

SOP 7

Determinación de carbono orgánico disuelto y nitrógeno total disuelto en agua de mar

1. Objetivos y aplicación

Este protocolo describe la metodología para la determinación de carbono orgánico disuelto (DOC) y nitrógeno total disuelto (TDN) en agua de mar, expresado en micromoles de carbono (nitrógeno) por litro de agua de mar. El método es apropiado para la detección de niveles oceánicos de carbono orgánico disuelto ($< 400 \mu\text{mol L}^{-1}$) y nitrógeno total disuelto ($< 50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Los instrumentos descritos y el procedimiento son aquellos empleados en el laboratorio Hansell de la Universidad de Miami. Instrumentos producidos por otros fabricantes deberán ser evaluados previamente para su aplicación.

2. Definición

El contenido de carbono orgánico disuelto en el agua de mar se define como:

La concentración de Carbono que queda en una muestra de agua de mar después de que todo el carbono particulado ha sido eliminado por filtración y todo el carbono inorgánico ha sido eliminado por acidificación y aireación.

El contenido de nitrógeno total disuelto en el agua de mar se define como:

La concentración de nitrógeno que permanece en una muestra de agua de mar después de que todo el nitrógeno particulado ha sido eliminado mediante filtración.

3. Principio

Una muestra de agua filtrada y acidificada es aireada con oxígeno para eliminar el carbono inorgánico. El agua es entonces inyectada en una columna de combustión empacada con esferas de alumina recubiertas con platino las cuales se mantienen a 680°C . Compuestos orgánicos no-volátiles se calcinan y son convertidos en CO_2 , el cual es medido mediante un Detector de Infrarrojo No-Dispersivo (NDIR). Compuestos no-volátiles de nitrógeno disuelto son

calcinados y convertidos a NO el cual, cuando se mezcla con ozono, forma quimioluminiscencia y es detectado por un fotomultiplicador.

4. Aparato

- Shimadzu TOC-V_{CSH} with ASI-V auto sampler and TNM-1 Total Nitrogen detector (or equivalent).

5. Reactivos

5.1 Gas comprimido

Oxígeno de ultra-alta pureza (UHP 99.995%) es utilizado como gas transportador para el Shimadzu TOC-V_{CSH}. Un gas transportador de alta pureza es necesario para obtener niveles bajos de línea base en el detector. Oxígeno es usado para asegurar la combustión completa de todo el material orgánico.

5.2 Catalizador de la columna de combustión

El gas transportador pasa a través de una columna empacada con esferas de alumina de 2 mm recubiertas con platino (Shimadzu P/N 017-42801-01) mantenidas a 680 °C.

5.3 Gasa de platino

Gasa de alambre de platino puro (malla 52 tejida con alambres de 0.1 mm de diámetro) es moldeada en cubos (~0.5 cm de lado) y varios (3–5) son colocados en la parte superior de la columna de combustión. La gasa de platino mejora la reproducibilidad analítica y retiene las sales inyectadas.

5.4 Acidificación de la muestra

Su utiliza ácido clorhídrico grado metal traza para acidificar las muestras antes del análisis. Se adiciona aproximadamente el 0.1% de ácido concentrado respecto al volumen a cada muestra antes del análisis para disminuir el pH a < 2. Con este pH y aireación, todas las especies del carbono inorgánico son convertidas en CO₂ y eliminadas de la muestra. No se usa la acidificación automática del TOC-V_{CSH}, dado que con el tiempo el blanco aumenta. Cuando la muestra es acidificada manualmente con ácido recién preparado tomado de botellas selladas, no se han observado aumentos del blanco.

6. Muestreo

Una apropiada técnica de muestreo y manejo de las muestras son esenciales para la buena calidad de los datos. Cuidados deberán ser considerados para minimizar la contaminación de la muestra. Los muestreos en la roseta deberán ser utilizando tubos limpios de silicón. Se deberá usar guantes durante el muestreo. Se recomienda que cualquier persona que colecte muestras de la roseta antes de la

colecta de muestras de DOC (por ejemplo gases) también use guantes. Si eso no es posible, se recomendarán esfuerzos para evitar tocar la boquilla (la ruta de salida de agua de la botella Niskin a la botella de muestreo deberá permanecer lo más limpia posible). Evitar en todo momento el contacto de grasa (de origen de operaciones del barco o del sellador utilizado en algunos muestreos de gases) con la boquilla de la botella Niskin.

6.1 Preparación de la muestra

Previo a los muestreos, se limpiaran las botellas de polietileno de alta densidad (HDPE) de 60 mL. Primero se enjuagan con agua destilada, posteriormente se dejan remojando por 4 horas en HCl al 10%, y después se enjuagan varias veces con agua destilada, y finalmente se dejan secar boca abajo sobre una superficie limpia.

Toda la tubería y sistemas de filtración de policarbonato deberán ser lavados con ácido y enjuagados repetidamente con agua destilada antes de usarse. Toda la tubería deberá ser de silicón y bajo ninguna circunstancia se debe usar tubería de Tygon® dado que es una fuente de contaminación.

Los filtros GF/F deberán ser calcinados a 450 °C por lo menos por 4 horas previo a su uso y guardados en contenedores de vidrio sellados.

6.2 Colecta de muestras

El que una muestra sea o no filtrada antes de su análisis depende del objetivo del muestreo. Si DOC(N) es la variable de interés, entonces todas las muestras deberán ser filtradas. Sin embargo, se pueden introducir contaminantes a la muestra durante la manipulación en el proceso de filtrado y en ciertos casos la filtración es omitida. Por ejemplo, en aguas oligotróficas las concentraciones de carbono orgánico particulado representan una fracción muy pequeña del carbono total y por tanto la filtración podría no ser necesaria. Dado que las partículas son generalmente pequeñas y están distribuidas de manera homogénea en las muestras, el análisis de agua sin filtrar representa una buena medida del carbono orgánico total (TOC). De igual forma, muestras colectadas a profundidades >250 m pueden permanecer sin filtrar, dado que son aguas que tienen un bajo contenido de carbono orgánico particulado ($< 1 \mu\text{mol L}^{-1}$).

En zonas muy productivas, una fracción substancial del carbono total puede estar presente en forma particulada, y muchas de esas partículas pueden ser grandes y no ser medidas homogénea y representativamente en el analizador de DOC. En estos casos, las muestras recolectadas entre la superficie y los 250m serán filtradas a través de filtros GF/F precalcinados. Para ser consistentes, cuando se realicen muestreos en aguas oligotróficas y eutróficas en un mismo estudio, se recomienda se realice el filtrado en las aguas superficiales de ambos ambientes.

Los filtros GF/F son colocados dentro de portafiltros de policarbonato, conectados en línea a la salida de la botella Niskin a través de un tubo de silicón, recolectando el filtrado en botellas de HDPE de 60 mL previamente lavadas. Las botellas de HDPE deberán ser marcadas con información específica sobre la muestra, tales como la designación del crucero, número de lance y número de

botella Niskin. El sistema de filtración deberá ser enjuagado muy bien con agua de la muestra previo a la colecta en la botella. La botella deberá ser enjuagada tres veces previamente a la toma final de la muestra. Las botellas deberán ser llenadas entre un 75 y un 90%, o de 45 a 55 mL en las botellas de 60 mL. Esto da el espacio necesario para la expansión del agua al congelarse la muestra. Las muestras son cerradas perfectamente y congeladas en posición vertical.

7. Proceso

Las muestras de agua serán colectadas directamente de la roseta. El agua colectada en botellas Niskin entre la superficie hasta 250 m será filtrada usando sistema en línea con filtros GF/F precalcinados (450°C). Muestras colectadas a profundidades > 250 m serán colectadas sin filtración. Después de la colecta en botellas de HDPE de 60 mL prelavadas en ácido, las muestras deberán permanecer congeladas en posición vertical hasta su análisis. Previo al análisis, las muestras deberán estar a temperatura ambiente y serán acidificadas a pH < 2 con ácido clorhídrico concentrado. El análisis se realizará usando un Analizador para Carbono Orgánico Total Shimadzu TOC-V_{CSH} con un detector de nitrógeno total TNM-1.

Las condiciones del instrumento serán las siguientes:

Temperatura de combustión	680 °C
Gas transportador	Oxígeno UAP
Velocidad de flujo del gas	150 ml min ⁻¹
Gas generador de ozono	Aire Cero desde el Generador de gas TOC Whatman
Velocidad de flujo del ozono	500 mL min ⁻¹
Tiempo de aireación de la muestra	2.0 min
Numero mínimo de inyecciones	3
Numero máximo de inyecciones	5
Numero de lavados	2
Desviación estándar máxima	0.10 ppm
CV máximo	2.0%
Volumen de inyección	100 µl

Cada detector funciona de manera independiente con respecto a las condiciones descritas arriba. Si el DOC alcanza las especificaciones requeridas, pero el TDN no, el instrumento seguirá haciendo inyecciones hasta alcanzar el criterio o el número máximo de inyecciones especificados. Lo mismo aplica para la situación donde el TDN ha cumplido con las especificaciones, pero el DOC no.

El sistema del DOC se calibra usando ftalato ácido de potasio y el sistema TDN utilizando nitrato de potasio, ambos en agua Milli-Q®. El desempeño del sistema se verifica de forma diaria usando el material de referencia (www.rsmas.miami.edu/groups/biogeochem/CRM.html). Este material de referencia es agua profunda del mar de los Sargazos (DSR) que ha sido acidificada y embasada en ampollitas de 10 ml, a la cual se le determinaron las concentraciones de DOC y TDN por consenso de hasta seis laboratorios expertos de forma independiente. Agua baja en carbono (LCW) que ha pasado a través del mismo proceso de acidificación, envasado y verificación de consenso como la

DSR, y que tiene una concentración de carbonado establecida de $1-2 \mu\text{mol-C L}^{-1}$ es utilizada también para verificar los blancos del instrumento. Después de verificar el funcionamiento del instrumento TOC/TN, se colocan las muestras en un automuestreador para su análisis. El análisis comienza con un blanco QW (Q-agua) y una muestra del material de referencia de agua de mar. Después de esto, seis muestras son analizadas, seguidas por otro blanco QW y un material de referencia. Esta secuencia es repetida hasta que todas las muestras son analizadas. El análisis termina con un blanco QW, un material de referencia y un blanco QW que no ha sido acidificado. Este último blanco permite verificar que el ácido clorhídrico utilizado para acidificar las muestras no está contaminado. Los blancos QW y el material de referencia son usados para evaluar el desempeño del sistema durante la corrida de las muestras. Si se detecta un problema con los blancos o con el material de referencia, las muestras serán analizadas nuevamente.

8. Cálculos y determinación de resultados

El Shimadzu TOC- V_{CSH} es calibrado para carbono usando un análisis de 4 a 5 puntos de ftalato ácido de potasio en agua Milli-Q[®]. El instrumento determina la concentración en partes por millón (ppm), y la concentración de la muestra en μM (micromolar o micromoles por litro), corregida con el blanco del instrumento, es calculada como:

$$[(\text{Muestra (ppm)} - \text{LCW (ppm)}) \times 83.33] + \text{Valor LCW } (\mu\text{M})$$

donde Muestra y LCW corresponden a las concentraciones determinadas por el TOC- V_{CSH} ; 83.33 es el factor de conversión de ppm a μM y LCW es la concentración de carbono en la referencia (CRM) de Agua Baja en Carbono. Restando el LCW (ppm) de la muestra se eliminan tanto el blanco instrumental y así como el contenido de carbono del LCW. El contenido de carbono del LCW se vuelve a añadir de nuevo (término al final de la ecuación) para calcular la concentración correcta de la muestra.

Para nitrógeno total disuelto, el instrumento es calibrado usando un método similar al del carbono. El estándar es nitrato de potasio en agua Milli-Q[®]. Nuevamente, el instrumento es calibrado en ppm y la ecuación siguiente será utilizada:

$$\text{Muestra (ppm)} \times 71.43$$

donde Muestra es la concentración determinada por el TOC- V_{CSH} y 71.43 es el factor de conversión de ppm a μM . No se ha detectado un blanco instrumental para el sistema de nitrógeno. El nitrógeno orgánico disuelto (DON) es calculado restando el nitrógeno inorgánico (NO_3^- , NO_2^- , *etc.*) al nitrógeno total disuelto determinado por el TOC- V_{CSH} .

9. Control de Calidad

Diariamente, será analizado un CRM para verificar el desempeño del sistema. Si el valor medido del CRM no cae dentro del rango esperado, no se realizarán mediciones de muestras hasta que el desempeño del sistema sea el requerido.

Los blancos QW y agua de mar de referencia analizados junto con las muestras son usados para control y aseguramiento de la calidad (QC/QA). Con la evaluación del desempeño de estas aguas de referencia se puede evaluar la deriva y el desempeño del instrumento. Si un problema es detectado con la deriva o desempeño, las muestras serán re-analizadas.