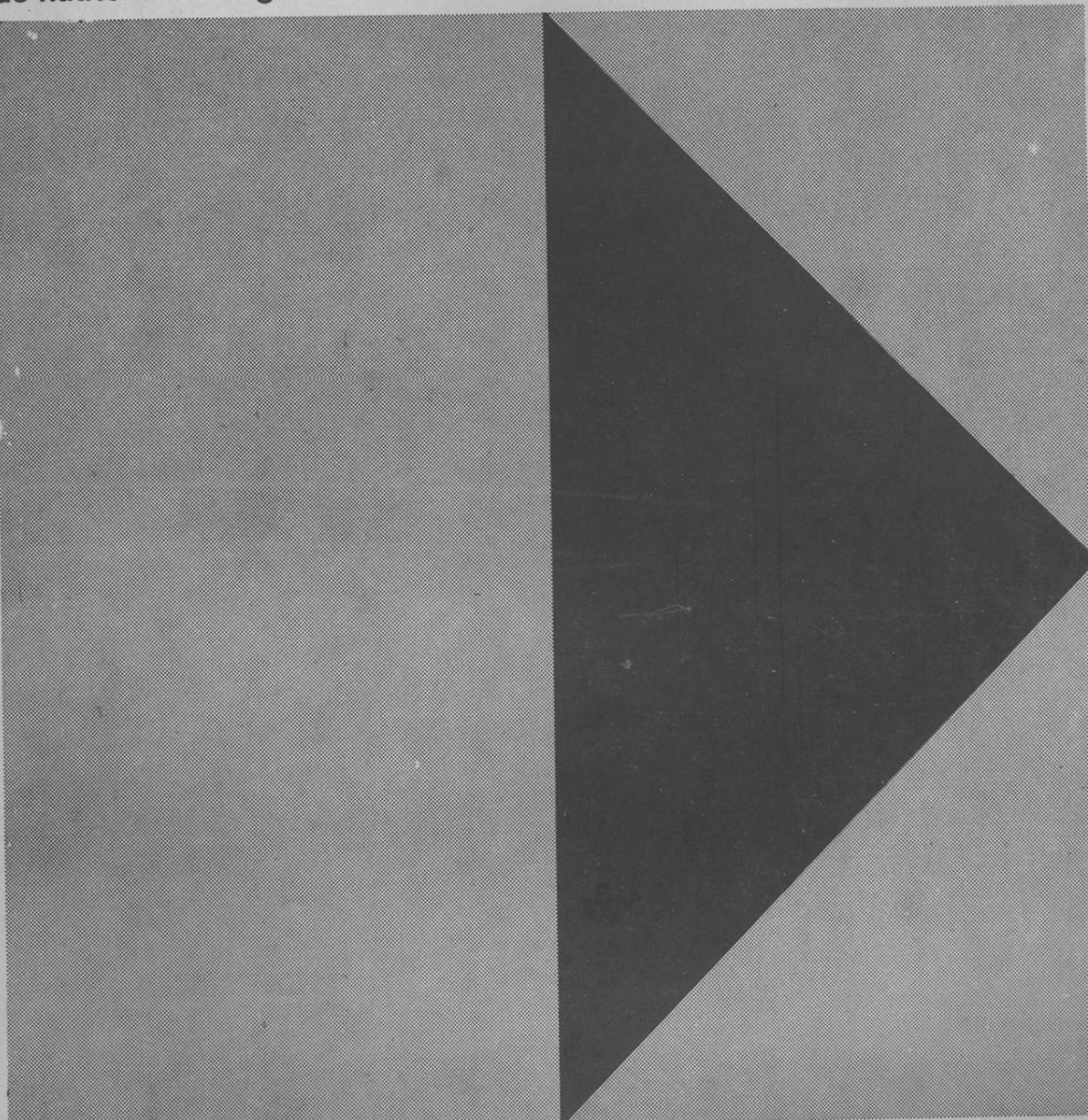


**INSTITUTO NACIONAL DE PESCA**  
**INFORMACION**

México 1974

Técnicas para determinación  
de nutrientes en agua de mar



INP/SI:m8

S.I.C./SUBSECRETARIA DE PESCA

TECNICAS PARA DETERMINACION DE NUTRIENTES EN AGUA DE MAR

Tomado de:

A PRACTICAL HANDBOOK OF SEA WATER ANALYSIS,  
de J. D. H. STRICKLAND y T. R. PARSONS, 1972

Traducido por:

Amado Villaseñor Casales

Origen de este trabajo

Las técnicas que se incluyen en este trabajo fueron traducidas del libro "A Practical Handbook of Sea Water Analysis", de J. D. H. Strickland y T. R. Parsons (Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, 1972).

Resumen

Se describen las técnicas para determinar nitrato, nitrito, silicato, fósforo y amoníaco en agua de mar.

Distribución

Personal del Instituto Nacional de Pesca y de otras instituciones de investigación y educativas de México.

Cita bibliográfica

Técnicas para determinación de nutrientes en agua de mar. Tomado de A PRACTICAL HANDBOOK OF SEA WATER ANALYSIS, de J. D. H. STRICKLAND y T. R. PARSONS, 1972. Traducido por Amado Villaseñor Canales. Inst. Nal. de Pesca. INP/SI:m8. 33 p.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
DETERMINACION DE NITRATO	
Introducción	1
Método	2
Notas	6
DETERMINACION DE NITRITO	
Introducción	9
Método	10
Notas	12
DETERMINACION DE SILICATO	
Introducción	14
Método	15
Notas	19
DETERMINACION DE FOSFORO	
Introducción	22
Método	23
Notas	25
DETERMINACION DE AMONIACO	
Introducción	28
Método	28
Notas	31

## DETERMINACION DE NITRATO

### Introducción

Desde la publicación de la primera edición de este manual, varios procedimientos nuevos han sido propuestos para la determinación de nitrato en agua de mar. El método basado en el trabajo de Mullin y Riley (Anal. Chim. Acta, 12:464, 1955) previamente descritos en la primera edición, ha probado ser moderadamente satisfactorio, pero son serias desventajas el período de reducción prolongado y la sensibilidad al movimiento. Pensamos ahora que lo último se debe a la presencia de aire encima de la solución, durante la reducción, y puede minimizarse efectuando ésta en una botella chica cerrada de 60ml de capacidad, en lugar de los matraces Erlenmeyer de 125ml recomendados.

El método de Chow y Johnson (Anal. Chim. Acta, 27:441, 1962), basado en una reducción de polvo de zinc, tiene la desventaja de que implica una solución agitada magnéticamente en baño de hielo seguido de un filtrado. Esto no es ni barato ni conveniente cuando se trabaja con muchas muestras en el mar. El procedimiento rápido y elegante descrito por Armstrong (Anal. Chem., 35:1292, 1963) carece de sensibilidad, puede ser problemático en aguas de alto contenido de "ácido húmico" e implica concentraciones no deseadas de ácido sulfúrico. Sin embargo, este método es ideal para determinaciones en soluciones de cultivos que contienen altas concentraciones de nitrato, especialmente cuando sólo se dispone de pequeños volúmenes de solución.

El siguiente procedimiento está basado en el método de Morris y Riley (Anal. Chim. Acta, 29:272, 1963) con algunas modificaciones. A sugerencia de Grasshoff (Kiel. Meeresforsch, 20:5, 1964), usamos cloruro de amonio. La columna de cadmio-mercurio ha sido reemplazada por otra de cadmio-cobre, basado en el trabajo de Wood, Armstrong y Richards (J. Marine Biol. Assoc. U. K., 47:25, 1967), aunque hemos tenido problemas con el uso de EDTA sugerido por estos investigadores y hemos tomado al cloruro de amonio como un activador. La reducción de nitrato a nitrito es casi completa y el método descrito enseguida es probablemente tan sensible como practicable por un procedimiento de rutina espectrofotométrico.

M E T O D OA. CAPACIDADES

Rango: 0.05 - 45  $\mu\text{g/litro}$

1. PRECISION EN EL NIVEL DE 20  $\mu\text{G-AT/LITRO}$ 

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm 0.50/n^{1/2}$   $\mu\text{g-at/litro}$

(usando celdas de 1cm).

2. PRECISION EN EL NIVEL DE 1  $\mu\text{G-AT/LITRO}$ 

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm 0.05/n^{1/2}$   $\mu\text{g-at/litro}$

(usando celdas de 10cm).

## 3. LIMITE DE DETECCION

La más pequeña cantidad de nitrógeno-nitrato que puede detectarse con certeza es cerca de 0.05  $\mu\text{g-at/litro}$ , usando celdas de 10cm.

B. BOSQUEJO DEL METODO

El nitrato en el agua de mar se reduce casi cuantitativamente a nitrito, pasando una muestra a través de la columna que contiene limaduras de cadmio (no apretadas) cubiertas con cobre metálico. El nitrito así producido se determina por diazonización con sulfanilamida en unión con N-1-Naftiletileno diamina, produciendo un tinte altamente coloreado debido a un compuesto azoico, la extinción del cual se mide. Puede hacerse una corrección para cualquier cantidad de nitrito inicialmente presente en la muestra.

C. APARATO Y EQUIPO ESPECIALES

Las columnas reductoras se preparan convenientemente uniendo por sus extremos tres piezas de tubo de vidrio, a saber: un tubo de 10cm de largo con 5cm de diámetro interno, con 30cm de tubo de vidrio de 10mm de diámetro interno, que es el que contiene las limaduras del metal (véase Sec. E más adelante), el cual a su vez se une a otro tubo de vidrio de 35cm con un diámetro interno de 2mm. Este último tubo se dobla justamente debajo de dicha unión, dándole forma de U, de manera que quede hacia arriba paralelamente al tubo de 10mm de diámetro y entonces se dobla nuevamente en el otro extremo para formar un sifón U invertido. Este último doblez debe quedar justamente a nivel con la parte superior del tubo de 10mm de diámetro, cuando el ensamble se mantiene hacia arriba para formar la columna.

Con este arreglo, el líquido colocado en el tubo superior que sirve de depósito debe fluir fuera del sistema, y detenerse cuando el nivel del líquido es tal que cubra las limaduras de metal (véase más adelante). Colocar las columnas reductoras dentro de cilindros grandes de vidrio o plástico, para su protección, y fijar por el exterior de éste un cilindro pequeño de vidrio, adaptado a otro tubo por uno de sus extremos con una manguera de hule cerrada con pinzas de presión. Dicho cilindro debe retener un volumen de 75ml y colocarse debajo de las salidas de las columnas reductoras, de manera que colecte los efluentes.

Márquese este cilindro a 40 y 50ml.

Probetas graduadas de 50ml.

Matraces Erlenmeyer de 125ml. Deben estar limpios, libres de grasa, de manera que retengan la mínima cantidad de agua cuando se escurran para secar.

#### D. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras (100ml  $\pm$  2ml) deben medirse con una probeta graduada de 100ml y colocarse en un matraz Erlenmeyer de 125ml. Las muestras serán estables durante varias horas si se mantienen frías en la oscuridad, pero el análisis no debe demorarse más de doce horas. Si son inevitables mayores demoras, las muestras deben congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un congelador donde no ocurrirán cambios detectables durante muchas semanas. A menos que el número de muestras sea grande, es recomendable almacenar a bordo las muestras de esta manera, y enviarlas después al laboratorio en tierra para análisis.

#### E. REACTIVOS ESPECIALES

##### 1. Solución concentrada de cloruro de amonio

Disolver 125g de cloruro de amonio calidad reactivo analítico, en 500ml de agua destilada, y almacenar en una botella de vidrio o de plástico.

##### 2. Solución diluída de cloruro de amonio

Diluir 50ml de solución concentrada de cloruro de amonio a 2,000ml, con agua destilada. Almacénese la solución en una botella de vidrio o de plástico.

##### 3. Limaduras de cadmio-cobre

Derretir el cadmio (una pureza de 99.9% es satisfactoria) en un tubo

de ensaye Pyrex, de 18 x 150mm, enterrado en arena seca, y déjese que el metal se solidifique. Con una escofina burda para madera, limar la cantidad requerida de metal y coleccionar la fracción, que pase un tamiz con malla de 2mm pero que se retenga en otro tamiz con malla de 0.5mm. Revolver unos 100g de limaduras a la vez, suficientes para dos columnas, con 500ml de una solución al 2% p/v de sulfato de cobre pentahidratado,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , hasta que la solución haya dejado toda la coloración azul y partículas semicoloidales de cobre empiecen a penetrar el líquido supernatante. Enrollar laminillas de cobre muy finas con los dedos y el pulgar para hacer un pequeño tapón y meterlo en el fondo de una columna reductora (es menos satisfactorio el pelo de angel -glass wool-, y debe usarse solamente si no es posible obtener laminillas de cobre muy finas). Llénese la columna con solución diluída de cloruro de amonio, o bien el licor supernatante de la preparación anterior de limaduras de cadmio-cobre, y vacíe después suficiente mezcla de cadmio-cobre para producir una columna de unos 30cm de longitud. Añadir las limaduras poco a poco y a la vez, golpeando suavemente la columna después de cada adición para asegurarse de que las limaduras se acomoden bien. Lavar completamente la columna con solución diluída de cloruro de amonio. El rango del flujo debe ser tal que 100ml de solución se lleven entre ocho y doce minutos para fluir completamente a través de la columna. Si el tiempo del flujo es menor de ocho minutos, hacer que sea más lento restringiendo la salida del sifón o bien empacando más cobre o pelo de angel -glass wool- en la base de la columna. Si el tiempo de flujo excede a doce minutos, aflojar el empaque de la base de la columna. Finalmente, agregar un pequeño tapón de "fibra" de cobre en la parte superior de la columna para prevenir que las limaduras de cadmio vayan a dar al depósito superior cuando se agreguen las soluciones a la columna. Mientras no se usen las columnas, deben dejarse con las limaduras de metal completamente cubiertas por la solución diluída de cloruro de amonio. Cuando se sospeche de la eficiencia en la reducción (véase la sección F, más adelante), deben vaciarse las columnas a un vaso de precipitados y deben lavarse las limaduras de cuatro columnas agitando vigorosamente con 300ml de solución al 5% v/v de ácido clorhídrico, decantando después el ácido y repitiendo el procedimiento una vez más. Finalmente, lavar el metal con porciones de 200-300ml de agua destilada hasta que el lavado no sea más ácido ( $\text{pH} > 5$ ), y decantar el líquido entonces para dejar el metal tan seco como sea posible. Trátese nuevamente el metal con la solución de sulfato de cobre, conforme se describió anteriormente. La mezcla regenerada de cadmio-cobre debe ser suficiente para tres columnas.

#### 4. Solución de sulfanilamida

Disolver 5g de sulfanilamida en una mezcla de 50ml de ácido clorhídrico concentrado (1.18gr esp.) y unos 300ml de agua destilada. Diluír

a 500ml con agua. La solución es estable por muchos meses.

5. Solución de N-1-Naftiletileno Diamina Diclorhidrato

Disolver 0.50g del diclorhidrato en 500ml de agua destilada. Almacenar la solución en una botella oscura. La solución debe renovarse una vez al mes, o bien directamente, cuando se desarrolla una fuerte coloración café.

F. ANALISIS EXPERIMENTAL

Procedimiento

1. Añadir 2.0ml de cloruro de amonio concentrado a la muestra en el matraz Erlenmeyer (Nota a). Mezclar la solución y vaciar unos 5ml en la parte superior de la columna y dejar que pase a través de ella (Nota b).

2. Añadir lo que resta de la muestra a la columna y colocar el matraz Erlenmeyer ya vacío debajo del recipiente colector (Sec. C, arriba). Cuando han pasado 40ml a través de la columna, drene el recipiente colector al matraz, enjuáguese éste con dicho efluente, escúrrase y pongáse nuevamente debajo del recipiente colector (Nota c).

3. Colectar 50ml adicionales en el recipiente colector y vaciarlos rápidamente al matraz Erlenmeyer (Nota d). La columna no estará completamente vacía; entonces debe dejarse que se drene sola hasta que cese el flujo (Nota e).

4. Tan pronto como sea posible después de la reducción, añadir 1.0ml de solución de sulfanilamida con una pipeta automática (Nota f). Dejar que reaccione el reactivo por un período mayor a dos minutos pero que no exceda a ocho minutos (Nota g). Agregar 1.0ml de solución de naftiletileno diamina y mezclar inmediatamente. Entre 10 minutos y dos horas después, medir la extinción de la solución en una celda de 1cm, contra agua destilada (Nota h), usando una longitud de onda de 5430 Å. Si la extinción es mayor a 1.25 (ca. 30 ug-at N/litro), medirla en una celda de 0.5cm, o pipetear 25.0ml de solución en un matraz seco y limpio, y añadir 25.0ml de agua destilada. Mezclar y volver a medir la extinción y duplicar este valor para usarlo en la fórmula siguiente. Si el valor de la extinción es menor que 0.1 en una celda de 1cm, repítase la lectura usando una celda de 10cm y use el último valor para propósitos de cálculo. Para extinciones entre 0.1 y 0.2 en una celda de 1cm, puede encontrarse conveniente hacer mediciones en una celda de 5cm. A menos que se sepa qué muestras adyacentes tienen valores de extinción dentro del 25% una de otra, la celda debe enjuagarse con cada nueva solución antes de ser llenada.

5. Corregir la extinción observada (usando celdas de 1, 5 o 10cm, como corresponda) con la de un blanco obtenido como se describe en la Sección G. Calcular el nitrato presente de la expresión:

$$\mu\text{g-at N/litro} = (\text{extinción corregida} \times F) - 0.95 C$$

donde C es la concentración de nitrito presente en la muestra en ug-at N/litro. (Nota i y Nota j).

#### N O T A S

(a) El uso continuo de las columnas provoca que éstas se desactiven; probablemente se deba al revestimiento de las partículas de metal por hidróxido o carbonato. La ligera acidificación de la muestra por la adición del cloruro de amonio, reduce grandemente el proceso de desactivación y una columna bien hecha debe ser capaz de reducir por lo menos 100 muestras. El volumen de las muestras no es crítico sino hasta por arriba de 5ml.

(b) Esta pequeña adición preliminar asegura que el líquido de la parte superior de la columna tenga la composición de la muestra, es decir, que no se registra error cuando se añade el volumen de la muestra y algo del líquido intersticial, que está en la parte superior de la columna, se mezcla con ella. De otra manera, si una muestra siguiera digamos a un testigo, pudieran ocurrir entonces algunas diluciones. Esta precaución es necesario tomarla solamente para trabajos de alta precisión, cuando la concentración de nitrato en muestras consecutivas varía grandemente.

(c) Se ha encontrado que es necesario el paso de los 40ml para vaciar la columna completamente de la muestra anterior, aunque esta precaución (Nota b) es sólo importante tomarla cuando las concentraciones varían grandemente de muestra a muestra. Pueden manejarse convenientemente a la vez un máximo de 8 - 10 columnas; si están preparadas apropiadamente, sus tiempos de drenado deben ser muy similares. El operador debe aprender a evaluar las demoras breves, necesarias entre los vaciados de las muestras de cada columna, a fin de que se cuente con tiempo para desechar la primera alícuota del efluente.

(d) Este volumen de 50ml no es crítico a unos pocos mililitros, y no es necesario que los matraces estén completamente escurridos de los lavados de la columna antes de colectarse esta fracción. Bajo las condiciones anteriores, la reducción es cerca de 93% completa y las variaciones de temperatura entre 10° y 35°C no tienen ningún efecto.

(e) No hay necesidad de lavar las columnas entre muestras, pero si éstas no van a usarse durante una, dos o más horas, debe vaciarse 50ml de cloruro de amonio diluido en el recipiente superior, y dejar que pase a través del sistema. Las columnas deben ser almacenadas completamente cubiertas por este líquido.

(f) Probablemente las soluciones reducidas de nitrito son estables durante varias horas, pero para mayor seguridad, especialmente en climas cálidos, su análisis no debe demorarse. El método que se sigue es idéntico al del nitrito.

(g) La temperatura no es crítica en este paso, puesto que cae en el rango de 15 - 30°C. La reacción de diazonización requiere de dos minutos para completarse, pero después de diez minutos son significativas y no deseadas las reacciones irreversibles y de descomposición.

(h) Se requieren diez minutos para un completo desarrollo de la coloración. Entonces, el color es estable por lo menos durante dos horas.

(i) Con buenas columnas, el nitrito queda reducido hasta a una extensión de 5%, de manera que se hace una corrección de 0.95 veces la concen-tración del nitrito en la muestra (véase determinación de nitrito). Cuando las columnas se encuentran desactivadas, esta fracción se incrementa, se vuelve errática y puede exceder al 20%.

(j) Cantidades de sulfuro de hasta 2mg de S<sub>2</sub>-/litro se dice que no interfieren con este método, aunque los repetidos análisis de tal agua desactivarán las columnas por la producción de sulfuro de cadmio.

## G. DETERMINACION DEL BLANCO

### 1. Blancos de celda a celda

Cuando ambas celdas (la de la muestra y la del agua destilada) se llenan con agua destilada, la extinción de una contra la otra debe ser de 0.000. Sin embargo, pequeños defectos ópticos pueden producir un pequeño valor positivo o negativo. El agua de la celda del agua destilada debe cambiarse cada día, puesto que pueden resultar marcadas turbideces aún en agua destilada, si permanece en la celda durante mucho tiempo.

### 2. Blancos de los reactivos

El blanco de los reactivos sólo es significativo cuando se trabaja con celdas de 1cm; sin embargo, debe checarsse ocasionalmente. Asume considerable importancia cuando se usa una celda de 10cm. El agua destilada

ordinaria debe ser satisfactoria, pero puede contener una apreciable cantidad de nitrato, así que, para su uso en la determinación de blancos de los reactivos, cuando se van a determinar pequeñas cantidades de nitrato, dicha agua destilada debe redestilarse de un permanganato poco alcalino, desechando los primeros pocos milímetros del destilado. Se asume que tal agua no contiene nitrato.

Efectúese el método exactamente como se describe en la Sección F, párrafos 1-4, usando las celdas adecuadas de 1, 5 ó 10cm. Añadir la solución concentrada de cloruro de amonio a 100ml de agua redestilada, en un matraz Erlenmeyer limpio, y usar una columna a la cual previamente se le ha agregado 50ml de solución diluida de cloruro de amonio en el momento de usarla. La extinción del blanco, corregida por cualquier blanco de celda a celda, no debe exceder de 0.1 usando una celda de 10cm.

### 30. Blanco para la turbidez

Si la cantidad de nitrato es suficientemente baja para garantizar el uso de una celda de 10cm, debe checarsé la turbidez y entonces las muestras deben filtrarse antes del análisis, si la extinción de la turbidez es apreciable.

## H. CALIBRACION

Puesto que hay un pequeño efecto debido a la sal en este método, la calibración debe efectuarse usando agua de mar sintética o bien agua de mar natural con una concentración de nitrato menor de 1  $\mu\text{g-at N/litro}$ . Cuando se hacen análisis para muy pequeñas concentraciones de nitrato (digamos menos de 0.5  $\mu\text{g-at N/litro}$ ), el factor puede determinarse en agua de mar con gran florecimiento planctónico, pero las evidencias apuntan por el momento que esto no es necesario. La relación concentración-extinción es estrictamente lineal y, por lo tanto, el factor necesita obtenerse solamente a un sólo nivel de concentración de nitrato. Como una protección contra la desactivación de las columnas, debe ponerse un estándar en cada columna al iniciarse cada día de trabajo. Generalmente, no debe haber una diferencia significativa entre los factores obtenidos para cada columna, pero puede usarse, si se desea, el promedio acumulativo para cada una de ellas, con el fin de minimizar los errores que pudieran surgir si es que presentan pequeñas diferencias.

### 1. Agua de mar sintética

Disolver 310g de cloruro de sodio, NaCl, calidad reactivo analítico, 100g de sulfato de magnesio,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , calidad reactivo analítico, y 0.50g de bicarbonato de sodio,  $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 10 litros de agua destilada.

## 2. Solución estándar de nitrato

Disolver 1.02g de nitrato de potasio;  $\text{KNO}_3$ , calidad reactivo analítico, en 1,000ml de agua destilada. La solución es estable indefinidamente en ausencia de evaporación.

1ml  $\equiv$  10.0  $\mu\text{g}$ -at de nitrógeno.

Diluir 4.00ml de esta solución a 2,000ml con agua de mar sintética. Esta solución debe almacenarse en una botella oscura y prepararse una nueva en el momento de usarse.

Concentración = 20  $\mu\text{g}$ -at N/litro.

## 3. Procedimiento

Añadir unos 110ml de dicha solución estándar diluída a matraces Erlenmeyer limpios y secos de 125ml y efectuar la determinación exactamente como se describe en la Sección F, párrafos 1-4. Medir la extinción en una celda de 1cm. Realizar el experimento inicialmente en triplicado para cada columna y corregir el promedio de las tres extinciones así obtenido por la extinción del blanco. Deben hacerse subsecuentes pruebas diarias pero solamente una determinación para cada columna.

Calcular el factor F de la expresión:

$$F = \frac{20.0}{E}$$

donde E es la extinción promedio de los tres valores para cada columna corregida por la de un blanco. F debe tener un valor cercano a 25 cuando se emplea un espectrofotómetro.

## DETERMINACION DE NITRITO

### Introducción

Hay varios métodos para la determinación de nitrito en el agua basados en una reacción Griess clásica, donde el ácido nitroso se convierte en un tinte muy coloreado formado por un compuesto azoico. Se ha escogido el método de Shinn [Ind. Eng. Chem. (Anal. Edition), 13:33, 1941], aplicado al agua de mar por Bendschneider y Robinson (J. Marine Res., 11:87, 1952) porque probablemente es la aplicación más sensible y libre de confusión de la reacción hasta aquí descrita.

M E T O D OA. CAPACIDADES

Rango: 0.01 - 2.5  $\mu\text{g-at/litro}$

1. PRECISION EN EL NIVEL DE 1  $\mu\text{g-at/litro}$ .

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm 0.032/n^{1/2}$   $\mu\text{g-at/litro}$ .

2. PRECISION EN EL NIVEL DE 0.3  $\mu\text{g-at/litro}$ .

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm 0.023/n^{1/2}$   $\mu\text{g-at/litro}$ .

3. LIMITE DE DETECCION

La más pequeña cantidad de nitrógeno-nitrito que puede detectarse con certeza es de 0.01  $\mu\text{g-at/litro}$ .

Elimine las dobles determinaciones si los valores de extinción difieren por:

más de 0.03 en el rango de extinción 0.5 - 1.0,  
más de 0.02 en el rango de extinción 0.1 - 0.5,  
ó más de 0.005 en el rango de extinción 0.03 - 0.1.

Si los valores dobles de la extinción difieren por menos de los anteriores límites, tómese un valor promedio.

B. BOSQUEJO DEL METODO

Se deja que el nitrito del agua de mar reaccione con sulfanilamida en solución ácida. El compuesto diazo resultante reacciona con N-1 Naftil-etileno diamina diclorhidrato y forma un tinte muy coloreado, la extinción del cual se mide usando celdas de 10cm.

C. APARATO Y EQUIPO ESPECIALES

Matraces Erlenmeyer de 125ml. Estos deben enjuagarse con agua destilada y dejarse escurrir, para que se sequen; no se requiere ningún tratamiento especial de lavado.

#### D. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las probetas de 50ml, así como los matraces Erlenmeyer de 125ml usados para esta determinación, deben enjuagarse dos veces con la muestra e invertirse para que escurran, y sacudirse. Después se mide una muestra de 50ml dentro de un matraz. Las muestras son estables con luz tenue durante muchas horas a temperatura del laboratorio, pero el análisis no debe demorarse más de 5 a 10 horas. Si esto es inevitable, deben congelarse las muestras, pero no se recomienda un almacenamiento prolongado. Para trabajos de mucha precisión en áreas cerca de la costa, sepárese una muestra de unos 30ml para medir la turbidez.

#### E. REACTIVOS ESPECIALES

##### 1. Solución de sulfanilamida.

Disolver 5g de sulfanilamida en una mezcla de 50ml de ácido clorhídrico concentrado (1.18gr esp.) y 300ml de agua destilada. Diluir a 500ml con agua. La solución es estable durante muchos meses.

##### 2. Solución de N-1 Naftiletileno Diamina Diclorhidrato

Disolver 0.50g de Diclorhidrato en 500ml de agua destilada. Almacéñese la solución en una botella oscura. La solución debe renovarse cada mes o bien directamente cuando se desarrolle una fuerte coloración café.

#### F. ANALISIS EXPERIMENTAL

##### Procedimiento

1. Medir las extinciones de la muestra para obtener las correcciones por turbidez, descritas en la Sección G.3.

2. Añadir 1.0ml de solución de sulfanilamida, con una pipeta automática, a cada muestra (50ml dentro de un matraz de 125ml), mezclar, y dejar que el reactivo reaccione entre dos y ocho minutos (Notas a y b).

3. Agregar 1.0ml de solución N-1 NAFTILETILENO DIAMINA y mezclar inmediatamente. Entre diez minutos y dos horas después, medir la extinción de la solución en una celda de 10cm contra agua destilada (Nota c). Debe usarse una longitud de onda de 5430 Å.

Si se usa un absorciómetro tipo filtro, escójase un filtro que tenga una cresta o máximo de transmisión tan cercano a 5400 Å como sea posible. A menos que se sepa cuáles muestras adyacentes tienen valores de extinción dentro del 25% una de otra, la celda debe anjuagarse con cada nueva solución antes de llenarse.

4. Corríjase la extinción medida restando ambos valores, el de turbidez y el del blanco de los reactivos (Sección G). Calcúlese la concentración nitrógeno-nitrito en microgramos-átomo de nitrógeno por litro ( $\mu\text{g-at N/litro}$ ) de la expresión:

$$\mu\text{g-at N/litro} = \text{extinción corregida} \times F$$

donde F es un factor obtenido como se describe abajo en la Sección H.

Los resultados se dan con tres cifras decimales. Numerosos compuestos pueden interferir con este método, pero ninguno de ellos estará presente en cantidades significativas en el océano, aguas cercanas a la costa o bien estuarinas, a menos que se encuentre una contaminación excesiva por escurrimiento terrestre.

#### NOTAS

(a) Este método no es afectado apreciablemente por la salinidad ni por pequeños cambios en la concentración y volumen de los reactivos, o por la temperatura. La temperatura, sin embargo, debe estar dentro del rango de 15 - 25°C. El volumen exacto de muestra no es crítico, pero debe estar entre 45 y 55ml.

(b) La reacción de diazonización requiere de dos minutos para completarse, pero son significativas, después de diez minutos, las reacciones irreversibles no deseadas y de descomposición.

(c) Se requieren diez minutos para un completo desarrollo de la coloración. El color es estable por lo menos durante dos horas, pero después de este tiempo se desvanece lentamente. Un máximo de dos horas es el límite seguro, y no ocurrirá ningún error apreciable durante una o dos horas después si las soluciones se guardan lejos de la luz directa del sol.

#### G. DETERMINACION DEL BLANCO

##### 1. Blancos de celda a celda

Cuando ambas celdas, la de la muestra y la del agua destilada, se llenan con agua destilada, la extinción de una contra la otra debe ser 0.000. Debido a pequeños defectos ópticos, puede encontrarse un pequeño valor positivo o negativo.

Se admite esto cuando los blancos para turbidez se restan (ver más adelante el párrafo No. 3) pero dicho valor debe encontrarse al ser determinado el blanco de los reactivos. El agua en la celda del agua destilada debe cambiarse cada día o cada dos, puesto que puede resultar cierta turbidez aún en el agua destilada si permanece en la celda mucho tiempo.

## 2. Blancos para los reactivos

Efectúese el método exactamente como se describe en la Sección F, párrafos 2 y 3, usando agua destilada en lugar de agua de mar. Corregir la extinción resultante con el blanco de celda a celda. Dicho valor del blanco de los reactivos no debe exceder a 0.03. El origen de este blanco es oscuro. Parece proceder principalmente cuando ambos reactivos se mezclan, y de algún modo cambia de día a día. Debe determinarse (promedio de dobles determinaciones) para cada grupo de muestras.

## 3. Blancos para la turbidez del agua de mar

En aguas turbias cercanas a la costa, éstas pueden convertirse en una fracción muy apreciable de la extinción total, que raramente excede a 0.03 en las determinaciones de nitrito. Los blancos para turbidez deben determinarse en las muestras superficiales y ser de 10m en cada lance. Después, medir progresivamente a mayores profundidades hasta que el valor sea apreciablemente constante. Entonces este valor (generalmente menor a 0.01 por debajo de los 25m en aguas oceánicas) es casi igual al blanco de celda a celda (Sección G.1 arriba) y puede aún tener un pequeño valor negativo. Los blancos para turbidez deben medirse en muestras separadas de agua de mar de 30ml a las cuales se le ha añadido 1ml de sulfanilamida.

## H. CALIBRACION

### 1. Solución estándar de nitrito

Para efectos de calibración, es suficiente el nitrito de sodio anhidro,  $\text{NaNO}_2$  (calidad reactivo analítico). Para mayor seguridad, un poco de la sal debe ponerse a secar durante una hora a  $110^\circ\text{C}$ . Disolver 0.345g en 1,000ml de agua destilada. Almacenar la solución en una botella oscura con 1ml de cloroformo como preservativo. La solución es estable por lo menos durante uno a dos meses.

$$1\text{ml} \equiv 5 \mu\text{g-at N}$$

Diluir 10.0ml de esta solución a 1,000ml con agua destilada y usarla el mismo día.

$$1\text{ml} \equiv 5 \times 10^{-2} \mu\text{g-at N}$$

$$1\text{ml} \equiv 1.0 \mu\text{g-at N/litro en 50ml de muestra de agua de mar.}$$

## 2. Procedimiento

Preparar cuatro soluciones estándar, consistentes en 2.00ml de la solución diluida de nitrito (medidas con una pipeta graduada de 2.00ml) llevados a un volumen de 50ml en un matraz volumétrico o en una probeta graduada de 50ml. Transferir las soluciones a cuatro matraces Erlenmeyer secos de 125ml y colocar 50ml de agua destilada en dos matraces más, para actuar como blancos.

Efectuar la determinación de nitrito como se describe en la Sección F, párrafos 2 y 3.

Calcular el factor F de la expresión:

$$F = \frac{2.00}{E_S - E_b}$$

donde  $E_S$  es la extinción promedio de los cuatro estándares y  $E_b$  es la extinción promedio de los dos blancos (no corregidos por los blancos de celda a celda).

Nota: El factor F no varía con el tiempo ni tampoco sobre un amplio rango de condiciones experimentales; cuando se emplea un espectrofotómetro es cerca de 2.1.

## DETERMINACION DE SILICATO

### Introducción

Todos los métodos para la determinación de silicato en agua de mar, se basan en la producción del complejo silicomolibdato. Algunos métodos que confían en la medición directa de la absorción de la luz de esta sustancia amarilla (i.g. Robinson y Thompson, J. Marine Res., 7:49, 1948) son mucho menos sensibles y satisfactorios que aquellos que llevan primero una reducción del complejo amarillo a un complejo azul más intensamente coloreado.

Una reducción por cloruro estannoso (Armstrong, J. Marine Biol. Assoc. U.K., 30:149, 1951) da la técnica más sensible, pero algunas condiciones son críticas especialmente en intervalos de tiempo y hemos preferido usar una reducción por metol, que es menos estricto. El método aquí descrito es una modificación muy leve del dado por Mullin y Riley (Anal. Chim. Acta, 12:162, 1955). Un trabajo en la química básica de la formación del silicomolibdato fue efectuado por el autor principal del presente manual (Strickland, J. Am. Chem. Soc., 74:862 et seq. 1952).

Debe recordarse que no todos los compuestos de sílice en "solución" reaccionarán para dar el complejo silicomolibdato. El ácido silícico se polimeriza rápidamente con el pH del agua de mar y solamente polímeros de cadena abierta de tamaño relativamente corto reaccionarán con el molibdato a cualquier velocidad apreciable.

Polímeros con pocas, como tres o cuatro unidades, de ácido silícico probablemente "no reaccionan" bajo las condiciones del método aquí descrito (Chow y Robinson, Anal. Chem., 25:646, 1953; Alexander, J. Am. Chem. Soc. 75:5655, 1953, y 76:2094, 1954). Para evitar ambigüedad, por lo tanto, se usa mejor el término "Silicato reaccionante", siendo entendido que mientras esta cantidad no sea tan grande como el total del ácido silícico disuelto, probablemente dé una medida completa de la cantidad disponible para el crecimiento de las células de los vegetales.

## M E T O D O

### A. CAPACIDADES

Rango: 0.1 - 140  $\mu\text{g-at/litro}$

1. PRECISION EN EL NIVEL DE 100  $\mu\text{G-AT/LITRO}$ .

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de  $\underline{n}$  determinaciones  $\pm 2.5/n^{1/2}$   $\mu\text{G-AT/LITRO}$   
(usando celdas de 1cm).

2. PRECISION EN EL NIVEL DE 10  $\mu\text{g-at/litro}$

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de  $\underline{n}$  determinaciones  $\pm 0.25/n^{1/2}$   $\mu\text{g-at/litro}$   
(usando celdas de 10cm).

3. LIMITE DE DETECCION

La más pequeña cantidad de silicato que puede detectarse con certeza es cerca de 0.1  $\mu\text{g-at/litro}$  (usando celdas de 10cm). Rechace las determinaciones llevadas a cabo en duplicados si los valores de extinción di-

fieren por:

más de 0.05 en el rango de extinción 0.5 - 1.0 en una celda de 1cm.  
más de 0.025 en el rango de extinción 0.1 - 0.5 en una celda de 1cm.  
más de 0.05 en el rango de extinción 0.5 - 1.0 en una celda de 10cm.

Si los valores duplicados de la extinción difieren sin alcanzar los límites anteriores, tómesese un valor promedio.

#### B. BOSQUEJO DEL METODO

Se deja que la muestra de agua de mar reaccione con el molibdato bajo condiciones que resultan de la formación de complejos: silicomolibdato, fosfomolibdato y arsenomolibdato. Se agrega entonces una solución reductora que contiene metol y ácido oxálico, la cual reduce el complejo silicomolibdato para dar un compuesto azul reducido y, simultáneamente, descompone cualquier fosfomolibdato o arsenomolibdato, de manera que se elimina cualquier interferencia por fosfato y arsenato. Se mide la extinción de la solución resultante con celdas de 1 ó 10cm.

#### C. APARATO Y EQUIPO ESPECIALES

Para cada determinación de silicato, usar una probeta graduada de vidrio con tapón, de 50ml de capacidad. Inicialmente, dichas probetas deben limpiarse llenándose con mezcla crómica. Si se reserva un juego de probetas especialmente para esta determinación, y se enjuagan bien con agua destilada antes y después de cada análisis, se ha encontrado poca evidencia de contaminación por sílice del vidrio.

Dos pizetas de polietileno, una de 300ml de capacidad por lo menos.

#### D. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de agua de mar para determinación de silicato no deben almacenarse en botellas de vidrio, ni siquiera minutos antes del análisis, y deben ser transferidas las muestras directamente a recipientes de vidrio encerados interiormente o a recipientes de polietileno. A fin de minimizar el efecto de multiplicación de diatomeas, hay que almacenar las muestras en la obscuridad y por un período no mayor de un día anterior al análisis. Es factible el almacenamiento de aguas con bajo contenido de plancton durante una semana, si las muestras se conservan frías, pero algo de materia silíceas suspendida puede disolverse y causar un error apreciable si el período de almacenamiento excede pocos días.

El almacenamiento de muestras congeladas a 20°C es satisfactorio por un período de meses, pero puede ocurrir que los resultados sean un poco más bajos (5 a 10% como máximo) si las muestras tienen concentraciones de silicato reaccionante que exceda de 50 µg-at Si/litro, especialmente cuando las concentraciones exceden de 100 µg-at Si/litro. En las muestras de aguas profundas, se recomienda efectuar el análisis a bordo del barco tan pronto como éstas se obtengan.

#### E. REACTIVOS ESPECIALES

##### 1. Molibdato

Disolver 4.0g de paramolibdato de amonio calidad reactivo analítico,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (de preferencia finamente cristalino) en unos 300ml de agua destilada. Añadir 12.0ml de ácido clorhídrico concentrado (12N, 1.18gr esp.), mezclar, y aforar a 500ml con agua destilada. Almacenar la solución en una botella de polietileno, en la cual es estable por muchos meses si se mantiene lejos de la luz directa del sol. La solución se desechará si se forma mucho precipitado blanco en los lados del recipiente.

##### 2. Solución de Metol-Sulfito

Disolver 6g de sulfito de sodio anhidro,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , en 500ml de agua destilada y después añadir 10g de p-(Metilamino) fenol sulfato (metol).

Cuando el metol se ha disuelto, filtrar la solución usando un papel filtro Whatman No. 1 y almacenarla en una botella de vidrio, limpia, la cual debe cerrarse herméticamente. Es posible que esta solución se deteriore rápidamente y provoque errores; por lo tanto, debe prepararse una cada mes, como mínimo.

##### 3. Solución de ácido oxálico

Preparar una solución saturada de ácido oxálico agitando 50g de ácido oxálico dihidratado,  $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , calidad reactivo analítico, con 500ml de agua destilada. Decantar la solución de los cristales para usarla. Esta solución debe almacenarse en una botella de vidrio y es estable indefinidamente.

##### 4. Solución de ácido sulfúrico al 50% V/V

Añadir 250ml de ácido sulfúrico concentrado (1.82gr esp.), calidad reactivo analítico, a 250ml de agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y aforar a 500ml con un poco más de agua destilada.

### 5. Solución reductora

Mezclar 100ml de la solución de metol-sulfito con 60ml de solución de ácido oxálico. Añadir lentamente, mezclando 60ml de solución de ácido sulfúrico al 50% como se señala antes y aforar la mezcla a un volumen de 300ml con agua destilada. Esta solución debe prepararse para uso inmediato.

### F. ANALISIS EXPERIMENTAL

#### Procedimiento

1. Las soluciones de las muestras deben estar a una temperatura entre 18 y 25°C (Nota a). Añadir 10ml de solución de molibdato a una probeta seca de 50ml, con tapón (Nota b). Pipetear 25ml de muestra de agua dentro de la probeta, taparla, mezclar las soluciones y dejar reposar la mezcla durante diez minutos (Notas c y d).

2. Añadir la solución reductora rápidamente para hacer el volumen exactamente a 50ml (Nota b), y mezclar enseguida (Nota e).

3. Dejar la solución reposando durante dos a tres horas (Nota f) para completar la reducción del complejo silicomolibdato (Nota g). Si se requieren valores precisos para cantidades de silicio debajo de 12  $\mu\text{g-at/litro}$ , úsese una celda de 10cm; de otra manera, medir la extinción de la solución en una celda de 1cm contra agua destilada. Debe usarse una longitud de onda de 8,100 Å con un espectrofotómetro (fotocelda sensitiva al rojo). Si se usa un absorciómetro tipo filtro, escoger un filtro que tenga un máximo de transmisión arriba de 7,000 Å (Nota h). A menos que se sepa qué muestras adyacentes tienen valores de extinción dentro del 25% una de otra, la celda del absorciómetro debe enjuagarse con cada nueva solución antes de llenarse.

4. Corregir la extinción medida restando el valor de un blanco obtenido con una celda de 1 ó 10cm, como convenga (véase Sec. G). Calcular la concentración de silicato reaccionante en microgramos átomo de silicio-silicato por litro ( $\mu\text{g-at Si/litro}$ ) de la expresión:

$$\mu\text{g-at Si/litro} = \text{extinción corregida} \times F$$

de donde F es un factor para cada longitud de celda, obtenido como se describe más adelante, en la Sección H. Los resultados se dan con tres cifras decimales.

N O T A S

(a) No hay ningún efecto pronunciado de temperatura con este método, pero las muestras, especialmente en el período de reducción, deben estar a una temperatura que exceda 18°C. Deben evitarse, sin embargo, temperaturas que excedan de 25 a 30°C, pues éstas apresuran la descomposición del complejo silicomolibdato.

(b) Las probetas limpias deben escurrirse para que se sequen antes de usarlas (sólo debe quedar en ellas menos de 0.5ml de agua).

El molibdato de amonio debe medirse directamente dentro de la probeta que se use, corrigiéndose el volumen a 0.5ml. En el mar, es conveniente que tanto esta solución como la solución reductora se tengan en pizetas de polietileno.

(c) El silicato y el molibdato deben combinarse antes de añadir la solución reductora. Diez minutos son suficientes para esta reacción. La adición de la solución reductora no debe demorarse más de 30 minutos; de lo contrario se efectuarán cambios no deseables en la forma isomérica del complejo silicomolibdato.

(d) Se agrega la muestra a la solución ácida de molibdato, en lugar de hacerse a la inversa, de manera que la mezcla agua de mar-molibdato se encuentre siempre arriba de una cierta acidez. Esto previene la posible aparición de una forma isomérica no deseable del complejo silicomolibdato.

(e) El uso de un reductor a base de metol es un método menos sensible que el que se logra al usar cloruro estannoso. Sin embargo, la sensibilidad no es de primordial importancia para el silicio, que es relativamente abundante en el agua de mar en comparación con un elemento como el fósforo, además de que el reductor a base de metol tiene algunas ventajas. Este reactivo es más estable que el cloruro estannoso, y la estabilidad del color azul que produce con el ácido silicomolibdico es mayor. Como no se producen compuestos de molibdeno pentavalente amarillos, el procedimiento para calcular la corrección del "Blanco" es menos complicado que cuando se emplea cloruro estannoso. Se agrega ácido oxálico a la solución reductora para descomponer cualquier fosfo o arsenomolibdato que se haya formado con el complejo silicomolibdato.

(f) El tiempo requerido para la completa formación del color azul varía según la cantidad de silicio que vaya a determinarse. Para menos de 50 µg-at/litro, una hora es suficiente. Sin embargo, para cantidades que excedan de 75 a 100 µg-at/litro, sólo 90 ó 95% del complejo silicomolibdato puede reducirse a 60 minutos, así que para mayor seguridad debe

dejarse por lo menos tres horas.

Puede registrarse un incremento muy pequeño (1 a 2%) en las 12 a 24 horas siguientes, pero el efecto es desechable. Las soluciones son estables, para efectos prácticos, durante seis horas.

(g) Dependencia de la extinción en la salinidad: a menos que el absorciómetro sea sensible al cercano infrarrojo, puede esperarse marcada reducción en la sensibilidad de este método. El efecto no es serio para longitudes de onda que excedan de  $6,500 \text{ \AA}$ , pero puede necesitarse el uso de curvas de calibración al mostrarse una pequeña desviación en la gráfica llamada Ley de Beer.

#### G. DETERMINACION DEL BLANCO

Puede omitirse la corrección del Blanco para agua destilada almacenada en polietileno, y se obtiene un Blanco satisfactorio para las soluciones, usando agua destilada en lugar de agua de mar.

Efectúese el método exactamente como se describe en la Sección F, párrafos 1 a 3, usando 25ml de agua destilada en lugar de la muestra de agua de mar. La extinción de este Blanco no debe exceder a 0.01 en una celda de 1cm ó a 0.1 en una celda de 10cm, debe medirse para cada grupo de soluciones y comprobarse a intervalos semanales durante un crucero. Si se usan celdas de 10cm, debe determinarse el Blanco en duplicado con cada grupo de muestras.

#### H. CALIBRACION

##### 1. Solución estándar de silicato

El silicofluoruro de sodio seco,  $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ , contiene de uno a dos por ciento del contenido teórico de sílice y forma un estándar muy conveniente.

Pesar 0.960g de polvo muy fino (deliberadamente, un pequeño exceso sobre lo teórico), deshacer los terrones y disolver la sal, agitándola en 50 a 100ml de agua, en un vaso de precipitados de plástico usando una espátula de níquel. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 1,000ml, enjuagar bien el vaso de precipitados y llevar el volumen hasta la marca. Mezclar y transferir la solución a una botella de polietileno para almacenamiento. La solución reacciona rápidamente con el sílice del

vidrio, por lo que sólo debe permanecer en el matraz volumétrico escasos minutos. La solución es estable indefinidamente, y ello es una gran ventaja sobre la mayoría de los estándares, que consisten de silicato de sodio.

$$1\text{ml} \equiv 5 \mu\text{g-at Si}$$

Diluir 10ml de esta solución en 500ml de agua de mar sintética (ver inciso 2, más adelante). Usar esta solución inmediatamente para propósitos de calibración, puesto que su contenido de silicato reaccionante comienza a decrecer por polimerización, en unas pocas horas.

$$1\text{ml} \equiv 0.1 \mu\text{g-at Si}$$

$$1\text{ml} \equiv 4 \mu\text{g-at Si/litro en 25ml de muestra de agua de mar.}$$

## 2. Agua de mar sintética

Disolver 25g de cloruro de sodio, calidad reactivo analítico y 8g de sulfato de magnesio heptahidratado,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , en cada litro de agua destilada. El agua es equivalente, para propósitos analíticos, al agua de mar con salinidad de 28<sup>o</sup>/oo. Esta solución se hace mejor en cantidades de 5 a 20 litros a la vez, y debe almacenarse en un recipiente de polietileno. El contenido de silicio en esta solución no debe exceder de 1 ó 2  $\mu\text{g-at/litro}$ .

## 3. Procedimiento

Efectuar la determinación de silicio como se describe en la Sección F (párrafos 1 a 3), usando 25.0ml de la solución estándar diluida de silicio en lugar de una muestra de agua de mar. Determinar la extinción de cuatro estándares y de dos Blancos hechos con agua de mar sintética. No es necesario efectuar un Blanco para las soluciones.

Medir la extinción en una celda de 1cm, después de dejarlo reposar durante tres horas para que se desarrolle completamente la coloración (véase Nota F).

$$\text{Calcular el factor } F_{(1\text{cm})} = \frac{100}{E_s - E_b}$$

donde  $E_s$  es la extinción promedio de los cuatro estándares y  $E_b$  es la extinción promedio de los dos Blancos. El valor para  $F_{(1\text{cm})}$  no debe cambiar y requiere comprobación a discreción del analista. El valor debe ser muy cercano a 100. Si se usa una celda de 10cm, para cálculos más precisos de pequeñas cantidades de silicato (menos de 12  $\mu\text{g-at Si/litro}$ ), debe

asumirse que el factor  $F(10\text{cm})$  es igual a  $0.1 \times F(1\text{cm})$ .

Nota: El factor  $F$  es una función de la salinidad de las muestras de agua de mar. La variación entre valores de salinidad de 25 y 35‰ es menor a 3% y puede desecharse. El factor  $F_S$ , a una salinidad  $S$  ‰ se relaciona con el factor  $F$  obtenido como se describe arriba, por la fórmula aproximada:

$$F_S = \frac{F \times (1 + 0.003 S)}{1.08}$$

debe usarse esta corrección para un trabajo más preciso cuando la salinidad varíe más de 10 ‰ en un valor de 28 ‰. El factor para agua pura (cero salinidad) es, por lo tanto, alrededor de 8% menor que el valor obtenido por el presente método usando agua de mar sintética.

## DETERMINACION DE FOSFORO

### Introducción

Todos los métodos para fosfato en agua de mar se basan en la formación de un complejo fosfomolibdato y su reducción subsecuente a compuestos azules fuertemente coloreados. Se han visto favorecidos los métodos que usan cloruro estannoso como reductor a temperatura ambiente, puesto que son más sensibles y originan menor interferencia, a partir de compuestos orgánicos fácilmente hidrolizables, que los de otras técnicas. Existen complejidades en estos métodos debido a la interferencia del arsénico y a Blancos encubiertos que se originan de la reducción de molibdato en agua de mar en ausencia de fosfato. Jones y Spencer (J. Marine Biol. Assoc. U.K., 43:251, 1963) han descrito un programa excelente de pruebas comparativas.

El procedimiento que se describe aquí se tomó de la publicación reciente de Murphy y Riley (Anal. Chim. Acta, 27:31, 1962) y es superior a otros métodos en términos de rapidez y facilidad de análisis, de tal manera que probablemente represente lo más avanzado en técnicas de alta mar.

M E T O D OA. CAPACIDADES

Rango: 0.03 - 5 µg-at/litro

## 1. PRECISION EN EL NIVEL DE 3 µG-AT/LITRO

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm 0.03/n^{1/2}$  µg-at/litro.

## 2. PRECISION EN EL NIVEL DE 0.3 µG-AT/LITRO

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm 0.02/n^{1/2}$  µg-at/litro.

## 3. LIMITE DE DETECCION

La más pequeña cantidad de fosfato que puede detectarse con certeza es cerca de 0.03 µg-at P/litro.

En el rango de extinción 0.5 a 1.0 y en el de 0.1 a 0.5, rechazar los valores de las determinaciones dobles si éstas difieren por más de 0.02 en el primer rango y de 0.01 en el segundo.

Si los valores dobles de la extinción difieren por menos de los límites anteriores, tómesese un valor promedio.

B. BOSQUEJO DEL METODO

Se deja que el agua de mar reaccione con una solución compuesta que contiene ácido molíbdico, ácido ascórbico y antimonio trivalente. El heteropoliácido complejo resultante se reduce in situ para dar una solución azul, la extinción de la cual se mide a 8850 Å.

C. APARATO Y EQUIPO ESPECIALES

Botellas de polietileno con tapón de rosca de 130ml de capacidad, marcadas con cinta scotch negra a 100ml (+ 2ml).

D. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las botellas de polietileno de 130ml deben llenarse completamente con la muestra después de enjuagarlas dos veces con el agua que va a analizarse. El análisis debe empezarse preferentemente dentro de la primera media hora y nunca después de dos horas. Hay que mantener las

muestras en un lugar fresco y obscuro y no tomar la temperatura ambiente a menos de que vaya a comenzarse el análisis. Si éste se pospone más de una hora, refrigérense las muestras a 0°C o menos. Una congelación rápida en un baño de glicol al 40% a -20°C (congélase a esta temperatura dentro de los 30 minutos siguientes después de colectarse) estabiliza las muestras durante muchos meses; esta técnica debe usarse en trabajos de precisión, para muestras procedentes de zonas eufóticas en aguas tropicales o subtropicales. Existe una evidencia contradictoria respecto de la pérdida de fosfato en botellas de polietileno, cuando las muestras se almacenan a temperatura ambiente; pero una demostración indica que esto puede evitarse (Hassenteufel, Jagitsch, y Koczy, *Limnol. Oceanog.*, 8:152, 1963).

#### E. REACTIVOS ESPECIALES

##### 1. Solución de molibdato de amonio

Disolver 15g de paramolibdato de amonio calidad reactivo analítico  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (de preferencia finamente cristalino), en 500ml de agua destilada. Almacenar en una botella de plástico, lejos de la luz directa del sol. La solución es estable indefinidamente.

##### 2. Solución de ácido sulfúrico

Añadir 140ml de ácido sulfúrico concentrado (gr. esp. 1.82) calidad reactivo analítico, a 900ml de agua destilada. Déjese enfriar la solución y almacénese en una botella de vidrio.

##### 3. Solución de ácido ascórbico

Disolver 27g de ácido ascórbico de buena calidad en 500ml de agua destilada. Almacenar la solución en una botella de plástico, dentro de un congelador, de manera que se solidifique. Descongelar para usarla e inmediatamente después volver a congelar. La solución es estable entonces durante muchos meses, pero no debe mantenerse por más de una semana a temperatura del laboratorio.

##### 4. Solución de tartrato de potasio-antimonilo

Disolver 0.34g de tartrato de potasio-antimonilo de buena calidad (tártaro emético) en 250ml de agua, calentando si es necesario. Almacenar en una botella de vidrio o plástico. La solución es estable durante muchos meses.

### 5. Mezcla reductora

Mezclar juntamente 100ml de molibdato de amonio, 250ml de ácido sulfúrico, 100ml de ácido ascórbico y 50ml de tartrato de potasio-antimonio. Preparar esta solución para uso inmediato y desechar cualquier exceso. No se almacene por más de seis horas. La cantidad anterior es apropiada para 50 muestras.

### F. ANÁLISIS EXPERIMENTAL

#### Procedimiento

1. Calentar las muestras a temperatura entre 15 y 30°C en un baño termostático de agua (Nota a) y medir la extinción de las muestras para obtener una corrección por turbidez (Nota b; véase también Sec. G).

2. A 100ml de muestra añadir  $10 \pm 0.5$ ml de la mezcla reductora y agitar inmediatamente.

3. Después de cinco minutos, y preferentemente dentro de las primeras dos a tres horas (Nota c), medir la extinción de la solución en una celda de 10cm contra agua destilada con longitud de onda de 8850 Å. Si se usa un absorciómetro tipo filtro, escoger un filtro que transmita luz con una longitud de onda que sea lo más grande posible; sin embargo, puede ocurrir alguna pérdida de sensibilidad. A menos que se sepa que las muestras adyacentes tienen valores de extinción dentro del 25% una de otra, la celda debe enjuagarse con cada nueva solución antes de llenarse.

4. Corregir la extinción medida restando tanto la turbidez como los blancos de los reactivos (véase Sec. G). Calcular la concentración de fosfato en microgramos-átomo de fósforo-fosfato por litro ( $\mu\text{g-at P/litro}$ ) de la expresión:

$$\mu\text{g-at P/litro} = \text{extinción corregida} \times F$$

donde F es un factor obtenido como se describe en la Sección H abajo. Los resultados se dan con tres cifras decimales. El silicio no causa interferencia, y la interferencia del arsénico es normalmente insignificante.

#### N O T A S

(a) El método parece no tener un coeficiente de temperatura significativo (menos de 0.2% por °C) entre 15 y 30°C, pero probablemente sea más

aconsejable mantener las muestras a una temperatura dentro de este rango.

(b) Muy raramente se requiere esta medición para cada muestra (véase Sec. G). Si la turbidez da una extinción que exceda de 0.05 la materia suspendida, esto puede afectar adversamente el método y entonces las soluciones deben filtrarse.

(c) La extinción alcanza su máximo en cinco minutos y permanece constante durante muchas horas. El blanco de las soluciones se vuelve amarillo, pero los valores de extinción corregidos cambian solamente un 10% (decrecen) aún después de varios días. Para trabajos de alta precisión, es preferible medir la absorción de la luz dentro de las primeras dos a tres horas, puesto que pueden ocurrir pequeños cambios en el primer medio día.

#### G. DETERMINACION DEL BLANCO

##### 1. Blancos de celda a celda

Cuando ambas celdas, tanto la de la muestra como la del agua destilada, se llenan con agua destilada, la extinción de una contra la otra debe ser 0.000. Debido a pequeños defectos ópticos, puede encontrarse un pequeño valor positivo o negativo. Esto es posible cuando se restan los blancos de la turbidez (véase el párrafo 3, abajo); sin embargo, debe encontrarse dicho valor al determinar el blanco de los reactivos. El agua en la celda del agua destilada debe cambiarse diariamente o cada dos días, pues pueden resultar marcadas turbideces aún en agua destilada, si es que permanece en la celda durante mucho tiempo.

##### 2. Blanco de los reactivos para el método estándar

Efectúese el método exactamente como se describe en la Sec. F, párrafos 2 a 4 inclusive, usando agua destilada en lugar de los 100ml de agua de mar. Corregir la extinción resultante con el blanco de celda a celda. El blanco de los reactivos no debe excederse de 0.02. Si excede de este valor, usar agua bidestilada. Si persiste tal valor, debe sospecharse del molibdato de amonio. El blanco de los reactivos, aunque pequeño, no es insignificante para trabajos de alta precisión o bien cuando se van a determinar cantidades menores de 1.5  $\mu\text{g-at P/litro}$ . Debe medirse para cada nueva solución de molibdato y checarsé a intervalos semanales durante un crucero.

##### 3. Blanco para la turbidez del agua de mar

Esta puede ser una fracción muy apreciable de la extinción total en

aguas superficiales, y debe determinarse en las muestras de la superficie y de los 10m, en cada lance. Medir gradualmente a mayores profundidades hasta que el valor sea aproximadamente constante. Este valor (generalmente menor a 0.01 debajo de los 25m en aguas oceánicas) es entonces casi igual al blanco de celda a celda (Sec. G, 1 arriba) y a menudo puede ser un poco negativo.

Los blancos para la turbidez deben medirse en las soluciones de las muestras, después de que éstas han sido calentadas a temperatura ambiente, justamente antes de añadir la solución de molibdato. Si se llenan las botellas de polietileno de 130ml hasta el borde con la muestra, entonces hay suficiente cantidad presente para el blanco de la turbidez, dejando casi 100ml para el análisis. Sin embargo, pueden regresarse unos pocos mililitros de la celda si es necesario.

Si el blanco para la turbidez excede de 0.1, entonces las mediciones de la extinción son inexactas.

## H. CALIBRACION

### 1. Solución estándar de fosfato

Disolver 0.816g de fosfato de potasio monobásico anhidro,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , en 1,000ml de agua destilada. Almacenar la solución en una botella oscura con 1ml de cloroformo. La solución es estable durante muchos meses.

$$1\text{ml} \equiv 6.0 \mu\text{g-at P}$$

Diluir 10.0ml de esta solución a 1,000ml con agua destilada (véase abajo). Almacenar en una botella oscura con 1ml de cloroformo. La solución debe ser estable durante muchas semanas, pero para mayor seguridad debe prepararse nuevamente cada 10 días.

$$1\text{ml} \equiv 6.0 \times 10^{-2} \mu\text{g-at P}$$

$$1\text{ml} \equiv 0.60 \mu\text{g-at P/litro en 100ml de muestra de agua de mar.}$$

### 2. Procedimiento

Preparar cuatro estándares, consistiendo cada uno en 5.0ml de la solución diluida de fosfato (equivalente a  $3.0 \mu\text{g-at P/litro}$ ) aforado a un volumen de exactamente 100ml con agua destilada, en una probeta graduada de 100ml (útese con cuidado). Transferir las soluciones a botellas secas de polietileno y llenar dos botellas más con agua destilada para que actúen como se describe en la Sección F, párrafos 2 a 4.

Calcular el factor F de la expresión:

$$F = \frac{3.00}{E_S - E_b}$$

donde  $E_S$  es la extinción promedio de los cuatro estándares y  $E_b$  es la extinción promedio de los dos blancos (no corregidos por blancos de celda a celda). El valor de F es completamente independiente de la salinidad (con más de 35‰ presente) y, por lo tanto, es posible determinarlo usando agua destilada; el método puede usarse también sin cambiarlo, con muestras de agua dulce. El valor de F es también constante, puesto que se usan soluciones nuevas cada vez y el mismo espectrofotómetro, etc., y sólo necesita chequearse a intervalos no frecuentes. El valor, cuando se usa una radiación de 8850 Å, debe ser cerca de 5.

## DETERMINACION DE AMONIACO

### Introducción

El siguiente método es específicamente para amoníaco, y aunque no es tan sensible como el procedimiento que describen Strickland y Parsons (A practical Handbook of Sea Water Analysis, páginas 81 a 85), deberá usarse cuando se desee hacer un cálculo de sólo la concentración de amoníaco. La técnica es una modificación sensible del método fenol-hipoclorito utilizado por muchos investigadores (i.g., Riley, Anal. Chim. Acta, 9:575, 1953; Emmet, Naval Ship Res. and Devel. Cent. Rept. 2570, 1968) por L. So lórzano, (Limnol. Oceanogr. 14:799. 1969).

### M E T O D O

#### A. CAPACIDADES

Rango: 0.1 - 10 µg-at/litro

1. PRECISION EN EL NIVEL DE 3 µg-AT/LITRO.

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm$  0.15/n µg-at/litro

2. PRECISION EN EL NIVEL DE 1.0 µG-AT/litro.

El valor correcto se encuentra en el rango:

Promedio de n determinaciones  $\pm$  0.10/n µg-At/litro.

### 3. LIMITE DE DETECCION

La más pequeña cantidad de nitrógeno-amoniaco que puede detectarse con certeza para una sola determinación es cerca de 0.1  $\mu\text{g-at/litro}$ .

Elimine las determinaciones dobles si los valores de extinción difieren por:

Más de 0.015 en el rango de extinción de 0.1 a 0.2,  
Más de 0.025 en el rango de extinción de 0.2 a 0.5.

Si los valores dobles de la extinción difieren por menos de los límites anteriores, tómese un valor medio.

### B. BOSQUEJO DEL METODO

El agua de mar se trata en un medio alcalino de citrato con hipoclorito de sodio y fenol, en presencia de nitroprusiato de sodio que actúa como catalizador. El Indofenol azul formado con el amoniaco se mide usando una celda de 10cm.

### C. APARATO Y EQUIPO ESPECIALES

Matraces Erlenmeyer de 125ml. Estos deben enjuagarse con abundante agua destilada y dejarse escurrir inmediatamente antes de usarlos.

### D. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Parece ser satisfactorio un almacenamiento temporal del agua de mar antes del análisis, ya sea en vidrio o polietileno; sin embargo, es recomendable no demorar el análisis por más de una hora o dos a lo sumo.

Si es necesario un período de almacenamiento mayor, congélense completamente las muestras. Hay indicaciones de que aún con refrigeración, después de algunos días pueden ser significativas las alteraciones en las muestras. Aunque se requiere de más evidencia, sería recomendable no almacenar las muestras.

### E. REACTIVOS ESPECIALES

#### 1. Agua desionizada

Esta debe usarse para preparar soluciones, en la determinación de

blancos y para las estandarizaciones. No puede confiarse en el agua destilada común para estos propósitos; precisamente antes de usarla puede separarse el amoníaco del agua destilada, pasándola a través de una pequeña columna (i.g. 30cm de largo por 1 a 2cm de diámetro interno) con resina de cambio de cationes en la forma de Hidrógeno; guarde después el agua en un matraz de vidrio bien cerrado. Omitir esta precaución originaría resultados erróneos en cualquier laboratorio.

## 2. Solución de fenol

Disolver 20g de fenol cristalino (grado reactivo analítico) en 200ml de alcohol etílico de 95% V/V.

## 3. Solución de nitroprusiato de sodio

Disolver 1.0g de nitroprusiato de sodio  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 200ml de agua desionizada. Almacénese en una botella ámbar. La solución es estable por lo menos durante un mes.

## 4. Solución alcalina

Disolver 100g de citrato de sodio y 5g de hidróxido de sodio (grado reactivo analítico) en 500ml de agua desionizada. Esta solución es estable indefinidamente.

## 5. Solución de hipoclorito de sodio

Usese una solución de hipoclorito comercial (i.g. cloro), aproximadamente de 1.5 N; la solución se descompone con lentitud y su concentración debe chequearse periódicamente.

Disolver 12.5g de tiosulfato de sodio de buena calidad,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , en 500ml de agua, agregando unos pocos cristales (2g) de yoduro de potasio, KI, a 50ml de agua dentro de un pequeño matraz y pipetearle 1.0ml de solución de hipoclorito.

Añadir de 5 a 10 gotas de ácido hipoclorórico concentrado y titular el iodo liberado con la solución de tiosulfato hasta la desaparición por completo del color amarillo. Deséchese el hipoclorito cuando se empleen menos de 12ml de tiosulfato.

## 6. Solución oxidante

Mezclar 100ml de la solución 4 y 25ml de la solución 5; manténgase esta solución tapada mientras no se use. Prepárese una cada día.

## F. ANALISIS EXPERIMENTAL

Debe consultarse la Sección G. 2 antes de comenzar esta determinación.

### Procedimiento

1. Usando una probeta graduada de 50ml, pasar dicho volumen de muestra a un matraz Erlenmeyer. Con una pipeta, agregar 2ml de solución de fenol, agitar con la mano la solución y, después, añadir consecutivamente 2ml de solución de nitroprusiato de sodio (Nota a) y 5ml de la solución oxidante (Nota b), mezclando después de cada adición. Déjese permanecer el matraz a una temperatura entre 20 y 27°C durante una hora (Nota d). La boca del matraz debe cubrirse con papel aluminio durante esta etapa para reducir la contaminación con amoníaco atmosférico.

2. Leer la extinción a 6400 Å en un espectrofotómetro contra agua destilada, usando celdas de 10cm.

3. Corregir la extinción medida con la de un blanco (Sec. G) y calcular la concentración de nitrógeno-amoníaco de la expresión:

$$\mu\text{g-at N/litro} = F \times E$$

donde E es la extinción corregida y F es un factor que se obtiene como se describe abajo en la Sección H. Los resultados se dan con dos cifras decimales. No hay interferencia en este método con aminoácidos y urea (Nota e).

### NOTAS

(a) El nitroprusiato de sodio en las concentraciones de 0.5% es suficiente para catalizar la reacción y producir un blanco estable y bajo. Una concentración mayor produce un blanco inestable y alto, el cual se incrementa con el tiempo.

(b) La cantidad y concentración del hipoclorito de sodio tiene efectos marcados en la reacción, en el agua de mar. Con hipoclorito más diluido puede agregarse un volumen correspondientemente mayor, pero debe tenerse cuidado de que el pH (ver nota c abajo) no exceda mucho de 9.8.

(c) La adición de reactivos, como se indica antes, da mejores resultados en agua de mar y agua destilada. A mayores valores de pH, la reacción es más rápida, pero se suprime una ligera coloración azul (no debida

a la presencia de aminocompuestos, sino asociada a la presencia del nitroprusiato). Esto da como resultado un "blanco falso" y valores erróneos también altos para el contenido de amoníaco en el agua de mar. Con el pH usado en la presente técnica (9.8 en agua de mar y 10.4 en agua destilada), el color azul del nitroprusiato se forma uniformemente en las muestras y los blancos.

(d) La reacción requiere un total de 60 minutos para completarse. Entonces el color producido es estable por lo menos durante 24 horas.

(e) La urea y varios aminoácidos (Glicina, D-L Alanina L-Arginina, D-L Histidina, L-Tirosina, L-Lisina y el ácido L-Glutámico), en las concentraciones de 3 µg-at N/litro en agua de mar filtrada, responden insignificadamente a este tratamiento.

#### G. DETERMINACION DEL BLANCO

##### 1. Blanco

Efectúese el método exactamente como se describe en la Sección F.1 y 2, utilizando agua recién desionizada. Las extinciones de los blancos, usando una celda de 10cm, no debe exceder 0.075.

##### 2. Precauciones para reducir la contaminación

Es necesario observar el mayor cuidado para prevenir la contaminación de las soluciones y las muestras con amoníaco (ya sea como gas o partículas de sales de amonio) en el laboratorio. Las soluciones deben mantenerse en botellas perfectamente bien cerradas, y almacenar las muestras en recipientes bien cerrados hasta que comience el análisis. Cuando esté efectuándose el análisis para la determinación de amoníaco, bajo ninguna circunstancia debe abrirse un frasco de hidróxido de amonio en el laboratorio; por breve que sea este período. Todo el equipo de vidrio debe lavarse inicialmente con ácido clorhídrico diluido, y enjuagarse muy bien con agua destilada previamente antes de usarse. El agua destilada común es satisfactoria para este enjuague.

#### H. CALIBRACION

Efectúese la calibración usando agua de mar filtrada.

##### 1. Solución estándar de amonio

Disolver 0.100g de sulfato de amonio (calidad reactivo analítico) en

1,000ml de agua destilada. Añadir 1ml de cloroformo y guardar lejos de la luz directa.

La solución es estable durante varios meses si queda bien cerrada.

$$1\text{ml} \equiv 1.5 \mu\text{g-at N}$$

Pipetear 1.00ml de esta solución dentro de un matraz de 500ml y aforar con agua de mar hasta la marca. La concentración de amonio resultante es equivalente a 3.0  $\mu\text{g-at N/litro}$ .

## 2. Procedimiento

Medir porciones de 50ml de la solución diluida de amonio dentro de cuatro matraces Erlenmeyer, limpios, de 125ml de capacidad, y tomar dos porciones más de 50ml de la misma agua de mar que se usó para hacer la solución estándar diluida, en otros dos matraces Erlenmeyer, limpios, de 125ml y preparar en ellos dos soluciones testigos sin agregar solución de amonio, como se describe en la Sección G. Efectuar las determinaciones en todos, exactamente como se describe en la Sección F.1 a 2. Leer la extinción después de 60 minutos. Evaluar el factor F de la expresión:

$$F = \frac{3.0}{E_s - E_b}$$

donde  $E_s$  es la extinción promedio de los estándares y  $E_b$  la extinción promedio de los blancos. El valor para F es cerca de 6.5 y se ha encontrado que es muy constante.